

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse de Doctorat  
Sciences de la Vie et de la Santé  
(Arrêté du 30 mars 1992)



*Hikmat AKOUM*

**ETUDE DES MECANISMES CELLULAIRES ET  
MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS  
L'EFFICACITE DE L'IMMUNOTHERAPIE  
SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES**

présentée le 12 Décembre 1997 devant la commission d'examen:

Président:	Professeur X. Desbiens
Directeur de Thèse:	Professeur A-B. Tonnel
Rapporteurs:	Professeur D. Vervloet Docteur J-M. Cavaillon
Examineurs:	Professeur D. Emilie Docteur M. Bizri Docteur A. Tsicopoulos

*Je dédie cette thèse à*

*Mes parents pour l'amour que je leur porte.*

*Ali, Magid, Sahar et Christine*

*Pour votre soutien et votre aide très généreuse*

*Sans vous, je ne serai pas arrivée là*

*Je vous remercie de tout cœur pour votre confiance*

*Cette thèse n'aurait certainement pas vu le jour sans vous.*

*Saad, Bader, Hayat, Walid, Imad et Mounifé*

*Pour le bonheur que j'ai de vous avoir.*

*Sally, Dany, Rémi, Moddy, Céline, Clara, Foufou, Adel*

*Avec mes souhaits d'avoir un avenir brillant et une vie magnifique.*

***Je voudrais exprimer ma plus vive reconnaissance à:***

***Monsieur le Professeur TONNEL,***

*Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire et m'avez permis d'y effectuer ma thèse. L'intérêt que vous avez porté à ce travail et votre confiance m'honorent. Je tiens à vous remercier particulièrement pour votre attention et votre altruisme. Croyez en mon grand dévouement et ma respectueuse admiration.*

***Monsieur le Professeur X. DESBIENS,***

*Vous me faites un grand honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez accepter mes sincères remerciements et croire en mon plus profond respect.*

***Monsieur le Professeur D. VERVLOET,***

*Vous avez accepté avec bienveillance de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Je tiens à vous assurer de mon respect et de ma gratitude.*

***Monsieur le Professeur J. M. CAVAILLON,***

*Vous avez accepté tout de suite et avec beaucoup de sympathie d'être rapporteur de ce travail. Je vous remercie vivement de l'intérêt porté à ma thèse ainsi que de votre présence dans ce jury.*

***Monsieur le Professeur D. EMILIE,***

*Je vous remercie vivement d'avoir accepté d'apporter un regard critique sur ce travail. Votre présence dans ce jury est pour moi un grand honneur.*

***Monsieur le Docteur M. BIZRI,***

*C'est avec un grand plaisir que je vous compte parmi les membres du jury de cette thèse. Vous représentez notre pays qui sort de la guerre et qui veut prendre de l'avance. Soyez assuré de ma gratitude et mon respect pour votre enthousiasme et votre participation à l'Avenir du Liban, en espérant que notre projet sera poursuivi avec succès.*

***Mademoiselle le Docteur Anne TSICOPOULOS,***

*Je te remercie Anne d'avoir accompagné ce travail pendant ces années. Tu m'a guidée pas à pas dans les voies de la recherche. Nos discussions enrichissantes m'ont beaucoup aidée, et j'ai eu beaucoup de chance de travailler avec toi, de bénéficier de tes compétences, ta disponibilité et surtout de ta confiance. Un grand MERCI pour la délicate attention que tu as montré envers moi et ma famille, et tu sais combien cela compte pour moi...*

**Mes plus sincères remerciements à l'ensemble des membres de l'Unité 416:**

**Joël Pestel,**

*pour m'avoir aidée et conseillée. Pour les paroles réconfortantes aux moments difficiles, un grand MERCI. Je n'oublierai pas les rires et taquineries particulièrement utiles en cette période de rédaction de thèse.*

**Monsieur le Professeur Benoît Wallaert,**

*je tiens à vous remercier pour vos précieux conseils, vos encouragements et surtout votre optimisme. Croyez en mon respect et mon admiration.*

**Philippe Gosset,**

*merci pour tes précieux conseils et ta disponibilité. Merci aussi pour cette longue discussion après notre plus grand accrochage, et les autres...*

**Monsieur Michel Joseph,**

*merci pour votre gentillesse et votre aide jusqu'aux derniers instants. Votre intérêt pour la culture libanaise me touche beaucoup.*

**Philippe Lassalle,**

*merci pour tes conseils et ton enthousiasme scientifique qui est un stimulant particulièrement pour les jeunes chercheurs.*

**Catherine Duez et Sophie Galand,**

*les meilleures amies que je puisse avoir, je vous dis tout simplement Merci. Je suis tellement touchée par votre amitié et comme dit G. K. Gibran: "Que le meilleur de vous même soit pour votre Ami, s'il doit connaître le reflux de votre marée, qu'il en connaisse aussi le flux".*

**Olivier,**

*pour ta bonne humeur et ta gentillesse, je te souhaite bonne continuation dans le domaine de la recherche.*

**Han Vorng,**

*pour ta disponibilité, ton aide technique de grande qualité et très précieuse, et surtout pour ton côté paternel très touchant, un grand MERCI.*

**Catherine Fourneau (Mamie), Gwenola Kervoaze ("Madame" !!), et Geneviève Marchandise,** *pour votre gentillesse, votre gaieté et votre soutien sans réserve, un grand Merci.*

*Pour finir, une mention spéciale à **Philippe Marquillies** (V... P..... !!!), pour ta bonne humeur, ton aide précieuse, ta gentillesse, tes oreilles attentives et ta résistance aux chocs, un grand MERCI. Et merci surtout de m'avoir supportée...*

*Merci à vous tous, grâce à vous, je me suis sentie en famille et en confiance. Je garderai un magnifique souvenir de mes années de thèse passées dans la bonne humeur, les fous rires et je vous le dis, tout cela me manque déjà.*

*A ceux qui sont passés dans le labo et qui sont toujours présents dans mon esprit, **Agnès Boitelle, Catherine Lamblin-Degros, Sophie Molet, Odile Parmentier, Arnaud (de) Scherpereel, Sabine Szeremeta et Dominique Vanhée.***

*Un grand merci aussi aux **infirmières de l'hôpital de jour** (Nadia, Sylvie, ...) et en particulier au **Docteur Isabelle Tillie-Leblond.***

*Je tiens à remercier plus particulièrement **Jamal Khalifé,** en qui j'ai une sincère confiance et qui a toujours su m'écouter et me donner des conseils, surtout les jours difficiles.*

*Merci à **Chantal Kikonzolo** pour les recherches bibliographiques, ta gentillesse et ta rapidité. Merci à **Jean-Marc Merchez** pour ton grand talent de photographe, ta gentillesse et tes stylos!!*

*Je remercie également **p'tit Manu, Jean-Pierre, christine, Fabrice, Yvette et Joëlle,** pour leur gentillesse, leur amabilité et surtout pour leur bonne humeur.*

*Une pensée spéciale à  
Monsieur et Madame Duez, Eric, Sylvie et Christophe,  
Pour votre affection à mon égard qui me touche infiniment  
et également pour vos encouragements, un grand MERCI.*

*A Monsieur et Madame Cholle,  
Ahmad et Anne-Marie,  
Pour leur gentillesse.*

*Merci à Malak et Christelle  
Pour leur amitié sincère et leur soutien sans réserve.*

*A tous mes amis  
en témoignage de mon affection.*

*...Mettez en toutes choses que vous façonnez  
un souffle de votre esprit...*

*Gibran Khalil Gibran*

**YELLOW JACKET**

*Vespula spp.*



**HONEY BEE**

*Apis mellifera*

*To bee  
or not to bee...*

# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION-GENERALITES</b>	<b>3</b>
<b>I- HYPERSENSIBILITE AUX VENINS D'HYMENOPTERES</b>	<b>4</b>
I.1- Les hyménoptères	4
I.1.1- Les vespides (famille des vespidae)	6
I.1.2- Les abeilles (famille des apidae)	6
I.2- Les venins d'hyménoptères	6
I.2.1- Composition chimique du venin	6
I.2.2- Toxicité du venin d'hyménoptère	8
I.2.3- Caractérisation des allergènes	8
2.3.1- Activité allergénique du venin d'hyménoptère	8
2.3.2- Allergènes du venin d'abeille	8
2.3.3- Allergènes du venin des vespines	12
2.3.4- Réactions croisées entre les venins d'hyménoptères	14
I.2.4- Standardisation des préparations allergéniques	14
I.3- Les manifestations cliniques	15
I.4- Diagnostic	17
I.4.1- L'anamnèse / l'interrogatoire	17
I.4.2- Diagnostic paraclinique	18
4.1.1- Les tests cutanés	18
4.1.2- Dosage des IgE spécifiques	18
I.5- Traitement	18
I.5.1- Traitement de l'accident allergique	18
I.5.2- Traitement de fond ou désensibilisation spécifique	19
<b>II- MECANISMES IMMUNOLOGIQUES DE LA REACTION ALLERGIQUE</b>	<b>21</b>
II.1- Les allergènes	22
II.2- Les anticorps	22
II.2.1- Les immunoglobulines d'isotype E (IgE)	22
2.1.1- Les récepteurs de l'IgE	22

2.1.2-	Induction et régulation de la synthèse d'IgE	29
II.2.2-	Les immunoglobulines d'isotype G4 (IgG4)	40
II.3-	Un réseau complexe de cellules effectrices	41
II.3.1-	Les basophiles et les mastocytes	41
II.3.2-	Les éosinophiles	42
II.3.3-	Les neutrophiles	44
II.3.4-	Les phagocytes mononucléés	44
II.3.5-	Les plaquettes	45
II.4-	Les lymphocytes T immunorégulateurs	46
II.4.1-	Concept de polarisation Th-1 / Th-2	47
4.1.1-	Sous-populations CD4+ : Th-1 / Th-2	47
4.1.2-	Sous-population de profil Th-3	48
4.1.3-	Sous-populations CD8+ : Tc-1 / Tc-2	49
II.4.2-	Déterminants de la polarisation Th-1 ou Th-2	49
4.2.1-	Rôle de l'antigène	49
4.2.2-	Rôle du récepteur des cellules T (TCR)	50
4.2.3-	Rôle des cellules présentatrices d'antigène (CPA)	51
4.2.4-	Rôle des molécules costimulatrices	51
4.2.5-	Rôle des cytokines	52
4.2.6-	Marqueurs de différenciation des cellules T	55
II.4.3-	Les lymphocytes Th-1 et Th-2 en pathologie allergique	56
II.5-	Médiateurs impliqués dans la réaction allergique	59
II.5.1-	Médiateurs préformés et néoformés	59
II.5.2-	Cytokines	59
II.5.3-	Chimiokines et leurs récepteurs	63
5.3.1-	Rôle des chimiokines dans la polarisation Th-1 / Th-1	67
5.3.2-	Récepteurs des chimiokines	71
<b>III- MECANISMES DE LA DESENSIBILISATION SPECIFIQUE</b>		<b>74</b>
III.1-	Mécanismes physiopathologiques de la désensibilisation	75
III.1.1-	Mécanismes humoraux de la désensibilisation	75
1.1.1-	Les anticorps de classe IgE	75
1.1.2-	Les anticorps bloquants	76
1.1.3-	Les anticorps anti-idiotypes (AAI)	77
III.1.2-	Mécanismes cellulaires de la désensibilisation	77
1.2.1-	Les cellules effectrices	78
1.2.2-	Les lymphocytes T immunorégulateurs	80
III.2-	Divers	85

<b>CADRE ET OBJECTIFS</b>	<b>86</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>88</b>
I- Profil des cytokines au cours de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères.	88
II- Modulation de l'expression de CD28 au cours de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères.	96
III- Modifications de la production et de l'expression des chimiokines au cours de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères.	104
IV- Désensibilisation des basophiles par le RANTES au cours de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères.	129
V- Régulation de la synthèse d'IgE au cours de l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères.	153
<b>DISCUSSION / CONCLUSIONS</b>	<b>166</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>180</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>185</b>
<b>ANNEXE: Liste des publications et communications</b>	<b>218</b>

# ***ABREVIATIONS***

<b>Ac</b>	Anticorps
<b>Ag</b>	Antigène
<b>IgE</b>	Immunoglobuline E
<b>Lc</b>	Lymphocytes
<b>PLA2</b>	Phospholipase A2
<b>EBV</b>	Virus d'Ebstein Bar
<b>CMN</b>	Cellules MonoNucléées
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>TCR</b>	Récepteur des Cellules T
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Ag
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>CD</b>	Cellules Dendritiques
<b>CCT</b>	Clone Cellulaire T
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>LPS</b>	LipoPolySaccharide
<b>LBA</b>	Lavage BronchoAlvéolaire
<b>HIS</b>	Hybridation In Situ
<b>ARNm</b>	Acide RiboNucléique messenger
<b>ADNc</b>	Acide DésoxyNucléique complémentaire
<b>PHA</b>	PhytoHémAgglutinine
<b>ITS</b>	ImmunoThérapie Spécifique
<b>RVIT</b>	Rush Venom ImmunoTherapy
<b>HSVH</b>	HyperSensibilité aux Venins d'Hyménoptères
<b>g<math>\epsilon</math></b>	germline epsilon
<b>P<math>\epsilon</math></b>	Productive epsilon
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription-mediated Polymerase Chain Reaction
<b>GAPDH</b>	GlycerAldehyde Phosphate DeHydrogenase
<b>CTLA-4</b>	Cytolytic T-Lymphocyte-associated Antigen-4
<b>IL-</b>	InterLeukine-
<b>TNF-</b>	Tumor-Necrosis Factor-
<b>TGF-</b>	Transforming Growth Factor-
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage-Colony stimulating Factor
<b>HRF</b>	Histamine Releasing Factor
<b>HRIF</b>	Histamine Release Inhibitory Factor
<b>MCP-</b>	Monocyte chemotactic Factor
<b>MIP- 1</b>	Macrophage inhibitory Factor
<b>PAF</b>	Platelet Activating Factor
<b>LT</b>	LeucoTriène
<b>TX</b>	ThromboXane
<b>PG</b>	ProstaGlandines
<b>NCF</b>	Neutrophil Chemotactic Factor
<b>ECF</b>	Eosinophil Chemotactic Factor
<b>PF4</b>	Platelet Factor
<b>RANTES</b>	Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and presumably Secreted

## **RESUME**

L'ImmunoThérapie Spécifique (ITS) des sujets présentant une hypersensibilité au venin d'hyménoptère selon la procédure accélérée (rush) est le moyen le plus efficace actuellement pour mettre ces personnes à l'abri d'un choc anaphylactique potentiellement mortel. Cependant, le mode d'action de l'ITS reste mal connu, de nombreuses hypothèses humorales et cellulaires ont été proposées mais aucune de ces hypothèses ne corrèle avec l'amélioration clinique. Notre travail de thèse s'inscrit dans l'exploration des hypothèses tendant à expliquer les mécanismes impliqués dans l'efficacité de l'ITS au venin d'hyménoptère.

Nous avons démontré, après ITS accélérée, une inversion du profil de cytokines de type Th-2 (IL-4) vers un profil de type Th-1 (IFN- $\gamma$ ) au niveau des cellules T de sujets allergiques au venin. Parallèlement, une abolition rapide de la prolifération lymphocytaire antigène spécifique a été observée, mais elle ne s'accompagne pas d'une diminution d'expression de la molécule costimulatrice CD28. Néanmoins, ces modifications sont tardives, suggérant l'intervention d'autres mécanismes dans la tolérance précoce observée à la fin des 3h30 du rush. Le basophile, cellule impliquée dans la phase précoce des réactions allergiques représente la cible de choix. Nous nous sommes donc intéressés aux chimiokines histamino-régulatrices (IL-8, MCP-1, RANTES) et nous avons observé une diminution générale de ces chimiokines par les cellules mononucléées (CMN) de sujets allergiques au venin au cours de l'ITS. Pour le RANTES, dès le premier jour du rush, une augmentation a été observée. De ce fait, nous avons mesuré l'effet au cours du rush, de chimiokines histamino-libératrices (RANTES, MCP-3 et MCP-1) sur les basophiles et l'on constate que le RANTES et le MCP-3 n'induisent plus de libération d'histamine dès la 4<sup>ème</sup> heure du rush suggérant une désensibilisation de leurs récepteurs par une production précoce de RANTES. Ce RANTES qui semble être d'origine plaquettaire désensibiliserait les basophiles au RANTES lui-même en empêchant la libération d'histamine induite par le RANTES produit ultérieurement par les CMN. Ce mécanisme constitue un début d'explication à la tolérance clinique observée dès les premières heures du traitement.

Finalement, l'étude de la régulation de la synthèse d'IgE au cours du rush a montré que seule une augmentation d'expression du transcrit productif pour l'IgE est observée corroborant l'augmentation paradoxale des IgE spécifiques observée au premier rappel du traitement, suggérant une stimulation des lymphocytes B mémoires et non naïfs.

*Ces résultats permettront de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans l'établissement de la tolérance allergénique vis-à-vis du venin, et à plus long terme de proposer d'autres solutions thérapeutiques aux maladies allergiques, dénuées d'effets secondaires.*

***INTRODUCTION***

**\*\*\*\***

***GENERALITES***

L'allergie représente un sérieux problème de santé publique, elle touche environ 20% de la population dans les pays développés. La grande majorité des symptômes survenant au cours des manifestations allergiques est la conséquence d'une réaction d'hypersensibilité de type I. Cette réaction est dite immédiate parce que les phénomènes qui en résultent apparaissent quelques minutes après un second contact avec l'allergène auquel le patient est sensible. Différents organes peuvent être la cible de la réaction d'hypersensibilité immédiate (HSI) comme par exemple la muqueuse bronchique dans l'asthme extrinsèque, la muqueuse rhinosinusienne dans la rhinite allergique et la peau dans l'urticaire et dans le cas particulier de la dermatite atopique. Enfin, une expression systémique de l'HSI survient après injection de substances étrangères telle que le venin d'hyménoptères.

Au cours de la thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'hypersensibilité aux venins d'hyménoptères notamment à l'étude des mécanismes physiopathologiques impliqués au cours de la désensibilisation spécifique aux venins.

## ***I- HYPERSENSIBILITE AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

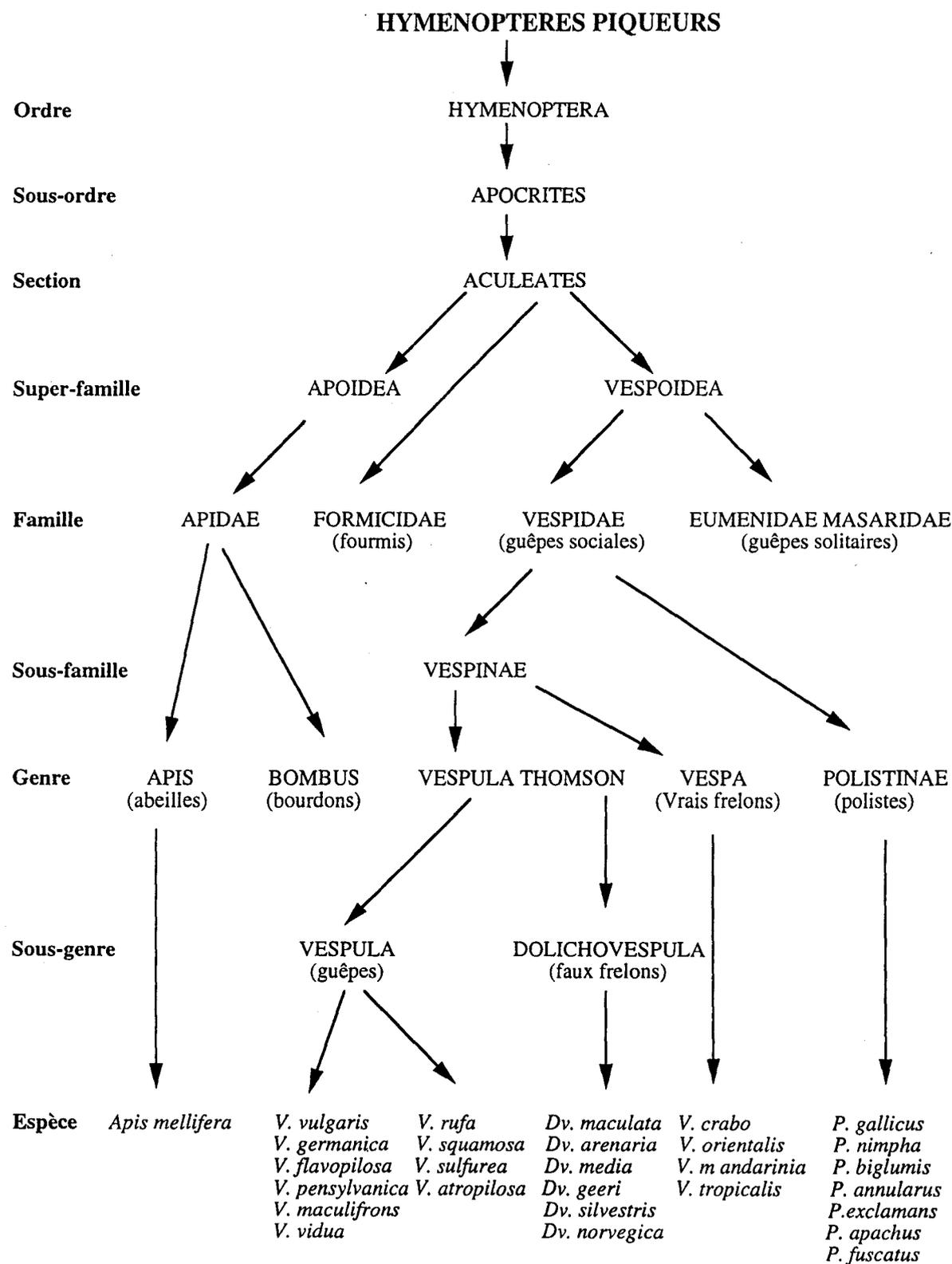
Le premier accident mortel connu, consécutif à une piqûre d'insecte, remonte au troisième millénaire avant Jésus Christ, avec le décès du pharaon Ménéès I d'Egypte, à la suite d'une piqûre de frelon. L'origine allergique des accidents fut suspectée par Waterhouse en 1914 et selon les études, environ 5% de la population présentent des réactions allergiques systémiques vis-à-vis de piqûres d'hyménoptères. Ces accidents surviennent surtout en période chaude et pendant la journée.

L'hypersensibilité aux venins d'hyménoptères représente actuellement un réel sujet de préoccupation tant en fréquence qu'en gravité. En France, on déplore ainsi une dizaine de décès par an, à la suite de piqûres d'hyménoptères, la plus redoutable des réactions allergiques étant le choc anaphylactique mortel.

### **I.1- Les hyménoptères**

L'ordre des insectes aux "ailes membraneuses" (signification grecque du terme Hyménoptère) comprend plus de 200 000 espèces dans le monde. Les hyménoptères ayant une importance médicale sont représentés par les abeilles, et les guêpes [Gervais, 1971]. Seules les femelles possèdent un appareil reproducteur qui va se transformer en aiguillon relié à un système de glande à venin. En Europe, les 3 groupes d'hyménoptères dotés d'un aiguillon sont les abeilles, les guêpes et les frelons (voir tableau 1).

Tableau 1 : Classification des Hyménoptères (D'après [Charpin et Vervloet, 1992])



### **I.1.1- Les vespides (famille des vespidae)**

Les guêpes sont facilement reconnaissables par leurs bandes jaunes et noires sur l'abdomen, elles se nourrissent de liquide sucré, fruits et détritux et affectionnent les fruits. Les guêpes possèdent un aiguillon finement barbelé et peuvent piquer plusieurs fois. On distingue plusieurs familles parmi lesquelles on isole :

- Les vespines, de grosse taille, à l'abdomen tronqué en avant, avec en chef de file *Vespula vulgaris* et *Vespula germanica*, et accessoirement le frelon, *Vespa crabo*, plus rarement impliqué en clinique.

- Les polistes, guêpes de petite taille, à l'abdomen effilé, retrouvées surtout dans la moitié de la France et notamment dans le midi méditerranéen.

### **I.1.2- Les abeilles (famille des apidae)**

Les abeilles sont moins agressives que les guêpes, elles s'en différencient par une plus petite taille, un abdomen velu marron rayé de noir; leur sac à pollen est accroché à leur dernière paire de pattes. Les abeilles piquent surtout en cas de menace ou d'attaque et leur dard, qui a la forme d'un harpon demeure dans le derme après la piqûre, provoquant la mort de l'insecte par éviscération. Elles se nourrissent de nectar et de pollen. Il en existe à peu près 20000 espèces. L'espèce la plus rencontrée en Europe est *Apis mellifica*.

## **I.2- Les venins d'hyménoptères**

Les micro-solutions venimeuses sont complexes par leur composition, par leurs activités pharmacologiques et par leur pouvoir immunologique. Les venins représentent un groupe de produits allergéniques et il est possible de les standardiser avant leur utilisation commerciale.

### **I.2.1- Composition chimique du venin**

La nature des composants du venin varie selon les espèces, ce qui pose le problème de l'identification de l'hyménoptère piqueur en cas d'allergie. La proportion des composants d'un venin est différente selon les périodes de l'année, ce qui pose le problème de l'activité antigénique des lots récoltés. Les venins d'hyménoptères contiennent des substances pharmacologiques, biochimiques et allergéniques comprenant des amines biogènes, des enzymes et des protéines (voir Tableau 2).

**Tableau 2 : Composition chimique des venins d'hyménoptères**

	<i>Abeille</i>	<i>Guêpe</i>	<i>Frelon</i>
<b><i>Amïnes vasoactives</i></b>			
Histamine	+	+	+
Sérotonine	-	+	+
Acétylcholine	-	-	+
Dopamine	+	+	+
Ephédrine	-	+	+
Noréphédrine	+	+	+
<b><i>Enzymes</i></b>			
Phospholipase A1 (PLA1)		Ag (Ves m 1; Ves v 1; Pol a 1; Pol e 1)	Ag (Dol m 1; Vesp c 1)
Phospholipase A2 (PLA2)	Ag (Api m 1; Bom p 1)		
Phospholipase B (PLB)	-	Ag	Ag
Hyaluronidase	Ag (Api m 2)	Ag (Ves m 2; Ves v 2; Pol a 2)	Ag (Dol m 2)
Phosphatase acide (AP)	Ag	Ag	Ag
Cholinestérase	-	+	-
Histidine décarboxylase	-	+	-
Protéases	Ag (Bom p 4)	+	+
Glucidases	+	+	+
Lipases	+	+	+
N-Gly-Pro-aryl-amidase	Ag	Ag	Ag
<b><i>Polypeptides et protéïnes</i></b>			
Antigène 5 (Ag 5)	-	Ag (Ves g 5; Ves m 5; Ves s 5; Ves v 5; Pol e 5)	Ag (Dol m 5; Dol a 5; Vesp c 5)
MCD* peptide	+	-	-
Minimine	+	-	-
Mellitine	Ag (Api m 4)	-	-
Apamine	+	-	-
Bradykinine	-	+	+
Cardiopep	+	-	-
Antigène (HMW)*	Ag	-	-

\* **MCD** : dégranulant les cellules mastocytaires, **HMW** : haut poids moléculaire

Ag: Activité antigénique (D'après[King et al, Allergen Nomenclature, 1995c]).

Chez les sujets sensibles aux venins d'hyménoptères, toutes les protéines induisent des réponses IgE spécifiques mais à des degrés variables. Les peptides, à l'exception de la mellitine, n'ont pas d'activité immunogénique chez l'homme. Les peptides ont des activités kinines, des activités dégranulant les mastocytes et des activités neurotoxiques, tandis que les protéines ont des activités enzymatiques bien connues, phospholipase, hyaluronidase et phosphatase acide (revue dans [King, 1987a]).

### **I.2.2- Toxicité du venin d'hyménoptère**

Les venins d'hyménoptères contiennent des substances toxiques constituant un poison pour certaines espèces. Les quantités injectées lors d'une piqûre sont minimales pour l'homme et provoquent simplement une réaction locale érythémateuse, œdémateuse et douloureuse. L'effet toxique des venins est dû à l'action combinée des substances pharmacologiquement actives qu'ils contiennent.

Les **amines biogènes** agissent sur la perméabilité, les vaisseaux, les fibres lisses et les terminaisons nerveuses. Elles contribuent également à provoquer une réaction locale cutanée inflammatoire et douloureuse.

Les **peptides et les petites protéines** agissent indirectement par histamino et sérotonino- libération notamment pour la mellitine. Ils agissent par contre directement sur la perméabilité capillaire, les muscles lisses et les terminaisons nerveuses. L'apamine possède une action neurotoxique.

Enfin, les **enzymes** telles que la hyaluronidase pourrait agir sur la perméabilité du tissu conjonctif amplifiant la pénétration et la diffusion du venin. La phospholipase A agit directement sur la perméabilité et la tension artérielle, elle peut agir indirectement par l'apparition de lysolécithine, sur les hématies, les fibres musculaires et les mastocytes.

### **I.2.3- Caractérisation des allergènes**

Les allergènes sont classés en deux catégories, d'une part, les allergènes majeurs définis comme les antigènes purifiés se liant aux IgE spécifiques présentes dans les sérums de plus de 50% de patients sensibles à cet allergène et donnant des réactions immédiates positives en tests cutanés; d'autre part, les allergènes mineurs réagissant avec les IgE spécifiques chez moins de 50% des patients sensibilisés.

### **2.3.1- Activité allergénique du venin d'hyménoptère**

Les venins constituent des sources d'allergènes responsables du développement de la sensibilisation. Ces molécules à pouvoir allergénique ont été mises en évidence par électrophorèse, immuno-électrophorèse, diffusion sur gel, ultracentrifugation et chromatographie d'affinité. Certains de ces antigènes sont spécifiques de l'espèce, d'autres sont susceptibles de donner des réactions croisées avec les antigènes d'autres espèces du groupe des hyménoptères. Différents travaux ont été consacrés aux antigènes contenus dans les venins d'hyménoptères et ont permis de préciser leur rôle allergénique. Ces protéines allergéniques ont été isolées et caractérisées par leur poids moléculaire, leur charge électrique (pHi) et leur degré de glycosylation. Les séquences en acides aminés de certaines de ces molécules spécialement les allergènes majeurs (glycoprotéines d'un poids moléculaire de 10 à 50 kDa) ont été établies par séquençage protéique ou par clonage de l'ADNc de ces protéines, ce qui a permis d'étudier la cartographie épitopique et l'activation des cellules T allergène spécifiques. La connaissance de la séquence primaire de ces protéines allergéniques a permis d'établir des homologies de séquence avec d'autres protéines allergéniques ou non. Certaines de ces protéines peuvent avoir une activité biologique enzymatique qui est cytotoxique (phospholipases) ou qui favorise la pénétration des toxines dans les tissus (hyaluronidase). De plus, l'obtention de molécules allergéniques recombinantes permet d'obtenir de grandes quantités de molécules pures. Ceci va permettre de mieux définir l'importance clinique des allergènes individuels. A titre d'exemple, alors que 99% de patients avec des tests cutanés positifs au venin d'abeille entier réagissent aussi à la PLA2 purifiée, il n'y a que 94% qui sont positifs à la PLA recombinée, ceci pourrait être lié à la conformation de ces molécules.

### **2.3.2- Allergènes du venin d'abeille**

Des techniques de chromatographie par échange d'ions et de filtration sur gel montrent que les allergènes majeurs du venin d'abeille sont la phospholipase A2, l'hyaluronidase, la phosphatase acide et la mellitine [Müller, 1989]. 90% des patients allergiques au venin d'abeille ont des IgE spécifiques vis-à-vis de la PLA2 [Kemeny, 1983]. La cartographie épitopique et la réponse cellulaire T ont été focalisées sur les allergènes majeurs notamment la PLA2, l'allergène dominant dans le venin d'abeille.

### ***Cartographie épitopique de la PLA2 et réponse cellulaire T***

La PLA2 est une glycoprotéine de poids moléculaire de 14-16 kDa, composée de 134 acides aminés et dont la structure primaire et cristalline tridimensionnelle sont connues (revue [King, 1987a, Scott, 1990, Shipolini, 1974]). Différentes études ont été consacrées à la cartographie épitopique de la PLA2 aussi bien chez l'homme [Carballido, 1993, Dhillon, 1992] que chez la souris [Specht, 1997]. Chez l'homme, Dhillon et al ont démontré que la cartographie des épitopes T effectuée avec 12 peptides synthétiques chevauchants de la PLA2 révèle 2 épitopes immunodominants. Ces épitopes correspondent aux séquences d'acides aminés 50-69 (peptide 6) et 83-97 (peptide 9) de la PLA2. La réponse des cellules T au peptide 6 est restreinte par DQ du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), et celle du peptide 9 par DP. Pour vérifier si les épitopes dominants restent les mêmes chez des individus à HLA (antigène des leucocytes humains) de classe II différents, Carballido et al ont étudié la cartographie des épitopes T au niveau des clones T ou des CMN de patients allergiques au venin d'abeille et de sujets sains. Ils ont isolé 3 épitopes dominants en position 81-92, 113-124 et 45-62 au niveau de la molécule PLA2. Ces épitopes sont reconnus par les clones cellulaires T spécifiques d'allergène isolés chez des sujets allergiques et d'autres non allergiques, en association avec les molécules de CMH de classe II différentes (HLA-DP, HLA-DQ et à un moindre degré HLA-DR).

En plus, au niveau de la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  (deux cytokines jouant un rôle majeur dans la régulation de la synthèse d'IgE) par les cellules T spécifiques d'allergène, la stimulation avec l'antigène entier (PLA2) ainsi qu'avec les peptides immunodominants (peptide 6 et peptide 9) et la toxine tétanique (TT) induit des taux élevés d'IL-4 tandis que seule la TT induit la production d'IFN- $\gamma$ . La réponse proliférative des sujets allergiques aux peptides immunogènes est extrêmement importante. Par contre, la prolifération aux mêmes fragments est abolie chez les sujets hyposensibilisés ce qui suggère une tolérance des cellules T en conséquence de contact répété avec l'allergène. Donc, les épitopes potentiellement immunogènes sont également fortement tolérogènes [Carballido, 1992, Dhillon, 1992].

La plupart des déterminants antigéniques de la PLA2 dépendent probablement de sa forme native parce que la forme dénaturée (obtenue par réduction et carboxyméthylation des liaisons disulfure) diminue fortement l'histaminolibération leucocytaire [King, 1976]. En effet, dans une étude récente, chez la souris, deux protéines recombinantes ont été isolées à partir de la PLA2 : une native à activité enzymatique, et une

mutante inactive enzymatiquement (changement d'un acide aminé au niveau du site enzymatique). Il a été démontré que la PLA2 sous sa forme native, permet la production d'IL-4 par les mastocytes. *In vivo*, les injections répétées de faibles doses de la forme active de la PLA2 aux souris induisent la synthèse d'IgE spécifiques de la PLA2 tandis qu'il n'y a pas d'IgE détectées avec la forme inactive. Les deux formes de la PLA2 sont immunogéniques quand elles sont injectées à forte dose [Dudler, 1995]. D'où l'hypothèse qu'avec des faibles doses de la PLA2, l'activation enzymatique des basophiles / mastocytes induit une production paracrine d'IL-4 qui conduit les lymphocytes T helper activés par l'Ag vers une différenciation Th2. Ceci favoriserait finalement l'activation des lymphocytes B pour la synthèse d'IgE. Pour démontrer que la non immunogénicité de la forme mutante de PLA2 n'est pas dûe à un épitope T altéré ou perdu dans le site actif, la cartographie des épitopes T et la stimulation des cellules T avec des peptides chevauchants ont été réalisées. Il a été démontré que les épitopes T de PLA2 reconnus par la souris sont en dehors du site enzymatique et que d'autres paramètres immunologiques peuvent donc être responsables de l'immunogénicité différente de la forme native et mutante [Specht, 1997].

*Les épitopes T dominants d'un allergène peuvent donc varier chez chaque patient à cause de la spécificité de la restriction de CMH de classe II. On peut imaginer qu'un mélange d'épitopes T puisse être utilisé pour l'immunothérapie spécifique (ITS). Cependant, la cartographie de tous les épitopes T reconnus par des individus différents est très difficile à réaliser. L'approche consistant à utiliser des fragments chevauchants qui ensemble constitueraient les épitopes T d'un allergène reconnu par tous les individus pose le problème de l'allergénicité de ces fragments.*

### **PLA2 et réponse humorale**

Comme les autres allergènes, la PLA2 peut éliciter des réponses Ac de différents isotypes [Aalberse, 1983, Kemeny, 1987]. La sélection des isotypes est contrôlée par les cytokines dérivées des cellules T [Finkelman, 1990]. Soloway et al ont démontré que la substitution d'un seul acide aminé dans un épitope T suffisait à abolir l'hypersensibilité associée à l'IgE et l'IgG1 dans différentes souches de souris [Soloway, 1991]. Certains travaux avec des dérivés de la PLA2 modifiés chimiquement suggèrent que la réponse anticorps aux différents déterminants antigéniques est variable [King, 1976].

### 2.3.3- Allergènes du venin des vespines

Quatre allergènes majeurs ont été décrits dans le venin des vespides, la phospholipase A1 et B, l'hyaluronidase et l'antigène 5 dont la fonction biologique n'est pas encore connue [Hoffman, 1985]. Les quantités de ces protéines sont différentes d'une espèce à l'autre. Tous les patients sensibles à ce genre de venin présentent des IgE et des IgG allergènes spécifiques. Des études récentes ont été focalisées sur ces molécules allergéniques et spécialement l'Ag 5.

**L'Ag 5** dont le poids moléculaire est de 25 kDa apparaît comme la protéine allergénique la plus puissante pour la libération d'histamine. L'Ag 5 de la guêpe (*vespula vulgaris*) cloné et exprimé dans des bactéries, contient 204 acides aminés, la structure primaire de l'Ag 5 de différentes espèces de guêpes et de frelons a été identifiée [Hoffman, 1993, Lu, 1993]. Il possède 69% et 60% d'homologie avec son homologue de frelon (*Dolichovespula maculata*) et de guêpe (*Polistes annularis*) respectivement. L'Ag 5 ou Dol m V pourrait être considéré comme un allergène majeur spécifique du frelon (*Dolichovespula maculata*). La fonction biochimique de l'Ag 5 est mal connue. L'Ag 5 présente des homologies avec d'autres protéines de l'environnement. En effet, il possède une homologie partielle de séquence avec la protéine testiculaire dépendante de l'androgène chez les mammifères [King, 1997, Lu, 1993]. Cette protéine testiculaire possède une activité enzymatique hyaluronidase [Gmachl, 1993] et est impliquée dans la liaison œuf / sperme dans le stade précoce de la fertilisation [Lin, 1993].

Il existe 3 isoformes de d'Ag 5 (Dol m 5) : Dol m 5.01, Dol m 5.02 (204 acides aminés), et Dol m 5.03. Les isoformes Dol m 5.02 et Dol m 5.03 ont été exprimés dans les bactéries [Fang, 1988] ou les cellules d'insectes [Tomalski, 1993] en utilisant des vecteurs d'expression.

**La cartographie épitopique** T et B des venins de guêpes et de frelons a fait l'objet de travaux récents. Chez la souris, la cartographie épitopique de l'Ag 5 (Dol m 5.02) a été réalisée et parmi les 20 peptides utilisés, 3 seulement représentent les épitopes T majeurs de Dol m 5 car ils sont reconnus par toutes les souris testées [King, 1997].

D'un autre côté, les réponses cellulaires T et B aux protéines naturelle et recombinante de Dol m 5.02 ainsi que celles des fragments recombinants de cette protéine ont été étudiées par King et al [King, 1995a]. La réponse cellulaire T est similaire pour les 3

formes de Dol m 5.02. En effet, les épitopes T de la forme naturelle sont retrouvés dans les fragments recombinants et ils sont aussi immunogéniques que la protéine naturelle pour induire la réponse T. Ceci peut être dû au fait que les épitopes T sont continus (des résidus d'acides aminés séquentiels et adjacents). Par contre les épitopes B peuvent être continus (séquentiels) ou discontinus (topographiques) et la spécificité des 3 formes de Dol m 5.02 pour la réponse anticorps est différente entre les formes recombinantes et la forme naturelle. La forme naturelle de Dol m 5.02 induit principalement des IgG spécifiques pour ses épitopes B discontinus et à un moindre degré pour ses épitopes B continus, tandis que la forme recombinante et les fragments recombinants induisent uniquement des anticorps spécifiques des épitopes B continus communs avec ceux de la protéine naturelle. Les anticorps spécifiques des épitopes B discontinus montrent une plus forte affinité de liaison aux épitopes que ceux spécifiques des épitopes B continus. La différence dans les propriétés immunogéniques entre les formes naturelle et recombinante ou les fragments recombinants pour les réponses T et B pourrait être liée à leur conformation.

*Ces résultats suggèrent la possibilité d'une utilisation potentielle de mélanges de ces fragments chevauchants comme agents immunothérapeutiques chez l'homme.*

***L'hyaluronidase et la phospholipase A1*** de guêpe (*Vespula vulgaris*) contiennent respectivement 331 et 300 acides aminés et montrent 92 et 67% d'identité de séquence avec leurs homologues de frelon (*Dolichovespula maculata*) [King, 1996]. Les structures primaires de l'hyaluronidase de frelon (*Dolichovespula maculata*) [Lu, 1995], des phospholipases de 2 espèces de guêpes (*Vespula maculifrons* et *V. squamosa*) et 2 espèces de frelons (*D. maculata* et *Vespa crabo*) [Hoffman, 1994b, Hoffman, 1994a, Soldatova, 1993] sont connues. King et al ont réalisé le clonage et l'expression de l'hyaluronidase (Ves v 1) et de la phospholipase (Ves v 2) de *vespula vulgaris* [King, 1996]. L'hyaluronidase du venin de vespides et d'abeilles possède la même spécificité enzymatique [King, 1987b].

Ces molécules présentent des homologies de séquence avec d'autres protéines de l'environnement, telle que les lipases pour la phospholipase A1, l'hyaluronidase de venin d'abeille et la protéine testiculaire des mammifères pour l'hyaluronidase.

*La caractérisation des épitopes T et B de ces molécules allergéniques de guêpes et d'abeilles est d'une importance majeure dans l'efficacité de l'ITS. L'établissement de la cartographie épitopique semble essentiel à la compréhension des interactions entre les*

*allergènes et le CMH II des CPA, les allergènes et le TCR, les allergènes et les IgE liés aux cellules B, aux cellules effectrices comme les mastocytes et les basophiles, aux CPA.*

*En conclusion, les venins modifiés permettront de réduire les réactions secondaires sans modifier l'allergénicité du venin.*

#### **2.3.4- Réactions croisées entre les venins d'hyménoptères**

Un patient allergique aux piqûres d'hyménoptères, présente souvent des tests positifs avec plusieurs venins. La question est de savoir si ces tests sont dûs à des sensibilités multiples ou à des réactions croisées. Selon des études *in vitro*, les réactions croisées sont bien marquées entre les différents venins de vespides, surtout entre *Vespula*, *Dolichovespula* et *Vespa* (75 % d'homologie) [Reisman, 1982a], tandis qu'elles sont moins prononcées entre ces trois et les polistes (50 % d'homologie) [Reisman, 1982b]. Les épitopes continus (linéaires) des venins de guêpe montrent des réactions croisées plus importantes que ceux discontinus. Au contraire, les réactions croisées sont rares entre le venin d'abeille et celui des vespides et apparemment largement limitées à l'hyaluronidase. En présence de tests fortement positifs avec les deux venins, le test d'inhibition de RAST révèle une réaction croisée dans seulement environ 10%. En pratique, il est donc conseillé de traiter avec les deux venins quand les tests sont positifs avec l'abeille et la guêpe. Cependant, les études concernant les réactions croisées entre les deux venins restent contradictoires [Reisman, 1984].

*Si l'insecte agresseur est identifié avec précision ou s'il y a une différence nette dans le degré de la réactivité des tests cutanés, une monothérapie est possible, malgré la présence de tests positifs à différents venins. Une étude sur l'immunothérapie avec un seul venin confirmerait l'efficacité de cette approche [Reisman, 1992].*

#### **I.2.4- Standardisation des préparations allergéniques**

Les extraits allergéniques commercialisés à des fins diagnostiques et thérapeutiques, préparés à partir des sources naturelles d'allergènes, restent difficiles à standardiser. Ces sources d'allergènes contiennent de multiples constituants : glycoprotéines, lipides, pigments et acides nucléiques. Les molécules allergéniques contenues dans un extrait présentent une réactivité plus ou moins importante suivant le sujet testé. En outre, les techniques de préparation des extraits allergéniques telles que extraction et purification vont influencer la nature, la quantité et l'activité des molécules allergéniques présentes. Par contre, en ce qui concerne les venins d'hyménoptères, la composition physicochimique des extraits

allergéniques est bien identifiée, d'où la réussite de la standardisation des extraits allergéniques. L'avantage d'utiliser des venins d'hyménoptères purs et standardisés est que l'allergène, dans ce genre de maladies allergiques, sauf à quelques rares exceptions, est bien le venin. Ces venins purs correspondent à un réel progrès par rapport aux broyats de corps d'insectes. Les préparations du venin utilisées pour le diagnostic et l'immunothérapie sont dérivées d'une seule espèce d'abeille (*Apis mellifera*), et de 2 espèces individuelles de frelons (*Dolichovespula maculata* et *Dolichovespula arenaria*). Les préparations de guêpes (*Vespula*) contiennent un mélange de 8 espèces et celles de polistes de 6 espèces (Dome Hollister Stier Laboratories, Spokane, U.S.A.).

### **I.3- Les manifestations cliniques**

La connaissance des hyménoptères est extrêmement importante car elle permet, face à un accident de :

- formuler le diagnostic d'allergie
- identifier parfois l'insecte piqueur
- apprécier le degré immédiat de la réaction.

Parmi les manifestations cliniques que peuvent provoquer les hyménoptères, on distingue 3 types de réactions :

- 1- les réactions locales normales
- 2- les réactions toxiques
- 3- les réactions allergiques vraies
  - les réactions locales étendues (1)
  - les réactions généralisées légères (2)
  - les réactions généralisées fortes (3)
  - les réactions généralisées sévères (4)
  - le choc anaphylactique (5)

#### 1- Les réactions locales normales

Ce sont des réactions inflammatoires normales rencontrées chez tout individu, même non sensibilisé, associant douleur, érythème, prurit et induration. Elles disparaissent rapidement : l'œdème ne persiste que 2 à 3 heures.

## 2- Les réactions toxiques

Elles surviennent à la suite d'un très grand nombre de piqûres simultanées, parfois capables de déclencher une réaction anaphylactoïde difficile à différencier d'une réaction allergique vraie. Plus souvent, ces réactions systémiques toxiques sont retardées, pouvant réaliser par exemple une néphropathie aiguë secondaire à une hémolyse et une rhabdomyolyse.

- Pour les abeilles, une piqûre correspond à l'injection d'environ 50 µg de venin, la dose létale étant atteinte avec 300 à 600 piqûres.

- Pour les frelons, il suffit de 10 à 20 piqûres.

## 3- Les réactions allergiques vraies

Les réactions allergiques vraies surviennent chez des sujets prédisposés qui se sont sensibilisés à la suite d'une ou plusieurs piqûres.

### *Les réactions locales étendues*

L'œdème est beaucoup plus important que dans la réaction locale normale. Sur un membre, cet œdème atteint au moins 2 articulations et peut persister plusieurs jours. Il sera particulièrement grave en cas de localisation bucco-pharyngée. Peu de sujets ayant présenté une réaction locale étendue présenteront des manifestations systémiques lors d'une nouvelle piqûre [Abrecht, 1980, Green, 1980].

### *Les réactions généralisées immédiates*

Elles peuvent apparaître dans un délai de quelques minutes à une heure après la piqûre, et peuvent rapidement évoluer vers une issue fatale en l'absence de traitement d'urgence. Ces mécanismes sont sous la dépendance d'un mécanisme d'hypersensibilité de type I, médié par l'IgE. L'on distingue 4 stades de gravité dans les réactions généralisées selon la classification de Mueller [Mueller, 1966]:

Stade I ou réaction généralisée légère associe une urticaire généralisée, un prurit, un malaise et une anxiété.

Stade II ou réaction généralisée forte à laquelle s'ajoutent de façon variable un œdème angioneurotique, des vertiges, une oppression thoracique, des douleurs abdominales, des sifflements, des nausées, des vomissements, diarrhée et paresthésies des extrémités, ou un prurit palmo-plantaire.

Stade III ou réaction généralisée grave associant les symptômes de la réaction généralisée forte à un œdème de Quincke laryngé, un œdème bronchique avec dyspnée asthmatiforme, dysphonie, apparition de dysphagie, gêne à la parole, un état de confusion avec impression de mort subite imminente.

Stade IV ou choc anaphylactique avec vasodilatation généralisée, tachycardie, refroidissement des extrémités, pouls petit et filant, hypotension, perte de connaissance, syncope, incontinence, risque de mort très rapide ou après un coma prolongé. Dans les cas extrêmes, la mort survient en 15 à 30 minutes avec obstruction du tractus respiratoire. Seuls 40 à 60% des sujets ayant eu des réactions systémiques préalables auront de telles réactions lors d'une piqûre ultérieure [Hunt, 1978].

### ***Les réactions retardées***

Les réactions de type retardées ne sont pas toujours précédées d'une réaction initiale immédiate. Elles peuvent survenir de quelques heures à quelques jours après la piqûre. Elles sont encore mal comprises et ne relèvent pas d'un mécanisme à IgE. La symptomatologie de ces réactions est très variée [Light, 1977] : maladie sérique, atteintes du système nerveux pouvant réaliser au maximum une encéphalite mortelle, troubles cardiovasculaires sanguins, rénaux et cutanés à répétition.

## **I.4- Diagnostic**

Le diagnostic d'allergie au venin repose sur la confrontation de 3 groupes de critères : l'anamnèse, les tests immunologiques *in vitro et in vivo*.

### **I.4.1- L'anamnèse / l'interrogatoire**

Elle permet par la description des manifestations symptomatiques et les conditions de leur survenue (le terrain atopique, les accidents antérieurs et leur gravité respective, le type d'insecte piqueur, le nombre et la localisation des piqûres, la chronologie des troubles locaux et généraux et leur intensité), d'écarter les accidents toxiques (piqûres multiples) et de préciser la gravité de l'accident, élément essentiel pour décider d'une sensibilisation. Cet interrogatoire minutieux doit permettre de conclure à l'opportunité d'un bilan complémentaire.

## **I.4.2- Diagnostic paraclinique**

### **4.2.1- Les tests cutanés**

Les tests cutanés occupent une place essentielle dans le diagnostic de l'allergie aux venins d'hyménoptères. Ils sont réalisés à l'aide d'extraits purifiés et standardisés de venin. Le sujet étant sous perfusion, on commence par un prick-test à la concentration de 0,1 µg/ml et si la réaction est négative, on effectue les tests par voie intra-dermique en injectant 2/100e d'une solution à  $10^{-3}$  µg/ml de venin, puis cette concentration augmente de 10 en 10 jusqu'à l'obtention d'une papule supérieure à 5 mm et d'un érythème supérieur ou égal à 15 mm dans les 15 min qui suivent. La dose maximale de venin testé est de 1 µg/ml. La plupart des études montrent une corrélation entre les tests cutanés et l'histoire clinique [Bousquet, 1982], cependant, certaines discordances imposent la réalisation d'autres examens.

### **4.2.2- Dosage des IgE spécifiques**

Le dosage des IgE spécifiques s'effectue par la méthode du RAST (Radio Allergo Sorbent Test), surtout lors d'une histoire clinique évocatrice avec des tests cutanés négatifs. Un RAST de classe 1 est douteux, de classe 2 est faiblement positif, de classe 3 est positif, de classe 4 est très positif. La positivité des RASTs implique la présence d'IgE spécifiques dans le sang circulant.

## **I.5- Traitements**

### **I.5.1- Traitement de l'accident allergique**

Il existe plusieurs types de traitement des maladies allergiques. Brièvement, les traitements symptomatiques des phénomènes allergiques comprennent certaines drogues inhibant l'action des mastocytes / basophiles comme les anti-histaminiques de type H1 (antagonistes compétitifs de l'histamine au niveau de ses récepteurs H1) et des anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes qui diminuent la réaction inflammatoire tardive. Dans le cas d'allergie aux venins d'hyménoptères, les conduites à tenir sont différentes en fonction de la gravité de la réaction après piqûre. Si la réaction est locale et étendue, un anti-histaminique ou éventuellement un corticoïde peuvent être envisagés. Par contre, si la réaction est générale, il faut immédiatement en apprécier la gravité, traiter les patients avec des

corticoïdes et des anti-histaminiques ainsi qu'avec l'adrénaline et surveiller l'éventuelle apparition d'un choc anaphylactique.

### **I.5.2- Traitement de fond ou désensibilisation spécifique**

Les modalités d'injection des allergènes et l'efficacité à long terme de l'immunothérapie spécifique restent controversées. La qualité des extraits allergéniques utilisés lors de la désensibilisation spécifique a souvent été mise en cause lors d'échecs de la désensibilisation. Néanmoins, cette technique donne des résultats incontestables pour certains allergènes comme le venin d'hyménoptère.

En cas d'allergie aux venins d'hyménoptères, une fois l'indication posée, un traitement désensibilisant en utilisant les extraits de venin purs lyophilisés et standardisés sera mis en route. Il existe différents types de protocoles de désensibilisation accélérée (ou rush) aux venins d'hyménoptères qui se déroulent sur 3 jours [Nataf, 1984], 6h [van der Zwan, 1983] ou 3h 30 [Birnbaum, 1993]. Ils ont tous pour but d'atteindre une dose d'entretien mensuelle au moins égale à 100 µg de venin (100 µg = dose d'entretien correspondant à deux fois la quantité du venin d'abeille injectée lors d'une piqûre). Ce traitement est efficace (96 %) [Hunt, 1978]. Dans notre travail, tous les patients ont subi le protocole de type "ultra rush" qui s'effectue en 3h 30. Il consiste en l'injection, le premier jour, de quantités croissantes de venin standardisé, jusqu'à une dose finale de 40 µg au bout de 3h 30 (dose cumulative de 100 µg). Puis cette dose est reçue en deux injections au jour 15, et réinjectée en dose d'entretien tous les mois.

Le déroulement de trois protocoles de désensibilisation standard est détaillé dans le tableau 3.

La technique de désensibilisation rapide comporte plusieurs avantages : (1) atteinte de la dose protectrice en 3h30; (2) moins de déplacement pour le patient; (3) elle peut être pratiquée à toute période de l'année.

Malgré tous ces avantages, quelques inconvénients restent à craindre et sont représentés par la survenue d'incidents au cours de l'ascension des doses injectées. Ces incidents sont plus fréquents avec le venin d'abeille qu'avec le venin de guêpe.

*Les mécanismes immunologiques impliqués dans l'efficacité de l'ITS aux venins d'hyménoptères seront détaillés dans le chapitre III.*

**Tableau 3 : Horaires des injections et doses injectées en microgrammes ( $\mu\text{g}$ ) de venin.** (D'après [Birnbbaum , 1993]).

Horaire des injections	Jour 1	Jour 1	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4
<b>0</b>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	0,1	10	50
<b>0h30</b>	1	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	1	50	<b>100</b>
<b>1h</b>	10	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	2	80	
<b>1h 30</b>	20	10 <sup>-2</sup>	0,1	4	<b>100</b>	
<b>2h</b>		10 <sup>-1</sup>	0,2	8		
<b>2h 30</b>	30	0,5	0,4	10		
<b>3h</b>		1	0,8	20		
<b>3h 30</b>	40	5	1	40		
<b>4h</b>		10		50		
<b>4h 30</b>		20				
<b>5h</b>		30				
<b>5h 30</b>		60				
<b>6h</b>		<b>100</b>				
	<b>Rush sur 3h30</b>	<b>Rush sur 6h</b>	<b>Rush sur 4 jours</b>			
<b>Jours de rappel</b>						
<b>7</b>				100		
<b>10</b>				100		
<b>15</b>	50	50		100		
	50	50				
<b>45</b>	100	100		100		

## **II- MECANISMES IMMUNOLOGIQUES DE LA REACTION ALLERGIQUE**

La réaction d'hypersensibilité immédiate survenant chez les sujets prédisposés après un second contact avec l'allergène est fortement liée à une production exagérée d'immunoglobulines d'isotype E (IgE). L'ensemble des manifestations locales et générales résulte de la dégranulation explosive de cellules spécialisées dites effectrices, les basophiles et les mastocytes, sensibilisés par des IgE. Cette réaction immédiate dépendante de l'IgE est souvent suivie, chez certains patients, d'une réaction retardée survenant 6 à 10 heures plus tard. Un afflux de cellules inflammatoires est alors observé avec en particulier un recrutement de cellules effectrices telles les éosinophiles et les neutrophiles, et de cellules immunorégulatrices que sont les lymphocytes. Il apparaît actuellement que toutes les cellules intervenant dans la réaction allergique sont mobilisées dès la pénétration de l'allergène dans l'organisme.

Ces dernières années, différents travaux ont été consacrés à la compréhension des mécanismes immunologiques intervenant dans la réaction d'hypersensibilité immédiate et la réaction retardée à composante inflammatoire. Schématiquement, ils font intervenir 4 éléments:

- les allergènes.
- les anticorps d'isotype IgE spécifiques d'allergènes.
- un réseau complexe de cellules effectrices et régulatrices.
- des médiateurs.

Dans ce chapitre, nous allons étudier successivement chacun de ces éléments.

## **II.1- Les allergènes**

Les allergènes se définissent comme des antigènes induisant chez les patients allergiques une production d'IgE spécifiques et une réaction d'hypersensibilité immédiate. Les sources d'allergène sont nombreuses, on distingue les allergènes inhalés ou pneumallergènes (allergie oculaire et respiratoire), les allergènes ingérés ou trophallergènes (allergie à localisation digestive ou extradiigestive), les allergènes injectés (médicaments, venins d'insectes). Ils sont responsables de l'immunisation puis du déclenchement de réactions anaphylactiques. Les caractères d'exposition conditionnent la localisation clinique de l'allergie. Cependant en cas de sensibilisation extrême, un choc peut être déclenché par toute voie d'introduction. Le nombre des sources d'allergènes auxquels les patients se sensibilisent augmente avec le temps.

## **II.2- Les anticorps**

La réaction allergique permet de différencier les anticorps réaginique d'isotype E (IgE) et d'autres non réaginique appartenant à une sous-classe d'IgG variable selon l'espèce. Ces immunoglobulines sont fortement impliquées dans les réactions d'hypersensibilité de type I.

### **II.2.1- Les immunoglobulines d'isotype E (IgE)**

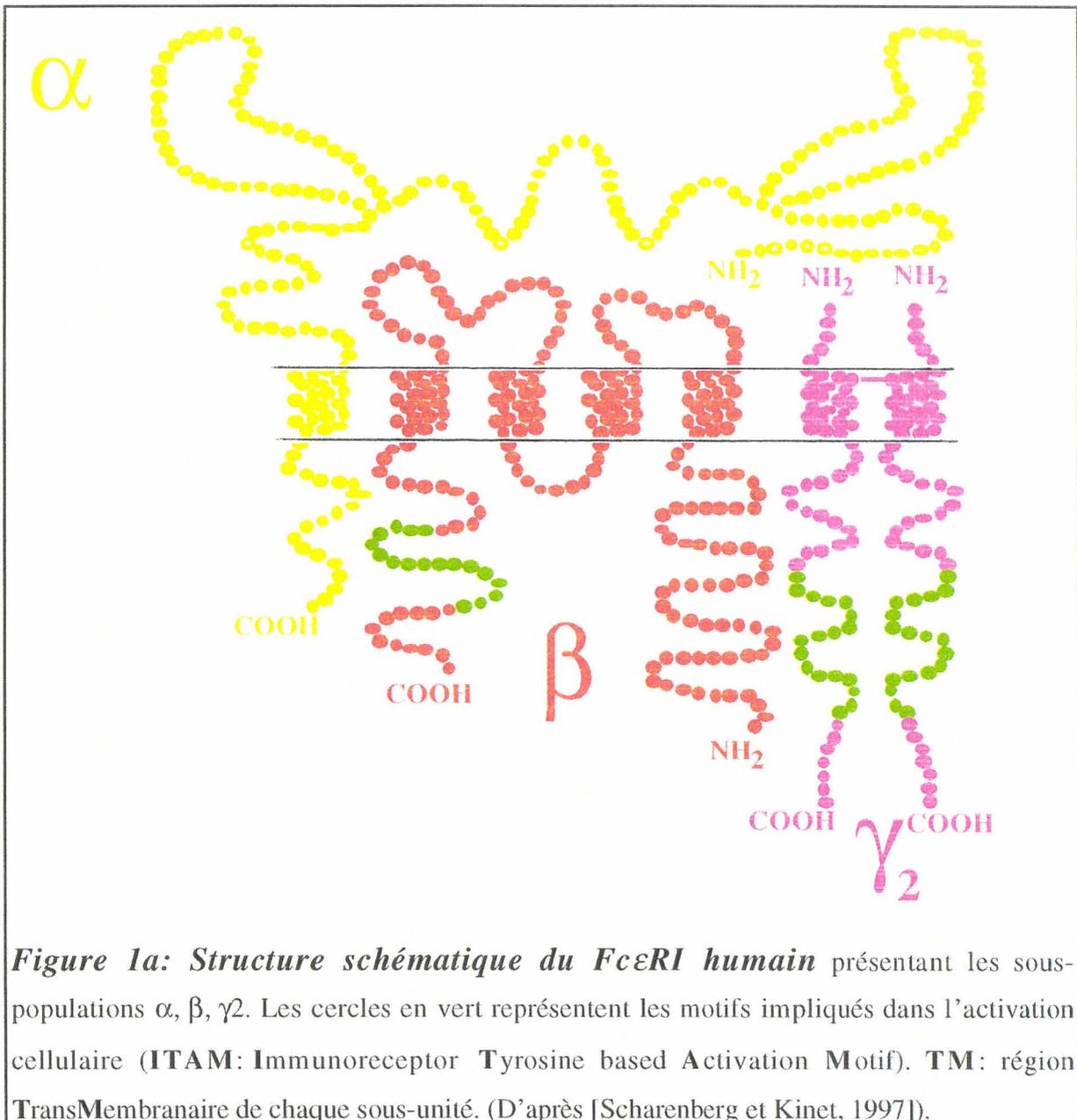
De toutes les classes d'immunoglobulines, l'IgE est celle dont la compréhension du rôle biologique a été la plus enrichie au cours des dernières années. Elle a un rôle protecteur dans le cas des maladies parasitaires et une fonction néfaste dans les maladies allergiques [Dessaint, 1993]. L'IgE est présente chez les sujets sains en quantité infime. Cependant, les sujets atopiques ont généralement une réponse IgE élevée et persistante et en présence d'une stimulation allergénique, développent des IgE spécifiques d'allergène. Une nouvelle exposition à l'allergène provoquera chez ces sujets une réponse plus intense et persistante. Les causes de la production exagérée d'IgE chez les patients allergiques restent mal connues. Citons l'importance du terrain génétique (antécédents familiaux) et des facteurs environnementaux (nature de l'allergène, dose et fréquence d'exposition à l'allergène). La durée de demi-vie de l'IgE est de 2 à 3 jours dans le sérum et de plusieurs mois quand les IgE sont fixées à la surface des cellules porteuses de récepteurs spécifiques.

#### **2.1.1- Les récepteurs de l'IgE (Figures 1a, 1b)**

L'IgE (anticorps cytophile) exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire de récepteurs membranaires au niveau de différentes populations cellulaires

cibles. En effet, ces récepteurs possèdent une certaine affinité pour la chaîne lourde des IgE (le fragment Fc $\epsilon$ ) et sont appelés le Fc $\epsilon$ RI (récepteur de forte affinité pour l'IgE) et le Fc $\epsilon$ RII (récepteur de faible affinité pour l'IgE). Un troisième récepteur peut également fixer l'IgE, il s'agit d'une glycoprotéine de la famille des lectines appelée IgE-BP (binding protein) ou Mac-2. La liaison de l'IgE avec le Fc $\epsilon$ RI est une caractéristique essentielle de l'inflammation allergique.

\* **Le Fc $\epsilon$ RI** est un complexe tétramérique monovalent d'environ 80 kDa formé de 3 chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  et qui fixe exclusivement l'IgE (Figure 1a).



La partie extracellulaire de la chaîne  $\alpha$  est constituée de deux domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  organisés à la manière des immunoglobulines, la chaîne  $\beta$  comporte 4 domaines transmembranaires et les chaînes  $\gamma$  forment un homodimère uni par deux ponts disulfures. Le tétramère  $\alpha\beta\gamma 2$  présente donc sept domaines transmembranaires. La chaîne  $\alpha$  lie l'IgE avec une très forte affinité tandis que les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  sont impliquées dans la transduction du signal [Bonney, 1993a]. Ce récepteur de très forte affinité pour l'IgE est exprimé classiquement à la surface des basophiles et des mastocytes [Ishizaka, 1970, Tomioka, 1971], des cellules de Langerhans [Bieber, 1992a], des éosinophiles [Gounni, 1994], des monocytes [Maurer, 1994], des cellules dendritiques [Maurer, 1996] et récemment, ce récepteur a été démontré à la surface des plaquettes [Joseph, 1997]. La présence de ce récepteur à la surface de ces populations cellulaires amène à reconsidérer la physiopathologie de la réaction allergique d'hypersensibilité immédiate. Ainsi, dans les maladies allergiques, la mobilisation de ce récepteur au niveau des basophiles induit le relargage de médiateurs intervenant dans les étapes précoces de l'hypersensibilité immédiate de type I, incluant les prostaglandines, les leucotriènes ainsi que les cytokines et les chimiokines qui ont un rôle dans la régulation de la réaction immune [Kulmburg, 1992, Wodnar Filipowicz, 1989]. Le cross linking de Fc $\epsilon$ RI induit la production et l'expression d'ARNm codant pour les cytokines de type Th-2 et plus particulièrement l'IL-4 [Plaut, 1989, Wodnar Filipowicz, 1989]. Des travaux effectués aussi bien chez l'homme que chez la souris, ont montré que des cellules non-T et non-B et exprimant le Fc $\epsilon$ RI peuvent produire telles cytokines. Au niveau des monocytes, Maurer a démontré la présence ainsi que la surexpression de Fc $\epsilon$ RI chez les sujets allergiques, cependant, seules les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  ont été détectées dans le monocyte, la chaîne  $\beta$  n'ayant pas été mise en évidence. Malgré cela, le Fc $\epsilon$ RI apparaît fonctionnel sur le monocyte puisque le cross linking du Fc $\epsilon$ RI induit un flux calcique [Maurer, 1994] et une sécrétion de PGE2 [Takenaka, 1995]. Au niveau des éosinophiles, une étude récente a rapporté une diminution de l'expression protéique de Fc $\epsilon$ RI par les éosinophiles, sous l'effet de l'IL-4, l'IL-5, IFN- $\gamma$  et du CD23s [Capron, 1997]. Au niveau des plaquettes, la mobilisation de Fc $\epsilon$ RI est inhibée par le CD23s et les Ac anti-CD23 suggérant un rôle régulateur négatif du Fc $\epsilon$ RII sur l'expression de Fc $\epsilon$ RI.

L'expression de Fc $\epsilon$ RI sur les leucocytes humains a été mise en évidence en cas d'atopie, d'asthme et de rhinite allergiques (revue dans [Grant, 1997]). En effet, au niveau des biopsies bronchiques, nasales ainsi que durant la réaction allergique cutanée tardive, le nombre de cellules exprimant le Fc $\epsilon$ RI augmente, suggérant un rôle possible de chacune de

ces cellules dans le développement de l'inflammation dépendante de l'IgE dans l'atopie et l'asthme. De plus, une étude très récente a démontré que l'expression de la chaîne  $\alpha$  du Fc $\epsilon$ RI augmente après stimulation par l'allergène chez des sujets rhinitiques avec une co-localisation de ce récepteur sur les mastocytes, les macrophages, les éosinophiles et les cellules dendritiques [Rajakulasingam, 1997].

#### **\* Fonctions de Fc $\epsilon$ RI**

Le Fc $\epsilon$ RI possède une activité tyrosine kinase qui est augmentée par l'agrégation du récepteur à la membrane cellulaire [Eiseman, 1992]. Des études *in vitro* ont démontré que l'interaction entre l'IgE et le Fc $\epsilon$ RI est médiée par la chaîne  $\alpha$  du récepteur [Blank, 1991, Hakimi, 1990, Riske, 1991]. Cependant, l'expression en surface de Fc $\epsilon$ RI nécessite la présence des 3 sous-unités  $\alpha\beta$  et  $\gamma$  [Blank, 1989, Ra, 1989]. Les deux chaînes  $\gamma$  et  $\beta$  de ce récepteur peuvent être phosphorylées. En effet, l'agrégation de Fc $\epsilon$ RI à la surface des mastocytes initie les modalités de transduction du signal intracellulaire incluant la phosphorylation tyrosine des protéines cellulaires, l'hydrolyse des phosphoinositides, l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Ces signaux sont impliqués dans la libération de médiateurs inflammatoires comme les amines vasoactives, les cytokines et les métabolites lipidiques.

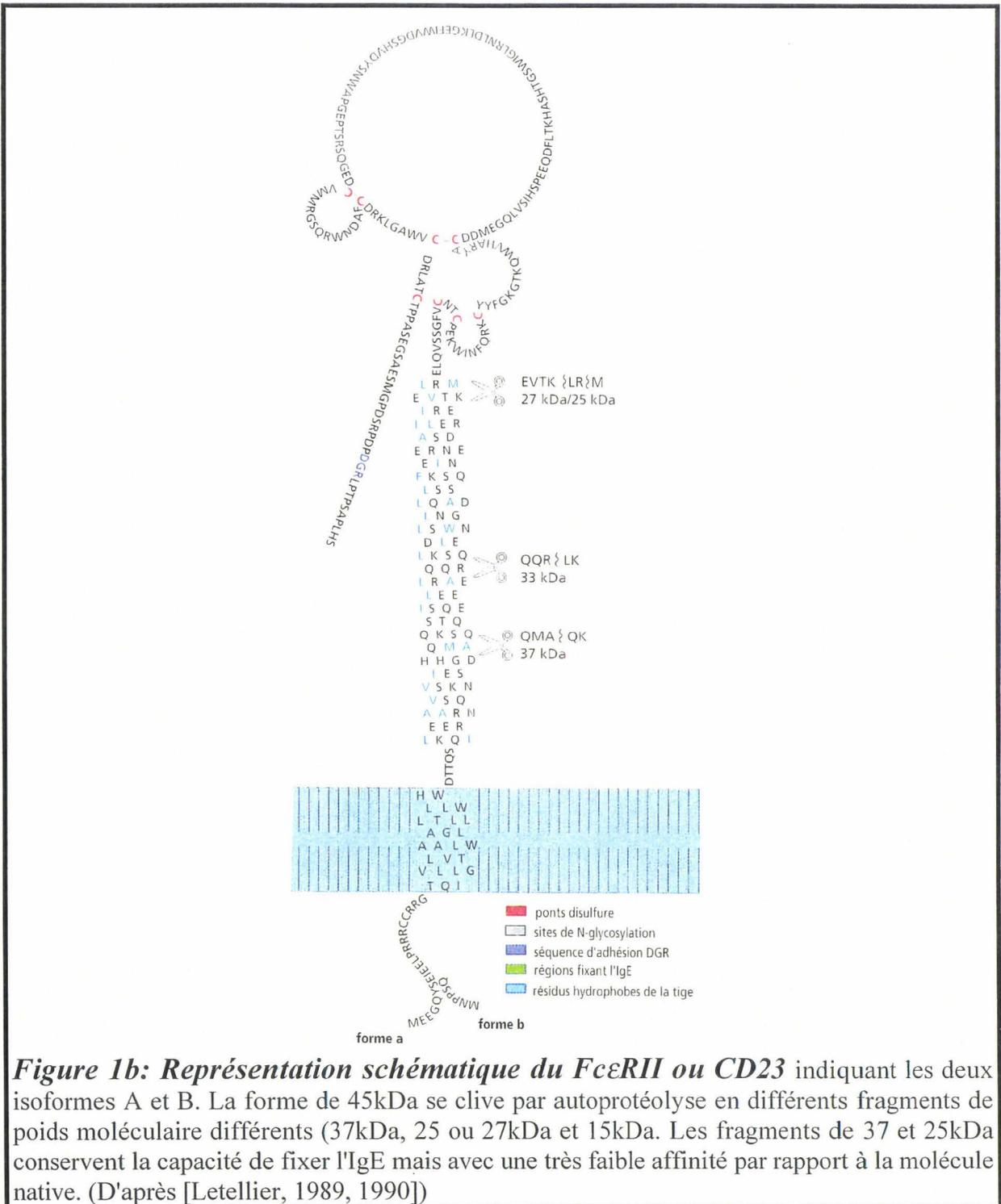
D'un autre côté, il a été récemment décrit que l'expression de Fc $\epsilon$ RI peut être régulée par le Fc $\gamma$ RII [Daëron, 1995a], en effet, une régulation négative de différents récepteurs incluant le Fc $\epsilon$ RI des mastocytes a été récemment observée, elle se révèle liée à la présence d'une séquence particulière dans le domaine intracellulaire de Fc $\gamma$ RII appelée ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif).

Pour étudier la contribution relative de Fc $\epsilon$ RI dans la genèse de l'anaphylaxie *in vivo*, des souris déficientes en Fc $\epsilon$ RI ont été générées. Dombrowicz et al ont démontré que des souris déficientes pour le Fc $\epsilon$ RI expriment un nombre normal de mastocytes mais sont résistantes à l'anaphylaxie cutanée et systémique suggérant que le Fc $\epsilon$ RI est nécessaire à l'initiation des réactions anaphylactiques dépendantes de l'IgE [Dombrowicz, 1993]. Dans une autre étude très récente, des souris knock-out pour le Fc $\epsilon$ RI, après infection avec *schistosoma mansoni* montrent une augmentation de la fibrose hépatique révélant que l'interaction entre l'IgE et son récepteur n'est pas essentielle pour le développement d'une réponse Th-2 ou la résistance à l'infection primaire mais joue un rôle significatif dans la réduction de la pathologie [Jankovic, 1997]. De plus, des souris transgéniques pour la chaîne

$\alpha$  du Fc $\epsilon$ RI ont été générées, révélant que le cross linking de Fc $\epsilon$ RI transgénique avec l'IgE humaine et l'antigène, entraîne l'activation et la dégranulation mastocytaire.

\* **Le Fc $\epsilon$ RII** ou CD23 est une structure transmembranaire de type lectinique (45-50 kDa) [Peterson, 1985], dont il existe deux isoformes A et B qui diffèrent uniquement par leur domaine intracytoplasmique, notamment par leurs 6 acides aminés en N terminal. Il s'agit d'un complexe moléculaire trimérique, trivalent, dont les "têtes" globulaires responsables de la liaison sont supportées par des "tiges" hélicoïdales enroulées sur elles-mêmes. Le CD23 est exprimé à la surface des basophiles et des mastocytes, des monocytes / macrophages [Melewicz, 1980, Pforte, 1990], des lymphocytes T et B [Armitage, 1989, Chen, 1981, Fournier, 1991], des cellules de Langerhans [Bieber, 1989], des cellules NK [Galli, 1982], des éosinophiles [Capron, 1981], des neutrophiles [Truong, 1993a], et des plaquettes [Joseph, 1986]. Les lymphocytes B naïfs n'ont que très peu de CD23 (CD23A) mais les lymphocytes B activés expriment les deux isoformes du CD23 [Yokota, 1988]. Jusqu'à maintenant, c'est l'isoforme B qui est retrouvé à la surface des autres cellules. Le CD23 est exprimé constitutivement à la membrane des cellules dendritiques folliculaires, dans la zone claire apicale du centre germinatif, et donc accessible aux centrocytes issus de la zone claire basale [Johnson, 1986, Masuda, 1989]. Il permet d'impliquer également ces populations cellulaires dans les réactions allergiques dépendantes de l'IgE. Le CD23 peut s'associer à plusieurs molécules telles que le CD21 [Aubry, 1992], à une tyrosine kinase de la famille Src kinases [Maekawa, 1992] et à des molécules HLA-DR [Bonney, 1988a]. Le CD21 est exprimé sur les cellules B, les cellules dendritiques folliculaires et les cellules T. Il peut se lier à différentes molécules, en particulier le C3b inactivé, l'EBV et le CD23. Les sites de liaison de l'IgE et du CD21 se chevauchent sur le CD23, d'où compétition possible entre ces deux molécules. L'IL-4 augmente l'expression de CD21 sur les lymphocytes B activés. Des Ac anti-CD21 et anti-CD23 bloquent l'interaction entre les cellules T et les cellules B [Aubry, 1993], ce qui suggère la possibilité d'interactions engrénant le CD23 des lymphocytes B et le CD21 des lymphocytes T ou *vice versa*. Cette interaction peut avoir d'autres effets indépendamment de la régulation d'IgE. En effet, elle joue un rôle dans la survie des centres germinatifs des cellules B, sur la différenciation des cellules B en plasmocytes [Bonney, 1993b], et sur la production d'histamine par les basophiles après stimulation [Bacon, 1993]. L'administration de Fab d'anticorps anti-CD23 entraîne une inhibition de 90% d'une réponse

IgE chez le rat par blocage des interactions entre le CD23 et ses divers ligands physiologiques [Flores Romo, 1993].



**\* Fonctions de FcεRII / CD23**

Dans les processus allergiques, l'activation de CD23 par l'IgE induit la libération de multiples médiateurs proinflammatoires : des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$ ), des métabolites de l'acide arachidonique et des radicaux libres [Borish, 1991, Dugas, 1995, Gosset, 1992, Joseph, 1980, Paul Eugene, 1992]. En particulier, l'expression du CD23 à la surface des lymphocytes B est due à l'engagement de CD40 par son ligand et à l'action de l'IL-4 ou de l'IL-13 [Banchereau, 1992, Bonnefoy, 1993c, Zurawski, 1994]. Cette action est renforcée par l'IL-2 ou l'IL-5, et inhibée par les interférons (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ ) et le facteur de croissance transformant (TGF- $\beta$ ). Le CD23 joue un rôle dans la présentation de l'Ag aux lymphocytes T. En effet, le CD23 à la surface des lymphocytes B fixe les immuns complexes IgE / Ag, le complexe CD23 / IgE / Ag est internalisé, l'Ag est transformé en peptides et présenté aux lymphocytes T [Mudde, 1990]. Ces cellules T vont induire la production d'IgE par les B [Mudde, 1995]. Différentes études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que le blocage de CD23 par un anticorps monoclonal inhibe la production d'IgE [Heyman, 1993, Sarfati, 1988a, Sherr, 1989].

Les voies de transduction du signal de CD23 varient selon le degré de maturité et le type cellulaire. Ainsi, chez les monocytes / macrophages la mise en fonctionnement du CD23 est suivie d'une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) mais non d'une production d'inositol phosphates. Par contre, chez les lymphocytes B, la liaison de CD23 et d'un anti-CD23 provoque la mobilisation du calcium intracellulaire, l'hydrolyse des phosphoinositides et l'augmentation de l'AMPc intracytosolique [Kolb, 1993, Paul Eugene, 1992]. La stimulation des monocytes humains par un complexe IgE-allergène provoque l'augmentation rapide de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) [Paul Eugene, 1995a]. L'augmentation de la GMPc précède celle de l'AMPc et serait secondaire à une mise en activité d'une NO synthase responsable d'une production de monoxyde d'azote [Kolb, 1994]. La stimulation de CD23 induit une activation du facteur nucléaire-kB et des proto-oncogènes (c-myc et c-jun). Par contre, elle bloque l'expression de c-myb [Ouaaz, 1994].

Chez les souris transgéniques, le CD23 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la synthèse d'IgE. D'un autre côté, des souris déficientes pour le CD23 ont été générées, et il a été démontré que ces souris ne présentent pas de différences concernant le développement des cellules T et B et l'expression de CD21 par comparaison aux souris

contrôles. Ceci suggère l'existence d'autres structures que le CD23 qui lient l'IgE telles le R $\gamma$ R [Takizawa, 1992].

Une fraction soluble dérivant du CD23 membranaire par clivage protéolytique (CD23s de 28 kDa) [Letellier, 1990] semble réguler positivement la production d'IgE [Sarfati, 1988a, Sarfati, 1984] en synergie avec l'IL-4 chez l'homme [Saxon, 1990]. Le relargage de CD23s est induit par l'IL-4 [Bonney, 1988b], augmenté par l'IL-5 et inhibé par l'IFN- $\gamma$  [Pene, 1988a]. Puisque la fixation d'IgE sur le CD23 membranaire stabilise ce dernier et régule négativement le relargage de CD23s [Delespesse, 1989a, Delespesse, 1989b], l'IgE crée une sorte de boucle régulatrice de sa propre production. On peut imaginer que l'altération de ce phénomène régulateur permettrait la production exacerbée d'IgE dans l'allergie chez l'homme.

#### **\* Le récepteur IgE-BP ou Mac-2**

Une glycoprotéine de 29 à 35 kDa de type lectinique, est présente à la surface des basophiles de rat [Liu, 1984], des éosinophiles [Truong, 1993b], des neutrophiles [Truong, 1993a], des cellules de Langerhans [Bieber, 1992b], des mastocytes et des macrophages [Frigeri, 1992, Liu, 1993]. Ce récepteur ne possède pas de portion transmembranaire, et peut être sécrété dans le milieu extracellulaire [Frigeri, 1993]. L'expression de ce récepteur sur les mastocytes et les macrophages peut être augmentée par l'activation des mastocytes à travers le Fc $\epsilon$ RI [Frigeri, 1992]. Chez la souris, il est trouvé en petite quantité sur les macrophages résidents, son expression augmente sur les macrophages provoqués par un stimulus inflammatoire. L'expression de Mac-2 augmente sur les basophiles du rat après l'interaction des récepteurs de haute affinité aux IgE et les complexes immuns IgE-allergène. Le rôle de ce récepteur est encore mal connu. Il pourrait intervenir dans la prolifération ainsi que dans les interactions cellulaires.

#### **2.1.2- Induction et régulation de la synthèse d'IgE**

La spécificité de liaison entre un antigène et une molécule d'immunoglobuline (Ig) est déterminée par l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale des chaînes lourde et légère d'Ig qui est très variable. Par contre, l'extrémité COOH terminale de la chaîne lourde possède une séquence d'acides aminés constante qui détermine les fonctions effectrices de la molécule d'Ig en se fixant aux récepteurs de différents types cellulaires entraînant leur activation.

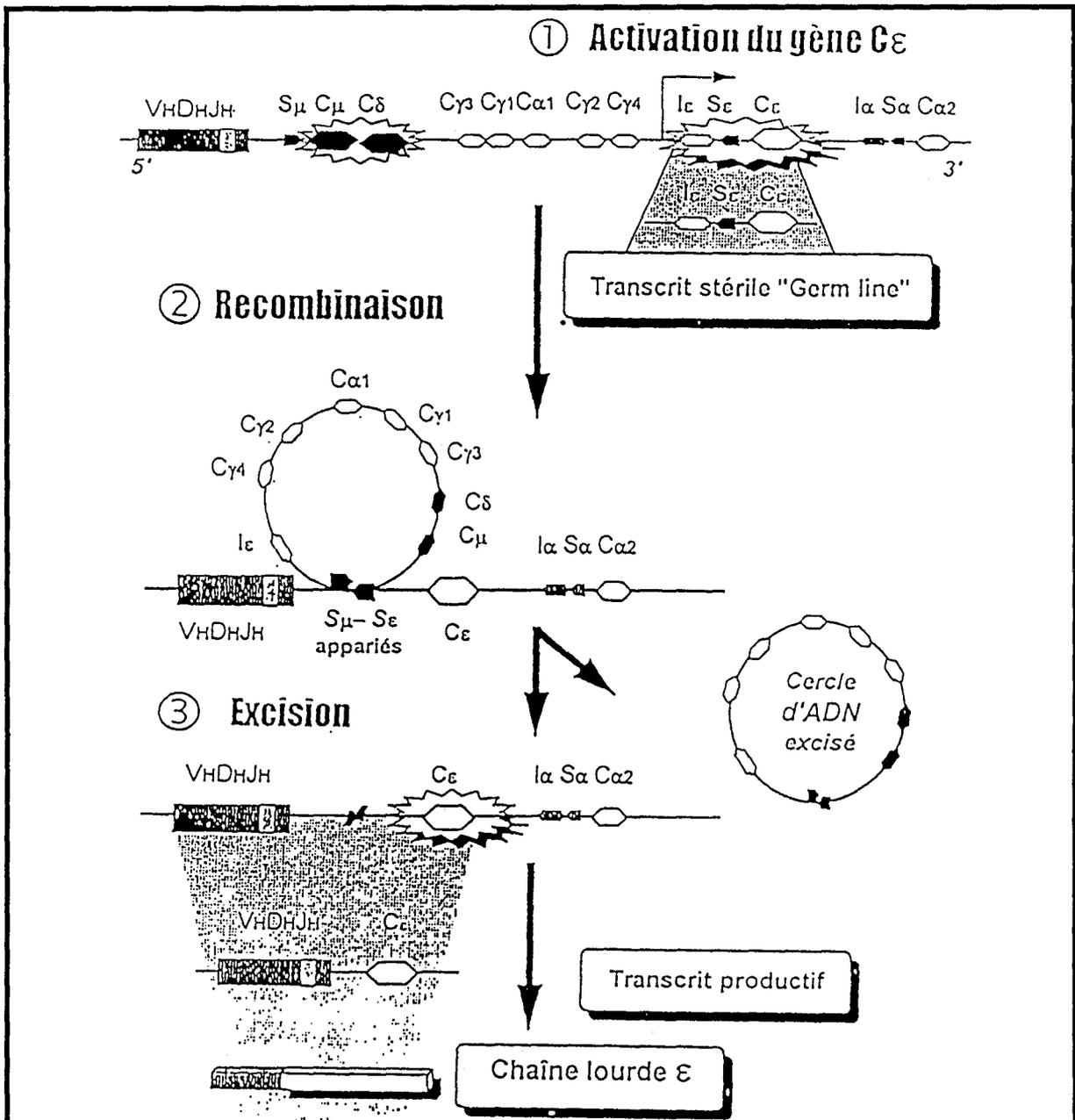
Durant la réponse immune, les lymphocytes B expriment différents isotopes de chaîne lourde qui se substituent à la chaîne  $\mu$  tout en conservant la même région variable (VDJ). La commutation de classe "switch" a lieu en seconde moitié de réponse primaire et se produit lors de l'initiation des réponses secondaires. La commutation isotypique est l'apanage des réponses anticorps thymo-dépendantes, ce qui suggère le rôle crucial des cellules T inductrices (T helper). En plus, il permet à un clone cellulaire B de produire des Ac qui retiennent la spécificité de la région variable en association à un gène de région  $C_H$  différente avec des fonctions effectrices différentes.

**\* La commutation isotypique**

Les domaines variables et constants des chaînes lourdes d'immunoglobulines sont codés par des gènes distincts. Le phénomène de commutation isotypique se déroule normalement dans l'ordre des gènes sur le chromosome. Sur le chromosome 14, les 9 gènes constants  $C_H$  correspondant aux isotopes de chaîne lourde, sont regroupés en aval du gène réarrangé codant pour le domaine variable (VDJ) [Hofker, 1989]. Le gène  $C_\mu$  proximal est initialement transcrit lors de l'activation du lymphocyte B naïf donnant naissance aux IgM. Les lymphocytes B mûrs synthétisent des IgM et des IgD possédant la même spécificité Ac. Les ARNm codant pour ces deux molécules sont issus par épissage différentiel d'un même transcrit primaire (VDJ /  $C_\mu$  ou  $C_\delta$ ). Un réarrangement génique supplémentaire est nécessaire à l'expression des autres classes d'immunoglobulines. Cette commutation s'effectue dans des régions de structure particulière dites séquences répétitives (S pour switch), situées en 5' de chaque gène de partie constante de chaîne lourde ( $C_H$ ), à l'exception du gène  $\delta$  ( $C_\delta$ ) [Davis, 1980].

La commutation isotypique permute les segments de gènes codant pour les domaines constants de la chaîne lourde d'Ig par une procédure de recombinaison intrachromosomique qui apparie les séquences du switch (S), en un temps ou parfois par switches successifs [Zhang, 1994] et qui juxtapose le gène  $C_H$  situé en aval à la région VDJ. Les séquences du gène  $C_H$  intermédiaires sont délétées. Ce mécanisme est intempestivement sollicité chez les allergiques pour générer des anticorps de classe IgE vis-à-vis des allergènes de l'environnement. Deux réarrangements de l'ADN sont nécessaires pour la synthèse d'IgE, une recombinaison VDJ (VDJ recombination) indépendante du contact de l'organisme avec l'allergène et une commutation isotypique (switch recombination) contrôlée par les lymphocytes T spécifiques d'allergène après leur contact avec cet allergène [Purkerson,

1992b]. Le gène C $\epsilon$  très distal, est précédé par son promoteur, par un exon initial (I $\epsilon$ ) et par une séquence switch (S $\epsilon$ ), complémentaire de séquences S $H$  homologues localisées en amont des autres gènes C $H$  [Gauchat, 1990]. La commutation de classe procède par trois étapes susceptibles d'être régulées de manière distincte. La commutation se réalise par recombinaison des gènes C $H$ , qui échange le gène C $\mu$  pour assurer la transcription d'un gène C $\epsilon$  distal (figure). La première étape est l'activation du gène C $\epsilon$  distal et sa transcription en un ARNm qui n'est pas traduit (germline ou ARNm stérile de 1,8 Kb) [Gauchat, 1990], car il inclut l'exon initial I $\epsilon$  comportant un codon stop dans les 3 cadres de lecture. L'altération par manipulation génétique du segment d'ADN contenant un exon I $\epsilon$  empêche la commutation vers l'IgE, ce qui montre l'importance de l'étape d'activation transcriptionnelle, dont on pense qu'elle expose la séquence switch S $\epsilon$ , la rendant accessible à la recombinase. En effet, la seconde étape apparie les séquences switch du gène C $\mu$  proximal (S $\mu$ ) et du gène C $\epsilon$  distal activé (S $\epsilon$ ), ce qui forme une boucle avec l'ADN intermédiaire incluant l'exon I $\epsilon$  distal et les gènes C $H$  proximaux. La troisième étape consiste en l'excision de cette boucle et la partie variable déjà réarrangée (VDJ) se trouve transloquée au devant du gène C $\epsilon$  après appariement des séquences S $\mu$  et S $\epsilon$ . Le lymphocyte B synthétise alors un nouvel isotype (E) de chaîne lourde en gardant la spécificité Ac. Un mécanisme d'épissage différentiel rend compte de l'expression des deux formes, membranaires et sécrétées, de l'immunoglobuline E. En effet, chaque locus C $\epsilon$  comprend 4 exons correspondant à chaque domaine constant de l'Ig et deux exons supplémentaires (M1 et M2) qui codent respectivement pour les parties intramembranaire et intracytoplasmique de l'Ig. Selon la voie d'épissage, la forme membranaire de l'Ig ou la forme sécrétée sera synthétisée [Ishida, 1982, Max, 1982]. Le transcrit stérile apparaît avant le transcrit productif (2 Kb) pour lequel l'excision de la boucle d'ADN a emporté l'exon I $\epsilon$ , permettant la synthèse de la chaîne lourde  $\epsilon$  [Zhang, 1994]. Les transcrits stériles sont plus courts que ceux matures (200 à 300 pb) puisque l'exon I est plus court que l'exon VDJ. L'analyse de l'ADN réarrangé et des cercles d'ADN résultant de la recombinaison montre que la commutation vers l'IgE se fait le plus souvent en un temps (commutation directe  $\mu$ - $\epsilon$ ), ou parfois de manière séquentielle, en deux voire en trois temps, avec transcription d'isotypes intermédiaires [Thyphronitis, 1993, van der Stoep, 1994, Zhang, 1994]. Un schéma récapitulatif des trois étapes de la commutation isotypique vers l'IgE est présenté dans la Figure 2.



**Figure 2: Les trois étapes de la commutation isotypique vers l'IgE.** Les gènes constants sont ordonnés de C $\mu$  à C $\alpha$ 2 sur le chromosome 14. Le gène C $\epsilon$  est proche de C $\gamma$ 4 et C $\alpha$ 2. Hormis C $\delta$ , les gènes constants sont précédés par une séquence switch de longueur variable (seuls S $\mu$ , S $\epsilon$  et S $\alpha$ 2 sont représentées ici). L'appariement entre la séquence S $\epsilon$  et la séquence S $\mu$  proximale forme une boucle dont l'excision entraîne la perte de l'ADN intermédiaire et assure la jonction du gène C $\epsilon$  au gène variable (V<sub>H</sub>D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>). Le choix du gène C $\epsilon$  est dicté par son activation transcriptionnelle, à l'origine d'un transcrit stérile, car l'exon initial I $\epsilon$  inclut un codon stop. L'exon I $\epsilon$  est éliminé par la recombinaison, si bien que le transcrit final est productif, codant pour la chaîne lourde  $\epsilon$ . (D'après [Dessaint, 1995])

**\* *Les centres germinatifs du follicule lymphoïde, sites de la commutation de classe***

Les plasmocytes qui se développent en situation extra-folliculaire ne produisent que des IgM. Dans les follicules lymphoïdes convergent l'Ag et les lymphocytes T et B spécifiques, donnant naissance aux centres germinatifs. Dans la zone sombre, les cellules B se dépouillent de leurs Ig membranaires et prolifèrent avant de migrer vers la zone claire, basale puis apicale. C'est au niveau de la zone claire du centre germinatif que la commutation isotypique se révèle par la réexpression à la membrane de la nouvelle classe d'Ig. En cas de commutation vers l'IgE, les lymphocytes B acquièrent des IgE de membrane puis se différencient pour la plupart en pro-plasmocytes qui quittent le centre germinatif pour se domicilier dans la moelle et le revêtement cutané ou muqueux, où ils terminent leur maturation en plasmocytes sécrétant les Ac IgE. D'autres lymphocytes B $\epsilon$  sont des cellules mémoires qui permettront la réponse IgE anamnestique. A toutes les étapes de leur parcours, les cellules B sont ainsi en contact étroit avec les lymphocytes T activés par l'antigène et les cellules dendritiques folliculaires. Ces microenvironnements stratifiés délivrent aux cellules B activées une séquence ordonnée de signaux synergiques, par contact direct et par des cytokines (revue dans [Dessaint, 1995]).

**\* *Signaux nécessaires à la commutation isotypique vers l'IgE***

La commutation isotypique est régulée par des agents mitogènes et des lymphokines. Ces agents peuvent contrôler la commutation en modulant l'accessibilité des régions S spécifiques à une recombinaison commune putative. Dans le cas de l'IgE, la commutation isotypique est initiée par un contact intercellulaire engrenant le CD40 membranaire des lymphocytes B et son ligand (CD40L) présent à la surface des lymphocytes T et orientée vers l'IgE par l'activation préalable du gène C $\epsilon$  en réponse à l'IL-4 ou à moindre degré l'IL-13.

Les 2 signaux nécessaires pour la commutation isotypique vers les IgE sont délivrés aux cellules B par l'intermédiaire des cellules T à travers une série complexe d'interactions. Les cellules B spécifiques d'allergène captent l'antigène par leurs immunoglobulines de surface, l'internalisent, le transforment (processing) en peptides qui sont représentés à la surface des cellules B en association avec les molécules de CMH classe II. La reconnaissance du complexe CMH II / antigène par le récepteur des cellules T (TCR /CD3) conduit à 2 événements cruciaux, d'une part, la sécrétion des lymphokines, en particulier l'IL-4

qui fournit le premier signal pour l'induction des IgE [Vercelli, 1989a] et d'autre part, l'expression du CD40 ligand (CD40L). L'engagement de CD40 / CD40L délivre le deuxième signal qui déclenche la recombinaison switch vers l'IgE [Rousset, 1991a]. D'autres molécules dites accessoires peuvent intervenir dans l'augmentation de la synthèse d'IgE.

Successivement, nous allons présenter les signaux nécessaires pour induire la commutation isotypique vers l'IgE.

### ***Signal 1 : IL-4 et commutation isotypique vers l'IgE***

*In vitro*, il est actuellement bien établi que l'IL-4 est fortement impliquée dans la commutation isotypique vers l'IgE ou l'IgG4 aussi bien chez l'homme que chez la souris [Coffman, 1986, Del Prete, 1988, Gascan, 1991, Lundgren, 1989, Pene, 1988b, Snapper, 1987, Vercelli, 1989c]. Chez l'homme, l'incubation des lymphocytes B avec l'IL-4 recombinante induit le transcrite ARN C $\epsilon$  stérile (2 Kb) mais pas l'ARNm productif P $\epsilon$  de (2,2 Kb) [Gauchat, 1990]. L'IL-4 contrôle la commutation isotypique vers l'IgE en modulant l'accessibilité de la région du switch (S $\epsilon$ ) à une recombinase commune putative. L'IL-4 est donc nécessaire mais pas suffisante pour l'induction de la synthèse d'IgE par les lymphocytes B. Le germline est détectable après 2 jours de culture des cellules B avec l'IL-4, tandis que le productif n'est détectable qu'après 7 jours de culture [Gauchat, 1990]. L'interaction entre l'IL-4 et son récepteur délivre le premier signal pour la commutation isotypique vers l'IgE. L'IL-4 sous sa forme recombinante est capable d'induire la synthèse d'IgE *in vitro*. Un anticorps anti-IL-4 abolit la production d'IgE chez les souris infectées par un parasite [Finkelman, 1986]. *In vivo*, le récepteur pour l'IL-4 existe non seulement à la surface des cellules mais également sous une forme circulante soluble. Le domaine extracellulaire recombinant de ce récepteur bloque la commutation isotypique vers l'IgE en bloquant les interactions IL-4 / IL-4R [Sato, 1993]. Le même résultat a été obtenu en utilisant de l'IL-4 mutante dans laquelle une tyrosine en position 124 a été remplacée par de l'acide aspartique [Kruse, 1992]. La mutation permet de préserver la capacité de liaison au récepteur d'IL-4 mais abolit la capacité à transmettre le signal [Aversa, 1993]. Elle bloque également la synthèse d'IgE et d'IgG4 par les cellules B sIgD<sup>+</sup> cultivées en présence d'anti-CD40 ainsi que l'expression de CD23 sur les cellules B induite par l'IL-4 [Kruse, 1992]. D'autres études sur des souris knockout pour le gène codant pour IL-4 montrent qu'elles sont incapables de produire l'IgE et à un moindre degré de l'IgG1 tandis que la production d'autres isotypes n'est pas affectée [Kuhn, 1991].

### *IL-13 et commutation isotypique vers l'IgE*

L'IL-13 induit la synthèse d'IgE par les CMN ainsi que par les cellules B purifiées cultivées en présence des clones T CD4<sup>+</sup> activés ou leurs membranes [Punnonen, 1993]. En addition, l'IL-13 induit la prolifération des cellules B et la différenciation en cellules sécrétant l'IgE en présence de CD40L [Cocks, 1993]. Elle induit également la synthèse d'IgG4 et des IgM.

Plus récemment, il a été démontré que l'IL-13 et l'IL-4 partagent plusieurs activités biologiques. Elles inhibent la production des cytokines inflammatoires et des chimiokines par les monocytes [Minty, 1993, Zurawski, 1994], augmentent l'expression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales [Bochner, 1995] et initient la prolifération et l'activation des cellules B humaines [Cocks, 1993, Defrance, 1994, Punnonen, 1993]. L'IL-13 comme l'IL-4 active le gène C $\epsilon$  et la commutation isotypique vers l'IgE [McKenzie, 1993, Zurawski, 1994]. Elle induit une synthèse d'IgE indépendante de l'IL-4. En effet, un Ac neutralisant anti-IL-4 n'inhibe pas la synthèse d'IgE induite par l'IL-13 [Punnonen, 1993]. L'IL-13 agit également sur les monocytes humains et prolonge leur vie [McKenzie, 1993]. En addition, l'IL-13 induit le changement phénotypique et affecte la synthèse de cytokines par les monocytes d'une façon similaire à celle de l'IL-4 [de Waal Malefyt, 1993]. L'IL-13 inhibe la production du TNF- $\alpha$  et d'IL-12 par les monocytes [de Waal Malefyt, 1993], donc favoriserait un profil de type Th-2 [Mosmann, 1989, Zurawski, 1994]. La similitude d'effet avec l'IL-4 est due à l'existence d'une chaîne  $\alpha$  commune au récepteur de l'IL-4 et de l'IL-13 et de facteurs de transcription communs dans le lymphocyte B [Callard, 1996, He, 1995, Zurawski, 1993]. L'IL-13 n'a pas d'effet sur les lymphocytes T humains et les lymphocytes B et T murins [Zurawski, 1994]. En effet, dans une étude citée précédemment, l'IL-4 mutante [Kruse, 1992] qui se lie fortement à l'IL-4 R $\alpha$  inhibe d'une façon compétitive la liaison de l'IL-4 et de l'IL-13 à leurs récepteurs et bloque l'induction de la réponse IgE par ces deux cytokines [Aversa, 1993, Zurawski, 1993].

### *Signal 2 : Interactions CD40 / CD40L*

La glycoprotéine de la classe de différenciation (CD) 40 (50 kDa) est un constituant normal de la membrane des lymphocytes B. Il constitue un membre de la superfamille des récepteurs du TNF. Elle est également exprimée par les monocytes activés par des cytokines et les cellules dendritiques folliculaires, les cellules épithéliales mais pas par les cellules T (revue dans [Banchereau, 1994]). Les lymphocytes T expriment la protéine

complémentaire de CD40 ou ligand de CD40 (CD40L). Le CD40L est une glycoprotéine membranaire (de 261 acides aminés) exprimée de manière transitoire à la surface des cellules T activées [Armitage, 1992], des basophiles et des mastocytes [Gauchat, 1993] et d'une façon constitutive à la surface des éosinophiles [Gauchat, 1995]. Expérimentalement, on savait que l'initiation de la commutation de classe nécessite le contact avec des lymphocytes T activés ou leurs préparations membranaires. Ce signal est mimé par des Ac monoclonaux anti-CD40 qui empêchent les cellules B activées de mourir par apoptose [Tsubata, 1993] et génèrent des transcrits stériles de différents isotypes. L'interaction CD40 / CD40L délivre le deuxième signal nécessaire à la production d'IgE par les cellules B. En effet, les cellules transfectées avec le CD40L induisent la synthèse d'IgE en présence de l'IL-4 tandis que la protéine de fusion soluble CD40-Ig inhibe cette synthèse dans les CMN humaines [Fanslow, 1992]. La relevance du couple CD40 / CD40L est solidement étayée *in vivo* par l'étude du syndrome hyper IgM, un déficit immunitaire primitif caractérisé par l'absence des centres germinatifs et un déficit des autres classes d'Ig, anomalies liées à l'incapacité des lymphocytes T activés à exprimer le ligand du CD40. Ceci révèle le rôle crucial de l'engrènement CD40-CD40L pour l'initiation de la commutation isotypique [Fuleihan, 1993]. Le CD40L peut être exprimé par les cellules T  $\gamma/\delta$  et  $\alpha/\beta$  activées [Horner, 1995]. Les cellules T  $\alpha/\beta$  sont plus efficaces que les T  $\gamma/\delta$  dans l'induction de la synthèse d'IgE, et ceci à cause de l'expression plus forte de CD40L sur les T  $\alpha/\beta$  que sur les T  $\gamma/\delta$ . Les cellules T  $\gamma/\delta$  peuvent induire la synthèse d'IgE *in vitro* en présence de l'IL-4 exogène. Wen et al ont démontré que chez la souris déficiente congénitalement en T  $\alpha/\beta$ , les cellules B produisent des Ig de tous les isotypes avec des niveaux élevés d'IgE et d'IgG, suggérant que les T  $\gamma/\delta$  peuvent diriger la commutation isotypique *in vivo* [Wen, 1994]. Le rôle potentiel des T  $\gamma/\delta$  dans l'induction de la synthèse d'IgE est confirmé dans une autre étude où les T  $\gamma/\delta$  sont montrés capables de distinguer précocément dans l'infection entre les agents pathogènes induisant une réponse Th-1 ou Th-2. Les cytokines produites par les T  $\gamma/\delta$  peuvent aider à l'élimination directe de ces agents pathogènes et contribuent à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en Th-1 ou Th-2 [Ferrick, 1995]. Par contre, Mc Menamin et al ont démontré une inhibition de la synthèse d'IgE médiée par les T  $\gamma/\delta$  et ceci après inhalation de l'antigène. Ces cellules T  $\gamma/\delta$  stimulées *in vitro* avec l'antigène spécifique produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  [McMenamin, 1994]. Donc, le rôle des T  $\gamma/\delta$  dans la régulation de la réponse IgE est différent selon le modèle étudié.

Certaines études ont démontré que le contact entre les T et les B par d'autres interactions que le TCR et le CMH / Ag peut également induire la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 [Parronchi, 1990]. D'un autre côté, il existe des activateurs des lymphocytes B pour la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 et ceci indépendamment des lymphocytes T. En effet, la stimulation avec l'IL-4 et l'EBV induit la synthèse d'IgE par les cellules B humaines d'une façon indépendante des T [Jabara, 1990a, Thyphronitis, 1989]. La costimulation des cellules B purifiées avec IL-4 recombinante et l'Ac monoclonal anti-CD40 induit la synthèse des taux élevés d'IgE chez les non-atopiques tandis que chez les atopiques, le CD40 seul pourrait augmenter la production d'IgE, ce qui reflète l'exposition à l'IL-4 *in vivo* [Jabara, 1990b, Zhang, 1991]. Les glucocorticoïdes ont des effets complexes sur la production d'IgE. L'hydrocortisone augmente la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 par les CMN normales [Wu, 1991] mais inhibe l'expression de CD23. De plus, il a été démontré que les lymphocytes B (exprimant les IgE à leur surface) dérivés de sujets non-atopiques produisent de l'IgE après stimulation par l'hydrocortisone et l'IL-4 recombinante [Jabara, 1991]. Ces différentes observations *in vitro* fournissent une base immunologique aux observations *in vivo* montrant que les patients atopiques possèdent des taux élevés d'IgE sériques durant les 2 premières semaines après une thérapie systémique aux stéroïdes [Hiratsuka, 1996].

### ***Régulation de la réponse IgE***

Différents travaux ont montré que des molécules accessoires (telles que CD28 / CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2), CD23 / CD21, LFA-1 / ICAM-1, CD2 / CD58) participaient aux interactions B / T conduisant à la synthèse d'IgE.

Le couple CD28 / CD80, CD86 joue un rôle majeur dans ces interactions comme démontré chez des souris knockout CD28 où il y a une diminution des niveaux de base d'Ig ainsi qu'une baisse de commutation de classe après infection virale (par exemple le virus de la stomatite vésiculaire) [Shahinian, 1993]. L'engagement de CD40 entraîne l'expression de B7 / BB1 sur les cellules B [Ranheim, 1993]. D'un autre côté, l'engagement de CD28 entraîne l'augmentation de l'expression du CD40L sur les cellules T ainsi que la sécrétion de l'IL-4 [Klaus, 1994] et la différenciation Th-2, en particulier quand la molécule B7.2 est impliquée dans la costimulation [Freeman, 1995, King, 1995b]. Une étude récente a montré que la synthèse d'IgE est inhibée par l'Ac anti-CD28 bloquant [Life, 1995]. Concernant les autres molécules accessoires, les interactions entre l'ICAM-1/LFA-1 et entre CMH II/TCR complètent l'aide aux cellules B

fournie par le couple CD40/CD40L [Poudrier, 1994]. Par contre, l'engagement de CD58 semble indépendant du modèle CD40 [Diaz Sanchez, 1994].

La synthèse d'IgE peut être induite indirectement par l'interaction entre le CD21 (récepteur du complément C3a et de l'EBV) [Aubry, 1992] et le CD23 qui sont exprimés à la surface des cellules T et B respectivement. L'IL-4 module positivement l'expression du CD23 par les cellules B [de Vries, 1991]. Après la commutation isotypique vers l'IgE, l'interaction entre le CD23 et le CD21 intervient dans la réponse IgE. Le CD23 réalise sur le lymphocyte B un pontage des IgE membranaires et du CD21, entraînant l'activation des cellules B $\epsilon$ . Le pontage peut être réalisé soit par le CD23 membranaire soit par le CD23 soluble. Le CD23 soluble ou des Ac anti-CD21 peuvent se substituer aux cellules T pour permettre la production d'IgE en présence d'interleukines appropriées (IL-4 et IL-13) [Bonnefoy, 1993c]. Les IgE peuvent se fixer au Fc $\epsilon$ RII sous forme de complexes immuns, protégeant de la sorte le récepteur vis-à-vis de la protéolyse et peut bloquer son interaction avec le CD21 ou les IgE de la membrane des lymphocytes B $\epsilon$ , d'où l'effet inhibiteur des complexes immuns à IgE sur la synthèse de l'IgE (boucle de feed-back négatif).

De plus de nombreuses cytokines modulent cette production d'IgE induite par l'IL-4. Une inhibition de la synthèse a été décrite par les interférons (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) [Pene, 1988b], l'IL-8 [Kimata, 1992], l'IL-12 [Kiniwa, 1992], le TGF- $\beta$  [Gauchat, 1992] et l'IL-10 [Punnonen, 1993a]. Inversement, l'IL-2 [Miyajima, 1991], l'IL-5 [Pene, 1988a], l'IL-6 [Vercelli, 1989b] et le TNF- $\alpha$  [Gauchat, 1992] augmentent cette production. La PGE2 augmente la synthèse d'IgE stimulée par l'IL-4 [Ohmori, 1990], tandis qu'en présence d'Ac anti-CD40 comme signal costimulateur, l'inhibe [Armerding, 1993a].

Très récemment, il a été démontré que la régulation de la transcription de l'ARNm stérile codant pour l'IgE (le germline) pourrait s'effectuer par la BSAP (B-Cell-Specific Activator Protein) [De Monte, 1997]. Cette protéine est spécifique des cellules B, en effet, elle est exprimée dans les cellules pro-B, pré-B et les B matures [Adams, 1992]. Ainsi, des souris knock out BSAP montrent un blocage de la différenciation des cellules B [Urbanek, 1994]. Des sites de liaison de cette protéine sont localisés en aval des séquences S responsables de la commutation isotypique au niveau du gène de la chaîne lourde d'Ig. La BSAP pourrait réguler l'activité du promoteur du gène humain mais pas sa répression. Parmi les facteurs de transcription, seule la BSAP régule l'expression du germline parce qu'elle intervient

dans l'intersection des deux signaux (l'IL-4 et le CD40) nécessaires à la commutation isotypique et à la synthèse d'IgE.

Les cellules T CD8 interviennent également dans la régulation de la synthèse d'IgE. Les CD8 peuvent produire de l'IL-4, exprimer le CD40L et se substituer *in vitro* aux cellules CD4 pour aider à la production d'IgE. Mais les cellules T CD8 peuvent produire également de l'IFN- $\gamma$  [Paliard, 1988a] et par conséquent, exercer une fonction suppressive sur la réponse IgE. En effet, dans le syndrome hyper IgE, il a été démontré que les cellules T CD8<sup>+</sup> sont capables d'inhiber la transcription du gène C $\epsilon$  [Claasen, 1991]. Kemeny et al se sont intéressés à l'étude du rôle des cellules T CD8<sup>+</sup> dans la régulation de la synthèse d'IgE. Ils ont démontré que chez le rat, la déplétion des T CD8<sup>+</sup> avant l'immunisation avec de l'OVA inhibe la réponse IgE tandis que la déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> après immunisation entraîne une augmentation de production d'IgE. L'inhibition de la production d'IgE suggère l'existence de plusieurs types de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> régulatrices. De plus, ceci a été confirmé par l'observation que les cellules T CD8<sup>+</sup> inhibent la différenciation des T CD4<sup>+</sup> Th-1 et Th-2 ainsi que la prolifération des T CD4<sup>+</sup> induite par l'IL-4 mais pas par l'IL-2 [Kemeny, 1995]. McMenamin et al ont démontré que la réponse immune à l'OVA chez des animaux présentant de faibles taux d'IgE comporte des cellules T CD8<sup>+</sup> [McMenamin, 1993].

Les mastocytes ou les basophiles infiltrant les tissus lors de la réaction allergique tardive peuvent sécréter diverses cytokines, parmi lesquelles l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  [Arock, 1993]. Les mastocytes représentent une des sources cellulaires de cytokines détectables dans les tissus exposés à l'allergène chez les sujets atopiques [Bradding, 1993]. Ces cytokines peuvent aider les lymphocytes T mémoires à se différencier en Th-2 qui sont dépendantes de l'IL-4, et les lymphocytes B proches à sécréter localement des IgE. Donc, les basophiles et les mastocytes sécrétant l'IL-4, l'IL-13 [Burd, 1995, Li, 1996, Ochensberger, 1996, Schroeder, 1994a, Schroeder, 1994b], et exprimant le CD40L [Gauchat, 1993] peuvent remplacer les cellules T et fournir les 2 signaux nécessaires pour la synthèse d'IgE. En effet, les mastocytes et les basophiles activés s'avèrent capables d'exprimer le CD21 et le CD40L, ils fournissent directement aux lymphocytes B l'aide par contact qui complète l'aide fournie par la sécrétion IgE-dépendante d'IL-4, dans une boucle locale de feed back positif. Cette boucle peut être influencée par d'autres événements localisés, comme le rôle régulateur des

macrophages exprimant le CD23 [Dessaint, 1993] et contre-balançée par la production de cytokines tissulaires inhibitrices comme le TGF- $\beta$ . Donc, cette boucle permet d'évoquer une régulation locale de la production d'IgE qui vient compléter et amplifier la régulation systémique d'aval et pourrait expliquer les manifestations allergiques dans certains territoires de l'organisme.

### II.2.2- Les immunoglobulines d'isotype G4 (IgG4)

les IgG4 apparaissent en réponse secondaire à un antigène et leur taux augmente après une exposition prolongée à l'antigène. Les allergènes et les parasites sont les principales cibles d'Ac d'isotype G4. Chez les atopiques, on observe une proportion plus importante d'IgG4 totales [Gwynn, 1979, Shakib, 1977]. Les IgG4 peuvent jouer différents rôles dans la réaction allergique, ils peuvent être bloquants capables d'entrer en compétition avec l'IgE lors de sa fixation à l'antigène circulant ou sur le Fc $\epsilon$ R à la surface des basophiles/mastocytes [Nakagawa, 1987, Tsai, 1991], ou anaphylactiques capables d'entraîner une activation cellulaire en présence de l'antigène spécifique. Dans ce dernier cas, les IgG4 peuvent sensibiliser les cellules effectrices de la réaction allergique [Nakagawa, 1983] et des anticorps anti-IgG4 sont capables d'induire une histaminolibération [Fagan, 1982, Jimeno, 1992]

A l'inverse de l'IgE, la régulation de la synthèse des IgG4 reste très peu étudiée. Cependant, il est connu que l'IL-4 ainsi que l'IL-13 induisent *in vitro*, un synthèse concomitante d'IgE et d'IgG4 [Ishizaka, 1990, Nusslein, 1990, Punnonen, 1993]. Certains travaux rapportent seulement la sécrétion d'IgG4 [Lundgren, 1989] tandis que d'autres, au contraire, mentionnent la sécrétion d'IgG1, IgG3 et IgG4 qui semblerait corrélée d'une part à l'induction de transcrits stériles  $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$  et  $\gamma 4$  par l'IL-4 seule, et d'autre part à l'induction de cercles  $\gamma 1$ - $\mu$ ,  $\gamma 3$ - $\mu$  et  $\gamma 4$ - $\mu$  après stimulation via le CD40 en présence d'IL-4 [Fujieda, 1995].

Récemment, chez la souris, il a été démontré que certains récepteurs mastocytaires de faible affinité pour l'IgG (Fc $\gamma$ RIIA) provoquent une libération d'histamine et de sérotonine après stimulation, alors que d'autres récepteurs (Fc $\gamma$ RIIB) inhibent la sécrétion de ces mêmes médiateurs induite par la stimulation des Fc $\epsilon$ RI [Daëron, 1995a]. P. Jeannin et al ont mis en évidence une réponse IgG4 spécifique anormale chez les patients allergiques à *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt). En effet, 90 % des patients allergiques ont des taux d'IgG4 spécifiques de Dpt plus élevés que les sujets sains, et 40% de ces patients ont des IgG4 anti-allergènes non relevants [Jeannin, 1994]. Le rôle des IgG4 dans la réaction allergique et la raison de leur production augmentée restent mal connus.

## **II.3- Un réseau complexe de cellules effectrices**

Les cellules impliquées dans l'hypersensibilité sécrètent des molécules qui permettent la communication des cellules entre elles et l'amplification ou le freinage de toutes les fonctions cellulaires mises en jeu dans ces réactions. Dans cette section, nous allons présenter les cellules et les médiateurs responsables des manifestations observées.

### **II.3.1- Les basophiles et les mastocytes**

Ces cellules ont un rôle "starter" dans les réactions d'hypersensibilité immédiate dépendantes de l'IgE parce qu'elles sont les premières cellules à entrer en contact avec l'allergène. Elles portent à leur surface des récepteurs de haute et de faible affinité pour l'IgE : le FcεRI et le FcεRII respectivement. Les basophiles sont des cellules circulantes tandis que les mastocytes sont exclusivement tissulaires. La population mastocytaire est hétérogène [Irani, 1989], on distingue les mastocytes désignés MC<sub>TC</sub> (contenant des protéases telles la tryptase, chymase, cathepsine G et carboxypeptidase) et MC<sub>T</sub> (contenant uniquement de la tryptase). Les MC<sub>TC</sub> sont localisés sous les épithéliums, dans la peau, les muqueuses gastro-intestinale, nasale et bronchique, tandis que les MC<sub>T</sub> sont insérés dans l'épithélium. L'activation des mastocytes peut être induite par des allergènes liés aux IgE, mais aussi par des substances endogènes telles que la substance P [Hagermark, 1978], les anaphylatoxines du complément (C5a, C3a) [Gorski, 1979], ou bien des substances exogènes histaminolibératrices (HRF).

L'allergène spécifique, une fois introduit dans l'organisme, interagit avec les molécules d'IgE spécifiques fixées sur les récepteurs membranaires des mastocytes. Ces derniers sont activés par pontage des récepteurs FcεRI. L'activation des mastocytes entraîne la libération des médiateurs pharmacologiques dans le foyer de diffusion de l'allergène. On distingue les médiateurs préformés contenus dans les granules sécrétoires des mastocytes et des basophiles et les médiateurs néoformés nécessitant une synthèse à partir de composés de la membrane cellulaire phospholipidique comme les radicaux libres. Après une stimulation prolongée par l'intermédiaire de FcεRI, des cytokines peuvent également être produites (IL-1α, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TNF-α, GM-CSF, IFN-γ) [Burd, 1995, Gordon, 1990, Moller, 1993]. Ces substances actives biologiquement augmentent la perméabilité vasculaire, la contraction des fibres musculaires lisses et le recrutement de cellules inflammatoires. Ainsi la stimulation dépendante de l'IgE des mastocytes pourrait entraîner la prolifération et la différenciation des mastocytes du foyer allergique et moduler les fonctions

des cellules inflammatoires présentes. Ces mastocytes pourraient également intervenir dans la réaction allergique retardée par la libération de facteurs chimiotactiques (ECF-A, NCF-A et la LTB<sub>4</sub>) et de cytokines influençant la mobilisation, l'attraction et l'activation des éosinophiles, monocytes et neutrophiles [Plaut, 1989].

Les mastocytes sont la source majeure de plusieurs cytokines multifonctionnelles. Récemment, les ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-5 ont été démontrés comme exprimés par les mastocytes dans les muqueuses nasales après stimulation allergénique [Ying, 1993, Ying, 1994], tandis que les mastocytes pulmonaires hautement purifiés expriment ceux codant pour l'IL-4, -5, -6, et le TNF- $\alpha$  après activation dépendante de l'IgE en présence de SCF (stem cell factor) [Ohkawara, 1992, Okayama, 1994]. L'IL-8 a été localisée *in situ* au niveau des mastocytes cutanés humains 6h après activation dépendante de l'IgE [Moller, 1993].

Bradding et al ont démontré que les mastocytes MC<sub>T</sub> produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-6, tandis que les MC<sub>TC</sub> produisent de l'IL-4 mais pas d'IL-5 et d'IL-6 [Bradding, 1995].

Les basophiles répondent à un grand nombre d'agonistes comme le FMLP, C5a, C3a, PAF, à différentes chimiokines (IL-8, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, éotaxine, RANTES et MIP-1 $\alpha$ ) [Li, 1996] ainsi qu'à plusieurs facteurs de croissance (IL-3, IL-5, GM-CSF, NGF) qui augmentent les fonctions effectrices notamment la chimiotaxie et la libération des médiateurs.

Les basophiles et les mastocytes comme nous l'avons déjà dit peuvent fournir les 2 signaux nécessaires pour la synthèse d'IgE.

*Grâce à la sécrétion des cytokines et des facteurs chimiotactiques, les basophiles et les mastocytes peuvent participer à la pérennisation de la réaction allergique.*

### **II.3.2- Les éosinophiles**

La présence des éosinophiles dans le sang périphérique est souvent associée à des désordres immunologiques. Initialement, dans les manifestations allergiques, il avait été démontré que les éosinophiles ont un rôle protecteur en inhibant la libération d'histamine et en inactivant les leucotriènes et le PAF [Bass, 1979]. Ultérieurement, différentes études ont montré que les éosinophiles activés pouvaient libérer des médiateurs préformés et néoformés comme les mastocytes et possédaient des activités pro-inflammatoires [Frigas, 1981, Fukuda,

1985]. La présence à leur surface des récepteurs de haute et de faible affinité pour l'IgE ainsi que des récepteurs pour l'IgA sécrétoire (IgAs) font des éosinophiles des cellules de l'allergie à part entière [Capron, 1986, Gounni, 1994, Lamkhieoued, 1995b, Monteiro, 1993]. Les éosinophiles ont été impliqués dans les réactions retardées associées à l'asthme [De Monchy, 1985], et particulièrement à la sévérité de l'asthme [Bousquet, 1990b] et sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines proinflammatoires contribuant à la chronicité de la réaction allergique. Les éosinophiles sont attirés au site inflammatoire par de nombreux facteurs chimioattractants comme le PAF [Wardlaw, 1986], la LTB<sub>4</sub> [Hakansson, 1987] et l'IL-8 et s'accumulent dans la muqueuse bronchique. Lors d'accès aigu, les IgE vont activer les éosinophiles en se fixant à leurs récepteurs de surface de faible et de forte affinité et induire leur dégranulation.

La migration des éosinophiles du sang vers les tissus est contrôlée par un grand nombre de cytokines et de chimiokines. Ainsi, l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sont impliquées dans le recrutement et l'activation des éosinophiles [Broide, 1992, Sullivan, 1996]. Ces cytokines peuvent agir en synergie avec d'autres signaux d'activation aussi bien *in vivo* pour l'IL-5 et l'éotaxine [Collins, 1995] qu'*in vitro* pour l'IL-5 et les complexes immuns [Fujisawa, 1990] et ceci pour induire le recrutement des éosinophiles et la libération de leurs médiateurs granulaires. D'un autre côté, les chimiokines  $\beta$  de type C-C impliquées dans le recrutement tissulaire des éosinophiles médient leurs actions par des récepteurs spécifiques (détaillé dans paragraphe chimiokines). Au niveau du site inflammatoire, les éosinophiles dégranulent et libèrent d'une part des médiateurs lipidiques, ayant des activités bronchoconstrictrices, vasoactives et chimiotactiques et impliqués dans la réaction inflammatoire allergique, comme la LTC<sub>4</sub>, la LTD<sub>4</sub> et le PAF [Lee, 1984], et d'autre part, des protéines basiques cationiques riches en arginine contenues dans leurs granules [Egesten, 1986] telles que la MBP (major basic protein), l'ECP (eosinophil cationic protein), l'EDN (eosinophil-derived neurotoxin) et l'EPO (eosinophil peroxydase). Ces protéines ont des activités cytotoxiques et sont impliquées dans les dommages épithéliaux [Frigas, 1986]. En plus, les éosinophiles peuvent être une source potentielle de cytokines. Ils produisent des chimiokines et des facteurs de croissance (IL-3, IL-5, GM-CSF, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , IL-16, et éotaxine) [Broide, 1992, Costa, 1993, Desreumaux, 1992, Garcia Zepeda, 1996, Kita, 1991, Lim, 1996, Moqbel, 1991], des cytokines impliquées dans l'inflammation (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ ) [Beil, 1993, Braun, 1993, Elovic, 1994, Hamid, 1992, Weller, 1993, Wong, 1991,

Yousefi, 1995] et des cytokines impliquées dans la régulation de la réponse immunitaire (IL-4, IL-2, IL-10 et IFN- $\gamma$ ) [Lamkhioued, 1995a, Levi-Schaffer, 1996, Moqbel, 1995, Nonaka, 1995].

### **II.3.3- Les neutrophiles**

Les neutrophiles ont été impliqués dans les réactions retardées associées à l'asthme [Nagy, 1982]. Chez les sujets atteints de rhinite allergique, la stimulation avec l'allergène spécifique entraîne un afflux de neutrophiles au niveau de la muqueuse nasale bien qu'au niveau de la muqueuse bronchique, leur présence ne soit pas toujours importante [Kay, 1992, Varney, 1992]. Activés, les neutrophiles sont capables de libérer des médiateurs tels que la PGE<sub>2</sub>, la thromboxane (TX), la LTB<sub>4</sub>, la 5-HETE, et le PAF. La LTB<sub>4</sub> constitue un agent autocrine chimiotactique très puissant [O'Byrne, 1985]. Chez l'homme, lors d'un test de provocation allergénique, une activité chimioattractante pour les neutrophiles (NCF) est retrouvée dans les sérums de patients, ainsi qu'une production accrue de médiateurs cytotoxiques.

### **II.3.4- Les phagocytes mononucléés**

Les monocytes et les macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés. Les macrophages dérivent d'un même précurseur hématopoïétique lequel donne naissance aux monocytes qui gagnent les tissus, ils présentent des différences fonctionnelles selon leur lieu de résidence. Dans toutes les réactions immunes, le macrophage intervient par des effets directs (phagocytose, présentation de l'antigène, et cytotoxicité) et par des effets modulateurs de l'ensemble des réactions cellulaires engendrées. Les macrophages alvéolaires sont les mieux étudiés chez l'homme en raison de leur collecte possible par lavage bronchoalvéolaire (LBA). Dans les réactions d'hypersensibilité [Lee, 1992], ils interviennent par la présence à leur surface des récepteurs pour l'IgE. Ces récepteurs permettent la présentation de l'antigène aux cellules B et T et entraînent la sécrétion de médiateurs impliqués dans la régulation des cellules intervenant dans ces réactions et dans la symptomatologie de ces réactions. La présentation de l'Ag aux lymphocytes T est donc une des principales fonctions du macrophage. Cette présentation s'accompagne de la sécrétion d'IL-1, qui d'une part, stimule la sécrétion d'IL-2 par les cellules T et d'autre part, entraîne la prolifération et la maturation des cellules B. L'IL-2 entraîne la maturation des lymphocytes T qui s'activent et sécrètent de l'IL-4, signal essentiel à la sécrétion d'IgE spécifiques par les lymphocytes B. En réponse à l'allergène, les macrophages sécrètent des radicaux libres oxygénés [Cluzel, 1987,

Joseph, 1980, Lee, 1992], des enzymes lysosomiaux ( $\beta$ -glucuronidase) [Dessaint, 1979, Joseph, 1980], du PAF [Arnoux, 1982] et des métabolites de l'acide arachidonique (thromboxane B<sub>2</sub>, le PGF<sub>2</sub>, le LTB<sub>4</sub>, PAF-acéther, ECF, NCF) [Damon, 1987, Gosset, 1984, Joseph, 1983, M'Rini, 1994, M'Rini Puel, 1993, Rankin, 1982, Rouzer, 1982]. Un taux élevé de 5-lipooxygénase et de la cyclooxygénase est observé dans les cellules recueillies dans les liquides de LBA d'asthmatiques [Funk, 1991]. Les métabolites cyclooxygénés peuvent avoir des activités anti-inflammatoires [Goodwin, 1983, Scodras, 1990] et inhibent la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 et l'anti-CD40 [Armerding, 1993a]. Les macrophages alvéolaires sécrètent des cytokines telles que l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  [Gosset, 1992], l'IL-8, le GM-CSF, l'IL-5 [Chanez, 1992]. Les monocytes stimulés par un IgE-anti-IgE sécrètent de l'IL-1 et du TNF- $\alpha$ . Ils sécrètent également, du GM-CSF [Howell, 1989], de l'IL-6, IL-8, IL-10 et du monoxyde d'azote [Mossalayi, 1994]. Alors que les monocytes de sujets allergiques sécrètent l'IL-1 en réponse à l'IgE, leurs macrophages alvéolaires en apparaissent incapables dans les mêmes conditions, et libèrent au contraire un inhibiteur de l'IL-1 [Gosset, 1988], indiquant soit une régulation locale dépendante de l'IgE distincte du contrôle systémique, soit une désactivation *in vivo* des macrophages exposés *in situ* à l'allergène.

### II.3.5- Les plaquettes

A côté de leur rôle dans l'hémostase, les plaquettes sanguines par le biais de leur récepteur de faible [Cines, 1986, Joseph, 1986] et de forte affinité pour l'IgE [Joseph, 1997] participent aux réactions allergiques et sont actuellement considérées comme des cellules effectrices dans les réactions d'hypersensibilité dépendantes de l'IgE [Durham, 1985, Knauer, 1981]. Les plaquettes de patients allergiques ou de sujets sains préincubées avec le sérum d'un patient allergique, libèrent après contact avec l'allergène auquel le patient est sensible (ou avec un Ac anti-IgE), des médiateurs cytotoxiques pour des larves de parasites, ainsi que des radicaux libres [Dessaint, 1991]. Différentes observations suggèrent l'implication des plaquettes dans l'allergie : des plaquettes ont été retrouvées dans le LBA immédiatement après un challenge allergénique et pendant la phase retardée [Metzger, 1985]. De plus, chez le lapin, il avait été démontré qu'après induction d'un choc anaphylactique dépendant de l'IgE, il y a une libération de PAF [McManus, 1979] et qu'une déplétion plaquettaire entraînait une abolition de ce choc anaphylactique [Halonen, 1981]. Chez des patients asthmatiques, des biopsies *post-mortem* ont permis de mettre en évidence de nombreux mégacaryocytes dans les

poumons [Slater, 1985]. Après stimulation par l'allergène, elles relarguent des médiateurs cytotoxiques et des métabolites de l'oxygène (PF4, PAF, HRF).

## **II.4- Lymphocytes T immunorégulateurs**

Les lymphocytes T présentent des récepteurs de surface (TCR) spécialisés dans la reconnaissance de l'antigène. Ces récepteurs sont spécifiques de l'antigène et sont associés au CD3 (marqueur de surface) qui transmet le signal d'activation du TCR à la cellule. Les lymphocytes T aident les lymphocytes B à produire des anticorps.

Les molécules CD4 et CD8 sont exprimées de manière mutuellement exclusive à la surface des lymphocytes T matures. Elles sont présentes à la surface des cellules et sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T. L'antigène est présenté aux lymphocytes T sous la forme de peptides, en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le complexe peptide-CMH est reconnu par le TCR des lymphocytes T. Toutes les cellules de l'organisme présentent à leur surface des molécules de CMH de classe I. Après infection par un agent pathogène, les cellules vont présenter des antigènes du non soi associés à des molécules du CMH I. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> définis comme cytotoxiques vont reconnaître ce complexe antigène-CMH I par le complexe TCR-CD8, et détruisent la cellule pathologique par cytolyse. Les molécules de classe II sont exprimées uniquement à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces cellules captent l'antigène, le transforment (processing), puis le présente sous forme de peptides à leur surface, en association avec les molécules de CMH II aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> produisent par la suite des cytokines qui vont fournir des signaux d'activation à de nombreuses populations cellulaires. Ces populations vont développer des moyens de défense vis-à-vis de l'agression antigénique. Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont appelés des lymphocytes auxiliaires ou T helper car ils induisent des mécanismes effecteurs contre l'antigène.

Dans les situations allergiques dépendantes de l'IgE, les cellules T immunorégulatrices font partie des cellules inflammatoires recrutées au niveau du foyer de diffusion de l'allergène. Stimulées par l'intermédiaire de leur récepteur à l'antigène (TCR), elles vont libérer des substances immunomodulatrices capables d'activer les cellules effectrices. Celles-ci vont à leur tour libérer un certain nombre de médiateurs qui vont contribuer à la pérennisation de l'inflammation et aux dommages tissulaires locaux.

## II.4.1- Concept de polarisation Th-1 / Th-2

### 4.1.1- Sous-populations CD4<sup>+</sup> de profil Th-1 et Th-2 (voir Tableau

4)

Les sous-populations de type Th-1 et Th-2 ont été en premier lieu décrites chez la souris [Cherwinski, 1987, Mosmann, 1986]. En effet, en 1986, Mosmann et coll ont mis en évidence chez la souris deux sous-populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> helper, les Th-1 et les Th-2 identifiables par leur profil des sécrétion de cytokines. Les Th-1 synthétisent [Abehsira Amar, 1992] de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\beta$  tandis que les Th-2 produisent de l'IL-4 de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13. Ces deux sous-populations sécrètent également de l'IL-3 et du GM-CSF et dérivent d'une sous-population commune Th-0 qui sécrète l'ensemble des cytokines précédemment citées. Ces cellules pourraient être des lymphocytes effecteurs à part entière, sécrétant un profil de cytokines non restreint [Kelso, 1991]. Ces différences dans le profil de sécrétion de cytokines engendrent une dichotomie fonctionnelle. En effet, les cytokines de type Th-1, notamment l'IFN- $\gamma$  activent les macrophages et les cellules cytotoxiques et sont impliquées dans les réactions d'hypersensibilité de type retardée (DTH). La coopération cellules B et Th-1 favorise la production d'IgG. A l'inverse, les Th-2 favorisent la différenciation et l'activation des éosinophiles notamment par l'IL-5, la synthèse d'immunoglobulines par l'IL-6 et la commutation isotypique des lymphocytes B vers la synthèse d'IgE par l'IL-4 et l'IL-13 et sont impliquées dans les réactions inflammatoires dépendantes de l'IgE. Ces deux sous-populations s'antagonisent mutuellement, en effet l'IFN- $\gamma$  inhibe la prolifération des cellules Th-2 alors que l'IL-10 et l'IL-4 inhibent la production des cytokines par les cellules Th-1. Ainsi en fonction de la prédominance de l'une ou de l'autre de ces sous-populations, la réponse immunitaire va s'orienter fonctionnellement de façon différente. Citons l'exemple de l'infection à *Leishmania major* où la susceptibilité ou la résistance de différentes souches de souris à l'infection est corrélée à la production de cytokines de type Th-1 ou Th-2 respectivement [Heinzel, 1993, Sadick, 1990].

Chez l'homme, la situation n'est pas aussi tranchée et est plus nuancée que chez la souris, et ce n'est que vers les années 90 qu'a commencé à apparaître la notion d'une certaine polarisation des réponses immunitaires en fonction de la pathologie. L'orientation d'une réponse vers un type Th-1 ou Th-2 dépend d'un grand nombre de facteurs dont nous parlerons plus tard.

**Tableau 4 : Caractéristiques des sous-populations Th-1 / Th-2 humaines.** (D'après [S. Romagnani, 1996])

	<i>Th-1</i>	<i>Th-2</i>
<b>Sécrétion de cytokines</b>		
IFN- $\gamma$	+++	-
TNF- $\beta$	+++	-
IL-2	+++	++
TNF- $\alpha$	+++	++
GM-CSF	+++	++
IL-3	++	+++
IL-10	++	+++
IL-13	+	+++
IL-4	-	+++
IL-5	-	+++
IL-6	-	+++
<b>Hypersensibilité retardée (DTH)</b>		
	+++	-
<b>Collaboration avec les lymphocytes B pour la synthèse d'Ac</b>		
IgE, IgG4	-	+++
IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgA		
<i>rapport T:B faible</i>	+++	++
<i>rapport T:B élevé</i>	-	+++

#### 4.1.2- Sous-populations de profil Th-3 et Tr1

Un profil de type Th-3 a été récemment décrit, notamment, il s'agit de la production du TGF- $\beta$ 1. En effet, chez des patients atteints de sclérose multiple, une maladie auto-immune caractérisée par un profil de type Th-1, l'administration orale de la myéline (contenant de la MBP (myelin basic protein) et de la PLP (protéine protéolipidique)) génère des cellules T dites de type Th-3 sécrétant du TGF- $\beta$ 1 spécifique de la MBP et de la PLP. Ces cellules sont localisées dans les tissus cibles et supprimeraient l'inflammation locale [Fukaura, 1996].

Très récemment, une sous-population de cellules T régulatrices appelée Tr1 a été mise en évidence. Elle est caractérisée par une production élevée d'IL-10 et régule la réponse immune spécifique d'Ag [Groux, 1997b].

#### **4.1.3- Sous-populations CD8<sup>+</sup> : Tc1 et Tc2**

Pendant longtemps, les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sécrétant des cytokines de type Th-1, ont été considérées comme des cellules T CD8<sup>+</sup> Th-1-like. Actuellement, il a été mis en évidence que, comme les cellules CD4<sup>+</sup>, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent être divisés en 2 sous-populations : les Tc1 et les Tc2. Ces deux sous-populations ont été identifiées aussi bien chez l'homme que chez la souris [Coyle, 1995, Croft, 1994, Sad, 1995, Salgame, 1991]. Les Tc1 produisent de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$  tandis que les Tc2 produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10. L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  encourageraient la différenciation des cellules précurseurs en cellules Tc1, tandis que l'IL-4 induirait la génération des cellules Tc2. Il a été démontré qu'une fois la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> en Tc1 ou Tc2 est établie, aucune conversion du profil de sécrétion de cytokines ne pourrait-être produite [Sad, 1995].

Les travaux concernant les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> restent très controversés. Chez des sujets asthmatiques, les T CD8<sup>+</sup> produisent de l'IL-5 et de l'IFN- $\gamma$  [Del Prete, 1993a]. D'un autre côté, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> produisant un profil de cytokines de type 2 (IL-4, IL-5 et pas d'IFN- $\gamma$ ) ont été démontrés au niveau cutané chez des sujets infectés par le VIH [Romagnani, 1994].

#### **II.4.2- Déterminants de la polarisation Th-1 ou Th-2**

En fait, la séparation Th-1 et Th-2 n'est pas aussi simple que cela, et les différents facteurs polarisant la réponse immune vers un profil de type Th-1 ou Th-2 ont été largement étudiés chez la souris et chez l'homme. L'attention a été plus particulièrement portée à l'étude du rôle possible de l'antigène, du TCR, des CPA, des molécules costimulatrices et de l'environnement en cytokines.

##### **4.2.1- Rôle de l'antigène**

Parmi les facteurs de l'environnement, un rôle majeur dans l'induction d'une réponse de type Th-1 ou Th-2 a été attribué à la voie d'administration de l'Ag, sa forme physique, le type d'adjuvant utilisé et la dose de l'antigène. Les allergènes et quelques

antigènes parasitaires induisent préférentiellement une réponse de type Th-2 [Parronchi, 1991]. D'autre part, dans les situations allergiques, il semblerait que la dose de l'allergène pourrait influencer le profil de réponse et ceci en fonction des cytokines produites. Mais les résultats sont très contradictoires. Ainsi, chez l'homme, des études *in vitro*, sur des clones lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> anti-PLA2 dérivés de patients allergiques au venin d'abeille produisent de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  en réponse à de fortes doses d'allergène, tandis que les faibles doses d'allergène induisent uniquement l'IL-4 [Carballido, 1992]. Secrist et al ont démontré que les faibles concentrations d'allergène, en présence des cellules B comme CPA, induisent des taux élevés d'IL-4 [Secrist, 1995]. Par contre, des fortes doses d'allergènes induisent la production de peu ou pas d'IL-4, ceci supporte l'observation que les cellules B présentent avec efficacité l'allergène quand la concentration est faible [Constant, 1995, Lanzavecchia, 1985, Malynn, 1985].

D'un autre côté, l'hypothèse d'une restriction spécifique de CMH de classe II chez les sujets allergiques a été illustrée par Wierenga et al [Wierenga, 1990a]. L'étude de différents allergènes a montré qu'ils présentent de nombreux épitopes T et qu'il y a peu de différences d'utilisation du répertoire T et de la restriction de CMH II entre les sujets allergiques et non allergiques [van Neerven, 1996].

#### 4.2.2- Rôle du récepteur des cellules T (TCR)

Dans le cas de l'antigène parasitaire *Leishmania major*, les TCR sont identiques au niveau des clones Th-1 et Th-2 [Reiner, 1993]. Par contre, l'engagement du TCR et son implication directe dans la polarisation Th-1 / Th-2 ont été précisés par Pfeiffer et al on [Pfeiffer, 1995]. En effet, les complexes peptide / CMH qui se lient fortement et avec une très forte densité au TCR favoriseraient la génération d'une réponse de type Th-1 tandis que ceux qui se lient faiblement favoriseraient une réponse de type Th-2. Dans les situations allergiques, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de *D. pteronyssinus* ou *D. farinae* utilisent un répertoire restreint de gènes variables du récepteur T à l'Ag (V $\alpha$ 8 et V $\beta$ 3 sont dominants malgré les différences de restriction par HLA) et persistent plusieurs années chez l'allergique [Wedderburn, 1993], ce qui renforce l'idée que l'atopique entretient des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> biaisés vers le profil Th-2 et l'aide à la production d'IgE, mais montre aussi combien le répertoire des cellules T vis-à-vis des épitopes potentiels d'un allergène donné est limité. Récemment, Parronchi et al ont démontré *in vitro* chez des sujets rhinitiques allergiques, que la présence de l'IFN- $\alpha$  favoriserait le développement des cellules T spécifiques d'allergène en

clones Th-1 produisant de l'IFN- $\gamma$ . En addition, ces clones T sont spécifiques d'un seul peptide allergénique et présentent un répertoire TCR V $\beta$  restreint (V $\beta$ 2<sup>+</sup>, V $\beta$ 17<sup>+</sup>, V $\beta$ 22<sup>+</sup>) [Parronchi, 1996]. Dans un modèle murin de sensibilisation allergique, il a été démontré *in vivo*, que le développement d'une réaction d'hypersensibilité immédiate est dépendant de la voie de sensibilisation ainsi que de la stimulation de certaines cellules T exprimant le TCR V $\beta$ . Ainsi, des allergènes différents pourraient stimuler des cellules T TCR V $\beta$  différentes avec un modèle différentiel de fonctions effectrices [Renz, 1993].

#### 4.2.3- Rôle des Cellules Présentatrices d'Antigène

Différentes cellules de l'organisme ont le pouvoir de présenter l'antigène, parmi ces cellules, citons les cellules dendritiques (CD), les lymphocytes B, et les macrophages. Mais les cellules Th répondent différemment à l'antigène et ceci en fonction de la cellule qui le présente. Les CD représentent le point primaire du contact entre l'allergène et le système immunitaire [Holt, 1989]. Les patients atopiques et asthmatiques possèdent des quantités plus élevées de CD intra-épithéliales que les sujets non-asthmatiques [Semper, 1996]. Le rôle des CD dans la polarisation Th-2 spécifique d'allergène reste à identifier. Katamura et al ont démontré, *in vivo*, que la PGE2 produite par les CPA comme les CD [Kurland, 1978] et les macrophages [Heinen, 1986] faciliterait la différenciation des T CD4<sup>+</sup> de type Th-2, en cas de stimulation primaire des cellules T naïves [Katamura, 1995, Snijdewint, 1993]. Les cellules de Langerhans expriment à leur surface des récepteurs de forte et de faible affinité [Bieber, 1992a, Bieber, 1989] pour l'IgE, et favoriseraient la différenciation Th-2 [Bieber, 1992a, Bieber, 1989, Hauser, 1989] et seules les cellules dont le récepteur est occupé par l'IgE apparaissent capables de présenter des allergènes d'acariens aux lymphocytes T chez l'eczémateux atopique [Bieber, 1994]. Quand l'Ag est présenté par les cellules B, c'est la dose de l'Ag qui détermine le profil de sécrétion de cytokines [Secrist, 1995]. Les monocytes et les macrophages humains expriment aussi le Fc $\epsilon$ RI et le Fc $\epsilon$ RII, ce qui favorise la capture de l'allergène complexé aux Ac IgE et sa présentation aux lymphocytes T CD4, il y a là une boucle vicieuse où les IgE peuvent favoriser l'emballement de la réponse IgE [van der Heijden, 1993].

#### 4.2.4- Rôle des molécules costimulatrices

Lors de la présentation de l'antigène aux cellules T, différentes molécules de surface du lymphocyte T entrent en contact avec leurs ligands à la surface des CPA,

entraînant une activation des cellules T. Le CD28 est présent à la surface des lymphocytes T [June, 1994], il présente 2 ligands à la surface des CPA, le CD80 (B7.1) et le CD86 (B7.2). Une autre molécule appelée CTLA4 présente à la surface des cellules T peut lier le CD80 et le CD86 [Brunet, 1987]. Le CD86 est exprimé de façon constitutive à la surface des CPA notamment les macrophages et les cellules dendritiques [Lenschow, 1993], il est exprimé fortement par les lymphocytes B après activation [Hathcock, 1994]. Le CD80 est faiblement exprimé par les macrophages et les cellules dendritiques, il est également exprimé par les lymphocytes B [Koulova, 1991]. Ces molécules costimulatrices pourraient intervenir dans l'orientation de la réponse vers un profil de type Th-1 ou Th-2 [Guerder, 1995]. D'un autre côté, le CD86 (B7.2) pourrait activer les lymphocytes de type Th-2 tandis que le CD80 (B7.1) orienterait la réponse vers un profil de type Th-1 [Freeman, 1995]. L'induction préférentielle d'un profil de type Th-1 ou Th-2 par l'activation de CD80 ou CD86 respectivement, a été démontrée *in vivo* dans le cas de la maladie autoimmune (encéphalomyélite allergique) [Kuchroo, 1995]. La différence de profil induite par les 2 molécules CD80 et CD86 pourrait trouver une explication dans le fait qu'elles se fixent sur des régions différentes du CD28 et de CTLA4 [Linsley, 1994].

D'autre part, la relevance de la costimulation notamment par le biais du CD28 et les molécules de la famille B7 sur le développement des cellules Th-2 dans les maladies allergiques a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. L'activation via le CD28 augmente l'expression des ARNm codant pour des cytokines de type Th-1 [Lindstein, 1989] mais également de type Th-2 [de Boer, 1993, Seder, 1994, Walter, 1994] et aide à la synthèse d'IgE [Life, 1995]. Il a été démontré *in vitro*, que la stimulation par de fortes doses de peptide d'acariens induit une abolition de la prolifération des lymphocytes T spécifiques d'allergène qui est associée à une forte baisse de l'expression de CD28 [Lake, 1993]. D'une façon très intéressante, dans un modèle murin, Keane-Myers et al ont démontré que le blocage de l'interaction entre les couples CD28 / CTLA4 et CD86 / CD80 exprimés respectivement sur les CPA et les cellules T [Linsley, 1990], inhibe le développement vers une réponse Th-2 ainsi que la réaction asthmatique [Keane Myers, 1997].

#### **4.2.5- Rôle des cytokines**

L'importance des cytokines dans la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> a été largement illustrée dans un grand nombre d'études. Les principales cytokines impliquées dans la polarisation Th-1 / Th-2 sont les suivantes :

**\* L'IL-4**

Différentes populations cellulaires produisent l'IL-4, notamment les cellules T, les basophiles [Schroeder, 1994a], les mastocytes [Bradding, 1992] et les éosinophiles [Moqbel, 1995]. Plusieurs études effectuées *in vivo* [Gross, 1993, Kopf, 1993] et *in vitro* chez l'homme et chez la souris, ont été consacrées au rôle primordial joué par l'IL-4 dans la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> précurseurs en lymphocytes de type Th-2 [Abehsira Amar, 1992, Seder, 1994, Seder, 1992, Swain, 1990]. Ainsi, chez l'homme, l'IL-4 induit *in vitro* une réponse de type Th-2 en favorisant le développement des clones T (CCT) spécifiques de PPD (purified protein derived) en CCT capables de produire de l'IL-4 et / ou l'IL-5 en addition à l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 [Abehsira Amar, 1992, Maggi, 1992, Seder, 1994, Seder, 1992, Swain, 1990].

D'un autre côté, l'origine cellulaire de l'IL-4 est variée. Puisque les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles sécrètent de l'IL-4, il a été suggéré que l'IL-4 produite par ces cellules non-T pourrait biaiser le développement d'une réponse de type Th-2 spécifique d'allergène. Ces trois types cellulaires expriment le Fc $\epsilon$ RI et la fixation de l'IgE induit la libération de l'IL-4 par les basophiles et les mastocytes *in vitro*. Ces cellules pourraient fournir un signal costimulateur pour la différenciation des cellules T naïves en cellules de type Th-2.

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'IL-4 initie le développement des lymphocytes T naïfs en T effecteurs de type Th-2 ont été étudiés. La fixation des cytokines à leurs récepteurs entraîne la phosphorylation tyrosine des facteurs de transcription et de transduction du signal (STATs). Parmi ceux-ci, le STAT 6 est sélectivement activé par l'IL-4 [Palmer-Crocker, 1996]. En effet, il a été démontré que chez les souris knock out STAT 6, une impossibilité à induire une réponse Th-2 a été observée [Kaplan, 1996b].

Récemment, chez les atopiques, Marsh et al ont reporté la liaison des IgE sériques totales à des marqueurs sur le chromosome 5, en particulier à une région du gène codant pour l'IL-4 humaine [Marsh, 1994]. Ainsi, une relation entre le polymorphisme du promoteur d'IL-4 ainsi que celui des facteurs de transcription correspondants et la prédisposition génétique à l'atopie a été mise en évidence [Rosenwasser, 1995, Song, 1996]. Le proto-oncogène c-maf est un facteur de transcription exprimé dans des clones de type Th-2 mais pas Th-1, il est responsable de l'expression tissulaire de l'IL-4 [Ho, 1996]. En outre, le c-maf agit en synergie avec le facteur nucléaire des cellules T activées (NF-ATp) pour initier la

production d'IL-4 endogène par les cellules B. En effet, des souris knockout NF-ATp montrent une absence de transcription d'IL-4 [Hodge, 1996].

L'IL-13 qui partage plusieurs fonctions biologiques avec l'IL-4 pourrait favoriser une réponse de type Th-2 en diminuant la production de l'IL-12 et de l'IFN- $\alpha$  [de Vries, 1995]. L'IL-4 représente la cytokine la plus importante dans l'induction du profil de type Th-2 d'autant que l'IL-13 n'agit pas sur les cellules T [de Vries, 1996].

#### *\* L'IFN- $\gamma$*

L'IFN- $\gamma$ , cytokine produite essentiellement par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les cellules NK [Sher, 1993, Trinchieri, 1989], et les éosinophiles [Lamkhied, 1995a], elle favoriserait une réponse de type Th-1 et inhiberait le développement d'une réponse de type Th-2 [Gajewski, 1989]. Chez l'homme, elle est considérée comme un facteur majeur d'induction d'un profil de type Th-1 [Maggi, 1992]. En effet, l'IFN- $\gamma$  ou la neutralisation de l'IL-4 permettent la différenciation des CCT spécifiques de Der p I en CCT capables de produire de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  ou de l'IFN- $\gamma$  seul. D'autres études ont démontré que les CMN du sang périphérique en présence d'IFN- $\alpha$  et de TGF- $\beta$  réduisent la production d'IL-4 et d'IL-5 par des lignées cellulaires T spécifiques de seigle [Ricci, 1993]. De plus, il serait possible de suggérer que l'IL-4, l'IFN- $\gamma$ , l'IFN- $\alpha$  et TGF- $\beta$  possèdent des effets régulateurs réciproques sur la différenciation des clones Th-1 et Th-2. Ainsi, l'origine cellulaire de l'IFN- $\gamma$  (les cellules T et les cellules NK), et de l'IFN- $\alpha$  (les macrophages) doit en principe, orienter la réponse vers un profil de type Th-1 en diminuant la réponse de type Th-2.

#### *\* L'IL-10*

Cytokine produite essentiellement par les lymphocytes T, elle est également produite par les lymphocytes B et les macrophages activés par du LPS [Moore, 1990]. Récemment, il a été démontré que l'IL-10 est produite par une sous-population T CD4<sup>+</sup> régulatrice nommée Tr1 [Groux, 1997b]. Chez l'homme, elle est produite par les lymphocytes Th-1 et Th-2, elle possède une activité anti-inflammatoire et inhibe aussi bien les fonctions des cellules de type Th-2 que celles de type Th-1 [Del Prete, 1993b, Yssel, 1992]. Chez l'homme et chez la souris, l'IL-10 inhibe la production de cytokines par les macrophages, en particulier l'IL-12 [D'Andrea, 1993, Murphy, 1994], l'IL-1, le TNF- $\alpha$  et l'IL-10 elle-même [de Waal Malefyt, 1991, Fiorentino, 1991, Fiorentino, 1991, Ralph, 1992]. Elle

est également capable d'inhiber la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T humains, et ceci en supprimant la synthèse d'IL-12 par les CMN activées [D'Andrea, 1993].

#### \* *L'IL-12*

Initialement appelée NK-CSF (Natural Killer Cell Stimulatory Factor), l'IL-12 stimule les cellules NK et induit la production de l'IFN- $\gamma$  par ces cellules, mais également par les cellules T [Chan, 1991]. Cette cytokine, produite par les macrophages et les CD [D'Andrea, 1992, Macatonia, 1995] est un puissant inducteur de cellules de type Th-1 [Hodgson, 1996, Macatonia, 1995, Manetti, 1993, Trinchieri, 1993]. Cependant, il semble que l'IL-12 soit incapable d'induire cette réponse de type Th-1 en absence d'IL-2 [Seder, 1993]. L'action de l'IL-12 sur la prolifération et la production des cytokines par les cellules de type Th-1 se ferait en synergie avec l'activation du CD28 [Kubin, 1994].

De même que pour l'IL-4, les mécanismes moléculaires par lesquels l'IL-12 initie le développement des lymphocytes T naïfs en T effecteurs de type Th-1 ont été étudiés. La fixation de l'IL-12 à son récepteur entraîne sélectivement la phosphorylation tyrosine d'un facteur de transcription et de transduction du signal, le STAT 4 [Bacon, 1995a].

#### \* *IL-6*

Récemment, il a été démontré que l'IL-6 produite par les CPA est capable de polariser les cellules T naïves en cellules de type Th-2 effectrices en induisant la production d'IL-4 par les cellules T CD4<sup>+</sup> [Rincon, 1997]. L'IL-6 serait au niveau des CPA l'équivalent pour la réponse de type Th-2 de l'IL-12 pour la réponse de type Th-1.

#### \* *TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor)*

Le TGF- $\beta$  a également été proposé comme un facteur polarisateur vers une réponse type Th-1 [Swain, 1991], mais les résultats des différentes études restent contradictoires.

#### **4.2.6- Marqueurs de différenciation des cellules T**

Les cellules T qui se polarisent vers un profil de type Th-1 ou Th-2 montrent une expression préférentielle de certains marqueurs d'activation tels que le CD30 (membre de la famille du récepteur de TNF) et le LAG3 (gène 3 d'activation des lymphocytes et membre de la superfamille d'Ig). La costimulation CD30 favorise *in vitro*, une réponse de

type Th-2 spécifique d'antigène tandis que le blocage de l'interaction CD30 avec son ligand exprimé sur les CPA (CD30L) inhibe le développement des cellules T mémoires en Th-2 [Del Prete, 1995]. Les cellules Th-2 CD30<sup>+</sup> sont présentes dans la circulation chez les patients allergiques durant l'exposition à l'allergène saisonnier (revue par [Romagnani, 1994]). Cependant, l'expression de CD30 à la surface des cellules T activées reste controversée. En effet, une étude récente a rapporté l'expression de CD30 sur les cellules T de type Th-0, Th-1 et Th-2 sans relation avec la polarisation Th-1 / Th-2 [Hamann, 1996]. Concernant le LAG3, il est associé aux cellules de type Th-1, son expression est augmentée par l'IFN- $\gamma$  et diminuée par l'IL-4 [Annunziato, 1996].

D'autres marqueurs de différenciation des cellules T sont la chaîne  $\beta$  du récepteur d'IFN- $\gamma$  et la chaîne  $\beta 2$  du récepteur d'IL-12. En effet, d'une part, des clones T de type Th-0 et Th-2 expriment constitutivement à leur surface la chaîne  $\beta$  du récepteur d'IFN- $\gamma$  mais pas les clones de type Th-1. H. Groux et al ont démontré très récemment que les niveaux d'expression de cette chaîne à la surface des clones de type Th-2 sont identiques en présence d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  à ceux observés en présence d'IL-4 seule. Donc, l'IFN- $\gamma$  ne peut pas moduler l'expression de son récepteur [Groux, 1997a]. D'autre part, la chaîne  $\beta 2$  du récepteur d'IL-12 est exprimée à la surface des cellules T de type Th-1 mais pas les cellules T de type Th-2 [Rogge, 1997]. Cette expression est régulée par les cytokines telles que l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  [Szabo, 1997]. En effet, l'IL-4 inhibe l'expression de la chaîne  $\beta 2$  du récepteur d'IL-12 tandis que l'IFN- $\gamma$  maintient cette expression.

D'autre part, il a été rapporté que le CCR3 (récepteur de l'éotaxine) décrit en principe sur les éosinophiles et les basophiles est également exprimé par les cellules T CD4<sup>+</sup> de type Th-2 [Sallusto, 1997].

#### **II.4.3- Les lymphocytes Th-1 et Th-2 en pathologie allergique**

Chez l'homme, la polarisation Th-2 / Th-1 n'est pas aussi bien tranchée que chez la souris. Dans des situations allergiques, un certain nombre d'études effectuées *in vitro* et *in vivo* a pu établir une prédominance préférentielle d'une réponse de type Th-2 [Peltz, 1991]. Ces cellules de type Th-2 jouent donc un rôle très important dans la pathogénèse des maladies allergiques de part leur spectre de cytokines dont le rôle a été détaillé auparavant. L'implication des cellules de type Th-2 en pathologie allergique a été argumentée sur des données *in vitro* et *in vivo*.

### ***IN VITRO***

Les allergènes induisent préférentiellement l'expansion des cellules de type Th-2. En effet, des clones cellulaires T (CCT) CD4<sup>+</sup> spécifiques d'allergène, chez des sujets atopiques ou allergiques, produisent de l'IL-4 et de l'IL-5 après stimulation par l'Ag spécifique et peu ou pas d'IFN- $\gamma$  [Del Prete, 1993a, Ebner, 1995, Maggi, 1991, Parronchi, 1991, Wierenga, 1990a, Wierenga, 1990b, Yssel, 1992]. Ces CCT spécifiques d'allergène et capables de produire l'IL-4 peuvent induire la synthèse d'IgE par les cellules B en présence de l'allergène et dans des conditions restreintes du CMH [Del Prete, 1993a, Parronchi, 1991, Wierenga, 1990a]. D'un autre côté, bien que tous les CCT spécifiques de PPD (protein purified derived) des sujets atopiques et non-atopiques produisent de l'IFN- $\gamma$ , leur production d'IL-4 montre une nette différence entre les deux groupes. En effet, une production d'IL4 et d'IL-5 par des lignées cellulaires T spécifiques de PPD et de streptokinase (SK) est observée chez les atopiques, mais pas chez les non-atopiques [Parronchi, 1992].

Les lymphocytes T du sang périphérique de sujets asthmatiques produisent des cytokines de type Th-2 capables de maintenir la survie des éosinophiles *in vitro*. Cette activité est due à l'IL-3, l'IL-5, et le GM-CSF [Walker, 1991]. Récemment, des clones T obtenus à partir de biopsies bronchiques et nasales de sujets atopiques [Del Prete, 1993a], ont montré une sécrétion de cytokines de type Th-2 après stimulation par l'allergène. Des résultats similaires ont été retrouvés au niveau des clones T dérivés de biopsies cutanées de sujets sensibles aux acariens, produisant de l'IL-4 et peu d'IFN- $\gamma$ . Ces clones Th-2 sont capables d'induire la synthèse d'IgE [Sager, 1992, van Reijsen, 1992].

### ***IN VIVO***

Les Th-2 s'accumulent préférentiellement dans les tissus cibles chez les sujets atopiques et peuvent orchestrer la réponse inflammatoire allergique. Différentes études effectuées *in vivo*, au niveau tissulaire ou périphérique, ont permis la mise en évidence que la stimulation avec l'allergène spécifique entraîne une activation locale et un recrutement des cellules de type Th-2 (revue dans [Romagnani, 1994]). A l'inverse de la réaction d'hypersensibilité cutanée de type retardée (DTH) induite par la tuberculine qui s'accompagne d'un profil préférentiel de type Th-1 [Tsicopoulos, 1994, Tsicopoulos, 1992], Kay et al ont détecté, par la technique d'HIS, au niveau des biopsies cutanées de sujets atopiques, un profil de sécrétion de cytokines de type Th-2 caractérisé par l'expression des ARNm codant pour l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF et ceci 24h après injection cutanée de l'extrait allergénique,

suggérant que les réactions cutanées allergiques contiennent l'équivalent des cellules Th-2 murines [Kay, 1991]. La prédominance préférentielle d'un profil de réponse de type Th-2 a été également démontrée chez les sujets asthmatiques, au niveau des muqueuses bronchiques ou nasales ainsi que dans des LBA [Bentley, 1993, Durham, 1992, Robinson, 1992]. Ces cytokines de type Th-2 et notamment l'IL-5 réguleraient la fonction des éosinophiles dans l'asthme [Hamid, 1994]. La majorité des cellules exprimant ces ARNm sont des lymphocytes T avec une minorité d'éosinophiles et de mastocytes [Robinson, 1993a, Ying, 1993]. Avec le challenge local, il a été démontré une augmentation du nombre des éosinophiles infiltrant le site inflammatoire et exprimant les ARNm codant pour le GM-CSF et l'IL-5 [Broide, 1992]. En plus, il a été mis en évidence dans des LBA [Wilson, 1992] et des biopsies bronchiques [Azzawi, 1990], que des cellules T CD4<sup>+</sup> sont activées dans les voies aériennes des asthmatiques. Les proportions des cellules de LBA exprimant l'ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-5 peuvent être reliées au nombre d'éosinophiles dans le LBA suggérant une liaison entre les cytokines de type Th-2 et la maladie [Robinson, 1993b].

D'autre part, la comparaison des biopsies bronchiques de patients atteints d'asthme allergique et d'asthme non allergique au toluène révèle chez les seconds un infiltrat de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> producteurs d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  et d'IL-5 mais pas d'IL-4 [Maestrelli, 1994]. Ainsi, dans l'asthme non allergique, les biopsies sont caractérisées également par un grand nombre d'éosinophiles et des cellules T activées [Bentley, 1992]. Des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-5 mais pas l'IL-4 sont produites dans ce contexte [Walker, 1992]. Par contre, récemment, différents travaux dans le cas d'asthme intrinsèque non allergique, ont démontré au niveau des biopsies bronchiques une production et une expression des cytokines de type Th-2 telles l'IL-4 et l'IL-5, notamment par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, les éosinophiles et les mastocytes [Humbert, 1996a, Ying, 1997].

*Toutes ces données suggèrent que l'accumulation dans les organes cibles et l'activation des cellules Th-2 spécifiques d'allergènes peuvent jouer un rôle central dans la maladie inflammatoire allergique, en particulier, par le recrutement des cellules effectrices et notamment les éosinophiles.*

## **II.5- Médiateurs impliqués dans la réaction allergique**

### **II.5.1- Médiateurs préformés et néoformés**

On distingue deux types de médiateurs, les préformés et les néoformés. Ces médiateurs ont des actions pharmacologiques variées à l'origine des manifestations de l'hypersensibilité immédiate : augmentation de la vasoperméabilité, contraction des muscles lisses, chimiotactisme des polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, et agrégation des plaquettes. Si les basophiles et les mastocytes sont les principaux producteurs de ces médiateurs, ceux-ci peuvent être également produits par d'autres types de cellules, notamment les plaquettes, les macrophages, les éosinophiles et les neutrophiles. Ce point ayant été abordé dans les chapitres précédents, seul un tableau récapitulatif est présenté (voir tableau 5).

### **II.5.2- Cytokines**

Les cytokines sont des médiateurs solubles sécrétés par de nombreux types cellulaires dont les cellules du système immunitaire. Leur rôle général est de permettre la communication intercellulaire interagissant avec des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Ces récepteurs sont, selon les cytokines, soit exprimés de façon constitutive, soit inductibles par la cytokine elle-même ou par d'autres cytokines. Leur synthèse a lieu *de novo*, après activation de la cellule productrice par un antigène, un agent mitogène, ou une autre cytokine, etc... Leur mode d'action est autocrine, paracrine ou même endocrine. Les cytokines intervenant dans la réaction allergique ayant été également détaillées précédemment, nous avons réduit ce chapitre à un tableau résumant leurs principales propriétés dans le contexte de la réaction allergique (voir tableaux 6a, 6b).

**Tableau 5: Médiateurs de la réaction allergique inflammatoire.**

<i>Médiateurs</i>	<i>Source</i>	<i>Fonctions</i>
<b>Histamine</b>	mastocytes, basophiles	vasodilatateur, vasoperméabilité, bronchospasme, production de mucus, prurit
<b>Sérotinine</b>	mastocytes, plaquettes	vasodilatation, vasoperméabilité, bronchoconstriction
<b>LTB4</b>	mastocytes, neutrophiles, macrophages	inflammation des voies aériennes, attire les neutrophiles et les éosinophiles, augmente la synthèse d'IL-5 par les lymphocytes T et l'expression de CD23 induite par l'IL-4
<b>LT (C4, E4, D4)</b>	neutrophiles, éosinophiles, monocytes, macrophages	bronchoconstriction prolongée, vasoperméabilité, œdème, sécrétion du mucus, hyperréactivité bronchique
<b>PGE2</b>	neutrophiles, monocytes	augmente la synthèse d'IgE en présence d'IL-4 mais l'inhibe en présence d'Ac anti-CD40
<b>PG (F2, D2)</b>	monocytes, macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, et pulmonaires,	vasodilatation, vasoperméabilité, bronchospasme
<b>TX (A2, B2)</b>	neutrophiles, monocytes, macrophages	vasoconstriction, agrégation plaquettaire, bronchospasme
<b>PAF acéther</b>	basophiles, mastocytes, neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules endothéliales, éosinophiles, plaquettes	agrégation plaquettaire, vasoperméabilité, bronchospasme, œdème muqueux, hyperréactivité bronchique, attire les éosinophiles
<b>MBP, ECP, EDN, EPO</b>	éosinophiles	activité cytotoxique, dommages des cellules épithéliales bronchiques et des pneumocytes
<b>VIP</b>	mastocytes, neutrophiles, cellules nerveuses	vasodilatation, potentialisation de l'œdème dû à la bradykinine et au C5a, chimiottractant des lymphocytes T
<b>NCF, ECF</b>	mastocytes, macrophages	chimiotactique des neutrophiles et des éosinophiles respectivement, inflammation des voies aériennes
<b>Protéases (chymase, tryptase)</b>	mastocytes	lésions tissulaires, production de C3a et de C5a

**LT** : Leucotriènes. **PG** : Prostaglandines. **TX** : Thromboxane. **PAF** : Facteur d'Activation Plaquettaire. **MBP** : Protéine basique majeure. **ECP** : Protéine cationique éosinophilique. **EDN** : Neurotoxine dérivée d'éosinophile. **EPO** : Peroxydase éosinophilique. **VIP** : Peptide Vasoactif Intestinal. **NCF** : Neutrophil Chemotactic Factor. **ECF** : Eosinophil Chemotactic Factor.

**Tableau 6a : Cytokines dans la réaction allergique**

<b>Cytokines</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Sources</b>
<b>IL-1</b>	cytokine pro-inflammatoire, stimule les lymphocytes (Lc) T, induit la production de PG par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les macrophages, les cellules pulmonaires et musculaires lisses, induit la production de PAF par les monocytes et les cellules endothéliales, augmente l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales	monocytes activés, mastocytes et basophiles, cellules de Langerhans, éosinophiles
<b>IL-2</b>	favorise la prolifération des Lc	Lc T, éosinophiles
<b>IL-3</b>	favorise la différenciation des mastocytes à partir des cellules souches hématopoïétiques, favorise le recrutement et l'activation des éosinophiles au niveau du site inflammatoire, augmente l'adhérence des basophiles aux cellules endothéliales	cellules T de type Th0, éosinophiles, mastocytes et basophiles
<b>IL-4</b>	favorise la synthèse d'IgE, d'IgG4 et l'expression de CD23 par les Lc B, favorise la réponse de type Th-2 et empêche la production d'IFN- $\gamma$ par les Lc T de type Th-1, augmente l'expression de CD23 sur les monocytes et l'expression de Fc $\epsilon$ RI sur les éosinophiles, facteur de croissance de mastocytes en synergie avec l'IL-3, augmente l'adhérence des basophiles aux cellules endothéliales	Lc T CD4 <sup>+</sup> de type Th-2 et CD8 <sup>+</sup> de type Tc-2, mastocytes (M <sub>TC</sub> ) et basophiles activés, éosinophiles
<b>IL-5</b>	favorise la synthèse d'IgE par les Lc B, facteur de différenciation et de maturation des éosinophiles chimioattractant et activateur des éosinophiles	Lc T CD4 <sup>+</sup> de type Th-2, Lc T CD8 <sup>+</sup> de type Tc-2, éosinophiles, mastocytes (M <sub>T</sub> ), basophiles
<b>IL-6</b>	favorise la synthèse d'IgE par les Lc B, induit la polarisation vers un profil de type Th-2	Lc T CD4 <sup>+</sup> de type Th-2, éosinophiles, mastocytes (M <sub>T</sub> ), basophiles, monocytes, macrophages alvéolaires, neutrophiles, cellules épithéliales bronchiques, cellules de Langerhans
<b>IL-10</b>	cytokine anti-inflammatoire, inhibe la production d'IgE induite par l'IL-4, inhibe la production de cytokines par les Lc T de type Th-1 et Th-2 chez l'homme, inhibe la production de cytokines par les macrophages (IL-1, IL-10, IL-12, et TNF- $\alpha$ ), diminue la production d'IFN- $\gamma$ par les Lc T humains en supprimant l'IL-12 par les CMN activées	Lc T de type Th-1 et Th-2 chez l'homme, T CD8 <sup>+</sup> de type Tc2, Lc B, monocytes, macrophages activés, éosinophiles

**IL**-(1, 2, 3, 4, 5, 6, 10) : InterLeukine. **PAF** : Platelet Activating Factor. **PG** : prostaglandine

D'après [Cavaillon, 1996]; (Les autres références sont citées dans le texte).

**Tableau 6b : Cytokines dans la réaction allergique**

(suite)

<i>Cytokines</i>	<i>Fonctions</i>	<i>Sources cellulaires</i>
<b>IL-12</b>	inhibe la synthèse d'IgE induite par l'IL-4, stimule la production d'IFN- $\gamma$ par les cellules NK et les Lc T, favorise une réponse de type Th-1 en présence d'IL-2, inhibe la production d'IL-10 et d'IL-4 par des clones T spécifiques d'allergène	macrophages, cellules dendritiques, NK
<b>IL-13</b>	favorise la synthèse d'IgE et d'IgG4 et l'expression de CD23 par les Lc B, induit la prolifération et la différenciation des cellules B, favorise une réponse de type Th-2 en diminuant la production d'IL-12 et d'IFN- $\alpha$ mais n'agit pas sur les cellules T, augmente l'expression de VCAM-1 sur les cellules endothéliales	Lc T CD4 <sup>+</sup> de type Th-2, éosinophiles, mastocytes et basophiles,
<b>IL-15#</b>	induit la production de MCP-1 et d'IL-8 par les monocytes humains, augmente la prolifération et la production d'IFN- $\gamma$ par des cellules T CD4 <sup>+</sup> activées	monocytes / macrophages, lignées cellulaires épithéliales et de fibroblastes
<b>IL-16#</b>	chimioattractant des cellules T CD4 <sup>+</sup> , éosinophiles, monocytes induit par l'histamine	Lc T CD4 <sup>+</sup> et CD8 <sup>+</sup> , mastocytes, éosinophiles, cellules épithéliales bronchiques
<b>IL-18#</b>	en présence d'IL-12, induit la production d'IFN- $\gamma$ par les cellules T et B activées, inhibe la production d'IgE et d'IgG1 et augmente la production d'IgG2a par les B	macrophages activés, kératinocytes murins, ostéoblastes
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	inhibe la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 et l'expression de CD23, favorise une réponse de type Th-1, inhibe le développement d'une réponse de type Th-2	Lc T CD4 <sup>+</sup> de type Th-1, et T CD8 <sup>+</sup> de type Tc-1, mastocytes et basophiles, cellules NK, éosinophiles
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	inhibe l'expression de CD23 par les lignées éosinophiliques et monocytaires, inhibe la production d'IL-4 et d'IL-5	Lc T, éosinophiles, plaquettes
<b>TNF-<math>\alpha</math>#</b>	cytokine pro-inflammatoire favorise la contraction des fibres musculaires lisses, la sécrétion des métabolites de l'acide arachidonique et l'expression de certaines molécules d'adhérence	mastocytes et basophiles, monocytes, macrophages alvéolaires, neutrophiles, cellules épithéliales bronchiques, cellules de Langerhans
<b>GM-CSF</b>	induit le recrutement et l'activation des éosinophiles	Lc T de type Th0, éosinophiles, mastocytes et basophiles, monocytes, macrophages alvéolaires, neutrophiles, cellules épithéliales bronchiques

**IL**-(12, 13, 15, 16, 18) : Interleuline. **IFN- $\gamma$**  : Interféron-gamma. **TGF** : Transforming Growth Factor. **TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor. **GM-CSF** : Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor. # : **IL-15** [Badolato, 1997; Seder, 1996]; **IL-16** [Center, 1996; Laberge, 1996; Lim, 1996]. **IL-18** [Yoshimoto, 1997]

D'après [Cavaillon, 1996]. (Les autres références sont citées dans le texte).

### II.5.3- Chimiokines

Les réactions allergiques sont accompagnées par une infiltration tissulaire par les éosinophiles, les lymphocytes et les neutrophiles. Elles peuvent causer des dommages tissulaires à travers la libération de certains médiateurs cytotoxiques à partir de leurs granules, des métabolites oxygénés, des cytokines et des médiateurs lipidiques comme le PAF et la LTC<sub>4</sub>. Le recrutement des cellules inflammatoires au niveau du site inflammatoire implique une série d'évènements incluant l'adhésion aux cellules endothéliales, la migration transendothéliale et le mouvement chimiotactique suivant. Ces processus sont régulés par la libération de certains médiateurs et de cytokines dans lesquelles les chimiokines ont un rôle significatif.

Depuis ces dix dernières années, les chimiokines ont fait l'objet de nombreux travaux. Les chimiokines représentent une famille de cytokines chimiotactiques de poids moléculaires compris entre 6 et 15 kDa. Leur classification est basée sur une homologie de séquence, à savoir la conservation de quatre résidus cystéine (C) formant des ponts disulfures à l'intérieur de la molécule, et la position relative de deux de ces résidus. En effet, si les deux cystéines sont séparées par un autre acide aminé, la chimiokine appartient à la sous-famille des C-X-C chimiokines (appelées chimiokines  $\alpha$ ) alors que si les deux cystéines sont l'une à côté de l'autre, la chimiokine fait partie de la sous-famille des C-C chimiokines (appelées chimiokines  $\beta$ ). La différence entre ces deux sous-familles est aussi fonctionnelle puisqu'il semble que les membres de la famille des chimiokines  $\alpha$  agissent préférentiellement sur les neutrophiles et les lymphocytes, alors que l'action des chimiokines  $\beta$  est plutôt portée sur les monocytes et dans certains cas sur les éosinophiles et quelques sous-populations lymphocytaires. La découverte de deux nouvelles molécules nommées lymphotactine et fractalkine suggère que les chimiokines peuvent avoir deux sous-familles supplémentaires, celle des chimiokines C [Kelner, 1994] et celle des chimiokines CX<sub>3</sub>C [Bazan, 1997]. La lymphotactine a été isolée à partir des cellules pro-T et ne possède que 2 résidus Cystéines. Elle est produite par les cellules NK et possède une activité chimiotactique pour les T CD8<sup>+</sup> ainsi que les cellules NK *in vivo* [Hedrick, 1997]. La fractalkine possède une activité chimioattractante vis-à-vis des lymphocytes et des monocytes et favorise l'adhérence leucocytaire à l'endothélium [Bazan, 1997].

De nombreuses études ont montré que les chimiokines sont impliquées dans les réactions inflammatoires et allergiques, et en particulier dans le recrutement leucocytaire au niveau du site inflammatoire. Une de leur propriété consiste à agir en tant que facteurs

histamino-libérateurs (HRF). Ces facteurs sont libérés par de nombreux types cellulaires tels que les cellules mononucléées, les macrophages pulmonaires, les neutrophiles et les plaquettes (revue dans [Kaplan, 1994]. Ils agissent sur les mastocytes et les basophiles en provoquant une libération d'histamine. D'un autre côté, les chimiokines peuvent agir comme des facteurs inhibiteurs de la libération d'histamine (HRIF) au niveau du basophile [Baggiolini, 1994, Kaplan, 1994].

Les principales chimiokines participant à ces différentes fonctions sont les suivantes :

**\*\* IL-8** : elle appartient à la sous-famille des chimiokines CXC de type  $\alpha$ . Cette chimiokine peut être synthétisée par une variété de cellules telles que les lymphocytes [Schröder, 1988], les monocytes [Matsushima, 1988], les mastocytes [Möller, 1993], les éosinophiles [Braun, 1993]. Elle a des activités chimiotactiques vis-à-vis des neutrophiles [Lindley, 1988], des lymphocytes [Larsen, 1989], des basophiles [Leonard, 1991] et des éosinophiles [Warringa, 1991]. En addition à ses activités chimiotactiques, l'IL-8 permet la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, l'augmentation de l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales.

Marini et al ont mis en évidence l'implication de l'IL-8 dans les réactions allergiques, en démontrant que les cellules épithéliales bronchiques de sujets asthmatiques libèrent l'IL-8 [Marini, 1992]. Ceci a été confirmé par d'autres études sur des biopsies bronchiques de sujets asthmatiques [Redington, 1993], des liquides de LBA [Yousefi, 1995] et dans les sécrétions nasales [Sim, 1995]. De plus, Gosset et al ont démontré qu'après stimulation allergénique en cas de rhinite allergique, l'IL-8 est exprimée dans les lavages nasaux, mais un anticorps neutralisant anti-IL8 inhibe faiblement l'activité chimiotactique des neutrophiles dans les liquides de lavages nasaux suggérant que l'IL-8 agirait en connection avec d'autres facteurs chimiotactiques pour le recrutement des neutrophiles [Gosset, 1997]. L'influence de l'IL-8 sur la chimiotaxie des éosinophiles reste controversée. Bien que plusieurs auteurs ont trouvé que les éosinophiles des sujets atopiques ont une réponse chimiotactique à l'IL-8 [Shute, 1994, Shute, 1995, Warringa, 1993], Schröder et al n'ont pas observé cette activité [Schröder, 1996]. D'autres études ont démontré que l'administration nasale d'IL-8 à des volontaires normaux induit une infiltration de leucocytes dans les muqueuses nasales des sujets atopiques et non atopiques notamment des neutrophiles et à moindre degré des éosinophiles [Douglass, 1994]. Ceci suggère que l'IL-8 peut induire le recrutement des éosinophiles d'une façon indirecte.

L'IL-8 est également capable d'inhiber la libération d'histamine des basophiles à des faibles concentrations [Kuna, 1991] mais elle est également capable d'induire cette libération quand les basophiles sont stimulés par les cytokines et notamment l'IL-3 [Dahinden, 1989]. L'IL-8 peut inhiber sélectivement la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 [Kimata, 1992]. De plus, elle peut inhiber la synthèse spontanée d'IgE et d'IgG4 par des cellules B présentant à leur surface des IgE (IgEs<sup>+</sup>) et des IgG4 (IgG4s<sup>+</sup>) chez des sujets atopiques, et ceci en inhibant la production endogène d'IL-6 et de TNF [Kimata, 1995].

\*\* **RANTES** : le RANTES est une chimiokine  $\beta$  spécifique des cellules T mémoires, des monocytes, des éosinophiles et des basophiles [Alam, 1993, Bischoff, 1993, Schall, 1990]. Cette chimiokine est produite par les cellules T [Schall, 1988], les plaquettes [Kameyoshi, 1992], les cellules endothéliales [Marfaing-Koka, 1995] et les éosinophiles [Ying, 1996]. Également, le RANTES peut être exprimé par les fibroblastes [Rathanaswami, 1993], et par les cellules épithéliales bronchiques [Heeger, 1992]. Le RANTES joue un rôle majeur dans l'inflammation allergique. Des études effectuées *in vitro*, ont démontré que le RANTES augmente la migration transendothéliale des éosinophiles activées par l'IL-5 [Ebisawa, 1994]. Il induit l'adhérence des cellules endothéliales à la lignée basophilique humaine (KU812) stimulée par l'IL-5 [Bacon, 1994]. *In vivo*, des études ont permis la mise en évidence du RANTES dans les polypes nasaux, dans les liquides de LBA de sujets asthmatiques [Alam, 1996, Beck, 1996], en cas de conjonctivite allergique [Chihara, 1995] et de dermatite atopique [Schröder, 1996]. Plus récemment, par la technique d'hybridation *in situ* sur des biopsies cutanées obtenues chez des sujets atopiques, une augmentation d'ARNm codant pour le RANTES a été observée 6h après stimulation allergénique [Ying, 1995]. Également, des sujets asthmatiques atopiques et non atopiques montrent une augmentation d'expression de RANTES au niveau des biopsies bronchiques [Humbert, 1997, Powell, 1996]. Les glucocorticoïdes utilisés pour le traitement de l'asthme et de la dermatite atopique diminuent la libération de RANTES par les lignées épithéliales [Kwon, 1995, Stellato, 1995] ainsi que par les cellules épithéliales bronchiques des sujets asthmatiques [Wang, 1996].

En plus de son activité chimiotactique vis-à-vis des basophiles, le RANTES joue le rôle d'un HRF [Kuna, 1992b]. Bien que le RANTES soit capable d'induire la libération d'histamine, il est, comme l'IL-8, capable d'inhiber cette libération [Alam, 1992] induite par d'autres chimiokines telles que le MCP-1 et le RANTES lui-même [Kuna, 1995, Kuna, 1992b]. Récemment, il a été démontré *in vitro*, que le RANTES est également impliqué dans la

régulation de la synthèse d'IgE et d'IgG4 [Kimata, 1996]. En effet, le RANTES augmente la production d'IgE et d'IgG4 par les cellules B présentant à leur surface des IgE (IgEs<sup>+</sup>) et des IgG4 (IgG4s<sup>+</sup>). Une corrélation entre les taux élevés de RANTES et ceux d'IgE et d'IgG4 a été également mise en évidence.

### **\*\* Eotaxine**

Chimiokine de type C-C, elle possède des homologies de séquence en acides aminés avec le MCP-1 (64,5 %), le MCP-2 (64,5 %) et le MCP-3 (57,7 %). L'éotaxine représente le facteur chimiotactique spécifique des éosinophiles aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* [Garcia Zepeda, 1996, Ponath, 1996]. En effet, l'injection intradermique de cette chimiokine à des singes entraîne l'infiltration des éosinophiles au niveau du site d'injection. De plus, ils ont démontré que la réactivité de l'éotaxine est localisée au niveau de l'épithélium dans des biopsies nasales. Donc, l'éotaxine peut être considérée comme un médiateur puissant pour le recrutement des éosinophiles au niveau du site inflammatoire dans l'allergie.

**\*\* MCP-1,-2,-3,-4,-5** : Ces chimiokines font partie de la sous-famille des chimiokines  $\beta$ . Elles ont été initialement décrites comme molécules chimioattractantes pour les monocytes / macrophages. Ultérieurement, il a été démontré qu'elles peuvent exercer des effets chimiotactiques sur plusieurs leucocytes. L'activité de MCP-1 est restreinte aux monocytes [Leonard, 1991], basophiles [Oppenheim, 1991] et lymphocytes [Carr, 1994], il représente le plus puissant facteur chimiotactique et activateur des monocytes [Leonard, 1991]. Le MCP-1 est produit par les CMN stimulées par la PHA (phytohématagglutinine) et l'IL-1 [Yoshimura, 1989a, Yoshimura, 1989b] et les monocytes au repos sécrètent constitutivement du MCP-1 [Rollins, 1989]. L'activité chimiotactique du MCP-1 s'effectue également vis-à-vis des basophiles [Oppenheim, 1991]. Le MCP-1 représente le plus puissant facteur libérateur d'histamine des basophiles [Bischoff, 1992, Kuna, 1992a].

Dans l'asthme allergique, il a été démontré une augmentation d'expression de MCP-1 au niveau des biopsies bronchiques ainsi que dans les liquides de LBA des sujets asthmatiques [Alam, 1996, Sousa, 1994]. D'un autre côté, les chimiokines MCP-2 et MCP-3 sont chimiotactiques vis-à-vis des monocytes, des basophiles et des éosinophiles [Alam, 1994, Carr, 1994, Matsushima, 1989, Noso, 1994]. Parmi les chimiokines chimiotactiques vis-à-vis des monocytes, seul le MCP-3 est fortement impliqué dans les réactions allergiques. Cette chimiokine possède des homologies de séquence en acides aminés avec le MCP-1 et le MCP-2

de 71% et 58% respectivement [Opdenakker, 1993]. Elle partage les activités de MCP-1 et de RANTES. Comme le MCP-1, le MCP-3 est capable d'induire la libération d'histamine par les basophiles, et comme le RANTES, il est chimiotactique pour les basophiles et les éosinophiles [Dahinden, 1994]. Le MCP-3 est 15 fois plus puissant que le MCP-2 et 15 fois moins puissant que le RANTES dans l'activité chimioattractante vis-à-vis des éosinophiles [Van Damme, 1992]. En addition à ces propriétés chimiotactiques, le MCP-3 est capable d'activer les basophiles purifiés mais d'une façon plus faible que le MCP-1, ainsi que les éosinophiles, il induit une augmentation du calcium intracellulaire, une chimiotaxie, une libération d'histamine et de LTC<sub>4</sub> [Alam, 1994, Dahinden, 1994], Sun Ying et al ont démontré que 6h après stimulation avec l'allergène, une augmentation d'expression d'ARNm codant pour le MCP-3 est observée au niveau des biopsies cutanées chez des sujets atopiques [Ying, 1995]. Egalement, des sujets asthmatiques atopiques et non atopiques montrent une augmentation d'expression de MCP-3 au niveau des biopsies bronchiques [Humbert, 1997, Powell, 1996]. D'autres populations cellulaires sont capables d'exprimer l'ARNm codant pour le MCP-3 comme par exemple les plaquettes et les mastocytes [Kulmburg, 1992, Power, 1995].

Récemment, le MCP-4 a été décrite comme une chimiokine de type C-C. Elle présente des similarités de séquence avec les autres chimiokines notamment les MCP et l'éotaxine. Avec la même efficacité que le RANTES, le MCP-3 et l'éotaxine, le MCP-4 possède une activité chimiotactique puissante vis-à-vis des éosinophiles, des lymphocytes et des monocytes [Ugucioni, 1996].

Une autre chimiokine de type CC a été récemment décrite chez la souris, il s'agit du MCP-5 qui est chimioattractante pour les monocytes, les lymphocytes et les éosinophiles et possède 66 % d'homologie de séquence en acides aminés avec le MCP-1 [Sarafi, 1997]. Le MCP-5 peut jouer un rôle dans l'inflammation allergique pulmonaire, en effet, G.Q. JIA et al ont démontré que la neutralisation de MCP-5 au cours de la réaction inflammatoire allergique entraîne une diminution du nombre des éosinophiles recrutés au niveau du poumon [Jia, 1996].

### **5.3.1- Rôle des chimiokines dans la polarisation Th-1 / Th-2**

Très récemment, le rôle possible des chimiokines dans la polarisation Th-1/Th-2 a été illustré dans deux études. Dans la première, l'analyse de la réponse des cellules T humaines à un antigène bactérien a démontré une corrélation entre l'expression des

chimiokines telles le MIP-1 $\alpha$ , le MIP-1 $\beta$ , et le RANTES et une réponse de type Th-1 [Schrum, 1996]. Dans la deuxième étude, Karpus et al se sont plus intéressés au rôle des chimiokines telles le MIP-1 $\alpha$  et le MCP-1 dans la régulation de la production des cytokines par les cellules Th et ceci chez des souris transgéniques pour le TCR. Ils ont observé que le MIP-1 $\alpha$  entraîne une augmentation de production d'IFN- $\gamma$  tandis que le MCP-1 celle d'IL-4 par les cellules T naïves ou stimulées par l'OVA ou l'Ac anti-CD3 [Karpus, 1997].

Toutes ces données ont permis de mettre en évidence la contribution de ces chimiokines dans la réaction allergique. Deux tableaux récapitulatifs des différentes chimiokines de type CC et CXC sont proposés (voir tableaux 7a, 7b).

**Tableau 7 : Classification des chimiokines**

**a) Chimiokines de type CXC**

<b>Chimiokines</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Sources cellulaires</b>
<b>IL-8/NAP-1 *</b>	chimioattractante et activatrice des neutrophiles, des lymphocytes (Lc), des basophiles et des éosinophiles	monocytes / macrophages, Lc T, fibroblastes, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, cellules endothéliales, kératinocytes, et cellules épithéliales
<b>GRO<math>\alpha</math> / MGSA *</b>	chimioattractant et activateur des neutrophiles. stimule la prolifération des mélanocytes humains, augmente la concentration du calcium cytoplasmique	monocytes / macrophages, Lc T, fibroblastes, neutrophiles, cellules épithéliales bronchiques, plaquettes, cellules endothéliales et cellules des mélanomes et sarcomes
<b>NAP-2 *</b> (CTAPIII / $\beta$ TG)*	chimioattractant et activateur des neutrophiles et des basophiles,	plaquettes
<b>ENA-78*</b>	chimioattractant et activateur des neutrophiles	cellules épithéliales alvéolaires (A549), plaquettes, monocytes et cellules endothéliales
<b>PF4*</b>	chimioattractant des neutrophiles et des fibroblastes	plaquettes
<b>IP-10 *</b>	chimioattractant et activateur des neutrophiles, des monocytes et des Lc T, initie l'adhérence des Lc T aux cellules endothéliales	monocytes, cellules endothéliales, fibroblastes, kératinocytes, et Lc T activés
<b>mig #</b>	chimioattractant et activateur des Lc T	monocytes / macrophages

\* **IL-8 / NAP-1** : interleukin-8/neutrophil activating peptide-1. **GRO** : granulocyte activating factor . **MGSA** : melanocyte growth stimulatory activity; **CTAPIII /  $\beta$  TG** : connective tissue activating peptide III /  $\beta$ -thromboglobulin. **ENA** : epithelial neutrophil activating peptide. **PF4** : platelet factor. **IP-10** : interferon  $\gamma$ -inducible protein 10. (D'après [Teran et Davies, 1996]; [Haskill, 1990; Geiser, 1993]; [Liao, 1995]).

Figure 7b : Chimiokines de type CC

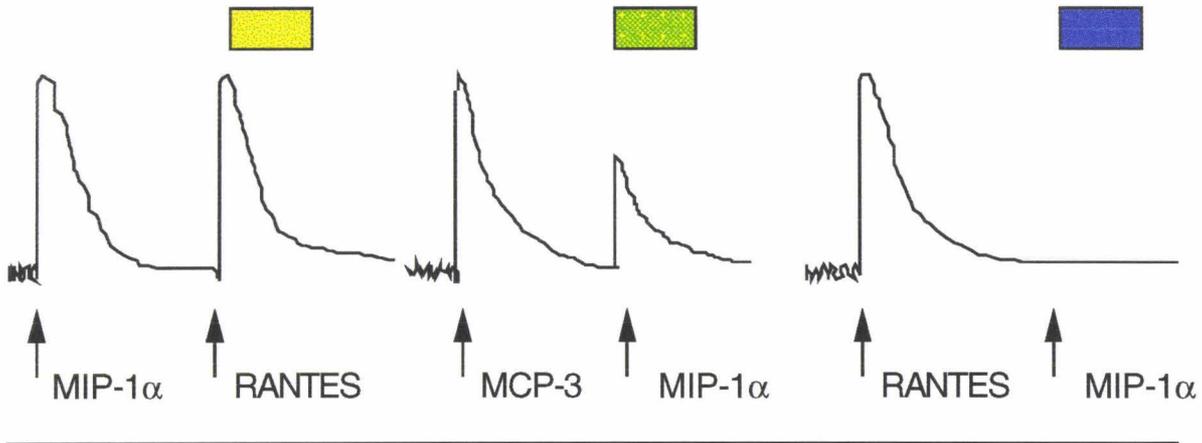
<i>Chimiokines</i>	<i>Fonctions</i>	<i>Sources cellulaires</i>
<b>RANTES *</b>	chimioattractant des lymphocytes (Lc) T mémoires, des monocytes, et des éosinophiles, chimioattractant et activateur des basophiles, induit la libération d'histamine par les basophiles	Lc T mémoires, monocytes / macrophages, plaquettes, éosinophiles, fibroblastes, cellules endothéliales, et cellules épithéliales bronchiques
<b>MIP-1<math>\alpha</math> *</b>	chimioattractant des monocytes, des Lc T CD8 <sup>+</sup> , des cellules NK, et des éosinophiles, libérateur d'histamine à partir des basophiles et des éosinophiles, stimule l'adhérence des Lc T aux cellules endothéliales, inhibe la prolifération précoce des cellules souches hématopoïétiques	Lc T et B, monocytes, fibroblastes, mastocytes
<b>MIP-1<math>\beta</math> *</b>	chimioattractant des monocytes et des Lc T CD4 <sup>+</sup> induit l'adhérence des Lc T via les intégrines b aux cellules endothéliales	Lc T et B, monocytes, fibroblastes, mastocytes murins
<b>MCP-1 *</b>	chimioattractant des monocytes, des basophiles et des Lc, régule l'expression des molécules d'adhérence et la production des cytokines par les monocytes, induit la libération d'histamine par les basophiles	monocytes / macrophages, fibroblastes, Lc T et B, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et épithéliales
<b>MCP-2 *</b>	chimioattractant des monocytes, des basophiles et des éosinophiles	monocytes et cellules d'osteosarcome
<b>MCP-3 *</b>	chimioattractant des monocytes, basophiles, lymphocytes, et éosinophiles, induit la libération d'histamine par les basophiles	exprimé par les plaquettes, les mastocytes, les cellules d'osteosarcome
<b>MCP-4 *</b>	chimioattractant des monocytes, des Lc T et des éosinophiles	exprimée par les cellules endothéliales et épithéliales activées
<b>MCP-5 *</b>	chimioattractant des monocytes, des Lc T et des éosinophiles active la libération d'histamine par les basophiles	macrophages activés <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> et cellules musculaires lisses au niveau du poumon
<b>MDC *</b>	chimioattractant des monocytes, des cellules dendritiques et des NK	macrophages
<b>Eotaxine</b>	chimioattractant des éosinophiles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	cellules épithéliales des polypes nasaux et cellules endothéliales
<b>Eotaxine-2</b>	chimioattractant des éosinophiles et des basophiles, permet la libération d'histamine et de LTC4 par les basophiles stimulés avec IL-3	ADNc isolé des monocytes humains activés
<b>DC-CK1</b>	chimioattractant des lymphocytes T naïfs CD45RA <sup>+</sup>	cellules dendritiques
<b>HCC-1</b>	active les monocytes	exprimée par les tissus normaux et le plasma humain

\* RANTES : regulated on activation-normal T expressed and secretion. MIP-1 : monocyte inflammatory peptide-1. MCP : monocyte chemotactic peptide. MDC : macrophage-derived chemokine. D'après [Teran et Davies, 1996]; [Stellano, 1995]; [Garcia-Zepeda, 1996]; [Godiska, 1997]; [Forssmann, 1997], [ Adema, 1997].

### 5.3.2- Récepteurs des chimiokines

Les chimiokines exercent leurs fonctions grâce à des récepteurs spécifiques et non spécifiques à la surface de certaines populations cellulaires. Ces récepteurs sont des glycoprotéines à 7 domaines transmembranaires couplées à la protéine G [Baggiolini, 1992, Bischoff, 1993, Sozzani, 1991], présents à la surface des leucocytes. Ces récepteurs peuvent lier une ou plusieurs chimiokines différentes d'où l'existence des réactions croisées entre ces molécules et la difficulté de les classer [Ahuja, 1994, Schall, 1994]. Les interactions entre les différentes chimiokines pourraient expliquer l'augmentation ou la diminution de la libération d'histamine par les basophiles [Baggiolini, 1994, Kuna, 1995]. Donc, des phénomènes d'auto-désensibilisation ou de désensibilisation croisée de récepteurs de certaines chimiokines ont été mis en évidence *in vitro*.

Ces récepteurs ont été classés en trois groupes, on distingue les récepteurs  $\alpha$  des chimiokines CXC qui peuvent être spécifiques ou non spécifiques, les récepteurs  $\beta$  des chimiokines CC qui sont actuellement considérés comme non spécifiques et enfin les récepteurs  $\alpha\beta$  liant les 2 types de chimiokines  $\alpha$  et  $\beta$  [Teran, 1996]. La stimulation des leucocytes avec des agonistes chimioattractants entraîne précocement, une augmentation rapide et transitoire du calcium intracellulaire. Quand le même récepteur est stimulé une deuxième fois, pendant une courte durée en saturant les concentrations d'agonistes, on observe une inhibition du passage transitoire du calcium intracellulaire due à la désensibilisation des récepteurs [Bischoff, 1992, Bischoff, 1993, Dahinden, 1994, Rot, 1992]. Différents travaux expérimentaux ont tenté d'évaluer l'usage des récepteurs par les chimiokines au niveau des basophiles et des éosinophiles (Figure 3). Une désensibilisation complète a été trouvée en réponse secondaire à la même chimiokine utilisée à forte concentration. Dans ces conditions, au niveau des basophiles, le MIP- $\alpha$  et le MCP-1 empêchent uniquement leur propre réponse. RANTES inhibe sa propre réponse et celle de MIP-1 $\alpha$ . Le MCP-3 désensibilise les basophiles à toutes les chimiokines testées. Au niveau des éosinophiles, une désensibilisation croisée a été observée entre le RANTES et le MCP-3, le MIP-1 $\alpha$  inhibe seulement sa propre réponse tandis que le MCP-1 n'a pas d'effet. Les différentes classes de récepteurs et leurs sources cellulaires seront détaillées dans le tableau 8.



	Stimulation avec: Désensibilisation des Basophiles au:				Désensibilisation des Eosinophiles au:		
	MCP-1	MCP-3	RANTES	MIP-1α	MCP-3	RANTES	MIP-1α
MCP-1	Blue	Yellow	Yellow	Yellow			
MCP-3	Blue	Blue	Blue	Green	Blue	Blue	Green
RANTES	Yellow	Yellow	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
MIP-1α	Yellow	Yellow	Yellow	Blue	Yellow	Yellow	Blue

**Figure 3: Désensibilisation des basophiles et éosinophiles humains par stimulation avec des chimiokines CC.**

Les cellules sont stimulées 2 fois à 90 secondes d'intervalle avec une chimiokine différente (50 ou 100nM). Les rectangles représentent le degré de sensibilisation par le second stimulus: désensibilisation complète (bleu), partielle (vert) ou inexistante (jaune). Les réponses cellulaires ont été évaluées par la mesure du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. (d'après [Baggiolini, 1994]).

**Tableau 8 : Classification des récepteurs des chimiokines et spécificité de leurs ligands** (D'après C. Mackay, J Exp Med, 184, 799, 1996; B.A. Premack, T.J. Schall, Nat Med, 2, 1996; L. M. Teran et D.E. Davies, Clin Exp Allergy, 26, 1005, 1996)

<i>Classe</i>	<i>Sous-classe</i>	<i>Nom actuel</i>	<i>Nom ancien</i>	<i>Ligands</i>	<i>Source (expression prédominante)</i>
$\alpha$	<i>spécifique</i>	CXCR 1	IL-8 RA, IL-8 R1	IL-8	Neutrophiles, cellules NK
		CXCR 4	fusine/humstr/lestr	SDF-1 *	Plusieurs populations cellulaires, et en particulier les lymphocytes (Lc) T et B
	<i>non-spécifique</i>	CXCR 2	IL-8 RB, IL-8 R2	IL-8, GRO- $\alpha$ , ENA-78, NAP-2	Neutrophiles, cellules NK, monocytes
		Aucun	HVS-ECR3*	NAP-2	ORF ECF3 du virus herpes de saimiri
		CXCR 3	Aucun	IP-10, Mig	T activés
	$\beta$	<i>non spécifique</i>	CCR 1	CC CKR 1	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , HCC-1, MCP-1, MCP-3
CCR 2 A, B			MCP-1 RA, B ou CKR 2A, B	MCP-1, 2, 3, et 4	Monocytes, Lc T, et basophiles
CCR 3			CKR 3	Eotaxine, éotaxine-2, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4	Eosinophiles, basophiles, neutrophiles, monocytes, et Lc CD4 <sup>+</sup> de type Th-2
CCR 4			CKR 4 ou K5-5R	MIP-1 $\alpha$ , HCC-1, MCP-1, et RANTES	Lc B et T, monocytes, plaquettes, et basophiles
CCR 5			CC CKR 5 ou chem R13	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$	Lc T CD4 <sup>+</sup> , monocytes
			US28 CMV *	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , $\beta$ , MCP-1	Cellules 293
$\alpha\beta$	<i>non-spécifique</i>	DARC *		IL-8, GRO $\alpha$ , NAP-2, MCP-1, RANTES, MIP-1 $\alpha$	Erythrocytes et cellules endothéliales

\* **US28 CMV** : protéine 28 de la séquence unique du cytomégalovirus. **ECR** : récepteur érythrocytaire des chimiokines. **DARC** : récepteur identique à l'antigène duffy pour les chimiokines. **SDF-1** : facteur 1 dérivé des cellules souches hématopoïétiques.

### **III- MECANISMES DE LA DESENSIBILISATION SPECIFIQUE**

Parmi les diverses armes thérapeutiques disponibles actuellement pour contrôler les maladies allergiques, la désensibilisation spécifique représente l'un des traitements de fond. La désensibilisation consiste en l'administration de doses croissantes d'allergène permettant d'obtenir un état de tolérance immunologique conduisant à l'obtention d'une tolérance clinique vis-à-vis d'une exposition allergénique naturelle. Les extraits allergéniques actuels sont bien caractérisés, très purifiés et de haute qualité. En général, les sujets traités présentent une amélioration clinique avec diminution ou disparition des symptômes liés à l'exposition allergénique. Encore contestée dans certaines indications, notamment l'asthme [Norman, 1996], la désensibilisation reste le traitement préventif de choix des accidents allergiques généraux sévères dans le cas d'hypersensibilité aux *venins d'hyménoptères*. La prévalence des réactions systémiques allergiques après piqûres d'hyménoptères (guêpe et abeille essentiellement) varie de 0,15 à 3,3 % dans différentes populations [Charpin, 1992, Settipane, 1972]. Certaines de ces réactions peuvent être mortelles en raison d'un choc anaphylactique sévère. La désensibilisation peut se faire sur un mode conventionnel avec augmentation des doses sur une période de 3 à 4 mois à raison d'une injection par semaine jusqu'à une dose moyenne d'entretien de 100 µg [Graft, 1996] ou sur le mode accéléré (rush) allant de quelques heures à quelques jours [Birnbaum, 1993]. La désensibilisation peut être interrompue en général après 5 ans s'il ne reste plus de stigmates de sensibilisation (tests cutanés positifs ou présence d'IgE spécifiques contre le venin concerné).

Par rapport à d'autres pathologies d'hypersensibilité dépendantes de l'IgE, l'ITS au venin d'hyménoptères présente des caractéristiques intéressantes. Elle est particulièrement efficace [Hunt, 1978], en effet, 96% des sujets désensibilisés sont protégés avec une dose de 100 µg par mois (100 µg = dose d'entretien correspondant à deux fois la quantité du venin injectée lors d'une piqûre). Il s'agit d'une pathologie systémique d'où un accès facile aux

cellules périphériques. Enfin, elle est rapide, notamment quand il s'agit du protocole d'hyposensibilisation accélérée de type "ultra rush" [Birnbau, 1993] qui s'effectue en 3h30 (déjà décrit dans le premier chapitre). En plus, cette thérapie peut être pratiquée à toute période de l'année et limite les déplacements des patients.

### **III.I- Mécanismes physiopathologiques de la désensibilisation spécifique**

Bien qu'introduite en 1911 par Noon [Noon, 1911], la désensibilisation spécifique reste toujours fondée sur des données empiriques. Malgré les quelques 85 années de recul, les mécanismes d'action de la désensibilisation sont restés relativement obscurs jusque récemment où d'autres données ont éclairé sous un jour nouveau les modifications immunologiques associées à l'efficacité de ce traitement. Différentes hypothèses ont été suggérées notamment humorales et cellulaires.

#### **III.1.1- Mécanismes humoraux de la désensibilisation**

##### **1.1.1- Les anticorps de classe IgE**

Les manifestations d'hypersensibilité immédiate sont médiées par les anticorps de classe IgE qui vont permettre l'interaction de l'allergène avec les mastocytes et les basophiles aboutissant à la libération de médiateurs responsables des manifestations cliniques immédiates. Très rapidement les auteurs se sont intéressés à l'évolution des IgE au cours de la désensibilisation. Dès 1940 l'on savait que la désensibilisation entraînait à long terme une diminution de l'activité "réaginique" (l'IgE n'avait pas encore été découverte) [Loveless, 1940] du sérum, à l'époque évaluée par la réaction de Prausnitz-Kustner (transfert passif *in vivo* de sérum de sujet allergique). Une atténuation de l'augmentation saisonnière des anticorps réaginqes observée en période pollinique avait été également retrouvée chez les sujets désensibilisés [Norman, 1968]. L'identification de l'IgE comme principale réagine chez l'homme fût rapidement suivie par la mise au point de tests de dosage qui confirmèrent les données initiales [Evans, 1976]. De nombreuses études ont alors suivi essayant de corréler l'efficacité clinique à cette baisse des IgE, ce qui a été dans l'ensemble assez décevant [Norman, 1981]. Cependant cette diminution n'intervient qu'à long terme, en effet on a, à l'inverse, une

augmentation des IgE spécifiques pendant les premiers mois suivant l'instauration de la désensibilisation. S'il existe bien une diminution des IgE spécifiques à long terme, celle-ci est toujours postérieure à l'amélioration clinique [McHugh, 1990]. Alternativement il pourrait y avoir des changements fonctionnels de l'IgE non reflétés par les concentrations sériques. Une seule étude est en faveur de cette hypothèse. Ainsi le relargage d'histamine par les basophiles est diminué pendant la phase précoce de la désensibilisation, alors que l'on constate une augmentation de l'IgE fixée aux cellules [Malling, 1988].

### **1.1.2- Les anticorps bloquants**

Très vite, il est apparu que le sérum de patients désensibilisés contenait des facteurs capables d'inhiber la réaction de Prausnitz-kustner ou le relargage d'histamine induit par la stimulation allergénique de leucocytes sensibilisés [Loveless, 1940]. Ainsi, au cours de désensibilisations spécifiques réalisées avec plusieurs sources d'allergènes tels que les pollens [Starr, 1970, van der Giessen, 1976], les acariens [Leynadier, 1986, Nakagawa, 1987] et les venins d'hyménoptères [Golden, 1982, Müller, 1989], une augmentation d'Ac bloquants d'isotype G et spécifiques d'allergènes a été mise en évidence. Des Ac bloquants de classe IgA ont été également rapportés au niveau de sécrétions nasales de patients désensibilisés aux pollens [Platts-Mills, 1976] et au niveau des cellules mononucléées périphériques de sujets désensibilisés aux acariens [Sparholt, 1992].

Une certaine corrélation avec l'amélioration clinique a surtout été observée dans le cadre de la désensibilisation aux venins d'hyménoptères. En effet, sur une cohorte de 109 patients, un taux d'IgG spécifiques supérieur à 3 µg/ml était prédictif d'un faible pourcentage de réactions systémiques lors d'une piqûre ultérieure (1,6 %) alors qu'un taux inférieur était associé avec un plus fort pourcentage de réactions systémiques (16%) [Golden, 1992]. Cependant, certaines études ne retrouvent pas de corrélation entre le taux d'IgG et la protection vis-à-vis d'une piqûre d'insecte [Ewan, 1993, Müller, 1989]. L'importance des sous-classes avait également été invoquée avec un rapport IgG1 / IgG4 élevé corrélant avec l'efficacité de la désensibilisation [Djurup, 1985]. Cependant, d'autres études ont au contraire montré une association entre l'augmentation des IgG4 et l'amélioration clinique [Nakagawa, 1987, Tsai, 1991]. Le mécanisme d'action invoqué était celui de la capture antigénique de Patterson avec une compétition sélective entre IgE et IgG spécifiques pour l'allergène. En fait, il a été montré récemment chez la souris que les IgG induisent une diminution de l'activation mastocytaire dépendante de l'IgE par un mécanisme d'inhibition par l'intermédiaire du récepteur FcγRII

[Daëron, 1995b, Takai, 1996]. La co-ligation du FcεRI au FcγRII par un ligand multivalent rend les mastocytes anergiques. La corrélation entre amélioration des symptômes cliniques et taux d'IgG spécifiques reste cependant faible [Bousquet, 1990a]. En pratique courante, le suivi clinique des patients sur le taux d'IgG spécifiques est décevant et n'est presque plus utilisé.

### **1.1.3- Les Ac anti-idiotypes (AAI)**

Quand un antigène est introduit dans l'organisme, il va activer un réseau cellulaire conduisant à la production d'anticorps. Chaque anticorps comporte au niveau de sa région variable des idiotypes pouvant eux-même donner lieu à une réponse anticorps (appelés AAI de 2ème génération). Lorsque ces anticorps sont dirigés contre le site de reconnaissance de l'antigène, ils vont alors former ce que l'on appelle l'image interne de l'antigène et pouvoir se fixer en lieu et place de l'antigène au niveau de cellules porteuses d'un récepteur pour cet antigène. Il a pu être montré que ces AAI peuvent diminuer la synthèse d'IgE [Blaser, 1981a, Stadler, 1992]. Plusieurs études ont évalué l'induction de ces AAI au cours de la désensibilisation [Bose, 1986, Castracane, 1988, Hebert, 1990]. La plupart des travaux montrent une augmentation de ces anticorps qui est cependant relativement tardive survenant entre 6 et 10 mois après le début de la désensibilisation. Certains autres ne retrouvent pas d'autoanticorps anti IgE après désensibilisation [Kemeny, 1990]. La corrélation entre la présence d'AAI et l'efficacité de la désensibilisation n'est pas établie.

### **III.1.2- Mécanismes cellulaires de la désensibilisation**

Comme on l'avait dit précédemment, la réaction d'hypersensibilité immédiate dépendante de l'IgE faisant intervenir les mastocytes et les basophiles est souvent suivie d'une réaction retardée survenant 6 à 10 heures plus tard. Un afflux de cellules inflammatoires est alors observé avec en particulier un recrutement de cellules effectrices telles les éosinophiles et les neutrophiles, et de cellules immunorégulatrices que sont les lymphocytes. Les lymphocytes T stimulés par l'intermédiaire de leur récepteur à l'antigène vont libérer des substances immunomodulatrices capables d'activer les cellules effectrices. Celles-ci vont à leur tour libérer un certain nombre de médiateurs qui vont contribuer à la pérennisation de l'inflammation et aux dommages tissulaires locaux.

L'effet de la désensibilisation sur les réactions retardées a été étudié au niveau cutané [Fling, 1989, Hamid, 1997, Nish, 1994, Pienkowski, 1985] et au niveau bronchique [Van Bever, 1989]. Il a pu être montré dans les deux cas une diminution voire une abolition

complète de la réaction retardée après stimulation allergénique dans 2/3 des patients traités. Cependant, si la désensibilisation est arrêtée précocément (après un an), la réaction retardée revient à son niveau de base d'avant traitement [Van Bever, 1990]. Par ailleurs une diminution significative de l'hyperréactivité bronchique non spécifique a été observée chez des patients asthmatiques désensibilisés au chat [Hedlin, 1991, Ohman, 1984].

L'ensemble des cellules effectrices et régulatrices impliquées dans les réactions IgE-dépendantes ont été évaluées individuellement comme cible potentielle d'action de la désensibilisation.

### 1.2.1- Les cellules effectrices

#### \* *Les mastocytes et les basophiles*

Porteuses du récepteur de forte affinité pour l'IgE, les mastocytes et les basophiles sont les premières cellules à entrer en contact avec l'allergène. Quand l'allergène interagit avec les IgE spécifiques liés à la cellule, des substances biologiquement actives telles que l'histamine, certaines cytokines, les prostaglandines ou les leucotriènes sont relarguées à partir de la membrane phospholipidique et des granules des mastocytes et basophiles. Ces substances augmentent la perméabilité vasculaire, la contraction des fibres musculaires lisses et le recrutement de cellules inflammatoires.

L'effet de la désensibilisation sur la réaction immédiate dépendante de l'IgE a été évalué au niveau des tests cutanés. Un certain nombre d'études retrouvent une baisse de la réactivité cutanée après désensibilisation à des allergènes variés tels que le poil de chat [Ohman, 1984, Van Metre, 1989], le *venin d'hyménoptère* [Tsicopoulos, 1990a], et les pollens de graminées [Bousquet, 1987, Varney, 1993]. Cependant, d'autres études ne montrent pas de changements [Jutel, 1995a]. Dans des études effectuées contre placebo, la désensibilisation aux pollens induit une diminution des médiateurs d'origine mastocytaire recueillis par lavage nasal après test de provocation nasale à l'allergène [Iliopoulos, 1991], notamment de la prostaglandine D<sub>2</sub>, de l'histamine, des dérivés des kinines, de la TAME esterase (N- $\alpha$ -p-tosyl-L-arginine methyl ester), parallèlement à l'amélioration du score clinique. Ces effets pourraient être liés à la diminution significative du nombre de mastocytes au niveau de la muqueuse nasale qui a été observé 3 à 6 mois après désensibilisation [Otsuka, 1991].

En ce qui concerne les basophiles du sang circulant, les études de l'effet de l'ITS sur cette population cellulaire sont plus contradictoires, avec des effets inhibiteurs de l'histaminolibération variable selon les études [Mahmood, 1982, Nusslein, 1985]. Dans le cas de la désensibilisation spécifique aux venins d'hyménoptères, plusieurs mois après administration de la dose de maintenance du venin, il semblerait qu'il y ait une diminution de l'histamine totale libérée par les basophiles, peut-être par diminution du nombre des basophiles, sans que la désensibilisation n'altère la réactivité du basophile en terme de pourcentage d'histaminolibération induit par l'allergène [Bernstein, 1989, Stephan, 1989]. Récemment, Jutel et al ont confirmé ces observations en démontrant que l'ITS induirait en plus de la diminution de la libération d'histamine totale, une diminution de la production de la leucotriène (LTC<sub>4</sub>) par les basophiles alors que la réactivité des basophiles à un stimulus IgE-dépendant n'est pas affectée par la désensibilisation [Jutel, 1996].

#### ***\* Les neutrophiles et les éosinophiles***

Les neutrophiles et les éosinophiles ont été impliqués dans les réactions retardées associées à l'asthme [De Monchy, 1985, Nagy, 1982], et les éosinophiles à la sévérité de l'asthme [Bousquet, 1990b]. Les médiateurs éosinophiliques telles que les protéines cationiques ont été impliquées dans les dommages épithéliaux [Frigas, 1986]. Les éosinophiles sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines proinflammatoires contribuant à la chronicité de la réaction allergique.

Dans une étude contre placebo étudiant 28 patients allergiques aux acariens, la désensibilisation par le principe actif s'accompagnait d'une diminution de l'activité chimioattractante pour les neutrophiles (NCA) des sérums de patients [McHugh, 1989]. Ces résultats ont également été retrouvés dans un autre travail chez des patients désensibilisés aux pollens de bouleau, où de façon concomitante était retrouvée une abolition de l'activité chimiotactique sérique vis-à-vis des éosinophiles lors de la saison pollinique par rapport à un groupe non traité [Rak, 1990]. Cette abolition de l'activité chimiotactique pour les éosinophiles a été retrouvée aussitôt que 4 semaines après désensibilisation accélérée [Nagata, 1994]. Là également, la désensibilisation s'accompagne d'une diminution du nombre d'éosinophiles lors de la saison pollinique que ce soit au niveau du lavage bronchoalvéolaire [Rak, 1991] ou du lavage nasal de sujets traités par rapport à des sujets non traités [Furin, 1991]. Une étude récente, au niveau des muqueuses nasales de sujets allergiques au pollen de

graminées, a démontré que l'ITS inhibe l'infiltration des éosinophiles qui représente une caractéristique de la réponse tardive induite par l'allergène spécifique [Durham, 1996].

### **\* Les plaquettes**

Les plaquettes sanguines interviennent dans les manifestations anaphylactiques et allergiques dépendantes de l'IgE, notamment par le biais du récepteur pour l'IgE. Après stimulation par l'allergène, elles relarguent des médiateurs cytotoxiques et des métabolites de l'oxygène. Cette activation plaquettaire est dépendante de la dose d'allergène et spécifique de cet allergène. Plusieurs travaux effectués dans le laboratoire ont montré une diminution de la réactivité plaquettaire induite par l'allergène spécifique au cours de la désensibilisation dans le modèle de l'hypersensibilité aux venins d'hyménoptères [Tsicopoulos, 1988]. Cette abolition n'est pas spécifique d'allergène parce que, si on désensibilise un patient polysensibilisé vis-à-vis du venin d'hyménoptère, on constate une abolition de la cytotoxicité plaquettaire également vis-à-vis des autres allergènes [Tsicopoulos, 1988]. En étudiant les effets de sérums de patients désensibilisés sur les plaquettes de patients non traités, un facteur sérique a été retrouvé capable d'inhiber, de façon dépendante de la dose, la cytotoxicité plaquettaire dépendante de l'IgE. Ce facteur n'est pas spécifique d'allergène et possède les mêmes caractéristiques qu'une lymphokine de 25 kDa, la PASL (Platelet Activity Suppressive Lymphokine) décrite par Pancre et al [Pancre, 1986]. Cette désactivation plaquettaire n'est pas liée à la présence d'Ac IgG bloquants spécifiques de l'allergène [Tsicopoulos, 1989]. Par contre, elle est associée à une diminution de la sensibilité des tests cutanés 6 semaines après ITS [Tsicopoulos, 1990a]. Par ailleurs, dans le cadre de l'ITS, il a été démontré que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> produisent un facteur de 25 kDa capable d'inhiber les fonctions cytotoxiques plaquettaires [Tsicopoulos, 1990b].

D'un autre côté, il a été démontré que des surnageants lymphocytaires obtenus chez des sujets désensibilisés et traités par un anticorps anti-TGF- $\beta$  perdent leur activité inhibitrice de la plaquette. Ce qui suggère que le TGF- $\beta$  pourrait être la PASL, en effet, le TGF- $\beta$  inhibe de façon dépendante de la dose, la cytotoxicité plaquettaire dépendante de l'IgE.

### **1.2.2- Les lymphocytes T immunorégulateurs**

La reconnaissance par le récepteur pour l'antigène des lymphocytes T de complexes peptide / molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) déclenche une

série de signaux intracellulaires entraînant la sécrétion par les lymphocytes T de différentes cytokines possédant des activités pléiotropes et permettant la différenciation, l'expansion et l'activation de diverses populations cellulaires.

**\* Diminution de la réactivité lymphocytaire T à l'allergène**

L'interaction de l'antigène avec son récepteur spécifique au niveau du lymphocyte T (TCR) va entraîner une expansion clonale de celui-ci. Après désensibilisation spécifique vis-à-vis de pneumallergènes ou de *venin d'hyménoptère*, l'on constate une diminution de la prolifération lymphocytaire T spécifique d'allergène, voire une abolition complète [Hiratani, 1981, Ledru, 1988, Rocklin, 1974]. Cette inhibition a été également démontrée par Van Bever et al, et ceci 6 mois après ITS à *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt) chez des enfants asthmatiques. D'une façon intéressante, cette abolition de la prolifération persiste même après stimulation des cellules T avec un agent activateur comme l'IL-2 [van Bever, 1993]. Cette tolérance lymphocytaire T qui est précoce a été confirmée dans une étude récente effectuée par Akdis et al, au niveau des cellules mononucléées de sang périphérique des sujets allergiques au venin d'abeille avant et 2 mois après ITS. En effet, ils ont démontré après ITS, une suppression de la prolifération lymphocytaire T spécifique des épitopes T de la molécule allergénique (la PLA) et pas de changement dans la prolifération induite par la toxine tétanique [Akdis, 1996]. Une étude effectuée par Lack et al a confirmé la suppression de la prolifération cellulaire T spécifique d'allergène chez des sujets allergiques à Dpt et ceci après immunothérapie spécifique de type rush [Lack, 1997]. Cependant, une étude effectuée par Cavaillon et al a montré que la prolifération lymphocytaire T ne varie pas entre les sujets contrôles et les sujets hyposensibilisés vis-à-vis du *Dermatophagoïdes farinae* (Der f I) avant et 5 à 24 mois après ITS [Cavaillon, 1988].

Pour induire une réponse spécifique d'antigène, les lymphocytes T doivent recevoir deux signaux de la cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le premier consiste en l'interaction entre le TCR et l'antigène associé au CMH, le deuxième est constitué par l'interaction de cosignaux additionnels entre les deux cellules. Si l'antigène est présenté en l'absence de ces signaux costimulateurs une non-réactivité des lymphocytes T spécifique de l'antigène est induite, conduisant à un mécanisme de tolérance [Jenkins, 1987]. Un de ces signaux est représenté par le couple CD86 / CD80 : CD28 / CTLA4 exprimés respectivement sur les CPA et les lymphocytes T [Linsley, 1990]. Il a été montré *in vitro* que la stimulation par de fortes doses de peptide d'acarien induit une abolition de la prolifération des

lymphocytes T allergène-spécifiques qui est associée à une forte baisse de l'expression de CD28 [Lake, 1993]. Dans ce cadre, nous avons recherché une diminution de l'expression de CD28 à la surface des cellules T de sujets allergiques après désensibilisation spécifique. Cette étude sera détaillée dans le RESULTAT II [Tsicopoulos, 1996].

**\* Les sous-populations lymphocytaire T au cours de la désensibilisation**

Afin de déterminer le type de sous-population T impliqué, diverses études ont étudié les variations de phénotype de surface des lymphocytes T au cours de la désensibilisation spécifique. La plupart des études n'ont pas montré de variation du nombre de cellules CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> au niveau du sang périphérique ou du lavage broncho-alvéolaire [Dominguez, 1983, Lesourd, 1987, Matloff, 1983, Rak, 1993, Tilmant, 1989]. Par contre lorsque ces sous-populations sont évaluées sur le plan fonctionnel en terme de prolifération spécifique de l'antigène, on note après désensibilisation une diminution de la réactivité des CD4<sup>+</sup> et inversement une augmentation de la réactivité des CD8<sup>+</sup> vis-à-vis de l'allergène [Hsieh, 1984].

L'association de certains marqueurs de surface cellulaire à une fonction, permettant le partage des lymphocytes T en sous-populations jouant un rôle régulateur distinct, a permis de mettre en évidence des fluctuations phénotypiques au cours de la désensibilisation spécifique. Ainsi, il a été observé une variation inverse de deux sous-populations CD4, avec une augmentation significative des CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> et une diminution concomitante des CD4<sup>+</sup>CDw29<sup>+</sup> [Tilmant, 1989]. Ces modifications apparaissaient précocément au 3ème jour de la désensibilisation pour disparaître au bout de 2 semaines. Les cellules CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> représentent l'état naïf et ont des effets inhibiteurs sur la réponse anticorps et la maturation des cellules effectrices. Quant aux cellules CD4<sup>+</sup>CDw29<sup>+</sup>, représentatives de l'état ultime de maturation induit par l'antigène, elles ont des effets amplificateurs sur la réponse IgE et sur la maturation des cellules effectrices. Donc, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> correspondent à une population ayant une fonction suppressive, tandis que les CD4<sup>+</sup>CDw29<sup>+</sup> à une population ayant une fonction helper.

**\* Génération de cellules T suppressives**

Dans les années 80, il a été postulé que l'un des mécanismes majeurs de la désensibilisation était lié à la génération de cellules T suppressives. La première étude publiée, montra qu'après désensibilisation à l'*ambrosia* des cellules suppressives spécifiques de

l'allergène étaient capables d'inhiber la prolifération lymphocytaire allergène spécifique [Rocklin, 1980]. Ces données furent confirmées par Nagaya qui montra que la sous-population suppressive appartenait aux cellules T CD8<sup>+</sup> [Nagaya, 1985]. Les CD8<sup>+</sup> ont également été impliquées dans l'effet sur la synthèse d'IgE *in vitro*. En effet la déplétion de cellules CD8<sup>+</sup> aboutit à une augmentation de la synthèse d'IgE *in vitro* chez des patients désensibilisés à l'ambrosia alors qu'elle n'a aucun effet chez des patients avant traitement [Tamir, 1987]. Un autre exemple est représenté par l'abolition de l'activation plaquettaire après désensibilisation au *venin d'hyménoptère* qui est elle aussi liée à un facteur inhibiteur de 25 kDa produit par les T CD8<sup>+</sup> [Tsicopoulos, 1990b]. Récemment, il a été démontré que le nombre des cellules T CD8<sup>+</sup> augmente après immunothérapie spécifique chez des sujets allergiques à Dpt et notamment un à deux jours après injection de la dose d'entretien [Lack, 1997].

Cette notion de cellules suppressives a été ensuite rejetée par les immunologistes qui y voyaient des artefacts de laboratoire. Ce concept est actuellement replacé dans le contexte de la polarisation Th-1 / Th-2, où l'on admet qu'il existe un équilibre entre ces deux sous-populations mutuellement inhibitrices l'une de l'autre.

**\* Th-1 / Th-2 et désensibilisation spécifique**

A la lumière de ces travaux, la question qui s'est posée a été la suivante : *La désensibilisation spécifique pourrait-elle réorienter la réponse Th-2 vers une réponse Th-1?* Des premières expériences effectuées *in vitro* ont montré qu'un tel switch pouvait être obtenu en stimulant des clones T humains spécifiques de Der p 1 par de fortes doses de peptide. Durant l'induction de la tolérance, une augmentation d'IL-4 a été observée alors qu'au moment de la phase établie de tolérance, la production d'IFN- $\gamma$  augmente et la production d'IL-4 diminue [O'Hehir, 1991]. Puis il a été montré que chez des sujets désensibilisés aux pollens de graminées, l'injection intradermique de l'allergène modifiait le profil de réponse cutanée avec induction d'ARN messager codant pour des cytokines de type Th-1 notamment l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 sans modification d'expression d'ARNm codant pour les cytokines de type Th-2 telles que l'IL-4 et l'IL-5 par rapport aux biopsies prélevées avant désensibilisation [Varney, 1993]. Le même profil d'expression de cytokines est retrouvé au niveau des biopsies nasales obtenues 24hr après un test de provocation allergénique nasale. En effet, une augmentation significative d'expression d'ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$  a été observée chez les sujets désensibilisés un an après ITS [Durham, 1996]. Une diminution d'IL-4 sécrétée par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

circulants a également été rapportée chez des sujets rhinitiques désensibilisés aux graminées par rapport à un groupe non traité, mais là sans modification de l'IFN- $\gamma$ . La diminution de l'IL-4 se fait proportionnellement à la durée de la désensibilisation [Secrist, 1993]. D'un autre côté, l'IL-12, une cytokine induisant la différenciation Th-1 [Hsieh, 1993, Manetti, 1993] a également été retrouvée au niveau de biopsies cutanées obtenues chez des patients, 4 ans après désensibilisation aux pollens. De plus, les cellules qui expriment l'ARNm codant pour l'IL-12 corrélaient positivement avec celles exprimant celui codant pour l'IFN- $\gamma$  et inversement avec celles exprimant l'ARNm codant pour l'IL-4 [Hamid, 1997]. Enfin, il a été démontré une augmentation dans la production de l'IFN- $\gamma$  particulièrement par les cellules T CD4<sup>+</sup> au cours du protocole rush vis-à-vis de Dpt corrélant avec la réduction de la réactivité cutanée [Lack, 1997].

C'est dans la désensibilisation aux *venins d'hyménoptères* que les résultats sont le plus tranchés. Ainsi, dans 3 travaux concordants dont le notre (voir RESULTAT I), une baisse de la production et de l'expression d'ARN messenger codant pour l'IL-4 et l'IL-5 et une augmentation de la production et de l'expression d'ARN messenger codant pour l'IFN- $\gamma$  ont été démontrées chez des sujets allergiques au *venin d'hyménoptères* après ITS par le protocole rapide "ultra rush" en 3h 30 [Akoum, 1996, Jutel, 1995b, McHugh, 1995]. De plus, une étude très récente montre également une réorientation du profil de type Th-2 vers un profil de type Th-1 après ITS au venin de guêpe ou d'abeille par un protocole accéléré. De plus, il a été observé une abolition de la prolifération spécifique du venin ainsi qu'une diminution d'expression du récepteur d'IL-4, de Fc $\epsilon$ RII, de CD40 et de CD40L. Par contre une augmentation de production et d'expression d'IL-10 a été démontrée. L'IL-10, une cytokine à fonction immunosuppressive pourrait contrôler l'expansion des cellules de type Th-1 parce qu'un anticorps neutralisant anti-IL-10 induit une restauration de la prolifération spécifique d'allergène et augmente davantage la production d'IFN- $\gamma$ , sans affecter la diminution d'IL-4 [Bellinghausen, 1997].

*Bien que l'hypothèse Th-1 / Th-2 soit séduisante pour expliquer les modifications immunologiques induites par la désensibilisation, des études sont nécessaires pour les corrélater avec l'efficacité clinique.*

## III.2- Divers

### **\*\* Chimiokines et désensibilisation spécifique**

Comme nous l'avons déjà décrit précédemment, les HRF libérés par plusieurs types cellulaires tels que les cellules mononucléées, les macrophages alvéolaires, les neutrophiles et les plaquettes, agissent sur les mastocytes et les basophiles en provoquant une libération d'histamine. Après désensibilisation spécifique, une diminution de la réactivité des basophiles et des mastocytes, cellules précocément impliquées dans les réactions allergiques, a été mise en évidence entraînant une diminution de la libération des médiateurs tels que l'histamine [Jutel, 1996, Mahmood, 1982, Pruzansky, 1968, Wantke, 1993]. L'on sait actuellement que ces HRF appartiennent en majorité à la superfamille des chimiokines [Baggiolini, 1994, Kaplan, 1994]. Au cours de la désensibilisation, plusieurs études effectuées en double aveugle contre placebo ont montré une diminution de la production spontanée et induite par l'allergène de ces HRF par les cellules mononucléées du sang circulant pendant la saison pollinique [Brunet, 1992, Kuna, 1989]. Une étude récente a démontré que 2 ans après désensibilisation d'enfants asthmatiques aux acariens, une diminution spontanée de la production de RANTES et de MCP-1 par les CMN et une augmentation de production d'IL-8 sont observées [Hsieh, 1996].

*Dans le cas de la désensibilisation aux venins d'hyménoptères, la tolérance clinique précoce observée rapidement après les 3h 30 du traitement "ultra rush", suggère des processus régulateurs de la réponse immune qui pourraient s'effectuer au niveau des cellules effectrices telles que les basophiles. Les chimiokines pourraient donc jouer un rôle important, cette étude fait partie de nos travaux et sera détaillée dans les RESULTATS III et IV.*

***CADRE ET OBJECTIFS***

L'ImmunoThérapie Spécifique (ITS) ou désensibilisation consiste en l'administration de doses croissantes d'allergène permettant l'obtention d'un état de tolérance immunologique conduisant à l'obtention d'une tolérance clinique vis-à-vis d'une exposition allergénique naturelle. Largement utilisée depuis le début du siècle, contestée par certains, la désensibilisation souffre d'une méconnaissance des mécanismes (humoraux et cellulaires) pouvant expliquer la tolérance induite. Diverses modifications ont été observées telles une baisse des IgE spécifiques, une augmentation des anticorps IgG bloquants, une baisse de la réactivité des cellules effectrices que sont les mastocytes, basophiles et éosinophiles. L'intervention de cellules régulatrices lymphocytaires suppressives a également été mise en évidence. Aucune de ces modifications, considérée séparément ne permet d'expliquer les mécanismes d'action de la désensibilisation.

Dans le cas de l'hypersensibilité aux venins d'hyménoptères (HSVH), la désensibilisation spécifique est le moyen le plus efficace actuellement pour mettre ces personnes à l'abri d'un choc anaphylactique potentiellement mortel. Cependant, le mode d'action de cette ITS reste mal connu et les différentes hypothèses proposées ne sont pas corrélées avec l'amélioration clinique.

Depuis plusieurs années, des travaux antérieurs ont été menés dans notre laboratoire sur l'ITS accélérée dans le modèle de l'HSVH. En effet, on observe au cours de ce processus une réduction significative de l'activité plaquettaire dépendante de l'allergène liée à la présence d'un facteur inhibiteur lymphocytaire T.

Le travail de recherche qui a été mené lors de la thèse s'inscrit dans la poursuite de l'exploration des hypothèses tendant à expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'efficacité de la désensibilisation spécifique au venin d'hyménoptères. Nous avons étudié :

1- le profil de cytokines de type Th-1 (IFN- $\gamma$ ) et Th-2 (IL-4) chez les sujets allergiques aux venins, parallèlement à l'étude de la prolifération lymphocytaire T spécifique

de l'Ag. D'un autre côté, l'expression de CD28 à la surface des cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> a été également étudiée dans le but d'évaluer une possible corrélation avec la prolifération lymphocytaire T.

2- les modifications précoces de production et d'expression de chimiokines (IL-8, MCP-1, RANTES) par les CMN de sujets allergiques au cours de l'ITS spécifique au venin. Dans la poursuite de ces travaux, l'effet du RANTES et du MCP-3 sur l'histaminolibération basophile a été appréhendé.

3- la régulation de la synthèse des Ac d'isotype E au cours de l'ITS spécifique, en analysant notamment l'expression des transcrits stériles (gε) et productifs (pε) pour l'IgE ainsi que celle des cytokines régulatrices de la synthèse d'IgE (IL-4, IL-13) et la production d'IL-13.

***RESULTATS***

## **RESULTAT I**

### ***PROFIL DES CYTOKINES AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

## **ARTICLE 1**

### ***PROFIL DES CYTOKINES AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans *Immunology* (1996, 87: 593) et insérée ci-après.

L'ImmunoThérapie Spécifique (ITS) ou désensibilisation des sujets présentant une hypersensibilité au venin d'hyménoptère (HSVH) est le moyen le plus efficace actuellement pour mettre ces personnes à l'abri d'un choc anaphylactique potentiellement mortel. Cependant, le mode d'action de l'ITS reste mal connu, de nombreuses hypothèses humorales et cellulaires ont été proposées mais aucune de ces hypothèses ne corrèle avec l'amélioration clinique. Notre travail de thèse s'inscrit dans l'exploration des hypothèses tendant à expliquer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'efficacité de la désensibilisation spécifique au venin d'hyménoptères.

Il est maintenant bien connu que lors des réactions allergiques, un profil préférentiel de type Th-2 est observé avec en particulier une production d'IL-4 impliquée dans la synthèse d'IgE et d'IL-5 intervenant dans la différenciation des éosinophiles par opposition au profil Th-1 où une synthèse d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  est retrouvée. La question posée était de savoir si l'efficacité de l'ITS aux venins d'hyménoptères, pouvait être liée à un changement de l'équilibre Th-1 / Th-2 avec une évolution d'un profil de type Th-2 vers Th-1. Ainsi, dans le but d'évaluer l'influence de l'ITS, réalisée selon la technique ultrarapide (rush), sur le profil T helper (Th-1 et Th-2), nous avons étudié la production et l'expression de l'IL-4 (cytokine de type Th-2) et de l'IFN- $\gamma$  (cytokine de type Th-1) par les lymphocytes T purifiés à partir du sang périphérique de 12 patients sensibles au venin d'hyménoptère, avant (à J0) et après traitement au venin (à J15 et J90). 7 sujets contrôles ont été inclus dans l'étude. La prolifération des cellules T spécifiques d'antigène a été également étudiée. La production (par ELISA) et l'expression (par Hybridation *in situ*) de ces cytokines ont été évaluées au niveau

des lymphocytes T, après 24h de culture, soit avec le milieu, soit avec le venin, soit avec un Ag non spécifique.

En terme de prolifération, on observe très rapidement (à J15 correspondant au premier rappel) une abolition de la réactivité spécifique d'antigène des lymphocytes T (Figure 1, ARTICLE 1). La production et l'expression d'ARNm pour l'IL-4 par les cellules T stimulées diminue à partir de J15 pour être minimale à J90 (Figure 2, ARTICLE 1). Par contre pour l'IFN- $\gamma$  on observe à l'inverse une augmentation de la production et de l'expression spontanée de cette cytokine, mais seulement à J90 après le rush (Figure 3, ARTICLE 1). De plus, l'abolition précoce de la prolifération spécifique de l'Ag ne corrèle pas avec l'augmentation tardive de l'IFN- $\gamma$ .

*L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'induction de la tolérance spécifique à l'Ag est associée, mais non exclusivement liée, à la correction du déséquilibre Th-1 / Th-2. Au total, une inversion du profil des cytokines est observée après désensibilisation accélérée, mais qui se produit après abolition de la réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de l'allergène, suggérant l'intervention d'autres mécanismes dans l'induction de la tolérance précoce.*

# ARTICLE 1

## Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon- $\gamma$ messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes

H. AKOUM,\* A. TSICOPOULOS,\*† H. VORNG,\* B. WALLAERT,\*† J. P. DESSAINT,‡ M. JOSEPH,\* Q. HAMID§ & A. B. TONNEL\*† \*Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, †Service de PneumoImmunoAllergologie, Hôpital Calmette, Lille, ‡Service d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille, France, §MacGill University, Meakins Christie Laboratories Montreal, Quebec, Canada

### SUMMARY

The mechanism by which specific immunotherapy exerts its beneficial effect remains unclear. In order to evaluate the influence of venom immunotherapy on the T-cell cytokine pattern of allergic reactions, we studied interleukin-4 (IL-4) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) mRNA expression of peripheral T lymphocytes from 12 patients undergoing rush venom desensitization, before treatment at Day 0 (D0), at Day 15 (D15) and Day 90 (D90) after treatment, and from seven controls. Antigen-specific T-cell proliferation was also determined. Cytokine mRNA expression was evaluated using *in situ* hybridization, 24 hr after culture of peripheral T cells with medium, venom, or an unrelated allergen. Allergen-induced T-cell proliferation decreased at D15 and D90 of rush immunotherapy ( $P \leq 0.02$ ). In venom-stimulated cultures of the patient group, there was a decrease in IL-4 mRNA-positive cells at D15 and D90 ( $P \leq 0.001$ ). Before desensitization, IFN- $\gamma$  mRNA expression was lower in patients than in controls and did not increase after *in vitro* allergen stimulation. In contrast, after immunotherapy, spontaneous IFN- $\gamma$  mRNA expression increased, but only at D90 ( $P \leq 0.001$ ). The cytokine pattern observed at D90 after immunotherapy was similar to that observed in control subjects. In conclusion, venom immunotherapy induced an altered cytokine mRNA pattern in allergen-stimulated T cells which was dissociated from the early changes of allergen-induced T-cell responsiveness.

### INTRODUCTION

Specific immunotherapy has been used for years on empirical bases. In the last decade, double-blind placebo-controlled studies have shown the efficacy of this form of treatment in some types of allergic reactions. This is the case for Hymenoptera venom immunotherapy where the protection achieved in allergic patients is around 96%.<sup>1</sup> However, the mechanism by which immunotherapy exerts its beneficial effect remains unclear. Different hypotheses have been formulated including humoral and cellular mechanisms (reviewed in ref. 2 and 3) but none of them has been undoubtedly correlated with the efficacy of immunotherapy. More recently, in allergic reactions, several groups of authors have reported a predominant T helper cell type 2 (Th2)-type pattern [interleukin-4 (IL-4) and IL-5 production and mRNA expression] at the level of peripheral T-cell clones and tissues<sup>4–7</sup> whereas the Th1-type pattern [IL-2 and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )] was predominantly observed in delayed-type hypersensitivity reactions.<sup>8–10</sup> Indeed,

Th2-type cytokines are potent inducers of IgE synthesis and of the differentiation and activation of Fc $\epsilon$ RI-bearing cells implicated in IgE-dependent anaphylactic reactions. One hypothesis regarding the effect of immunotherapy is that hyposensitization might alter the cytokine profile observed in allergic reactions by down-regulating Th2-type cytokines and/or increasing Th1-type cytokines. Hitherto, two studies have been published on this topic and have shown different results. One found that grass pollen immunotherapy in allergic rhinitis induced IL-2 and IFN- $\gamma$  mRNA expression in allergen-elicited late-phase cutaneous responses, without changes in IL-4 and IL-5 mRNA expression.<sup>11</sup> Using the same immunotherapy model, the other study showed a decrease in IL-4 production by peripheral CD4<sup>+</sup> T cells, but no significant changes in IL-2 and IFN- $\gamma$  secretion.<sup>12</sup> In order to evaluate the influence of immunotherapy on the cytokine pattern of allergic reactions we studied the effect of a well-established model of protection, i.e. venom immunotherapy, on the IL-4 (Th2-type cytokine) and IFN- $\gamma$  (Th1-type cytokine) mRNA expression by peripheral T cells purified from patients undergoing rush venom hyposensitization.

### MATERIALS AND METHODS

#### Subjects

Twelve patients (age 19–63 years) and seven controls (age 16–62 years) were included in the study. All patients had a history

Received 28 August 1995; revised 1 November 1995; accepted 26 November 1995.

Abbreviations: D0, Day 0; D15, Day 15; D90, Day 90; IL, interleukin; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; mRNA, messenger RNA.

Correspondence: Dr A. Tscopoulos, Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59019 Lille cedex, France.

Table 1. Patients and control subjects characteristics

Donor	Age (years)	Sex	Atopy	Clinical score*	Skin test reactivity†	RAST‡	
Patients	1	28	F	—	2	10 <sup>-1</sup>	1
	2	49	F	+	2	10 <sup>-2</sup>	2
	3	48	F	—	3	10 <sup>-3</sup>	3
	4	23	M	+	2	10 <sup>-2</sup>	2
	5	41	F	—	5	10 <sup>-1</sup>	1
	6	36	M	—	4	10 <sup>-1</sup>	1
	7	63	M	—	3	10 <sup>-3</sup>	2
	8	30	F	—	5	10 <sup>-1</sup>	2
	9	55	F	—	3	10 <sup>-2</sup>	2
	10	19	M	+	4	10 <sup>-3</sup>	3
	11	34	F	—	3	10 <sup>-1</sup>	2
	12	46	M	+	3	10 <sup>-2</sup>	3
Controls	1	62	F	—	0	—	0
	2	16	M	+	0	—	0
	3	50	M	—	0	—	0
	4	16	F	+	0	—	0
	5	20	M	—	0	—	0
	6	40	F	—	0	—	0
	7	62	M	—	0	—	0

\* The clinical reactions were classified as follows: (0) local reaction; (1) large local reaction; (2) slight general reaction; (3) general reaction: any of the above plus two of the following: angioneurotic oedema, constriction of chest, abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhoea; (4) severe general reaction: any of the above plus two of the following: dyspnoea, dysphagia, hoarseness; (5) shock reaction with fall in blood pressure and/or unconsciousness.

† Venom concentration giving a positive skin test (wheal  $\geq$  5 mm).

‡ Specific IgE are expressed as RAST score 0–4.

of systemic anaphylactic reactions after Hymenoptera stings, positive intradermal tests and radioallergosorbent tests (RAST). Eleven were sensitive to *Vespula germanica* and one to *Apis mellifica*. Control subjects had all been stung by Hymenoptera, but experienced only normal reactions and had negative venom skin tests and RAST. Table 1 presents the main characteristics of the subjects. Clinical reactions were classified according to Mueller classification.<sup>13</sup>

#### Immunotherapy regimen

The method used for treatment was the ultrarush method as described by Birnbaum *et al.*<sup>14</sup> Briefly, at day 0, increasing doses of venom were injected every 30 min for 3 hr 30 min to reach a final dose of 40  $\mu$ g (cumulative dose, 100  $\mu$ g). At day 15, and every month afterwards 100  $\mu$ g of venom were injected subcutaneously. Rush immunotherapy was well tolerated in the 12 patients, with only local reactions.

#### Allergens, antibodies and mitogens

Venom allergens were purchased from Dome Hollister Stier Laboratories (Elkhart, IN). The same aliquoted batches of venoms were used throughout the study. Grass pollen and house dust mite allergens were supplied by Laboratoire des Staller-gènes (Fresnes, France) and were used as unrelated allergens according to the results of the skin prick tests. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3 monoclonal antibodies (mAb) and anti-CD14 mAb were purchased from Becton Dickinson (San Jose, CA), phytohaemagglutinin (PHA)

from Difco (Detroit, MI) and tetanus toxoid was a kind gift from A. Tartar (Institut Pasteur de Lille).

#### IgE levels

Total serum IgE and specific IgE antibody (AlaSTAT, Behring Diagnostic, Rueil-Malmaison, France) were measured successively at day 0 (D0), day 15 (D15) and day 90 (D90) of the immunotherapy protocol.

#### Preparation of T cells

Venous blood was collected on calcium heparinate (Choay, France) at D0, D15 and D90 of the rush protocol. Blood samples were collected before the venom injections. The blood was diluted with an equal volume of 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) and layered over Ficoll-Hypaque gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After centrifugation, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were harvested and washed three times in PBS. T cells were purified by E-rosetting PBMC with AET-treated sheep red blood cells (SRBC). Rosetting was carried out at 4° for 1 hr using 1 ml of SRBC for 4  $\times$  10<sup>6</sup> PBMC/ml. After rosetting, the cells were resuspended, layered over Ficoll-Hypaque, and centrifuged for 35 min. The SRBC-T-cell pellet was collected and washed. SRBC were lysed using hypotonic sodium chloride, and the resulting T cells were washed twice. Purity of the T-cell population was assessed by cytofluorometry using FITC-conjugated CD3 antibody. Purity was 82  $\pm$  3.6% CD3<sup>+</sup> cells. The contaminating cells were

mainly monocytes as determined by Giemsa staining and fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis, and allowed antigen presentation to T cells. There was no basophil contamination.

#### Proliferation assays

Enriched T cells ( $10^5$  cells/well) were incubated at  $37^\circ$  in 96-well flat-bottomed microculture plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in 5%  $\text{CO}_2$ , in the presence of optimal venom concentration (1 ng/ml), an unrelated allergen (grass pollen or house dust mite), PHA (1/1000), tetanus toxoid (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and medium. The optimal venom concentration was determined in preliminary experiments by performing dose-responses. We chose the venom concentration which gave optimal proliferation as evidenced by comparison with control subjects (i.e. 1 ng/ml). Cells were cultured in endotoxin-free RPMI-1640 supplemented with 2 mM glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate,  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -mercaptoethanol and 5% autologous serum. After 5 days of incubation, cells were pulsed with [ $^3\text{H}$ ]thymidine ([ $^3\text{H}$ ]TdR) (0.5  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ) for 18 hr before harvesting. Proliferation as correlated with [ $^3\text{H}$ ]TdR incorporation was measured by liquid scintillation spectrometry. Triplicate values for each assay were generally within 20% of the SEM. Results were expressed as stimulation index (SI) (mean c.p.m. value of stimulated cultures/mean c.p.m. value of unstimulated cultures).

#### Cell cultures and in situ hybridization

T cells ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) were incubated with venom, an unrelated allergen and medium, as described above. Cell viability was greater than 96% as evaluated by trypan blue exclusion test. After 24-hr culture cells were cytocentrifuged on poly-L-lysine-coated RNAase-free slides and immediately fixed in 4% paraformaldehyde and then washed in 15% PBS/sucrose. Slides were stored with silica gel at  $-80^\circ$  until used.

*In situ* hybridization was performed as previously described.<sup>15,16</sup> Briefly, cytopins were hybridized with  $^{35}\text{S}$ -labelled riboprobes ( $1 \times 10^6$  c.p.m. per section) in hybridization buffer containing 50 mM dithiothreitol (DTT; Promega, Madison, WI). Cytopins were hybridized overnight at  $50^\circ$  and washed in high stringency conditions ( $50^\circ$ ,  $0.1 \times \text{SSC}$ ). A peripheral blood T-lymphocyte clone obtained from a patient with the hyper IgE syndrome, which expressed mRNA for IL-4 was used as a positive control. PHA-stimulated blood mononuclear cells were used as IFN- $\gamma^+$  controls. For negative controls, cytopins were hybridized using sense probes for the relevant cytokines. Additional cytopins were treated with RNAase-A before the prehybridization step with antisense probes. Specific hybridization was recognized as clear dense deposits of silver grains in the emulsion overlying cells in the cytopin preparations. Cells were identified as dense, discrete, well-circumscribed areas of silver grains. When hybridized cells were in close proximity, their numbers were determined by visualizing the number of individual nuclei, using dark field illumination. Cytopins corresponding to different time-points of the rush, for a given patient, were processed all together for each probe. The cells expressing mRNA for each lymphokine were enumerated using an eyepiece graticule. Slides were counted blind. For each condition, at least three cytopins were hybridized with the probes. Results were expressed as the number of positive cells per 1000 cells. The within-observer coefficient of variation was  $< 5\%$ .

#### Statistical analysis

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between results obtained for a single subject in different conditions of stimulation at one particular time point were performed using paired *t*-tests. Comparisons between results observed in the control group and the patient group studied before immunotherapy were performed using unpaired *t*-tests. Finally, comparisons within results obtained at different time-points for a particular type of stimulation were done using one-way analysis of variance. Statistical analysis was performed by using the computer program StatView.

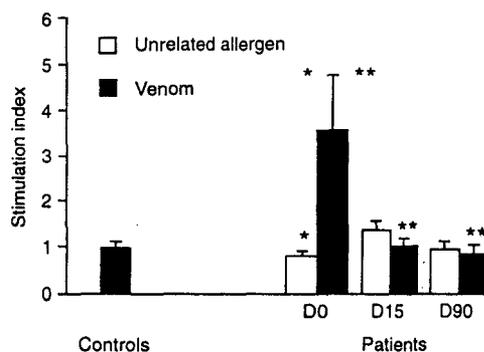
## RESULTS

### Modulation of IgE production

Total and venom-specific IgE were measured in serum obtained from the patients at D0, D15 and D90, and from the controls, and were expressed as KUI/L and RAST units respectively. Total IgE levels were  $298 \pm 129$  at D0,  $262.3 \pm 99.6$  at D15, and  $243.7 \pm 116.3$  KUI/L at D90, and  $222.8 \pm 92.8$  in the controls. There was no statistical difference between the different time-points in the patients, and between the controls and the patients at D0. Venom-specific IgE increased at D15 ( $7.09 \pm 1.9$  RAST units) compared with D0 ( $3.14 \pm 0.8$  RAST units) ( $P \leq 0.04$ ) and was  $6.1 \pm 2.5$  RAST units at D90.

### Abolition of venom-specific T-lymphocyte proliferation after rush immunotherapy

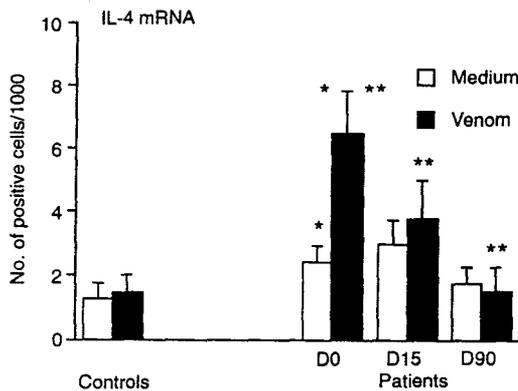
We chose to study T cells rather than total mononuclear cells, because in a previous study, we showed that enriched T cells gave better results in terms of venom-induced proliferation than total mononuclear cells.<sup>17</sup> Whole venom was used since the majority of the patients were sensitive to yellow jacket venom which does not contain one major allergen like bee venom but several allergenic components recognized differently according to the patients. In order to determine the optimal venom dose for T-cell proliferation, dose-responses were performed in patients and controls. A biphasic curve was observed in the patients with a peak at 1 ng/ml and a second



**Figure 1.** Evolution of antigen-induced T-cell proliferation in patients undergoing rush venom immunotherapy compared with controls. Results are expressed as mean Stimulation index (mean c.p.m. value of stimulated cultures/mean c.p.m. values of unstimulated cultures)  $\pm$  SEM.

\* $P \leq 0.05$  at D0 (paired *t*-test).

\*\* $P \leq 0.02$  within D0 D15 D90 (one way analysis of variance).



**Figure 2.** IL-4 mRNA expression by enriched T lymphocytes from patients undergoing rush venom immunotherapy compared with controls. Results are expressed as number of positive cells per 1000.

\* $P \leq 0.01$  at D0 (paired *t*-test).

\*\* $P \leq 0.001$  within D0 D15 D90 (one way analysis of variance).

increase at  $1 \mu\text{g/ml}$ . Since we observed some proliferation at  $1 \mu\text{g/ml}$  venom dose in a few control subjects, we chose the  $1 \text{ ng/ml}$  dose. Unrelated allergens were defined as giving a negative skin prick test. Venom-stimulated T lymphocytes from the control group as well as unrelated allergen-stimulated T lymphocytes from the patient group showed only background proliferation (Fig. 1). On the other hand, at D0 of rush immunotherapy, venom-stimulated T lymphocytes from allergic patients showed enhanced proliferation compared with unrelated allergen-stimulated T cells ( $P \leq 0.05$ ). At D15 and D90, allergen-specific T-cell proliferation was totally abolished with low doses of venom (Fig. 1). Analysis of variance showed significant differences within the different time points for venom-specific T-cell proliferation ( $P \leq 0.02$ ). The positive controls used for T-cell proliferation were PHA and tetanus toxoid stimulation. There were no statistical differences within the observed proliferations at the different time-points of the rush (For PHA D0,  $31.88 \pm 12.7$ ; D15,  $30.24 \pm 13.54$ ; D90,  $25.72 \pm 13 \times 10^3$  c.p.m.; for tetanus toxoid D0,  $6.48 \pm 1.9$ ; D15,  $5.85 \pm 2.2$ ; D90,  $5.64 \pm 1.7 \times 10^3$  c.p.m.).

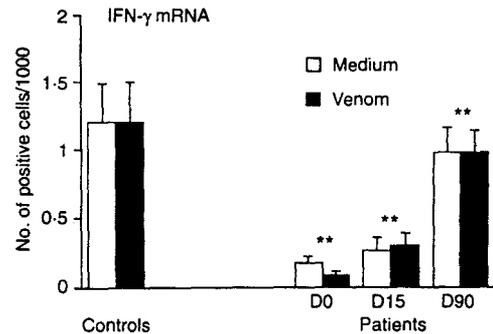
#### Modulation of IL-4 mRNA expression during immunotherapy

In the control group, IL-4 mRNA expression after venom stimulation was at the background level, similar to that of non-stimulated T cells (Fig. 2).

In the patient group, at D0, IL-4 mRNA expression was at baseline levels after culture with medium only, and after unrelated allergen stimulation. On the other hand, stimulation with the low venom dose used induced significant increases in IL-4 production mRNA expression ( $P \leq 0.01$ ). After the initiation of rush immunotherapy, in non-stimulated conditions, no significant variation of the spontaneous IL-4 mRNA expression was observed. After specific venom stimulation, there was a significant decrease in the number of positive cells at D15 and D90 compared with D0 ( $P \leq 0.001$ ).

#### Increase in IFN- $\gamma$ mRNA expression during immunotherapy

At baseline, IFN- $\gamma$  mRNA expression was higher in cells from controls than from patients at D0 ( $P \leq 0.001$ ) (Fig. 3).



**Figure 3.** IFN- $\gamma$  mRNA expression by enriched T lymphocytes from patients undergoing rush venom immunotherapy compared with controls. Results are expressed as number of positive cells per 1000.

\*\* $P \leq 0.001$  within D0 D15 D90 (one way analysis of variance).

Whatever the group or the time-point, the stimulation of T cells with the specific venom at low concentration did not induce increased IFN- $\gamma$  mRNA expression, as compared with baseline. In non-stimulated conditions there was no IFN- $\gamma$  modification at D15 in terms of mRNA expression. However, at D90, an increase in spontaneous IFN- $\gamma$  mRNA expression was observed which reached the level observed in the control group. The difference within the different time-points for spontaneous IFN- $\gamma$  mRNA expression was statistically significant ( $P \leq 0.001$ ). After venom stimulation, a similar significant increase in the number of IFN- $\gamma$  mRNA-positive cells was observed within the different time-points ( $P \leq 0.001$ ).

## DISCUSSION

T-cell modifications induced by immunotherapy have been described as early as the 1970s. Reduction of antigen-specific proliferation was the first to be specified<sup>18</sup> and since, has been confirmed in other studies.<sup>17,19-21</sup> In this study we also observed that venom immunotherapy abolished antigen-specific T-cell proliferation. The striking point was that this effect was observed early at D15 of the rush, thus correlating with the efficacy of rush venom immunotherapy which is rapid, since patients can tolerate high doses of venom at the end of the rush. This clinical tolerance was therefore reflected at the level of T cells which became very quickly unresponsive to the specific antigen, at least at the low dose of venom that we used. The fact that a low dose of antigen was able to induce T-cell proliferation is probably related to the presence of monocytes as antigen-presenting cells, which have been recently shown to favour allergen-specific T-cell proliferation as compared with B cells, even at low allergen concentration. Low allergen concentrations have also been shown to be more efficient in triggering IL-4 mRNA expression and synthesis than high doses of allergen.<sup>22</sup>

T cells, through secretion of lymphokines, are potent cells that regulate specific and non-specific immune responses. For instance, IL-4 and IFN- $\gamma$  reciprocally antagonize the actions of each other on B cells, in particular at the level of IgE synthesis,<sup>23</sup> and each inhibits the differentiation of naive T cells into secretors of the other cytokine.<sup>24,25</sup> Thus, in many experimental systems, cytokines serve as potent down-modulators of lymphocyte differentiation and activation, with

IL-4 exerting an inhibitory effect on Th1-like responses, and IFN- $\gamma$  doing the same to Th2-like responses. These observations raise the possibility that cytokine regulation plays a role in antigen-specific tolerance *in vivo*. However, in the case of venom immunotherapy, the changes observed in IFN- $\gamma$  and IL-4 mRNA expression were not concomitant to the early lymphocyte unresponsiveness, ruling out a role for these cytokines in this event. An increase in spontaneous IFN- $\gamma$  mRNA expression was observed at D90 but not at D15. This increase was also observed in some patients studied at D45 (data not shown). The expression of IFN- $\gamma$  obtained at D90 was similar to that of controls, suggesting that venom-allergic patients had at baseline a defect in IFN- $\gamma$ , as has been previously reported in atopic patients.<sup>26-28</sup> Moreover, among the controls, two were atopic and exhibited higher IL-4 and lower IFN- $\gamma$  mRNA expression than the non-atopic controls. Among venom-sensitive patients, there was no difference whether they were atopic or not. The delayed IFN- $\gamma$  elevation does not preclude the intervention, at an earlier stage, of other cytokines known to trigger IFN- $\gamma$ , like IL-12, which is also able to inhibit the development of IL-4-producing T cells.<sup>29</sup>

Messenger RNA is not equivalent to protein translation, and indeed we first measured by ELISA, cytokine production in the culture supernatants harvested at the same time as cell recovering. However, owing to a wide variability between patients and to the low levels of IL-4 which could be detected, results were difficult to interpret. We therefore chose to use a more sensitive method of detection, i.e. *in situ* hybridization, looking at the gene level. It is of note that in a recent study, using a culture system allowing the amplification of allergen-specific T cells, decreases in IL-4 and increases in IFN- $\gamma$  have been confirmed at the protein level in allergen-stimulated mononuclear cells during bee venom immunotherapy.<sup>30</sup>

Our study did not address the exact cell origin of the cytokine production. Although we used enriched T cells, we did not separate CD4<sup>+</sup> from CD8<sup>+</sup> cells and it is known that IFN- $\gamma$  and IL-4 can be produced by both sub-populations<sup>31,32</sup> and by natural killer cells. CD8<sup>+</sup> cells have been involved in the mechanisms of immunotherapy. During hyposensitization, they have been shown to suppress antigen-specific T-cell proliferation,<sup>33</sup> antigen-specific platelet reactivity,<sup>34</sup> and *in vitro* IgE synthesis.<sup>35</sup> It is therefore of interest that, in the study that did not find changes in IFN- $\gamma$  after immunotherapy, T cells had been depleted in CD8<sup>+</sup> cells<sup>12</sup> and that in the other study where there was an increase in IFN- $\gamma$ , CD8<sup>+</sup> cell counts were elevated.<sup>11</sup>

After rush immunotherapy, the rapid induction of antigen unresponsiveness in terms of T-cell proliferation was the only parameter associated with the establishment of the clinical tolerance. Albeit rush immunotherapy was able to modulate IL-4 and IFN- $\gamma$  expression by peripheral T lymphocytes, it appeared that both phenomena were not simultaneous, suggesting that the induction of the early antigen-specific tolerance was not linked to the modification of the IL-4/IFN- $\gamma$  balance. The very early clinical protection obtained within a few hr following rush immunotherapy, suggests that additional regulatory pharmacological processes might operate at the level of the effector cells involved in the triggering of the anaphylactic reaction.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM U 416. The authors would like to thank Mrs Jocelyne Fossati for IgE dosages and the nurses for their help in collecting the blood samples: Mrs Nadia Fernez, Sabine Quandalle, Laurence Capy and Bernadette Thiebaut.

## REFERENCES

- HUNT K.J., VALENTINE M.D., SOBOTKA A.K., BENTON A.W., AMODIO F.J. & LICHTENSTEIN L.M. (1978) A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* **299**, 157.
- ROCKLIN R.E. (1983) Clinical and immunological aspects of allergen-specific immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinitis and/or allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* **72**, 323.
- NAKAGAWA T. & GERSHWIN M.E. (1993) Immunotherapy of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* **102**, 117.
- WIENGA E.A., SNOEK M., DE GROOT C. *et al.* (1990) Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol* **144**, 4651.
- PARRONCHI P., MACCHIA D., PICCINI M.P. *et al.* (1991) Allergen- and bacterial antigen-specific T cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 4538.
- KAY A.B., YING S., VARNEY V. *et al.* (1991) Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, IL-3, IL-4, IL-5, and GM-CSF in allergen-induced late-phase reactions in atopic subjects. *J Exp Med* **173**, 775.
- ROBINSON D.S., HAMID Q., YING S. *et al.* (1992) Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* **326**, 298.
- BROD S.A., BENJAMIN D. & HAFNER D.A. (1991) Restricted T cell expression of IL-2/IFN-gamma mRNA in human inflammatory disease. *J Immunol* **147**, 810.
- DEL PRETE G.F., DE CARLI M., MASTROMAURO M. *et al.* (1991) Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand *in vitro* human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine secretion. *J Clin Invest* **88**, 346.
- TSICOPOULOS A., HAMID Q., VARNEY V. *et al.* (1992) Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN- $\gamma$  + IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* **148**, 2058.
- VARNEY V.A., HAMID Q.A., GAGA M. *et al.* (1993) Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* **92**, 644.
- SECRET H., CHELEN C.J., WEN Y., MARSHALL J.D. & UMETSU D.T. (1993) Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4<sup>+</sup> cells from allergic individuals. *J Exp Med* **178**, 2123.
- MUELLER H.L. (1966) Diagnosis and treatment of insect sensitivity. *J Asthma Res* **3**, 331.
- BIRNBAUM J., CHARPIN D. & VERVOLET D. (1993) Rapid hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols. *Clin Exp Allergy* **23**, 226.
- HAMID Q., WHARTON J., TERENGI G. *et al.* (1987) Localization of atrial natriuretic peptide mRNA in rat heart and human atrial appendage. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 6760.
- TSICOPOULOS A., HAMID Q., HACZKU A. *et al.* (1994) Kinetics of cell infiltration and cytokine messenger RNA expression after intradermal challenge with allergen and tuberculin in the same atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* **94**, 764.
- LEDRU E., PESTEL J., TSICOPOULOS A. *et al.* (1988) Lymphocyte-mediated regulation of platelet activation during desensitization in patients with hymenoptera hypersensitivity. *Clin Exp Immunol* **73**, 198.
- GATIEN J.G., MERLER E. & COLTEN H.R. (1975) Allergy to ragweed

- antigen E: effect of specific immunotherapy on the reactivity of human T lymphocytes *in vitro*. *Clin Immunol Immunopathol* **4**, 32.
19. ROCKLIN R.E., SHEFFER A.L., GREINER D.K. & MELMON K.L. (1980) Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. *N Engl J Med* **302**, 1213.
  20. HIRATANI H., MUTO K., OSHIDA H.O.S. & KASEI M. (1981) Lymphocyte responsiveness to *Dermatophagoïdes farinae* extract in mite-sensitive patients: effect of immunotherapy on cellular proliferative response and specific immunoglobulin E antibody. *J Allergy Clin Immunol* **68**, 205.
  21. HSIEH K.H. (1984) Changes of lymphoproliferative responses of T cell subsets to allergen and mitogen after hyposensitization in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* **74**, 34.
  22. SECRIST H., DEKRUYFF R.H. & UMETSU D.T. (1995) Interleukin 4 production by CD4<sup>+</sup> T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type. *J Exp Med* **181**, 1081.
  23. SNAPPER C.M. & PAUL W.E. (1987) IFN- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science (Wash. DC)* **236**, 944.
  24. SWAIN S.L., WEINBERG A.D., ENGLISH M. & HUSTON G. (1990) IL-4 directs the development of Th2-like helper functions. *J Immunol* **145**, 3796.
  25. MAGGI E., PARRONCHI P., MANETTI R. *et al.* (1992) Reciprocal regulatory effects of IFN- $\gamma$  and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* **148**, 2142.
  26. REINHOLD U., WEHRMANN W., KUKEL S. & KREYSEL H.W. (1990) Evidence that defective interferon-gamma production in atopic dermatitis patients is due to intrinsic abnormalities. *Clin Exp Immunol* **79**, 374.
  27. ROUSSET F., ROBERT J., ANDARY M. *et al.* (1991) Shifts in interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* **87**, 58.
  28. JUJO K., RENZ H., ABE J., GELFAND E.W. & LEUNG D.Y.M. (1992) Decreased interferon gamma and increased IL-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* **90**, 323.
  29. MANETTI R., PARRONCHI P., GIUDIZI M.G. *et al.* (1993) Natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12(IL-12)) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**, 1199.
  30. JUTEL M., PICHLER W.J., SKRBIC D., URWYLER A., DAHINDEN C. & MÜLLER U.R. (1995) Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- $\gamma$  secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* **154**, 4187.
  31. TAGUSHI T., MCGHEE J.R., COFFMAN R.L. *et al.* (1990) Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that secrete IFN- $\gamma$  and IL-5. *J Immunol* **145**, 68.
  32. BENDELAC A. & SCHWARTZ R.H. (1991) CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* **353**, 68.
  33. NAGOYA H. (1985) Induction of antigen-specific suppressor cells in patient with hayfever receiving immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* **75**, 388.
  34. TSICOPOULOS A., TONNEL A.B., VORNG H. *et al.* (1990) Lymphocyte-mediated inhibition of platelet cytotoxic functions during Hymenoptera venom desensitization: characterization of a suppressive lymphokine. *Eur J Immunol* **20**, 1201.
  35. TAMIR R., CASTRACANE J.M. & ROCKLIN R.E. (1987) Generation of suppressor cells in atopic patients during immunotherapy that modulate IgE synthesis. *J Allergy Clin Immunol* **79**, 591.

## **RESULTAT II**

***MODULATION DE L'EXPRESSION DE  
CD28 AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE  
SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

## **ARTICLE 2**

### **MODULATION DE L'EXPRESSION DE CD28 AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES**

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans Clin. Exp. Allergy (1996, 26: 1119) et insérée ci-après.

Pour induire une réponse spécifique d'antigène, les lymphocytes T doivent recevoir deux signaux de la cellule présentatrice d'antigène (CPA). Le premier consiste en l'interaction entre le TCR et l'antigène associé au CMH. Ce signal est nécessaire mais il n'est pas suffisant pour induire l'activation et la prolifération des cellules T. Le deuxième est constitué par l'interaction de cosignaux additionnels entre les deux cellules. Ces molécules costimulatrices jouent un rôle critique dans l'induction de la prolifération des cellules T, la sécrétion de cytokines et la fonction effectrice. C'est le cas de CD28, un récepteur de surface du lymphocyte T qui interagit avec le couple CD80 / CD86 exprimés sur les CPA. Le blocage de l'interaction entre ces molécules accessoires empêche l'activation du lymphocyte T par l'antigène spécifique créant ainsi un état d'anergie, anergie qui est observée au cours de l'ITS. Dans notre modèle d'étude, l'immunothérapie spécifique aux venins d'hyménoptères, nous ainsi que d'autres auteurs avons également retrouvé cette inhibition de la prolifération des lymphocytes T après stimulation avec le venin spécifique et ceci dans les premières semaines après le début du traitement par la technique rapide "le rush". Dans la présente étude, l'hypothèse était de savoir si cette abolition de la prolifération est liée à une diminution d'expression des molécules costimulatrices. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude de l'expression de CD28 au niveau des sous-populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> du sang périphérique chez dix patients allergiques aux venins d'hyménoptères. Le sang périphérique a été prélevé avant le début du traitement (à J0), à la fin des 3h30 du rush (à J1), au premier et au deuxième rappel (à J15 et J45) du traitement. L'expression de CD28 a été analysée par la technique du FACS avec un double marquage des sous-populations lymphocytaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.

Chez les patients avant ITS, on constate une augmentation de l'expression en base du CD28 par rapport aux sujets contrôles ( $p \leq 0,04$ ) et en particulier de la sous-population CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> ( $p \leq 0,01$ ) reflétant une diminution de la sous-population suppressive CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> (Table 2; ARTICLE 2). Au cours de l'ITS, la population des cellules T CD28<sup>+</sup> totales ne varie pas ainsi que la sous-population CD4<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup>; seule une diminution mais non significative de la sous-population CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> est observée à partir de J15 (Table 3; ARTICLE 2).

*Les résultats observés dans ce travail, suggèrent que la signalisation via le CD28 est probablement impliquée dans le développement des réactions allergiques, cependant au niveau phénotypique, aucune diminution d'expression de CD28 n'a été retrouvée ex vivo sur les lymphocytes T de patients désensibilisés aux venins d'hyménoptères.*

# ARTICLE 2

*Clinical and Experimental Allergy*, 1996, Volume 26, pages 1119–1124

## CD28 expression is increased in venom allergic patients but is not modified by specific immunotherapy

A. TSICOPOULOS\*†, M. LABALETTE‡, H. AKOUM\*, C. DUEZ\*,  
B. WALLAERT\*†, J. P. DESSAINT‡ and A. B. TONNEL\*†

\*Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, †Service de PneumoImmunoAllergologie, Hôpital Calmette.

‡Service d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional et Universitaire, Lille, France

### Summary

**Background** Recognition of antigen bound to the major histocompatibility complex by the T cell receptor is insufficient to lead to T cell proliferation and effector function, which require co-stimulatory signals, such as those resulting from the interaction of CD28 expressed on T lymphocytes and CD80/CD86 expressed on APCs. Lack of interaction between these accessory molecules during antigen stimulation leads to a state of antigen-specific lymphocyte unresponsiveness. Previous studies have shown that rush venom immunotherapy decreases venom-specific T cell proliferation very early after the initiation of the rush.

**Objective** In order to see whether this hyporeactivity was associated with a down regulation of accessory molecules, we studied CD28 surface expression on T lymphocytes from 10 non-atopic controls and from 10 non-atopic patients undergoing rush venom immunotherapy.

**Methods** Peripheral blood samples were collected before the rush (day 0), at the end of the rush (day 1), at day 15 and at day 45. CD28 expression was analysed using flow cytometry with double labelling of the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte subpopulations.

**Results** At baseline CD28 was expressed at a higher level on T lymphocytes from allergic patients than from control subjects ( $P < 0.04$ ), and in particular on the CD8 subset ( $P < 0.01$ ), reflecting a decrease in the suppressive CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> subpopulation. No changes were found in the percentages of total CD28<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells at the different time points after the initiation of immunotherapy.

**Conclusion** These results suggest that the CD28 pathway is probably involved in the development of allergic reactions, but at least at the phenotypic level, CD28 expression remained unchanged after rush venom immunotherapy.

**Keywords:** rush venom immunotherapy, tolerance, CD28, T lymphocyte

*Clinical and Experimental Allergy*, Vol. 26, pp. 1119–1124. Submitted 8 November 1995; revised 8 March 1996; accepted 24 April 1996.

### Introduction

To induce an antigen-specific response, T lymphocytes must receive two signals from the APC. The first signal, the interaction between the TCR complex and antigen associated with MHC, is necessary but not sufficient for T cell activation. The outcome of TCR engagement is

determined by additional signals, termed co-stimulatory, provided by cell surface molecules expressed on APCs, which are critical for the induction of maximal T cell proliferation, cytokine secretion and effector function. Therefore, when antigen is presented without appropriate co-stimulation, functional unresponsiveness (anergy) of antigen-specific T lymphocytes is induced and may represent a mechanism of non-deletional tolerance *in vivo* [1].

Correspondence: Dr A. Tsicopoulos, Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59019 Lille cedex, France.

One such critical co-stimulatory signal is the CD86/CD80:CD28/CTLA4 ligand-receptor pair expressed on APC and T lymphocytes respectively [2–4]. This complex prevents the induction of antigen-specific tolerance [5] and its blocking induces *in vitro* antigen-specific hyporesponsiveness [6,7] and *in vivo* long lasting tolerance to human xenoantigen [8]. CD28 is expressed on all CD4<sup>+</sup> and around 50% of CD8<sup>+</sup> human T lymphocytes, and also on Th1- and Th2-type clones in mice as well as in humans [9,10]. Signalling via CD28 enhances cytokine gene transcription and mRNA stabilization of Th1-type cytokines (IL-2, IL-3, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) [11] but also enhances the secretion of Th2-type cytokines [12–15] and help for IgE synthesis [16]. CD28 knock-out mice show impaired lymphokine secretion after T cell stimulation and also defects in humoral immune response [17].

Specific immunotherapy has been used for years on empirical bases. In the last decade, double-blind placebo-controlled studies have shown the efficacy of this form of treatment in some types of allergic reactions. This is the case for venom immunotherapy where the protection achieved in allergic patients is around 96% [18]. Several studies have shown that immunotherapy decreases specific antigen-induced T cell proliferation [19–22]. Recent studies have shown that venom immunotherapy, using an accelerated schedule, strongly inhibits venom-specific T lymphocyte proliferation in the first weeks after the beginning of the rush [23,24,25].

In order to see if this hyporesponsiveness was related to a down regulation of co-stimulatory molecules, we

studied CD28 expression on peripheral T lymphocytes from patients undergoing rush venom immunotherapy before and at different time points after the initiation of the treatment.

## Materials and methods

### Subjects

Ten non-atopic venom allergic patients (age, 19 to 70 years) were included in the study. All patients had a history of systemic anaphylactic reactions after Hymenoptera stings, positive intradermal tests and RASTs. Nine were sensitive to *Vespula germanica* and 1 to *Apis mellifera*. Table 1 presents the main characteristics of the subjects. Clinical reactions were classified according to Mueller classification. Ten non-atopic controls, sex- and age-matched (19 to 70 years) were also included. They had no history of allergic disease, negative skin prick tests to inhaled allergens, negative intradermal tests to venom and normal IgE levels.

### Immunotherapy regimen

The method used for treatment was the ultrarush method as described by Birnbaum and coworkers [26]. Briefly, at day 0, increasing doses of venom were injected every half an hour for 3 h 30 min to reach a final dose of 40  $\mu$ g (cumulative dose: 100  $\mu$ g). At day 15, and every month afterwards 100  $\mu$ g of venom were injected subcutaneously.

Table 1. Patients characteristics

Donor	Age	Sex	Atopy	Clinical score*	Skin test reactivity†	RAST‡
1	31	M	–	5	10 <sup>-3</sup>	4
2	69	M	–	5	10 <sup>-3</sup>	1
3	19	F	–	4	10 <sup>-3</sup>	3
4	70	M	–	4	10 <sup>-1</sup>	1
5	70	F	–	5	10 <sup>-2</sup>	3
6	30	M	–	4	10 <sup>-2</sup>	1
7	57	F	–	4	10 <sup>-3</sup>	4
8	45	F	–	4	10 <sup>-3</sup>	3
9	27	M	–	4	10 <sup>-3</sup>	3
10	64	F	–	4	10 <sup>-1</sup>	2

\* The clinical reactions were classified as follows: (0) local reaction; (1) large local reaction; (2) slight general reaction; (3) general reaction: any of the above plus two of the following — angioneurotic oedema, constriction of chest, abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhoea; (4) Severe general reaction: any of the above plus two of the following — dyspnoea, dysphagia, hoarseness; (5) Shock reaction with fall in blood pressure and/or unconsciousness.

† Venom concentration ( $\mu$ g/ml) giving a positive skin test (wheal  $\geq$  5 mm).

‡ Specific IgE are expressed as RAST score 0–4.

None of the patients included in this study had adverse systemic reactions during the rush or the maintenance doses.

#### Monoclonal antibodies

Anti-CD28 antibody conjugated with PE was purchased from Coulter Immunology (Hiialeah, FL). FITC-conjugated anti-CD4 and -CD8 antibodies were obtained from Becton Dickinson (Mountain View, CA).

#### Blood preparation and antibody staining

Five millilitres of peripheral blood were collected in EDTA Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Meylan, France) before the first injection of venom (day 0), half an hour after the last injection of venom on the same day (called day 1), then at days 15 and 45 before the maintenance dose injections. One hundred microliters of whole blood diluted 1:2 in phosphate-buffered saline (PBS) were incubated with 2–5 µg antibody for 10 min at room temperature and washed twice with PBS. Incubation with the second labelled antibody was performed under the same conditions. Then, the cells were treated with 1 ml of lysing detergent and fixed in 250 µl of fixative solution (Coulter) and analysed by flow cytometry.

#### Two-colour flow cytometric analysis of lymphocyte subsets

Data were collected on 10 000 cells/sample using an Epics C cytofluorograph equipped with the manufacturer's filters for fluorescein (525 nm band-pass) and phycoerythrin (575 nm band-pass), photomultiplier tubes (run between 950 to 1100 V) and argon ion laser (488 nm). Logarithmic amplification was used for fluorescence measurement on 1024 channels for one-colour analysis and 64 × 64 channels for two-colour fluorescence analysis. Calibration was checked each day using 10 µm grade II fluorescent beads (Coulter). Stained cells were gated on live lymphocytes as determined by forward scatter, which is proportional to cell size to exclude any dead cells, and right angle scatter. Non-specific staining by irrelevant isotype-matched antibodies was <2% and subtracted from raw data. Fluorescence histograms were further analysed by using cytological software (Coulter) after normalization to 10 000 stained cells.

#### Analysis of data

In a previous study we showed that there was no significant variation in lymphocyte counts during rush venom immunotherapy over a period of 73 days [27]. Using an ultra rush schedule with a low cumulative dose

(100 µg) does not affect the yield of peripheral blood mononuclear cell recovery, contrary to other protocols where a decrease in lymphocyte counts has been observed immediately after rush [25]. Therefore, results are given as percentages of single or double-stained lymphocyte subsets. Comparisons between untreated patients and controls were performed using an unpaired *t*-test (*n* = 10 subjects in each group). One-way analysis of variance was used to compare time-related variations (for seven patients since three patients were missing at day 45).

#### Results

##### *CD28 expression by peripheral T lymphocyte sub-populations in untreated venom allergic patients and non-atopic controls (Table 2)*

The percentage of CD28<sup>+</sup> T lymphocytes was higher in the untreated non-atopic venom allergic patients than in the non-atopic controls (*P* < 0.04). Within the T cell population, essentially all CD4<sup>+</sup> T lymphocytes co-expressed CD28, both in allergic patients and in controls. Within the CD8 subset, both CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> cells were observed; however, the percentage of double stained CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells was higher in the allergic patients than in the non-atopic controls (*P* < 0.01).

##### *Evolution of CD28 expression during rush venom immunotherapy (Table 3)*

No changes were found in the percentage of total CD28<sup>+</sup> T lymphocytes at the different time points after the initiation of immunotherapy, by comparison with the pre-treatment values (ns using one way analysis of variance). Within the CD4<sup>+</sup> T lymphocyte sub-population,

**Table 2.** Basal levels of percentages of CD28 positive cells in allergic patients and controls

	Patients	Controls	<i>P</i>
Number	10	10	
Age (year ± SEM)	48.2 ± 6.3	46.4 ± 5.9	ns
Sex (M/F)	5/5	5/5	
CD28 <sup>+</sup> (%)*	65.3 ± 3.3	57.9 ± 2.3	<0.04
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (%)	96.7 ± 1.1	96.6 ± 0.7	ns
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> (%)	65.3 ± 5.4	50.3 ± 3.1	<0.01

Patients and controls were sex- and age-matched.

\*Results are given as percentages of single or double-stained lymphocyte subsets.

ns: not significant.

**Table 3.** Percentages of expression of the CD28 marker within the different T cell sub-populations in patients undergoing rush desensitization

T cell sub-populations*	Day 0	Day 1	Day 15	Day 45
CD28 <sup>+</sup>	65.3 ± 3.3	69.9 ± 2.5	64.0 ± 3.4	62.7 ± 3.3
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	96.7 ± 1.1	97.7 ± 0.7	96.6 ± 1.4	96.8 ± 1.3
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	65.3 ± 5.4	66.7 ± 5.7	56.8 ± 5.2	60.2 ± 6.6

\* Results are given as percentages of single or double-stained lymphocyte subsets.

the double stained CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> population remained remarkably stable during the course of immunotherapy (ns).

Within the CD8<sup>+</sup> T lymphocyte sub-population a small decrease of the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> population was observed by day 15 which did not reach statistical significance using one way analysis of variance (for 7 patients).

### Discussion

T cell modifications induced by immunotherapy have been described as early as in the 1970s. Reduction of antigen-specific proliferation was the first to be specified [20] and since has been confirmed in other studies [21,22]. In a recent study we also observed that rush venom immunotherapy decreased antigen-specific T cell proliferation [23]. The striking point was that this effect was observed early at day 15 of the rush. Another recent study has even shown that a decrease in venom-specific proliferation was observed immediately after the rush (day 1) [25] thus correlating with the efficacy of rush venom immunotherapy which is rapid, since patients can tolerate high doses of venom at the end of the rush.

CD28 has been associated with allergen-specific lymphocyte hyporesponsiveness of activated human CD4<sup>+</sup> clones anergized with high doses of specific peptide [28]. In the latter study, the induction of anergy was associated with a profound down-regulation of CD28, both at the level of mRNA and surface expression of the mature protein. Therefore, this *in vitro* model of anergy induction with high doses of peptide in Th2-type clones is theoretically very similar to the induction of lymphocyte hyporesponsiveness by the high doses of venom injected *in vivo* during venom immunotherapy.

We chose to study whole T cells rather than allergen-specific clones because of the advantage of evaluating the entire repertoire of allergen-specific responses and of allowing sequential studies to look at effects of therapy. On the other hand, the increased expression of the

CD28<sup>+</sup> T cell population in allergic patients is consistent with the recent report of the involvement of CD28 in the up-regulation of human IgE synthesis [16], and in the enhancement of Th-2 type cytokine secretion. Indeed, an increase in IL-5, IL-10 and IL-13 [12–15] has been reported, as well as in IL-4 (through the induction of CD40L) [12], this production being preferentially co-stimulated by CD86 (B7-2) [29,30]. However, we did not observe changes in the cell surface expression of CD28 on CD4<sup>+</sup> cells during immunotherapy. This does not completely rule out a possible role for the CD28 pathway at the level of CD4<sup>+</sup> cells.

Different explanations can be suggested. First, kinetics experiments showed that CD28 surface expression in activated CD4<sup>+</sup> T cells decreased by 12 to 24 h after ligand binding to CD28, leading to a state of unresponsiveness to CD28 signalling. CD28 expression returned to initial or higher levels by 48 h although T cells remained unresponsive [31]. In our work CD28 expression was studied before the rush, at the end of the rush, i.e. 4 h after the initiation, and at the first maintenance dose (day 15). We could therefore have missed the possible transient down-regulation of CD28 on CD4<sup>+</sup> cells. Secondly, the CD28 co-stimulatory pathway involves several other molecules such as CTLA-4 [32] and their ligands CD86 (B7-2) and CD80 (B7-1), which may also be involved in antigen-specific hyporesponsiveness. Indeed, antigen presentation in the absence of CD86/CD80 co-stimulation leads to T cell anergy [3,7].

The absence of changes in CD28 expression might also reflect the fact that only a small part of the T cell repertoire was concerned, i.e. allergen-specific T cells. However, although ubiquitous, an increase in CD28 expression was observed in non-atopic venom-allergic patients compared to non-atopic non-venom allergic controls. Moreover, changes induced by immunotherapy and concerning only venom-specific T cells have been observed at the level of the whole T cell population, such as an increase in IFN- $\gamma$  and a decrease in IL-4 mRNA expression and secretion [23,24,25].

Within the CD8<sup>+</sup> sub-population, the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> subset is present in normal adult human peripheral blood (50.6% of CD8<sup>+</sup> cells) and is thought to represent a type of memory population [33]. Previous studies have implicated the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells in the suppression of antigen-specific proliferation of human T cell clones [34]. In our study, this sub-population was clearly of smaller size in the untreated allergic patients than in the non-atopic controls, suggesting a lack of negative regulation in allergic patients. However, rush immunotherapy did not induce significant size variations in the CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> subpopulation.

In conclusion, the up-regulation of CD28 expression in allergic patients implicates this pathway in the development of allergic reactions. However, at least at the phenotypic level, CD28 expression remained unchanged after rush venom immunotherapy.

#### Acknowledgements

This work was supported by INSERM U 416. The authors would like to thank the nurses for their help in collecting the blood samples: Mrs Nadia Fernez, Sabine Quandalle, Laurence Capy and Bernadette Thiébaud.

#### References

- Jenkins M, Pardoll D, Mizugushi J, Quill H, Schwartz R. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol Rev* 1987; 95:113–25.
- Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:5031–5.
- Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG et al. B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:6575–9.
- Koulova L, Clark EA, Shu G, Dupont B. The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 1991; 173:759–62.
- Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992; 356:607–9.
- Tan P, Anasetti C, Hansen JA et al. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 1993; 177:165–73.
- Chen CY, Nabavi N. In vitro induction of T cell anergy by blocking B7 and early T cell costimulatory molecule ETC-1/B7-2. *Immunity* 1994; 1:147–54.
- Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4-Ig. *Science* 1992; 257:789–92.
- Wierenga EA, Snoek M, Jansen HM et al. Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol* 1991; 147:2942–9.
- Freeman GJ, Lombard DB, Gimmi CD et al. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation. Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production. *J Immunol* 1992; 149:3795–801.
- Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* 1989; 244:339–43.
- De Boer M, Kasran A, Kwekkeboom J et al. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol* 1993; 23: 3120–5.
- Seder RA, Germain RN, Linsley PS, Paul WE. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 1994; 179:299–304.
- Walter H, Schepens S, Vanwauwe J, Deboer M. Ligation of CD28 on resting T cells by its ligand B7 results in the induction of both Th1- and Th2-type cytokines. *Eur Cytokine Netw* 1994; 5:13–21.
- Minty A, Chalon P, Derocq JM et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 1993; 362:248–50.
- Life P, Aubry JP, Estoppey S, Schnuriger V, Bonnefoy JY. CD28 functions as an adhesion molecule and is involved in the regulation of human IgE synthesis. *Eur J Immunol* 1995; 25:333–9.
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 1993; 261:609–12.
- Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK et al. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 1978; 299:157–61.
- Rocklin RE, Sheffer AL, Greineder DK, Melmon KL. Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. *N Engl J Med* 1980; 302:1213–9.
- Gatien JG, Merler E, Colten HR. Allergy to ragweed antigen E: effect of specific immunotherapy on the reactivity of human T lymphocytes in vitro. *Clin Immunol Immunopathol* 1975; 4:32–7.
- Hiratani H, Muto K, Oshiday HOS, Kasei M. Lymphocyte responsiveness to *Dermatophagoïdes farinae* extract in mite-sensitive patients: effect of immunotherapy on cellular proliferative response and specific immunoglobulin E antibody. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68:205–11.
- Ledru E, Pestel J, Tscopoulos A et al. Lymphocyte-mediated regulation of platelet activation during desensitization in patients with hymenoptera hypersensitivity. *Clin Exp Immunol* 1988; 73:198–203.
- Akoum H, Tscopoulos A, Vorng H et al. Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon- $\gamma$  messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunol* 1996; 87:593–98.

- 24 Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D et al. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- $\gamma$  secretion in specific allergen-stimulated cultures. *J Immunol* 1995; 154:4188-94.
- 25 McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:828-38.
- 26 Birnbaum J, Charpin D, Vervloet D. Rapid hymenoptera venom immunotherapy: comparative safety of three protocols. *Clin Exp Allergy* 1993; 23:226-30.
- 27 Tilmant L, Dessaint JP, Tsicopoulos A, Tonnel AB, Capron A. Concomitant augmentation of CD4+ CD45R+ suppressor/inducer subset and diminution of CD4+ CDw29+ helper/inducer subset during rush hypsensitization in hymenoptera venom allergy. *Clin Exp Immunol* 1989; 76:13-8.
- 28 Lake RA, O'Hehir RE, Verhoef A, Lamb JR. CD28 mRNA rapidly decays when activated T cells are functionally anergized with specific peptide. *Int Immunol* 1993; 5:461-6.
- 29 Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A et al. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995; 2:523-32.
- 30 Kuchroo VK, Das MP, Brown JA et al. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995; 80:707-18.
- 31 Linsley PS, Bradshaw J, Urnes M, Grosmaire L, Ledbetter JA. CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signalling. *J Immunol* 1993; 150:3161-9.
- 32 Friccius H, Siegels HP, Rehbein A, Schlotz E, Pawelec G. Induction of hyporesponsiveness in human lymphocytes-T despite their expression of both the co-receptor CD28 and its ligand B7. *Cell Immunol* 1993; 151:283-90.
- 33 Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. CD28-T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 1993; 150: 1147-59.
- 34 Li SG, Ottenhoff TH, Van den Elsen, P et al. Human suppressor T cell clones lack CD28. *Eur J Immunol* 1990; 20:1281-8.

## **RESULTAT III**

***MODIFICATIONS DE LA PRODUCTION ET DE  
L'EXPRESSION DES CHIMIOKINES AU COURS  
DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE  
AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

## **ARTICLE 3**

### ***MODIFICATIONS DE LA PRODUCTION ET DE L'EXPRESSION DES CHIMIOKINES AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMÉNOPTÈRES***

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis pour la publication (1997) et inséré ci-après.

Les résultats rapportés dans la première partie de ce travail suggèrent que l'ITS aux venins d'hyménoptères selon la procédure accélérée "rush" induit une abolition précoce de la prolifération cellulaire T spécifique d'Ag et favorise une inversion du profil de type Th-2 (IL-4) vers un profil de type Th-1 (IFN- $\gamma$ ). Néanmoins, les modifications observées dans la production et l'expression de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  sont tardives et dissociées de l'établissement précoce de la tolérance clinique observée en l'espace de quelques heures. Ceci suggère que des processus régulateurs additionnels doivent être impliqués au niveau des cellules effectrices déclenchant les réactions anaphylactiques dépendantes de l'IgE. Les basophiles et les mastocytes, cellules précocément impliquées dans ce type de réaction systémique représentent donc une cible de choix de l'ITS aux venins d'hyménoptères. De plus, les lymphocytes T sont capables d'induire la maturation et la différenciation des mastocytes et des basophiles et d'activer les basophiles grâce à des médiateurs dits facteurs histaminolibérateurs (HRF : histamine releasing factors). La production de ces HRF diminue au cours de l'ITS. Les chimiokines sont douées de propriétés histaminolibératrices (HRF) mais aussi sont des inhibiteurs de cette libération (HRIF). Dans le cas de la désensibilisation aux venins d'hyménoptères, plusieurs travaux ont démontré une diminution de la libération d'histamine. Nous nous sommes donc intéressés à la production (par ELISA) et à l'expression d'ARNm (par RT-PCR semi-quantitative) des chimiokines RANTES, IL-8 et MCP-1, à différents temps du "rush". Le RANTES et le MCP-1 sont histaminolibérateurs alors que l'IL-8 est inhibiteur sauf en cas de présensibilisation des cellules productrices par l'IL-3. Les cellules mononucléées (CMN) ont été prélevées à J0, J4h (juste après les 3h30), J15 (premier rappel) et J45 (deuxième rappel) du rush et stimulées ou non par l'allergène pendant 24hr. L'ARNm

d'une partie de ces CMN a été extrait immédiatement pour étudier les modifications induites *ex vivo*.

Nous avons observé dès J4h une augmentation du RANTES en protéine (Figure 1A, ARTICLE 3) et en ARNm (TABLE 1, ARTICLE 3), qui diminue ensuite à J15 et J45. Par contre pour l'IL-8 et le MCP-1, alors qu'il existe une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour L'IL-8 (TABLE 2, ARTICLE 3) et une expression constitutive de celui codant pour le MCP-1 (TABLE 3, ARTICLE 3), au niveau protéique, une diminution est observée tout au long de l'ITS (Figure 1B, 1C, ARTICLE 3), suggérant un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle.

*Ces résultats suggèrent que l'ITS aux venins de guêpe ou d'abeille est associée à une diminution générale de production et d'expression de chimiokines par les CMN observée au cours du rush, sauf pour le RANTES, qui augmente dès la fin des 3h 30 du rush puis diminue progressivement à J15 et J45. Les modifications observées pour les chimiokines étudiées, pourraient contribuer à expliquer l'efficacité clinique tardive du rush cependant que les mécanismes conduisant à la protection précoce restent obscurs. Nous avons été intrigués par l'augmentation précoce de RANTES observée à J4h alors qu'aucun des patients n'a présenté de manifestations adverses, ce qui aurait pu être attendu étant donné les propriétés histaminolibératrices du RANTES. Ceci nous a conduit à poursuivre nos recherches pour mieux comprendre l'implication des chimiokines (notamment le RANTES) au cours de la phase précoce de l'ITS aux venins d'hyménoptères.*

**ARTICLE 3**

**Early modifications of chemokine Production and mRNA  
Expression during Rush Venom Immunotherapy**

Hikmat Akoum, Catherine Duez, Han Vorng,  
Benoît Wallaert, André-Bernard Tonnel, and Anne Tsicopoulos

Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille; Service de PneumoImmunoAllergologie,  
Hôpital Calmette, Lille; FRANCE.

Correspondence : Dr A. Tsicopoulos

Ph Number : 03 20 87 78 80

Fax Number : 03 20 87 73 45

E-mail : Anne.Tsicopoulos@pasteur-lille.fr

Address : Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59019

Lille cedex, France.

Running title : Early changes of chemokines after immunotherapy

Key words : Chemokine/Mononuclear cells/Venom/Rush Immunotherapy

## ABSTRACT

The mechanism by which specific immunotherapy exerts its beneficial effect remains unclear. Chemokines are implicated in inflammatory and allergic diseases, in particular via their ability to induce histamine release from basophils, a potential early target of rush venom immunotherapy (RVIT). In this study, we evaluated *ex vivo* RANTES, IL-8 and MCP-1 production and mRNA expression by mononuclear cells (MNC) from nine patients undergoing a 3h30 ultra rush treatment, before treatment at Day 0 (D0), at the end of the 3h30 of the rush at Day 4h (D4h), at Day 15 (D15) and Day 45 (D45) after treatment. Increased RANTES release and mRNA expression were observed in 24h culture of peripheral blood MNC collected at D4h. This was followed by a decrease in the production of RANTES, IL-8 and MCP-1, 45 days after initiation of RVIT. The same pattern was observed after *in vitro* venom stimulation of MNC. At the mRNA level, similar profiles were observed except for IL-8 mRNA which inversely increased during RVIT. These results suggest that RVIT is associated with a general decrease in chemokines which may explain, in part, the clinical efficacy of specific immunotherapy.

## INTRODUCTION

Specific immunotherapy has been used for years on empirical bases. In the last decade, double blind placebo-controlled studies have shown the efficacy of this treatment in some types of allergic reactions, including *Hymenoptera* venom immunotherapy (VIT), where the protection achieved in allergic patients is around 96%<sup>1</sup>. Basophils and mast cells are the first cells involved in IgE-dependent anaphylactic reactions and might be an early target of rush venom immunotherapy (RVIT). T lymphocytes play a major role in the immediate type allergic reaction through IgE synthesis regulation and through the release of cytokines able to induce the maturation and differentiation of mast cells and basophils<sup>2</sup>. T cells can also directly activate basophils by mediators termed Histamine Releasing Factors (HRFs). HRFs have been described in various type I hypersensitivity reactions like allergic rhinitis and asthma<sup>3, 4</sup>. Several previous studies have shown that production of HRFs by mononuclear cells is impaired during specific immunotherapy<sup>5-7</sup>. In venom immunotherapy, although HRFs have not been studied, several studies have shown a decrease in the amount of histamine release<sup>8-10</sup>. It is now established that members of the chemokine superfamily contribute mostly to the HRF activity<sup>11, 12</sup>. IL-8, a potent chemotactic factor for neutrophils<sup>13</sup>, lymphocytes<sup>14, 15</sup>, basophils<sup>16</sup> as well as for primed eosinophils<sup>17, 18</sup> has been shown to inhibit histamine generation from basophils<sup>19, 20</sup>, but to promote its release when applied to cytokine-primed cells<sup>21</sup>. On the other hand, MCP-1 is a potent chemotactic and activating factor for monocytes, lymphocytes, and basophils<sup>22-24</sup>. This chemokine has been identified as a powerful HRF for human basophils, with a kinetics and potency similar to those observed with well-established agonists, such as anti-IgE and C5a<sup>25-27</sup>. MCP-3, which combines activities of MCP-1 and RANTES, is a member of the  $\beta$  chemokine subfamily, and is 71% homologous with MCP-1. MCP-3 is as effective as MCP-1 in inducing mediator release from basophils, and as RANTES as a chemoattractant for basophils and eosinophils<sup>28</sup>. RANTES was first purified as a product of activated T cells<sup>29</sup> and is a powerful chemoattractant for basophils<sup>30</sup> and eosinophils<sup>31</sup>. Additionally, it is now evident that RANTES is produced by platelets<sup>32</sup> and eosinophils<sup>33</sup>. Furthermore, RANTES is also chemotactic for memory T lymphocytes and monocytes<sup>34</sup>.

We therefore evaluated the kinetics of chemokine production, in particular RANTES, IL-8 and MCP-1, during rush venom immunotherapy. A general decrease in their secretion and expression by mononuclear cells was observed along the desensitization process except for RANTES which increased as soon as the end of the rush, i.e., at the 4<sup>th</sup> hour, and then declined progressively up to day 45.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Subjects***

Nine patients were selected for RVIT on the basis of a history of systemic anaphylactic reaction after *Hymenoptera* stings. All patients were sensitive to *Vespula germanica*, and had positive intradermal skin tests to wasp venom and positive radioallergosorbent tests (RASTs).

### ***Immunotherapy regimen***

The method used for treatment was the ultrarush method as described by Birnbaum and coworkers<sup>47</sup>. Briefly, at day 0, increasing doses of venom were injected every half an hour for 3h30 to reach a final dose of 40µg (cumulative dose : 100µg). At day 15, and every month afterwards 100µg of venom were injected subcutaneously. None of the patients experienced adverse reactions during or after the rush procedure, and no medication was given to them either before or during the desensitization. Venom allergens were purchased from Dome Hollister Stier Laboratories (Spokane, WA). The same aliquoted batches of venoms were used throughout the study.

### ***Mononuclear cells experiments***

#### ***Cell isolation***

Venous blood was collected on calcium heparinate (Choay, Gentilly, France) before the first injection of venom (Day0), half an hour after the last injection of venom on the same day (Day 4h), then at Days 15 and 45 before the maintenance dose injection. Platelet rich plasma was obtained by centrifugation (120 g, 15min) and was discarded. Platelet contamination never exceeded 5%. The platelet-depleted blood was diluted with an equal volume of 0.01M PBS and layered onto a Ficoll-Hypaque gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After centrifugation, PBMC were harvested, washed three times in PBS and part of the cells was immediately homogenized in RNazol (Bioprobe systems, Montreuil-sous-bois, France) and stored at -80°C. The remaining cells were resuspended in RPMI 1640 supplemented with 2mM glutamine, penicillin, streptomycin, sodium pyruvate, 5 x 10<sup>-5</sup> M β mercaptoethanol

and 5% autologous serum. PBMC ( $3 \times 10^6$  cells/well) were incubated at 37°C in 24-well flat-bottomed microcultures plates (Nunc-Roskilde, Denmark) in 5% CO<sub>2</sub>, in the presence of two venom concentrations (1 µg/ml and 10<sup>-3</sup> µg/ml) and medium. Preliminary kinetics experiments were performed with these two doses of venom in comparison with baseline, to determine the optimal time point of production for the three chemokines. PBMC were cultured with venom for 6h, 24h and 48h. The RANTES production by MNC was maximal at 24h and decreased at 48h. The IL-8 level was maximal at 24h and 48h after allergen stimulation. Concerning MCP-1 secretion, there was a slight production at 24h but the maximal level was observed at 48h after specific allergen stimulation. As we wanted to simultaneously evaluate mRNA expression, we choose the 24h time point where supernatants and cells were collected.

### ***Chemokine production***

Supernatants were aliquoted and stored at -80°C. Chemokine production was assessed using commercial ELISA kits according to the manufacturer's recommendations. Each sample was measured in duplicate. Sensitivities of the ELISAs were 2.5 pg/ml for RANTES (Research and Diagnostics Systems, Minneapolis, USA), 5 pg/ml for MCP-1 (Research and Diagnostics Systems) and 4-8 pg/ml for IL-8 (Tebu, CLB, Amsterdam). Care was taken to test the MNC supernatants corresponding to the different time points of the rush immunotherapy for a given patient all together during the same experiment.

### ***Chemokine mRNA expression***

Mononuclear cells were homogenized in RNazol and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions (Bioprobe systems, Montreuil-sous-bois, France). Briefly, pelleted PBMC were lysed with RNazol and chloroform; the aqueous phase was then precipitated with isopropanol (v/v), washed in 70 % alcohol, and resuspended in RNase free water. RNA concentration and purity was ascertained spectrophotometrically and the integrity of the RNA was determined by visualizing the 18S and 28S ribosomal RNA bands with ethidium bromide after electrophoresis on a 2% formaldehyde gel. mRNA expression was assessed by using a semi-quantitative Reverse Transcription-mediated

Polymerase Chain Reaction technique. mRNAs were reverse transcribed by using Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (Life Technologies, Paisly, Scotland) and digoxigenin-labelled nucleotid (Boehringer, Mannheim, Germany, as previously described 48, 49). Briefly, the resultant cDNAs were used as templates for each PCR reaction in a 25  $\mu$ l reaction mixture containing 100 $\mu$ M of dATP, dCTP, dGTP, 95 $\mu$ M of dTTP and 10  $\mu$ M of digoxigenin-11-dUTP (Boehringer, Mannheim, Germany), 1.25U Ampli Taq polymerase (Perkin Elmer, Saint Quentin, France), 0.5 $\mu$ M primers, and 2mM MgCl<sub>2</sub>. Reactions were carried out with a denaturation step at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min followed by 7 min extension at 72°C using a cyclone DNA thermal cycler. Primers used were as following : GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) sense primer 5'-GTCTTCACCACCATGGAG-3', GAPDH antisense primer 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'; RANTES sense primer 5'-TCCCCATATTCCTCGGAC-3', RANTES antisense primer 5'-GATCTACTCCGAAGCCA-3'; IL-8 sense primer 5'-TTGGCAGCCTTCCTGATT-3', IL-8 antisense primer 5'-AACTTCTCCACAACCCTCTG-3'; MCP-1 sense primer 5'-TCCAGCATGAAAGTCTCTGC-3', MCP-1 antisense primer 5'-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3'. The number of cycles for each chemokine was determined to provide a linear correlation between the amount of input cDNA and the final product. 21 cycles were performed for GAPDH, 22 for MCP-1, 25 for RANTES and IL-8. To account for variability in starting cDNA concentration and integrity among the samples, cDNA from all samples were amplified concomitantly for the chemokines and the housekeeping gene "GAPDH". PCR products were visualized by gel electrophoresis in 1,5% agarose after ethidium bromide staining, Southern blotted on a nylon membrane and detected using a digoxigenin nucleic acid detection kit (Boehringer, Mannheim, Germany) according to the manufacturer protocol. The intensity of each spot was determined by densitometry analysis (Vilbert Lourmat, Torcy, France). Results were expressed as percentage of GAPDH optical density. To ascertain the specificity of the amplified products, oligonucleotide probes were labelled using a digoxigenin oligonucleotide 3' end labelling kit (Boehringer) and hybridized with the Southern blotted PCR products. Detection was performed as described

above. The sequence of the oligonucleotide probe for MCP-1 was 5'- GCT-GCT-ATG-AGC-AGC-AGG-CAC-AGA-AGG-GCG -3' and for RANTES was 5'- CAG-TGG-GCG-GGC-AAT-GTA-GGC-AAA-GCA-GCA -3'. The 30-mer oligonucleotide probe for IL-8 has been previously described <sup>50</sup>.

### ***Statistical analysis***

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between results obtained for a single subject in different conditions of stimulation at one particular time point were performed using paired t-test. Comparisons within results obtained at different time points (D0, D1, D15 and D45) for a particular type of stimulation were done using one-way analysis of variance. p values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

### *Modulation of RANTES production (Figure 1A) and mRNA expression (Table 1) by mononuclear cells during immunotherapy*

In *ex vivo* conditions, the spontaneous RANTES production and mRNA expression by PBMC increased at the end of the rush (at D4h) compared with D0 and then decreased at D15 and D45 which correspond respectively to the first and second maintenance dose injections. These variations within the different time points of RVIT were statistically significant ( $p \leq 0.01$  for protein and mRNA using one way analysis of variance). The *in vitro* stimulation of mononuclear cells with the specific venom induced a significant increase in the RANTES production and mRNA expression compared to that of non stimulated MNC at all time points ( $p \leq 0.05$ ). The same profile was observed after stimulation with a lower dose of specific venom ( $10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ ) (data not shown). To evaluate the influence of culture on the expression of RANTES mRNA, the latter was also assessed without culture after immediate extraction of MNC at the different time points. Again, the same pattern was observed.

### *Modulation of IL-8 production (Figure 1B) and mRNA expression (Table 2) by mononuclear cells during immunotherapy*

The general pattern of IL-8 production was different from RANTES with a decrease starting as soon as the end of the rush until day 45 ( $p \leq 0.02$  using one way analysis of variance). The *in vitro* stimulation of MNC with 1  $\mu\text{g/ml}$  of specific venom induced a significant increase in the IL-8 production and mRNA expression compared to that of non stimulated MNC at all time points ( $p \leq 0.05$ ). The same decrease of IL-8 secretion was observed after specific venom stimulation at the different time points ( $p \leq 0.01$  using one way analysis of variance).

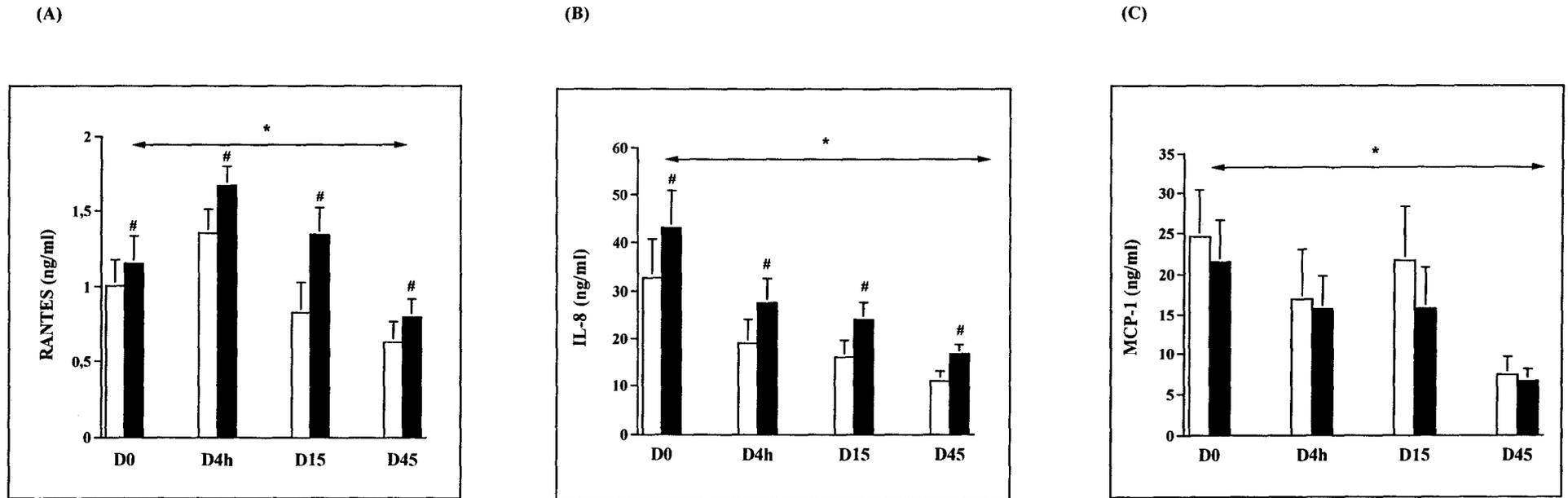
In terms of mRNA expression, surprisingly, the results obtained were completely different from those observed with IL-8 protein. There was a significant increase in spontaneous IL-8 mRNA expression beginning at D4h until D45 ( $p \leq 0.04$  using one way analysis of variance). The same profiles of protein secretion and mRNA expression were observed with the low

venom dose ( $10^{-3}$   $\mu\text{g/ml}$ ) (data not shown). Concerning RNA extracted from freshly purified cells, the same increase in IL-8 mRNA expression was observed along VIT ( $p \leq 0.04$ ).

***Modulation of MCP-1 production (Figure 1c) and mRNA expression (Table 3) by mononuclear cells during rush venom immunotherapy***

No modification in spontaneous MCP-1 production was observed until D45 where a significant decrease occurred ( $p \leq 0.03$ ). The incubation of MNC with different concentrations of specific venom did not stimulate MCP-1 production or mRNA expression at 24h as compared with baseline. Concerning mRNA expression, spontaneously, after venom stimulation, and after immediate extraction, MCP-1 mRNA was not modulated whatever the time point ( $p = \text{NS}$ ).

A representative pattern of chemokine mRNA expression in PBMC obtained from a single patient is shown in Figure 2.



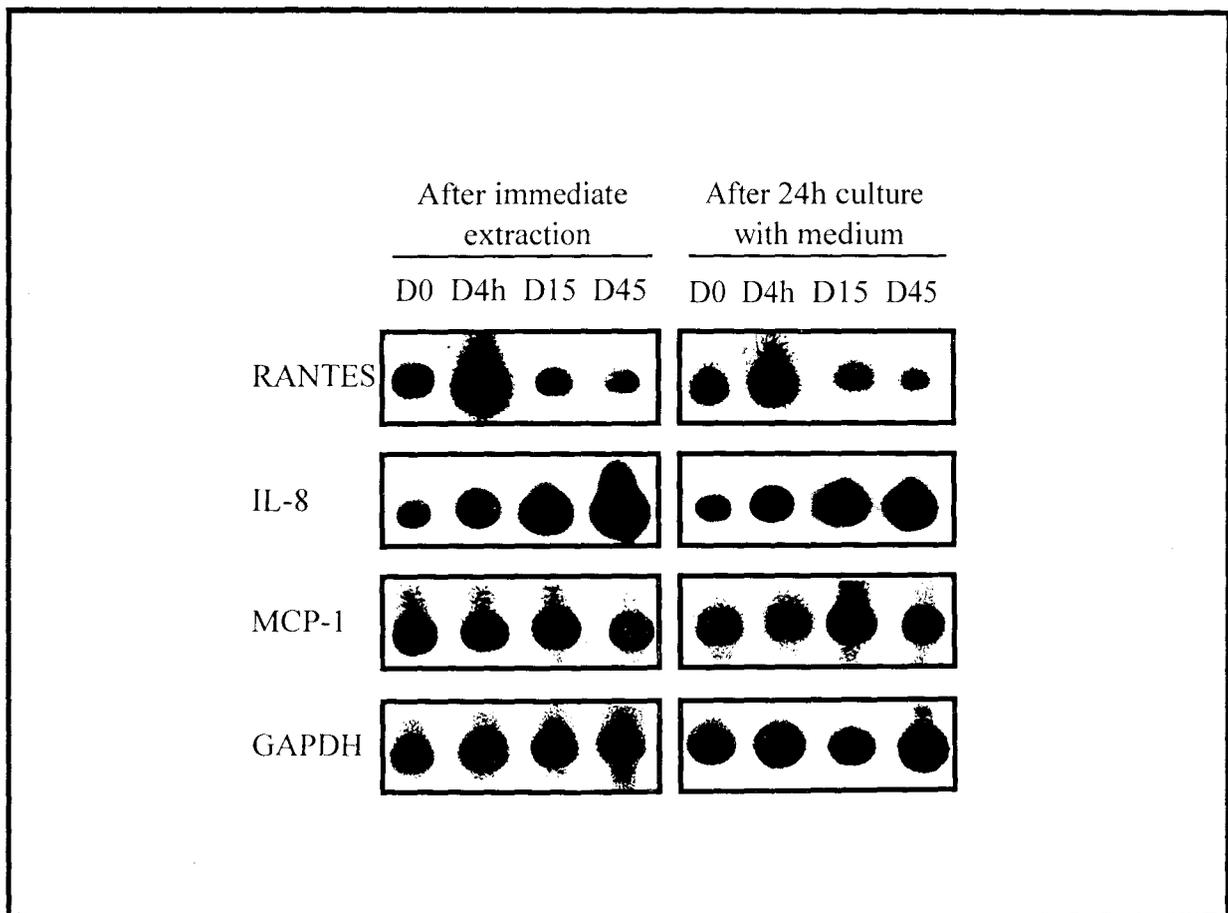
**Figure 1. Modulation of chemokine production by 24h cultured PBMC during RVIT.**

RANTES (A), IL-8 (B) and MCP-1 (C) were measured in supernatants from PBMC cultured during 24 h with medium alone (□) or venom (■) and expressed as ng/ml.

\* : All variations within different time points were statistically significant ( $p \leq 0.03$ , using one way analysis of variance).

# : Venom stimulation induced significant increases as compared with baseline ( $p \leq 0.05$ , using paired t-test).

**Figure 2. Chemokine mRNA expression by PBMC from a venom allergic patient during RVIT.**



PBMC were isolated at different time points of the rush treatment (D0, D4h, D15 and D45) and RNA was extracted either immediately, or after 24h culture in the medium alone. mRNA was reverse transcribed and cDNA was amplified by PCR, using digoxigenin-labelled nucleotides. PCR products were Southern blotted and detected using alkaline phosphatase labelled anti-digoxigenin antibodies. Data were analysed by densitometry and expressed as percent of GAPDH, used as internal standard.

**TABLE 1. Modulation of RANTES mRNA expression by mononuclear cells during venom immunotherapy.**

Culture conditions	Patients			
	Day 0	Day 4h	Day 15	Day 45
immediate extraction	68.13 ± 8.80	100.40 ± 23.50	74.00 ± 13.80	43.67 ± 9.20
medium (24h)	63.74 ± 14.42	102.44 ± 11.30	67.45 ± 16.40	34.75 ± 7.70
venom (24h)	74.83 ± 14.80 <sup>#</sup>	133.11 ± 22.0 <sup>#</sup>	87.17 ± 16.4 <sup>#</sup>	58.33 ± 11.9 <sup>#</sup>

Mean values of RANTES mRNA expression by MNC from patients undergoing rush venom immunotherapy after 24 h MNC culture with medium only or with the specific venom (1 µg/ml) or without culture after immediate RNA extraction.

Results are expressed as percentage of GAPDH optical density.

# : venom stimulation induced significant increases as compared with baseline (p≤0.05 using paired t-test).

Significant variations within the different time points were observed in all conditions (p≤0.01) using one way analysis of variance.

**TABLE 2. Modulation of IL-8 mRNA expression by mononuclear cells during venom immunotherapy.**

Culture conditions	Patients			
	Day 0	Day 4h	Day 15	Day 45
immediate extraction	72.53 ± 8.90	105.12 ± 11.50	110.5 ± 11.85	101.55 ± 9.04
medium (24h)	63.95 ± 7.38	83.44 ± 10.17	93.56 ± 12.63	99.83 ± 17.80
venom (24h)	73.82 ± 11.2 <sup>#</sup>	93.44 ± 11.19 <sup>#</sup>	115.8 ± 18.7 <sup>#</sup>	121.13 ± 20.86 <sup>#</sup>

Mean values of IL-8 mRNA expression by MNC from patients undergoing rush venom immunotherapy after MNC culture with medium only or with the specific venom (1 µg/ml) or without culture after immediate RNA extraction.

Results are expressed as percentage of GAPDH optical density.

# : venom stimulation induced significant increases as compared with baseline using paired t-test (p≤0.05 ).

There were significant variations within the different time points using one way analysis of variance (p≤0.04 in all conditions).

**TABLE 3. Modulation of MCP-1 mRNA expression by mononuclear cells during venom immunotherapy.**

Culture conditions	Patients			
	Day 0	Day 4h	Day 15	Day 45
immediate extraction	71.25 ± 8.30	77.88 ± 11.60	79.00 ± 7.50	78.00 ± 11.90
medium (24h)	88.44 ± 4.80	83.78 ± 7.00	92.11 ± 9.80	83.11 ± 11.50
venom (24h)	88.44 ± 8.20	94.88 ± 3.70	102.89 ± 15.10	91.22 ± 9.89

Mean values of MCP-1 mRNA expression by MNC from patients undergoing rush venom immunotherapy after MNC culture with medium only or with the specific venom (1 µg/ml), or without culture after immediate RNA extraction.

Results are expressed as percentage of GAPDH optical density.

There was no difference whatever the conditions (p=NS).

## DISCUSSION

Among chemokines susceptible to modulate histamine release from basophils or mast cells, the most potent HRF is represented by MCP-1, immediately followed by RANTES, while the role of IL-8 is more controversial : although first described as an inhibitor of histamine release <sup>19, 20</sup>, it is also able to promote it when applied to IL-3 primed basophils <sup>21</sup>, cytokine present in the allergic tissues <sup>35-37</sup>. The kinetics of production and mRNA expression of these three chemokines was evaluated in the course of a rush IT procedure in patients sensitive to *Hymenoptera* venom.

For MCP-1, in contrast with the two other chemokines, *in vitro* allergen stimulation did not induce its production or mRNA expression by MNC, probably related to the 24 h time point stimulation which was not optimal in the kinetics experiments. However the lack of modification of MCP-1 during the first 15 days after RVIT suggests that this chemokine is not primarily involved in the early events of RVIT, but may have a role at later stages of immunotherapy as suggested by its decrease at D45. A decrease of MCP-1 has also been observed in a recent immunotherapy study, after two years of treatment <sup>38</sup>.

Contrasting results were obtained when IL-8 protein secretion and mRNA expression by PBMC were compared. Indeed, the decrease of the IL-8 protein product observed at D4h was accompanied by an enhanced mRNA expression. This phenomenon, which was observed at all time points of RVIT, suggests that post transcriptional regulatory events occurring during RVIT may lead to decreased IL-8 production. Similar observations have previously been reported using an *in vitro* model of anergy induction in allergen-reactive T cell clones, which may mimic the mechanisms underlying successful allergen immunotherapy <sup>39</sup>. In these cells, anergy was followed by a decrease in IL-8 production by a post transcriptional regulation mechanism. In contrast, Hsieh et al have recently demonstrated that IT increases the production of IL-8 by MNC from asthmatic children <sup>38</sup>. The difference with our results might be related to the time of MNC culture or to the type and period of immunotherapy. Indeed, in the later study, all the patients had been treated by a conventional IT shedule for more than 2 years while, in our study, the patients were treated using a rush protocol and evaluated during the first 45 days.

An increase in RANTES secretion and mRNA expression occurred in 24h cultured PBMC collected at D4h. This increase was not related to contamination of MNC preparations by platelets which are known to release large quantities of RANTES <sup>32</sup>. We took care to eliminate most of the platelets from mononuclear cells leading to a contamination of less than 5 %. This contamination could account for a small part of the RANTES secreted product, but not for the increased RANTES mRNA expression at D4h, since platelets do not have nuclei and contain very little mRNA species. For RANTES, mRNA expression was strictly parallel to protein secretion. Our results showing enhanced RANTES mRNA expression in freshly purified cells, suggest that this chemokine is involved in the initial events underlying RVIT. Unexpectedly, this early increase in RANTES was not associated with clinical side effects, as might be expected from its known HRF activity. At later time points, a decrease in RANTES was observed, in agreement with the above described study of Hsieh et al <sup>38</sup>.

Therefore, a general decrease in chemokine levels was observed at D45, as opposed to D0, with some variations depending on the chemokine considered. This decrease is reminiscent of the state of antigen-specific tolerance of T cells after immunotherapy, which has been associated with a down-regulation in the production of a number of cytokines, except interferon- $\gamma$  <sup>40-43</sup>. This decrease could lead to decrease HRF activity, but also to decrease chemotaxis, cytokine release and cell proliferation <sup>44-46</sup>, chemokine properties known to be involved in allergic reactions.

In conclusion, the general decrease in chemokine levels during RVIT may explain, in part, the clinical efficacy of immunotherapy, although the mechanisms leading to the very early clinical tolerance during rush procedures remain to be investigated.

Acknowledgments : The authors thank Dr. Marina Pretolani for critical review of the manuscript, and Mrs Nadia.Fernez, Sylvie Laurence, Laurence Capy and Bernadette Thiébaud for their help in collecting blood samples.

Abbreviations used in this paper : RVIT : rush venom immunotherapy; HRF : histamine releasing factors; HRIF : histamine release inhibitory factors; MCP : monocyte chemoattractant protein; RANTES : regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted.

Footnotes : This work was supported by INSERM U 416.

## REFERENCES

1. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodo FJ, Lichtenstein LM (1978) A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 299:157.
2. Stadler B, Hirai K, Todokoro K, de Weck A (1985) Distinction of the human basophil promoting activity from human interleukin-3. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 77:151-154.
3. Sim T, Alam R, Forsythe P, Welter J, Lett-Brown M, Grant J (1992) Measurements of histamine releasing factor activity in individual nasal washings : relationship with atopy, basophil response, and membrane-bound IgE. *J Allergy Clin Immunol* 89:1157.
4. Alam R, Rozniecki J, Salmaj K (1984) A mononuclear cell-derived histamine-releasing factor (HRF) in asthmatic patients : histamine release from basophils in vitro. *Ann Allergy* 53:66-69.
5. Kuna P, Alam R, Kuzminska B, Rozniecki J (1989) The effect of preseasonal immunotherapy on the production of histamine-releasing factor (HRF) by mononuclear cells from patients with seasonal asthma : Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 83:816-824.
6. Brunet C, Bedard PM, Lavoie A, Jobin M, Hebert J (1992) Allergic rhinitis to ragweed pollen. II. Modulation of histamine releasing factor production by specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 89:87-94.
7. Liao T, Hsieh K (1990) Altered production of histamine-releasing factor (HRF) activity and responsiveness to HRF after immunotherapy in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 86:894-901.
8. Mahmood T, Wall H, Sobus S, Stechshulte DJ, Abdou NI (1982) Modulation of venom-induced leukocyte histamine release by mononuclear cells. *J Allergy Clin Immunol* 70:445-451.
9. Jutel M, Müller UR, Fricker M, Rihs S, Pichler WJ, Dahinden C (1996) Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Allergy* 26:1112-1118.

10. Stephan V, Kühr J, Urbanek R (1989) Relevance of basophil histamine release changes during venom immunotherapy. *Allergy* 44:453-459.
11. Baggiolini M, Dahinden CA (1994) CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 15:127-133.
12. Kaplan AP, Kuna P, Reddigari SR (1994) Chemokines as allergic mediators-relationship to histamine-releasing factors. *Allergy* 49:495-501.
13. Lindley I, Aschauer H, Seifert JM, Lam C, Brunowsky W, Kownatzki E, Thelen M, Peveri P, Dewald B, Tschärner Vv, Walz A, Baggiolini M (1988) Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci* 85:9199-9205.
14. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989) The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243:1464-1468.
15. Taub DD, Anver M, Oppenheim JJ, Longo DL, Murphy WJ (1996) T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 97:1931-1941.
16. Leonard EJ, Skeel A, Yoshimura T, Noer K, Kutvirt S, Van Epps D (1990) Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J Immunol* 144:1323-1330.
17. Villar MTA, Douglass J, Shute J, Church MK, Holgate ST (1993) Interleukin-8 is a chemoattractant for eosinophils primed with interleukin-4. *Am Rev Resp Dis* 147:
18. Sehmi R, Cromwell O, Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB (1993) Interleukin-8 is a chemoattractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 23:1027-1036.
19. Kuna P, Reddigari SR, Kornfeld D, Kaplan AP (1991) IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptideIII, and IL-3. *J Immunol* 147:1920-1924.

20. Bischoff SC, Baggiolini M, de-Weck AL, Dahinden CA (1991) Interleukin 8-inhibitor and inducer of histamine and leukotriene release in human basophils. *Biochem Biophys Res Commun* 179:628-633.
21. Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B, Baggiolini M (1989) The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med* 170:1787.
22. Leonard ED, Skeel A, Yoshimura T (1991) Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In Westwick, J. , S.L. Kunkel, I. Lundley, eds. *Chemotactic cytokines : biology of the inflammatory peptide supergene family*. New York : Plenum 305:57-61.
23. Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, Van Damme J (1995) Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95:1370-1376.
24. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9:617-648.
25. Alam R, Lett-Brown MA, Forsythe PA, Anderson-Walters DJ, Kenamore C, Kormos C, Grant JA (1992) Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils. *J Clin Invest* 89:723-728.
26. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA (1992) Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* 175:1271-1275.
27. Kuna P, Reddigari SR, Rucinski D, Oppenheim JJ, Kaplan AP (1992) Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J Exp Med* 175:489-493.
28. Dahinden CA, Geiser T, Brunner T, Vontscharner V, Caput D, Ferrara P, Minty A, Baggiolini M (1994) Monocyte Chemotactic Protein 3 Is a Most Effective Basophil- and Eosinophil-Activating Chemokine. *J Exp Med* 179:751-756.
29. Schall TJ, Jongstra J, Dyer B, Jea (1988) A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 141:1018-1025.

30. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von TV, Baggiolini M, Dahinden CA (1993) RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol* 23:761-767.
31. Alam R, Stafford S, Forsythe P, Harrison R, Faubion D, Lett BM, Grant JA (1993) RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150:3442-3448.
32. Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM (1992) Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176:587-592.
33. Ying S, Meng Q, Tabordabarata L, Corrigan CJ, Barkans J, Assoufi B, Moqbel R, Durham SR, Kay AB (1996) Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur J Immunol* 26:70-76.
34. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671.
35. Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid QA (1992) Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation : relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol* 148:2390-2394.
36. Kay A, Ying S, Varney V, Gaga M, Durham S, Moqbel R, Wardlaw A, Hamid Q (1991) Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J Exp Med* 173:775.
37. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay B (1992) Predominant TH2-like bronchoalveolar T-Lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326:298-304.
38. Hsieh K, Chou C, Chiang B (1996) Immunotherapy suppresses the production of monocyte chemotactic and activating factor and augments the production of IL-8 in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 98:580-587.

39. Ohehir RE, Lake RA, Schall TJ, Yssel H, Panagiotopoulou E, Lamb JR (1996) Regulation of cytokine and chemokine transcription in a human TH2 type T-cell clone during the induction phase of anergy. *Clin Exp Allergy* 26:20-27.
40. Akoum H, Tsicopoulos A, Vorng H, Wallaert B, Dessaint JP, Joseph M, Hamid Q, Tonnel AB (1996) Venom immunotherapy modulates Interleukin-4 and Interferon- $\gamma$  messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 87:593-598.
41. Jutel M, Pichler WJ, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller UR (1995) Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154:4187-4194.
42. McHugh SM, Deighton J, Stewart AG, Lachmann PJ, Ewan PW (1995) Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 25:828-838.
43. Akdis CA, Akdis M, Blesken T, Wymann D, Alkan SS, Müller U, Blaser K (1996) Epitope-specific-T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J Clin Invest* 98:1676-1683.
44. Hsieh K (1984) Change of lymphoproliferative responses of T-cell subsets to allergen and mitogen after hyposensitization in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 74:34-40.
45. Hsieh K (1985) Altered interleukin 2 (IL-2) production and responsiveness after hyposensitization to house dust. *J Allergy Clin Immunol* 76:188-194.
46. Hsieh K (1988) Decreased production of interleukin-2 receptor after immunotherapy to house dust. *J Clin Immunol* 8:171-178.
47. Birnbaum J, Charpin D, Vervloet D (1993) Rapid hymenoptera venom immunotherapy : comparative safety of three protocols. *Clin Exp Allergy* 23:226-230.
48. Legoux P, Minty C, Delpech B, Minty AJ, Shire D (1992) Simultaneous quantitation of cytokine mRNAs in interleukin-1b stimulated U373 human astrocytoma cells by a polymerisation chain reaction method involving co-amplification with an internal multispecific control. *Eur CytokineNetw* 3:553-563.
49. Lion T, Haas OA (1990) Nonradioactive labeling of probe with digoxigenin by polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 188:335-337.

50. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K (1989) Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 143 (4):1366-1371.

## **RESULTAT IV**

***DESENSIBILISATION DES BASOPHILES PAR LE  
RANTES AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE  
SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

## **ARTICLE 4**

### ***DESENSIBILISATION DES BASOPHILES PAR LE RANTES AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis pour la publication (1997) et inséré ci-après.

Dans notre étude, les résultats rapportés jusqu'à maintenant, révèlent que la tolérance clinique observée rapidement dès la 4<sup>ème</sup> heure après le début du rush, ne peut être expliquée par des phénomènes de régulation lymphocytaire qui prennent du temps à s'établir mais doit plutôt être liée à des mécanismes de type pharmacologique empêchant les cellules effectrices notamment les mastocytes et les basophiles de libérer leurs médiateurs anaphylactogènes.

On sait que le RANTES est capable d'empêcher l'action histaminolibératrice du MCP-1, du MCP-3 et du RANTES lui-même au niveau du basophile, par désensibilisation de leurs récepteurs. Etant donné les résultats précédents, nous avons testé la capacité histaminolibératrice de ces 3 chimiokines sur des leucocytes enrichis en basophiles avant (J0) et juste après le rush (J4h). Nous avons observé qu'à la fin d'une désensibilisation sur 3h30, le RANTES et à un moindre degré le MCP-3, mais pas le MCP-1, ne sont plus capables d'induire une histaminolibération basophilique (FIGURE 1a, 1b, 1c; ARTICLE 4). Cette inhibition suggère une désensibilisation pharmacologique des récepteurs basophiliques pour ces chimiokines par du RANTES libéré précocément au cours du rush.

En effet, lorsque l'on évalue la cinétique d'apparition de chimiokines à partir des surnageants de sang total hépariné prélevé immédiatement avant et 4h après le début du rush, et stimulés pendant 30 min avec l'allergène, on observe parallèlement à une libération d'histamine, une libération de RANTES dès 30min de stimulation par l'allergène à J0. Par contre, 4h après le rush, en condition de stimulation allergénique spécifique, une baisse significative du RANTES est observée (FIGURE 2a, 3a; ARTICLE 4). Aucune production d'IL-8 et de MCP-1 n'est retrouvée au niveau du sang total. Deux candidats potentiels sont capables de libérer des médiateurs pré-formés, le basophile et la plaquette. Nous avons donc

analysé la libération de RANTES par ces deux types cellulaires lors d'une activation dépendante de l'IgE. La lignée basophilique humaine KU812 produit très tardivement une faible quantité de RANTES (à 24h de stimulation) alors que les plaquettes exprimant des récepteurs pour l'IgE en produisent abondamment, dès 30min de stimulation. Des plaquettes purifiées à partir d'échantillons sanguins prélevés avant et après le rush, montrent un profil de sécrétion de RANTES identique à celui observé en sang total (FIGURE 2b; ARTICLE 4).

Nos résultats suggèrent qu'au cours du rush, la libération précoce de RANTES par les plaquettes pourrait désensibiliser les récepteurs des chimiokines au niveau des basophiles et secondairement empêcher l'histaminolibération induite par d'autres chimiokines produites ultérieurement notamment par les CMN (Figure 1A, ARTICLE 3).

*Le RANTES pourrait contribuer aux mécanismes impliqués dans l'établissement de la tolérance clinique observée à la fin du rush, notamment en empêchant la libération d'histamine induite par certaines chimiokines à partir des basophiles, qui sont fortement impliqués dans les réactions d'hypersensibilité immédiate.*

**ARTICLE 4**

**Rush Venom Immunotherapy Induces *In Vivo*  
Basophil Desensitization to RANTES**

Hikmat Akoum,<sup>\*</sup> Catherine Duez,<sup>\*</sup> Han Vorng,<sup>\*</sup>  
Benoît Wallaert,<sup>\*†</sup> André-Bernard Tonnel,<sup>\*†</sup> and Anne Tsicopoulos<sup>\*†</sup>

<sup>\*</sup>Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille; <sup>†</sup>Service de PneumoImmunoAllergologie,  
Hôpital Calmette, CH et U, Lille; FRANCE.

Running title : Rush Immunotherapy Induces Basophil Desensitization to RANTES

Key Words : Human. Basophils. Allergy. Chemokines. Immunotherapy.

## Abstract

Venom sensitive patients treated by 3h30 rush immunotherapy protocol tolerate a venom dose equivalent to one Hymenoptera sting without side effects. The mechanisms of this very early tolerance are poorly understood. Chemokines are implicated in inflammatory and allergic diseases, in particular *via* their ability to induce histamine release from basophils, a potential early target of RVIT (rush venom immunotherapy). Here we report that RVIT inhibits histamine release induced by RANTES and, to a lesser extent, by MCP-3, but not MCP-1, as early as 4h (D4h) after the initiation of RVIT. *In vitro* venom stimulation of whole blood cells from untreated patients induced RANTES release, which was accounted for by platelet production. At D4h, venom stimulation was not longer able to induce RANTES generation from purified platelets. In a previous study, we have observed an increased RANTES release and mRNA expression in 24h culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) collected at D4h. This was followed by a decrease in RANTES, IL-8 and MCP-1, 45 days after initiation of RVIT. These findings suggest that the rapid induction of tolerance to venom by RVIT might be in part related to a change in chemokine-induced reactivity of basophils.

## **Introduction**

Specific immunotherapy has been used for years on empirical bases. In the last decade, double blind placebo-controlled studies have shown the efficacy of this treatment in some types of allergic reactions, including Hymenoptera venom immunotherapy (VIT), where the protection achieved in allergic patients is around 96% (1). Very rapid immunotherapy protocols are now available allowing to reach a venom concentration equivalent to one bee sting in less than 4h without side effects (2). However, the mechanism by which immunotherapy exerts its beneficial effect remains unclear. Although different hypotheses have been formulated, including humoral and cellular mechanisms (for review see (3, 4)), none of them has been undoubtedly correlated with the efficacy of immunotherapy. Hymenoptera venom hypersensitivity is different from allergic asthma and rhinitis in the sense that it involves systemic anaphylactic reactions affecting the vascular compartment. We have previously shown that rush venom desensitization induced an early decrease in antigen-induced T cell proliferation and favoured the shift toward a Th1-type cytokine mRNA expression (5). Nevertheless, these cytokine modifications were not associated with the rapid clinical tolerance, suggesting that additional regulatory processes might operate at the level of the effector cells involved in the triggering of the anaphylactic reaction. Basophils and mast cells are the first cells involved in anaphylactic reactions and might be an early target of rush venom immunotherapy (RVIT). It has been shown that basophil total histamine is diminished after VIT (6-8), and that histamine releasing factors (HRF) are impaired during specific immunotherapy (9, 10). HRF and histamine release inhibitory factors (HRIF) modulate the release of basophil-derived mediators, and it is now established that members of the chemokine superfamily contribute mostly to this activity (11, 12). IL-8, a potent chemotactic factor for neutrophils (13), lymphocytes (14, 15), basophils (16) as well as for primed eosinophils (17, 18) has been shown to inhibit histamine generation from basophils (19, 20), but to promote its release when applied to cytokine-primed cells (21). On the other hand, MCP-1 is a potent chemotactic and activating factor for monocytes, lymphocytes, and basophils (22-24). This chemokine has been identified as a powerful HRF for human

basophils, with a kinetics and potency similar to those observed with well-established agonists, such as anti-IgE and C5a (25-27). MCP-3, which combines activities of MCP-1 and RANTES, is a member of the  $\beta$  chemokine subfamily, and is 71% homologous with MCP-1. MCP-3 is as effective as MCP-1 in inducing mediator release from basophils, and as RANTES as a chemoattractant for basophils and eosinophils (28). RANTES was first purified as a product of activated T cells (29) and is a powerful chemoattractant for basophils (30) and eosinophils (31). Additionally, it is now evident that RANTES is produced by platelets (32) and eosinophils (33). Furthermore, RANTES is also chemotactic for memory T lymphocytes and monocytes (34). Among these chemokines, the most potent HRF are represented by MCP-1, MCP-3, and RANTES. Although able to induce histamine release, RANTES has been reported to inhibit the release of histamine induced by other chemokines, in particular MCP-1, and also to prevent further basophil activation by itself (35-37). Cross or homologous desensitization involving interactions between different chemokines may lead to enhanced or decreased histamine release by basophils (11, 28, 37).

In the present study, we examined chemokine-induced basophil histamine release before and after RVIT. A rapid release of RANTES, likely from platelets, was detected upon allergen stimulation of whole blood cells collected before RVIT, but not at the end of the 4h treatment. This phenomenon was accompanied by a marked reduction in RANTES- and, to a lesser extent, in MCP-3-induced histamine release from basophils.

## **Materials and Methods**

### *Subjects and Immunotherapy regimen*

Nine patients were selected for RVIT on the basis of a history of systemic anaphylactic reaction after Hymenoptera stings. All patients were sensitive to *Vespula germanica*, and had positive intradermal skin tests to wasp venom and positive radioallergosorbent tests (RASTs). The method used for treatment was the ultrarush method as described by Birnbaum et al. (2). Briefly, at day 0, increasing doses of venom were injected every half an hour for 3h30 to reach a final dose of 40 $\mu$ g (cumulative dose : 100 $\mu$ g). At day 15, and every month afterwards 100 $\mu$ g of venom were injected subcutaneously. None of the patients experienced adverse reactions during or after the rush procedure, and no medication was given to them either before or during the desensitization. Venom allergens were purchased from Dome Hollister Stier Laboratories (Spokane, WA). The same aliquoted batches of venoms were used throughout the study.

### *Isolation of peripheral blood leukocytes and histamine release*

In order to avoid alterations in the basophil response related to purification procedures, mediator release was studied in total leukocyte preparations obtained after dextran sedimentation of erythrocytes. Several studies have shown that, under these conditions, chemokine-induced histamine release is similar in total leukocytes and in purified basophils. Histamine being only released by basophils and not other cell types. Venous blood was collected on EDTA before the first injection of venom (D0), and 30 min after the last injection of venom on the same day (D4h). The procedure for leukocyte isolation has been described previously (38). Briefly, the cells were prepared by dextran sedimentation [0.6% dextran, 0.6% glucose, 0.02M EDTA], the basophil-containing layer was washed twice with N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid buffered saline (HBS) containing 0.3% human serum albumin (HSA), and the cells were resuspended at  $30 \times 10^6$  cells/ml in HBS-HSA containing 2mM CaCl<sub>2</sub> and 2mM MgCl<sub>2</sub>. The percentage of basophils was between

1.07% and 2.5 % at D0 and between 0.98 % and 2.1 % at D4h, as determined by alcian blue staining. Aliquots of 20µl of recombinant human (rh) RANTES (Research and Diagnostics Systems, Minneapolis, MN), of rhMCP-1 or of rhMCP-3 (Pepro Tech Inc., Rocky Hill, NJ), at concentrations ranging from  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M were incubated with 100µl of the leukocyte suspension for 45min, at 37°C. After incubation, the supernatants were separated by centrifugation at 650g for 5min, at 4°C and histamine release was measured using a specific radioimmunoassay (Immunotech, Luminy, France), according to the manufacturer's instructions. Total basophil histamine content was determined after boiling the cell pellets for 10 min. The results were expressed as percent of total histamine content. Spontaneous histamine release from the cells was less than 5% and was subtracted from the calculated histamine release.

#### *Whole blood experiments*

Whole blood was collected at D0 and D4h of the rush protocol and further incubated with different concentrations of specific venom (from  $10^{-1}$  to 1 µg/ml) in round bottomed microtiter plates (Nunc-Roskilde, Denmark). After 30min incubation at 37°C, plates were centrifuged for 5min at 1500g, at 4°C. Supernatants were collected and stored at -20°C until histamine and chemokine quantification. Chemokine release was determined using commercial ELISA kits, according to the manufacturer's recommendations. Each sample was measured in duplicate. Sensitivities of the ELISAs were 2.5 pg/ml for RANTES (Research and Diagnostics Systems), 5 pg/ml for MCP-1 (Research and Diagnostics Systems) and 4-8 pg/ml for IL-8 (Tebu, CLB, Amsterdam, The Netherlands). Since optimal mediator release was obtained at  $10^{-1}$  µg/ml venom, this concentration was selected to express the results on whole blood experiments.

*Platelets and KU812 basophil cell line experiments*

Venous blood was collected on ACDC (citric acid/trisodic dextrose/citrate) (39) at D0 and D4h. Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation (120g, 15 min) and platelets were then washed three times by repeated centrifugations (2000g, 15min) in 0.9 % NaCl (saline) supplemented with citric acid (36mM), glucose (5mM), calcium (2mM), magnesium (1mM), BSA (0.35%), and prostaglandin E1 (100nM). After counting,  $7.5 \times 10^7$  platelets were suspended in Eagle's MEM containing 10% autologous sera and cultured in flat bottomed microplates (Nunc-Roskilde) with medium only or with specific venom, at the optimal concentration of  $10^{-1} \mu\text{g/ml}$ , in a final volume of 200 $\mu\text{l}$ . Kinetics experiments performed on platelets from allergic patients showed that RANTES was released as early as 30min after venom stimulation and reached a peak at 3h. This latter time point was selected to recover platelet supernatants by centrifugation at 700g and to quantify RANTES by ELISA.

When the human basophilic cell line KU812 was used,  $2.5 \times 10^6$  cells/ml were cultured in flat bottomed microplates (Nunc, Roskilde) in the absence or in the presence of  $10 \mu\text{g/ml}$  of human monoclonal IgE (provided by Dr. H. Spiegelberg, La Jolla, CA) followed by 100ng/ml of an anti-IgE antibody (Goat IgG fraction to human IgE, Cappel, Turnhout, Belgium). The supernatants were harvested at 30min, 2h, 5h and 24h by centrifugation at 700g and were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until the measurement of RANTES.

*Statistical analysis*

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between results obtained for a single subject in different conditions of stimulation at one particular time point were performed using paired *t*-test. Comparisons within results obtained at different time points for a particular type of stimulation were done using one-way analysis of variance. P values  $< 0.05$  were considered as statistically significant.

## Results

### *Effect of venom immunotherapy on chemokine-induced histamine release from basophils*

Basophil responsiveness to the histamine-releasing chemokines, MCP-1, MCP-3 and RANTES, was evaluated before and immediately after the 3h30 rush protocol.

Before treatment (D0), all the chemokines studied induced a dose-dependent histamine release. In contrast, at the end of the 3h30 rush protocol, a significant reduction in histamine secretion was observed after stimulation with all concentrations of RANTES ( $p < 0.05$ ) (maximal inhibition of 83.08 % at  $10^{-7}M$ ) (fig. 1a), after MCP-3 stimulation at  $10^{-7}$  and  $10^{-6} M$  ( $p < 0.05$ ) (maximal inhibition of 67.75 % at  $10^{-6}M$ ) (fig. 1b). Comparable amounts of histamine were measured in response to MCP-1 stimulation before and at the end of the rush (fig. 1c).

### *Effect of allergen stimulation on chemokine release from whole blood and platelets*

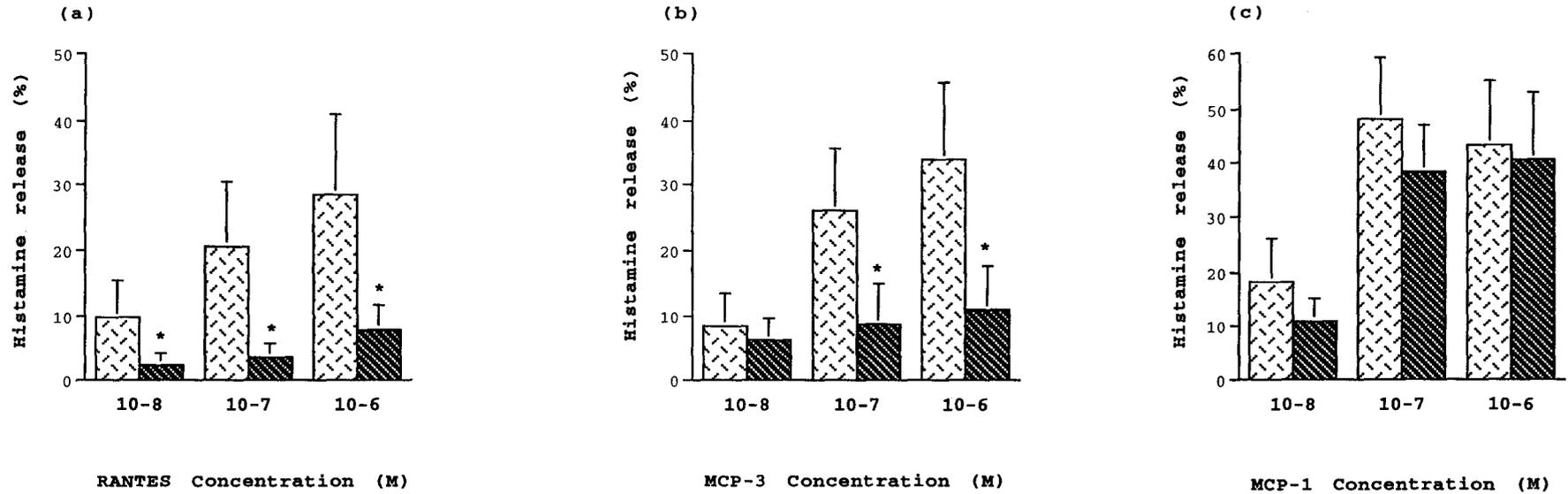
In order to elucidate the possible role of preformed chemokines released very early after the beginning of RVIT, their production in whole blood was evaluated concomitantly to that of histamine. At D0, stimulation of whole blood cells with specific venom for 30min induced an increase in RANTES production, as compared with baseline (respectively,  $6.24 \pm 1.00$  and  $4.68 \pm 0.94$  ng/ml;  $p < 0.05$ ), but not at D4h (respectively,  $3.59 \pm 0.67$  and  $3.22 \pm 0.44$  ng/ml). Moreover, venom-induced RANTES release was significantly lower at D4h than at D0 (fig. 2a). In contrast, levels of IL-8 and MCP-1 in whole blood from allergic patients were very low and they were not modified by specific venom stimulation (respectively,  $0.05 \pm 0.02$  and  $0.06 \pm 0.03$  ng/ml IL-8;  $0.48 \pm 0.13$  and  $0.51 \pm 0.1$  ng/ml MCP-1), suggesting that there is no early release of IL-8 or MCP-1 during RVIT. .

In order to determine the cellular origin of the early released RANTES, two cell types known to contain preformed mediators, i.e. basophils and platelets, were used. IgE-dependent stimulation of the human basophilic cell line KU812 failed to induce early RANTES release,

although a delayed but low production (less than 50 pg/ml) was observed at 24h. In contrast, significantly higher amounts of RANTES were generated at D0 by venom-challenged as opposed to non stimulated platelets from allergic patients (respectively,  $14.44 \pm 2.76$  ng/ml and  $10.2 \pm 1.89$  ng/ml,  $p < 0.01$ ) (fig. 2b). At D4h, venom stimulation did no longer induce RANTES release (venom versus baseline :  $9.67 \pm 2.07$  and  $9.51 \pm 2.18$  ng/ml, NS). Venom-induced RANTES release was significantly decreased at D4h, as compared to D0 ( $p < 0.04$ ). No changes in spontaneous RANTES level were observed before and after treatment.

*Allergen stimulation of whole blood induces a similar level of histamine release at all time points*

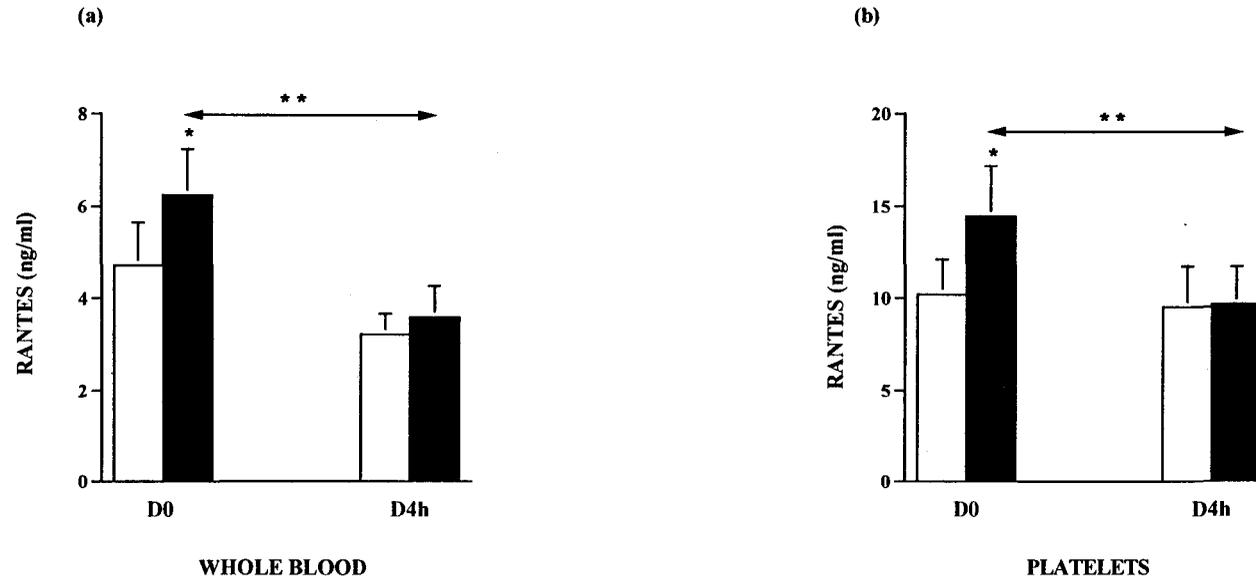
Histamine release as expressed as percent of total histamine content (fig. 3a) increased after venom stimulation both at D0 (venom versus baseline :  $49.50 \pm 21.53$  and  $7.46 \pm 1.67$  %,  $p < 0.05$ ), and at D4h ( $40.05 \pm 6.40$  and  $8.90 \pm 2.60$  %,  $p < 0.02$ ). There was no statistical difference in venom-induced histamine release when values obtained at D0 and D4h were compared. In contrast, when the absolute amount of total histamine was evaluated (fig. 3b), a significant decrease was observed at D4h versus D0 ( $p < 0.04$ ), showing that although RVIT induced a decrease in the absolute amount of histamine, it did not affect IgE-dependent basophil release capacities.



**FIGURE 1. Chemokine-induced histamine release from basophils in patients undergoing RVIT.**

Before (D0, □) and after (D4h, ▨) rush treatment, leukocytes were challenged with RANTES (a), MCP-3 (b) and MCP-1 (c), at concentrations ranging from 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-8</sup> M for 45 min, at 37°C and the percent of histamine release was determined. Results are expressed as means ± SEM (n = 6 patients).

\* p < 0.05. as compared with values obtained at D0 (paired t-test).



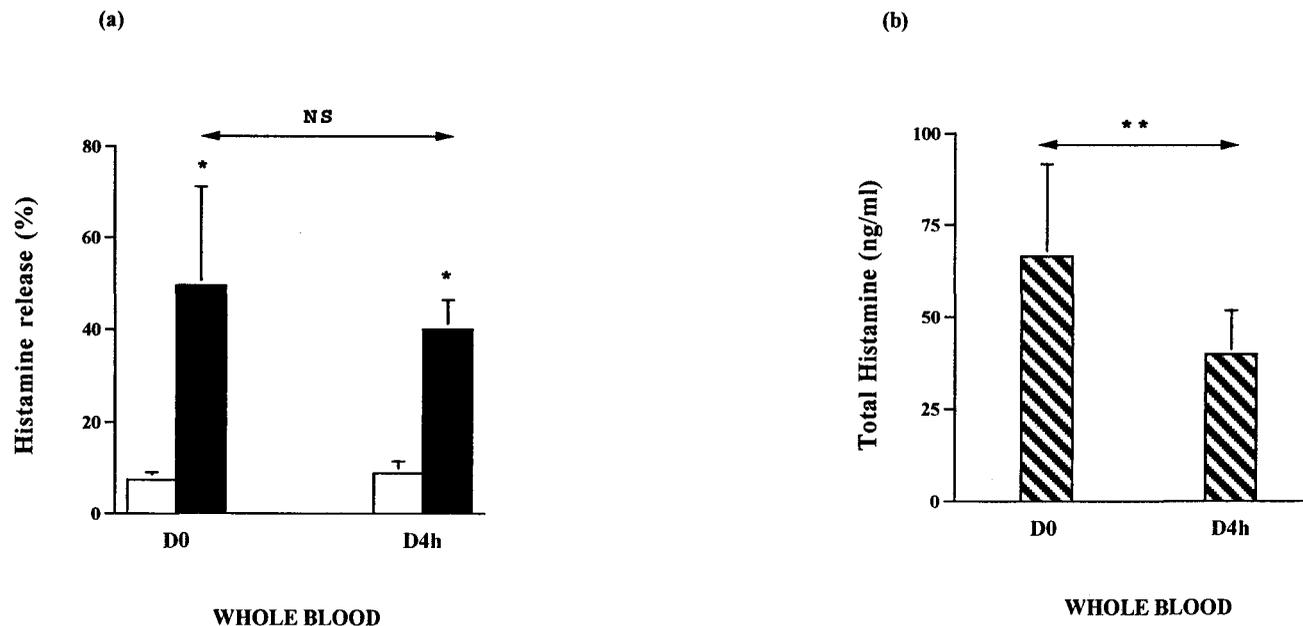
**FIGURE 2. Early release of RANTES in whole blood and platelet supernatants from patients undergoing RVIT.**

RANTES was measured in whole blood (a) or platelet supernatants (b) after incubation with medium alone (□) or in the presence of the specific venom (■).

Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n= 9 patients).

\* p < 0.05, as compared with medium alone.

\*\* p < 0.05, as compared with values obtained at D0 (paired t-test).



**FIGURE 3. Histamine release in whole blood supernatants from patients undergoing RVIT.**

Histamine was measured in whole blood supernatants (a) after incubation with medium alone (□) or in the presence of the specific venom (■) (percent of total histamine release) and in the cell lysates (absolute amount of histamine) (b)(▨).

Data are expressed as means  $\pm$  SEM (n= 9 patients).

\* p < 0.05, as compared with medium alone.

\*\* p < 0.05, as compared with values obtained at D0 (paired t-test).

## Discussion

The early clinical tolerance obtained within hours with fast RVIT protocol suggests desensitization of effector cells primarily involved in systemic anaphylactic reactions, such as mast cells and basophils. We examined the ability of different chemokines known to exert potent histamine-releasing activities, such as MCP-1, MCP-3 and RANTES (27, 28, 36), to promote histamine release from blood leukocytes obtained from venom allergic patients before and after rush treatment. Although considered as basophil activators, recent *in vitro* experiments have shown that chemokines can inhibit basophil histamine release in response to other chemokines, *via* homologous or cross desensitization of their receptors (28, 35, 37). Consistent with the phenomenon of homologous desensitization observed with ligand-receptors interactions that are coupled to G protein, RANTES can desensitize basophils to itself (36).

In the present study, we demonstrated that RANTES-induced histamine release from blood leukocytes was strongly inhibited after rush, suggesting a possible homologous desensitization as a consequence of *in vivo* RANTES release during immunotherapy. Previous studies have shown that when using total leukocyte preparations obtained after dextran sedimentation of erythrocytes, all the histamine is derived from basophils (37, 40). Moreover, the pattern of histamine release inhibition observed in chemokine desensitization experiments is similar in mixed leukocytes and in purified basophils (37). A decreased responsiveness, although less pronounced, was also observed towards MCP-3, a chemokine also known to induce basophil desensitization to itself (11). On the one hand, this finding argues for a release of MCP-3 during the rush and suggests that, as shown for RANTES, this chemokine might be stored as a preformed mediator in certain cell types. In confirmation, the expression of MCP-3, but not MCP-1, has been previously identified in platelets (41) and mast cells (42). On the other hand, MCP-3 has been shown to desensitize basophils to MCP-1, but during RVIT, MCP-1 was still able to induce histamine release. Opposite results have been obtained in the literature about basophil desensitization to MCP-1 by RANTES. In terms of histamine release, studies have shown that RANTES could induce desensitization to MCP-1 (35, 37),

while in terms of changes in intracellular calcium, this effect was not observed (11, 30). In contrast to what we have observed with RANTES and MCP-3, no basophil desensitization towards MCP-1 occurred after rush treatment. This finding would also argue against basophil cross desensitization between RANTES and MCP-1, at least in this clinical situation. Our results suggest a mechanism involving chemokine receptors, thus it would be interesting to evaluate their expression during RVIT. However, the interpretation would be difficult since surface receptors can be expressed without being functional (43).

Although we have shown basophil desensitization during rush RVIT in terms of histamine release, production of other mediators might also be down-regulated. This would be the case for leukotriene C<sub>4</sub>, which is released concomitantly to histamine in response to chemokine stimulation, and which has been shown to be decreased after RVIT (7).

RANTES was also generated in whole blood from venom allergic patients immediately after allergen stimulation, suggesting its release as a preformed mediator. Among different cell types, basophils and platelets are good candidates as a source of preformed RANTES, since they are able to be activated by IgE-dependent stimuli (44). Our results show that venom stimulation of platelets from allergic patients induced early (D0) but not late (D4h) RANTES production, suggesting that they became unresponsive to the allergen following the rush procedure. These results agree with those previously reported, showing that RVIT decreased IgE-dependent platelet reactivity as evidenced by the release of oxygen metabolites and cytotoxic mediators (45). Although not completely assimilable to peripheral blood cells, basophils derived from the human cell line KU812 failed to show rapid RANTES release upon IgE-dependent stimulation. Furthermore, the pattern of histamine release from these cells was different from that of RANTES in whole blood. It is of note that although the basophil absolute histamine amount was decreased at the end of the 3h30 rush, the venom-specific basophil reactivity was not reduced. This indicates that RVIT does not affect the IgE-dependent reactivity of basophils at early time points, as already suggested (7).

In a previous study, at the level of PBMC, we have demonstrated a general decrease in chemokine levels (in particular RANTES, IL-8, and MCP-1) at D45, as opposed to D0, with some variations depending on the chemokine considered (46). This decrease is reminiscent of

the state of antigen-specific tolerance of T cells after immunotherapy, which has been associated with a down-regulation in the production of a number of cytokines, except interferon- $\gamma$  (5, 47-49). Surprisingly, RANTES increased as soon as the end of the rush, i.e., at the 4<sup>th</sup> hour and then declined progressively up to day 45. This suggests that RANTES is involved in the initial events underlying RVIT.

Thus, during RVIT, early basophil desensitization likely related to RANTES production by antigen-stimulated platelets, might be able to prevent further basophil activation by RANTES itself originating from other cell types, particularly PBMC. This hypothesis needs to be evaluated by further experiments, and remains presently speculative. This area might be of wider interest, since RANTES receptor is expressed not only on basophils, but also on eosinophils, monocytes and T lymphocytes. Desensitization through the RANTES receptor has been described in human monocytes, leading to an inhibition of the chemotactic response to RANTES itself (50) and in eosinophils with cross desensitization between RANTES and MCP-3 (28). Even though homologous desensitization has not been investigated in T lymphocytes, the ability of RANTES to activate these cells within minutes through two different signaling pathways, one leading to chemotaxis, and the other to cytokine release and cell proliferation, has been documented (51). Therefore, it would be of interest to investigate the effect of rush desensitization on RANTES-induced recruitment and activation of cells expressing its receptor.

In conclusion, a reduction in the release of preformed histamine by RANTES-stimulated leukocytes observed within the first hours of desensitization indicates that basophil is a target for RVIT. The rapid tolerance induction to venoms by RVIT might thus be in part related to a change in the chemokine-dependent reactivity of basophils.

## References

1. Hunt, K. J., M. D. Valentine, A. K. Sobotka, A. W. Benton, F. J. Amodo and L. M. Lichtenstein. 1978. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med* 299:157.
2. Birnbaum, J., D. Charpin and D. Vervloet. 1993. Rapid hymenoptera venom immunotherapy : comparative safety of three protocols. *Clin Exp Allergy* 23:226.
3. Rocklin, R. E. 1983. Clinical and immunological aspects of allergen-specific immunotherapy in patients with seasonal allergic rhinitis and/or allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 72:323.
4. Nakagawa, T. and M. E. Gershwin. 1993. Immunotherapy of allergic diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 102:117.
5. Akoum, H., A. Tsicopoulos, H. Vorng, B. Wallaert, J. P. Dessaint, M. Joseph, Q. Hamid and A. B. Tonnel. 1996. Venom immunotherapy modulates Interleukin-4 and Interferon- $\gamma$  messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 87:593.
6. Mahmood, T., H. Wall, S. Sobus, D. J. Stechshulte and N. I. Abdou. 1982. Modulation of venom-induced leukocyte histamine release by mononuclear cells. *J Allergy Clin Immunol* 70:445.
7. Jutel, M., U. R. Müller, M. Fricker, S. Rihs, W. J. Pichler and C. Dahinden. 1996. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Allergy* 26:1112.
8. Stephan, V., J. Kühr and R. Urbanek. 1989. Relevance of basophil histamine release changes during venom immunotherapy. *Allergy* 44:453.
9. Kuna, P., R. Alam, B. Kuzminska and J. Rozniecki. 1989. The effect of preseasonal immunotherapy on the production of histamine-releasing factor (HRF) by mononuclear cells from patients with seasonal asthma : Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Allergy Clin Immunol* 83:816.
10. Brunet, C., P. M. Bedard, A. Lavoie, M. Jobin and J. Hebert. 1992. Allergic rhinitis to ragweed pollen. II. Modulation of histamine releasing factor production by specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 89:87.

11. Baggiolini, M. and C. A. Dahinden. 1994. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 15:127.
12. Kaplan, A. P., P. Kuna and S. R. Reddigari. 1994. Chemokines as allergic mediators - relationship to histamine-releasing factors. *Allergy* 49:495.
13. Lindley, I., H. Aschauer, J. M. Seifert, C. Lam, W. Brunowsky, E. Kownatzki, M. Thelen, P. Peveri, B. Dewald, V. v. Tschärner, A. Walz and M. Baggiolini. 1988. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor. *Proc Natl Acad Sci* 85:9199.
14. Larsen, C. G., A. O. Anderson, E. Appella, J. J. Oppenheim and K. Matsushima. 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243:1464.
15. Taub, D. D., M. Anver, J. J. Oppenheim, D. L. Longo and W. J. Murphy. 1996. T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 97:1931.
16. Leonard, E. J., A. Skeel, T. Yoshimura, K. Noer, S. Kutvirt and D. Van Epps. 1990. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J Immunol* 144:1323.
17. Villar, M. T. A., J. Douglass, J. Shute, M. K. Church and S. T. Holgate. 1993. Interleukin-8 is a chemoattractant for eosinophils primed with interleukin-4. *Am Rev Resp Dis* 147:.
18. Sehmi, R., O. Cromwell, A. J. Wardlaw, R. Moqbel and A. B. Kay. 1993. Interleukin-8 is a chemoattractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 23:1027.
19. Kuna, P., S. R. Reddigari, D. Kornfeld and A. P. Kaplan. 1991. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptideIII, and IL-3. *J Immunol* 147:1920.

20. Bischoff, S. C., M. Baggiolini, A. L. de-Weck and C. A. Dahinden. 1991. Interleukin 8-inhibitor and inducer of histamine and leukotriene release in human basophils. *Biochem Biophys Res Commun* 179:628.
21. Dahinden, C. A., Y. Kurimoto, A. L. De Weck, I. Lindley, B. Dewald and M. Baggiolini. 1989. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med* 170:1787.
22. Leonard, E. D., A. Skeel and T. Yoshimura. 1991. Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In Westwick, J. , S.L. Kunkel, I. Lundley, eds. Chemotactic cytokines : biology of the inflammatory peptide supergene family. *New York : Plenum* 305:57.
23. Taub, D. D., P. Proost, W. J. Murphy, M. Anver, D. L. Longo and J. Van Damme. 1995. Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 95:1370.
24. Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida and K. Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9:617.
25. Alam, R., M. A. Lett-Brown, P. A. Forsythe, D. J. Anderson-Walters, C. Kenamore, C. Kormos and J. A. Grant. 1992. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils. *J Clin Invest* 89:723.
26. Bischoff, S. C., M. Krieger, T. Brunner and C. A. Dahinden. 1992. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* 175:1271.
27. Kuna, P., S. R. Reddigari, D. Rucinski, J. J. Oppenheim and A. P. Kaplan. 1992. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. *J Exp Med* 175:489.
28. Dahinden, C. A., T. Geiser, T. Brunner, V. Vontscharner, D. Caput, P. Ferrara, A. Minty and M. Baggiolini. 1994. Monocyte Chemotactic Protein 3 Is a Most Effective Basophil- and Eosinophil-Activating Chemokine. *J Exp Med* 179:751.
29. Schall, T. J., J. Jongstra and B. J. e. a. Dyer. 1988. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* 141:1018.

30. Bischoff, S. C., M. Krieger, T. Brunner, A. Rot, T. V. von, M. Baggiolini and C. A. Dahinden. 1993. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol* 23:761.
31. Alam, R., S. Stafford, P. Forsythe, R. Harrison, D. Faubion, B. M. Lett and J. A. Grant. 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150:3442.
32. Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christophers and J. M. Schroder. 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 176:587.
33. Ying, S., Q. Meng, L. Tabordabarata, C. J. Corrigan, J. Barkans, B. Assoufi, R. Moqbel, S. R. Durham and A. B. Kay. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur J Immunol* 26:70.
34. Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy and D. V. Goeddel. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669.
35. Alam, R., P. A. Forsythe, B. M. Lett and J. A. Grant. 1992. Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:427.
36. Kuna, P., S. R. Reddigari, T. J. Schall, D. Rucinski, M. Y. Viksman and A. P. Kaplan. 1992. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol* 149:636.
37. Kuna, P., S. R. Reddigari, D. Rucinski, T. J. Schall and A. P. Kaplan. 1995. Chemokines of the alpha, beta-subclass inhibit human basophils' responsiveness to monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *J Allerg Clin Immunol* 95:574.
38. Kaplan, A. P., M. Haak-Frendscho, A. Fauci, C. Dinarello and E. Halbert. 1985. A histamine-releasing factor from activated human mononuclear cells. *J Immunol* 135:2027.

39. Patscheke, H. and P. Wörner. 1978. Platelet activation detected by turbidimetric shape change analysis : differential influence of cytochalasin B and prostaglandin E1. *Thrombos Res* 12:485.
40. Kurimoto, Y., A. L. De Weck and C. A. Dahinden. 1989. Interleukin-3 dependent mediator release in basophils triggered by C5a. *J. Exp. Med.* 170:467.
41. Power, C. A., J. M. Clemetson, K. J. Clemetson and T. N. C. Wells. 1995. Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets. *Cytokine* 7:479.
42. Kulmberg, P. A., N. E. Huber, B. J. Scheer, M. Wrann and T. Baumruker. 1992. Immunoglobulin E plus antigen challenge induces a novel intercrine/chemokine in mouse mast cells. *J. Exp. Med.* 176:1773.
43. Tsicopoulos, A., M. Labalette, H. Akoum, C. Duez, B. Wallaert, J. P. Dessaint and A. B. Tonnel. 1996. CD28 expression is increased in venom allergic patients but is not modified by specific immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 26:1119 .
44. Joseph, M., A. Capron, J. C. Ameisen, M. Capron, H. Vorng, V. Pancre, J. P. Kusnierz and C. Auriault. 1986. The receptor for IgE on blood platelets. *Eur J Immunol* 16:306.
45. Tsicopoulos, A., A. B. Tonnel, B. Wallaert, M. Joseph, J. C. Ameisen, P. Ramon, J. P. Dessaint and A. Capron. 1988. Decrease of IgE-dependent platelet activation in Hymenoptera hypersensitivity after specific rush desensitization. *Clin Exp Immunol* 71:433.
46. Akoum, H., C. Duez, H. Vorng, B. Wallaert, A. Tonnel and A. Tsicopoulos. 1997. Early modifications of chemokine production and mRNA expression during rush venom immunotherapy. (*submitted*) .
47. Jutel, M., W. J. Pichler, D. Skrbic, A. Urwyler, C. Dahinden and U. R. Muller. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154:4187.
48. McHugh, S. M., J. Deighton, A. G. Stewart, P. J. Lachmann and P. W. Ewan. 1995. Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 25:828.

49. Akdis, C. A., M. Akdis, T. Blesken, D. Wymann, S. S. Alkan, U. Müller and K. Blaser. 1996. Epitope-specific-T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *J. Clin. Invest.* 98:1676.
50. Wang, J. M., D. W. McVicar, J. J. Oppenheim and D. J. Kelvin. 1993. Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. *J Exp Med* 177:699.
51. Bacon, K. B., B. A. Premack, P. Gardner and T. J. Schall. 1995. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 269:1727.

## **Footnotes**

This work was supported by Unité INSERM 416, Institut Pasteur de Lille, France.

Abbreviations used in this paper : RVIT : rush venom immunotherapy; HRF : histamine releasing factors; HRIF : histamine release inhibitory factors; MCP : monocyte chemoattractant protein; RANTES : regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted.

Correspondence address: Dr A. Tsicopoulos, Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille.  
BP 245, 59019 Lille cedex, France.

Ph Number : 33 3 20 87 78 80 ; Fax Number : 33 3 20 87 73 45

E. mail address : Anne.Tsicopoulos@pasteur-lille.fr

## **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Marina Pretolani for critical review of the manuscript, and Mrs Nadia Fernez, Sylvie Laurence, Laurence Capy and Bernadette Thiébaud for their help in collecting blood samples.

## **RESULTAT V**

***REGULATION DE LA SYNTHESE D'IgE AU COURS  
DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE  
AUX VENINS D'HYMENOPTERES***

**REGULATION DE LA SYNTHÈSE D'IgE  
AU COURS DE L'IMMUNOTHERAPIE SPECIFIQUE  
AUX VENINS D'HYMENOPTERES**

***Objectifs de l'étude***

On sait depuis longtemps que l'ITS induit une augmentation initiale des IgE spécifiques d'antigène, avant qu'une diminution puisse être observée à long terme après établissement de la tolérance clinique. Dans notre modèle d'étude, l'ITS aux venins d'hyménoptères selon la procédure accélérée "rush" sur 3h 30, une augmentation des IgE sériques spécifiques est observée au premier rappel après rush (à J15) et une diminution à partir du deuxième rappel (à J45). Dans cette partie de notre travail, nous avons essayé de préciser les facteurs et les mécanismes responsables de cette amplification de synthèse d'Ac à J15 du rush. Ainsi, une étude de la régulation de la synthèse d'IgE a été réalisée au cours de l'ITS au venin de guêpe ou d'abeille. Il faut rappeler que la synthèse d'IgE est sous l'étroite dépendance de l'IL-13, et de l'IL-4 qui stimulent l'expression d'ARNm stérile pour l'IgE (germline (g)  $\epsilon$ RNA), lui-même permettant la transcription d'ARNm productif pour ces immunoglobulines (productif (p)  $\epsilon$ RNA). Des observations *in vivo* dans un modèle murin ont montré que lors d'une réponse primaire, la stimulation de cellules B naïves par un Ac anti-IgD induit la commutation "switch" vers l'IgE ainsi qu'une faible sécrétion d'IgE, alors que lors d'une réponse secondaire obtenue par l'injection consécutive d'Ac anti-IgD et d'Ac anti-IgE aboutit à une intense sécrétion d'IgE. Lors de la réponse primaire, 3 jours après injection d'Ac, l'augmentation d'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 est suivie 24h après, d'une expression de g $\epsilon$  et 1 à 2 jours plus tard, par un accroissement de l'expression de p $\epsilon$ . Lors de la réponse secondaire, l'augmentation de p $\epsilon$  et des IgE sériques s'accompagne d'une faible augmentation d'IL-4 et de

gE. Néanmoins, alors qu'un Ac neutralisant anti-IL-4 bloque l'expression de gE dans les 2 cas de réponses primaire et secondaire, la production de pE et des IgE sériques n'est pas affectée par cet Ac en cas de réponse secondaire. En conclusion, il semble donc que l'IL-4 et le gE ne sont pas nécessaires à la production d'IgE par les B qui expriment les IgE à leur surface (lymphocytes B IgE<sup>+</sup>) [Thyphronitis et al, 1993].

Dans notre modèle d'étude, la détection des transcrits stérile et productif pour l'IgE devrait permettre de savoir si l'augmentation d'IgE après désensibilisation provient de cellules B n'ayant pas encore exprimé l'IgE à leur surface ou de cellules B ayant déjà commuté vers l'IgE. Donc, afin d'étudier l'effet de l'ITS sur la régulation des transcrits pour l'IgE, une étude cinétique de l'apparition des ARNm codant pour l'IL-13, l'IL-4, ainsi que celle du gE et du pE a été réalisée sur les CMN de sujets allergiques aux venins d'hyménoptères avant (à J0) et à différents temps après traitement (à J4h, J15 et J45). De plus, en parallèle, le niveau de production de l'IL-13 par les CMN a été également étudié.

## **Matériels et méthodes**

### **1- Patients**

9 patients ayant présenté des réactions anaphylactiques systémiques après piqûre d'hyménoptère ont été inclus dans l'étude. Tous présentaient des tests cutanés positifs et avaient des IgE spécifiques (RAST) vis-à-vis du venin d'hyménoptère. 8 étaient sensibilisés au venin de guêpe (*Vespula germanica*) et 1 au venin d'abeille (*Apis mellifica*).

### **2- Hyposensibilisation spécifique accélérée ou ultra rush**

Elle a été réalisée en 3h 30 selon le protocole déjà décrit [Birnbaum, 1993]. Il consiste en l'injection sous-cutanée aux patients à J0, de quantité croissante de venin standardisé (Dome Hollister Stier, Spokane, U.S.A.), à une demi-heure d'intervalle jusqu'à une dose finale de 40 µg au bout de 3h 30 (dose cumulative = 100 µg). Puis cette dose est reçue en deux injections en sous-cutanée, au jour 15 (J15), et réinjectée en dose d'entretien tous les mois.

### **3- Préparations cellulaires**

Le sang veineux de 9 patients allergiques aux venins d'hyménoptères a été prélevé sur héparinate de Ca<sup>++</sup> à J0, J4h (30 min après les 3h 30 du rush), J15 et J45 du rush. Les prélèvements s'effectuent avant l'injection d'allergène. Après élimination des plaquettes par centrifugation à 120g pendant 15min, le sang est dilué au demi dans un tampon phosphate (PBS 0,01M) et centrifugé à 400g pendant 30 min à 15°C, sur gradient Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Les cellules mononucléées (CMN) recueillies à l'interface et lavées 3 fois en PBS sont resuspendues en RPMI 1640 complété avec de la glutamine (2mM) et du β-2 mercaptoéthanol (5x10<sup>-5</sup>M). Sur une partie des CMN, une extraction d'ARNm dans le RNazol a été effectuée immédiatement (*ex vivo*). Le reste des cellules a été incubé avec le milieu ou avec le venin spécifique. Après 24hr de culture, les cellules sont centrifugées à 500g pendant 7 min et les surnageants correspondants récupérés aliquotés et conservés à -80°C pour le dosage de l'IL-13 réalisé par ELISA (Kit de dosage immunoenzymatique commercial dont la sensibilité est de 1,5 pg/ml (Immunotech)).

#### **4- Extraction de l'ARNm**

Les CMN sont lysées dans le RNazol (Bioprobe systems, Montreuil-sous-bois, France) (1ml pour  $10 \times 10^6$  cellules) pendant 5 min à température ambiante; 200  $\mu$ l de chloroforme sont ensuite ajoutés. Suite à une centrifugation 15 min à 12000g à 4°C. L'ARN, présent dans la phase aqueuse, est précipité par l'isopropanol (10 min à température ambiante). Après centrifugation 10 min à 12000g, le culot est lavé dans l'éthanol à 75% (centrifugation de 7500g pendant 5 minutes), séché sous vide puis dissous dans l'eau apyrogène. La quantité d'ARN obtenue est dosée par spectrophotométrie puis congelés à -80°C jusqu'à rétrotranscription en ADNc. La qualité de l'échantillon est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% en présence de bromure d'éthidium.

#### **5- RT-PCR semi-quantitative**

La rétrotranscription s'effectue sur un volume correspondant à 1  $\mu$ g d'ARN auquel sont ajoutés des amorces oligo-dT à 0,1 $\mu$ g/ml (Boehringer), et de la RNAsine à 4U/ $\mu$ l (Promega). Cette solution est laissée 5 min à 70°C puis 5 min dans la glace. Par la suite, au mélange est ajouté du tampon 5x (Life technologies), de la RNAsine à 4U/ $\mu$ l, du dithiothréitol (DTT) à 0,1M (Gibco BRL), de l'enzyme MMLV-transcriptase reverse (mouse moloney leukemia virus, Gibco BRL) à 200U/ $\mu$ l, et du dNTP (Pharmacia) à 10mM. L'ensemble est incubé 1h à 42°C puis chauffé 5min à 95°C. La solution finale correspond à 50  $\mu$ l d'ADNc qui peuvent être utilisés de suite pour les expériences de PCR ou conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

L'ADNc est amplifié en présence d'amorces soit de GAPDH (Glycéraldéhyde Phosphate Déshydrogénase), soit des cytokines (IL-4 et IL-13), soit des transcrits stériles et productifs pour l'IgE (Eurogentec) dans une réaction de PCR de volume final de 25  $\mu$ l contenant : 100  $\mu$ M de dATP, dCTP, dGTP et 95  $\mu$ M dTTP (Pharmacia); 0,1 $\mu$ M digoxigenin-11-dUTP (Boehringer); 0,5  $\mu$ M des amorces; 1,25U/ $\mu$ l de Taq polymérase (Perkin Elmer) 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer). Toutes ces étapes se déroulent dans la glace puis les tubes sont placés dans un amplificateur (Cyclone Integra Biosciences). Les séquences de ces

différentes amorces sont les suivantes : **GAPDH** sens : 5'-GTCTTCACCACCATGGAGA-3'; anti-sens : 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'. **IL-4** sens : 5'-TGCCTCCAAGAACACAACACTG -3'; anti-sens : 5'- AACGTACTCTGGTTGGCTTC -3'. **IL-13** sens : 5'- GAGTGTGTTTGTACCGTTG -3'; anti-sens : 5'- TACTCGTTGGCTGAGAGCTG -3'. **gε** sens : 5'-AGGCTCCACTGCCCGGCACAGAAAT -3'; anti-sens : 5'-ACGGAGGTGGCATTGGAGGGAATGT -3'. **pε** sens : 5'-AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCC -3'; anti-sens : 5'-GACGCTGAAGGTTTTGTTGTCG -3'. Le gène codant pour la GAPDH est un gène dit domestique (housekeeping gene) dans la mesure où il est exprimé constitutivement dans toute cellule et que son expression n'est pas modulable. Pour ces raisons, la GAPDH est considérée comme témoin interne des expériences de PCR.

La GAPDH, les cytokines, le gε et le pε ont été étudiés conjointement et le nombre de cycles permettant une amplification linéaire des produits de PCR a été déterminé dans des expériences préliminaires (21 cycles pour la GAPDH; 26 pour l'IL-4 ; 34 pour l'IL-13; 26 pour le gε et 30 pour le pε). Le nombre de cycles a été préalablement défini pour chaque molécule par des expériences de cinétique faisant à la fois varier la concentration d'ADNc à amplifier et le nombre de cycles d'amplification. Chaque cycle d'amplification est constitué de 3 étapes : l'étape de dénaturation à 94°C pendant 1min; l'étape d'hybridation à 60°C pendant 1min afin de permettre aux amorces de s'apparier au premier brin d'ADNc; l'étape d'élongation à 72°C pendant 1min. La première étape peut être précédée d'une première dénaturation (2min à 94°C); de même la troisième étape est généralement suivie d'une élongation terminale (7min à 72°C). Après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5%-Bromure d'éthidium, les produits de PCR sont transférés sur une membrane de nylon (Boehringer) par capillarité et sur la nuit. Après transfert, la membrane est séchée puis fixée aux UV. Les ADNc sont révélés par l'intermédiaire d'un anticorps anti-digoxygénine marqué à la phosphatase alcaline et un système de chimioluminescence (CDP-star, Boehringer). Les résultats sont analysés par densitométrie (Bio-profil; Vilber Lourmat) et exprimés en pourcentage de la densité optique obtenue pour la bande de GAPDH correspondante.

### ***6- Analyses statistiques***

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons des résultats obtenus au même temps du rush et entre différentes conditions de culture sont réalisées par un t-test apparié, tandis que celles entre les différents temps du rush pour la même condition de culture par analyse de variance unilatérale.  $p \leq 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.

## **Résultats**

### **1- Dosage des IgE sériques totales et spécifiques**

Les IgE totales (exprimées en KUI/L) et spécifiques (exprimées en unités RAST) ont été dosées dans le sérum de patients à différents temps du rush (J0, J4h, J15 et J45). Les taux d'IgE totales étaient de  $628 \pm 107,5$  à J0;  $608,28 \pm 95,72$  à J4h;  $681 \pm 104,69$  à J15 et  $613 \pm 99,09$  KUI/L à J45. La différence entre ces valeurs n'est pas statistiquement significative.

Les IgE spécifiques du venin étaient augmentées à J15 ( $10,76 \pm 3,85$  Unités RAST) par rapport à J0 ( $8,98 \pm 3,97$ ) et J4h ( $8,45 \pm 8,34$ ) et commençaient à diminuer à J45 ( $10 \pm 9,6$ ) ( $p=0,02$  par analyse de variance unilatérale).

### **2- Modulation de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 au cours de l'ITS**

Chez les patients, l'expression spontanée de l'ARNm codant pour l'IL-4 diminue d'une façon statistiquement significative entre les différents temps du rush (J0, J4h, J15 et J45) ( $p \leq 0,02$  par analyse de variance). La même diminution est observée quand les CMN ont été isolées immédiatement (*ex vivo*) ( $p \leq 0,05$  par analyse de variance unilatérale) (Figure 1).

### **3- Modulation de la production et de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-13 au cours de l'ITS**

Chez les patients allergiques aux venins d'hyménoptères, la stimulation par l'allergène spécifique induit une augmentation significative des taux de production et d'expression d'ARNm codant pour l'IL-13 (résultats non montrés) par comparaison aux taux observés à l'état de base, et ceci quelque soit le temps du rush (pour la protéine :  $p \leq 0,04$  à J0, J4h, J15 et J45 et pour l'ARNm :  $p \leq 0,04$  à J0, J1, J15 et J45 par t-test apparié).

Quand les CMN sont isolées immédiatement (*ex vivo*), l'expression de l'ARNm codant montre un profil identique à celui observé à l'état de base après 24hr de culture des CMN (Figure 2). Cependant, on n'a pas observé de variations statistiquement significatives dans l'expression de l'IL-13 entre les différents temps du traitement étudiés.

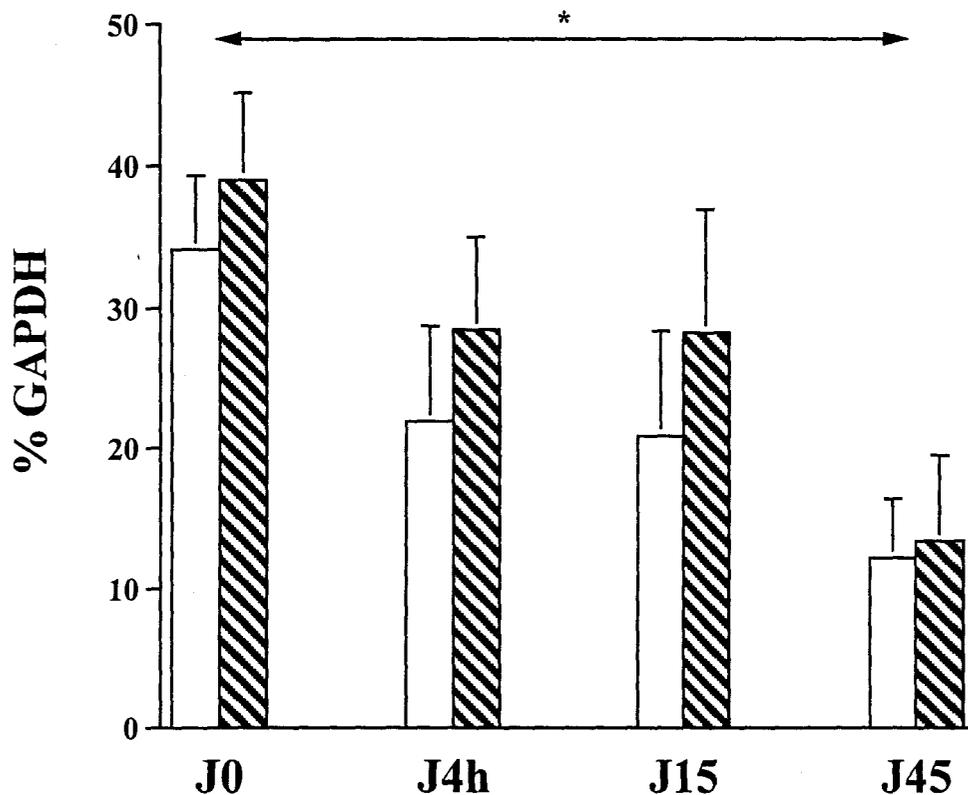
#### **4- Modulation de l'expression d'ARNm stérile (gε) codant pour l'IgE au cours de l'ITS**

Chez les patients, à l'état de base, on n'observe pas de variations statistiquement significatives entre les différents temps du rush. Quand les CMN sont immédiatement isolées (*ex vivo*), le même profil d'expression du transcrit stérile pour l'IgE que celui observé à l'état de base après 24hr de culture (Figure 3).

#### **5- Modulation de l'expression d'ARNm productif (pε) codant pour l'IgE au cours de l'ITS**

Chez les patients, à J15 du rush, une augmentation significative d'expression de pε a été observée à l'état de base ( $p \leq 0,05$  par analyse de variance unilatérale) qui diminue à J45. Le même profil a été observé quand les CMN ont été isolées immédiatement (*ex vivo*) ( $p \leq 0,05$  par analyse de variance unilatérale) (Figure 4).

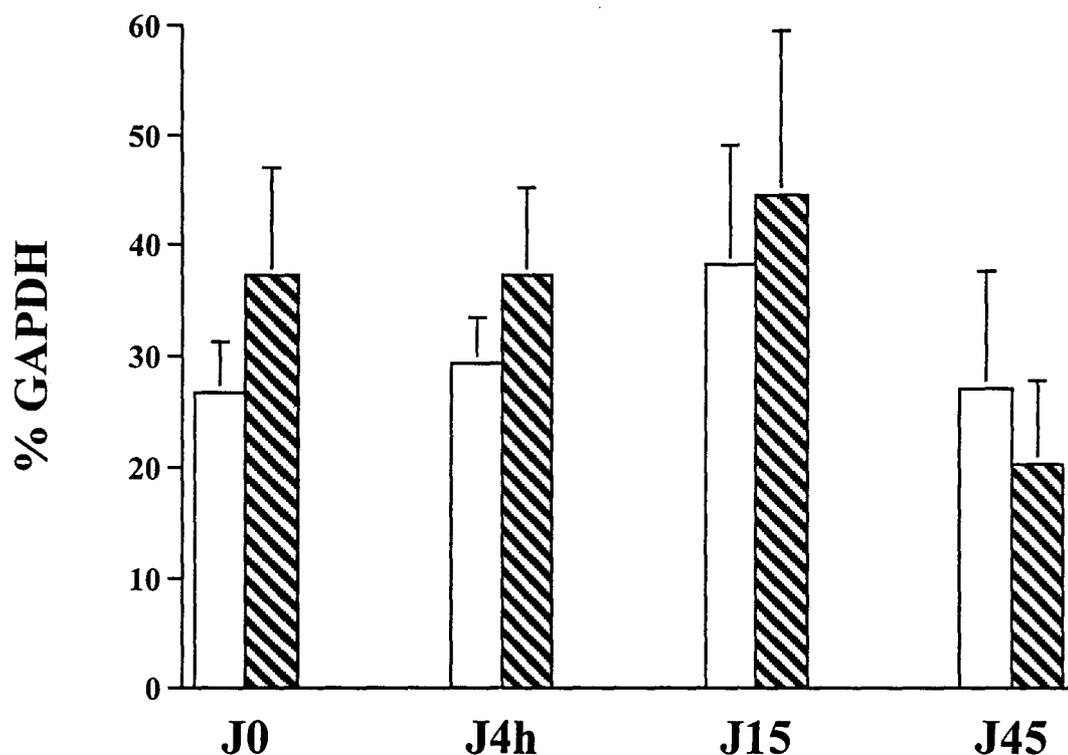
Un exemple représentatif des résultats obtenus avec un seul patient sont montrés dans la figure 5.



**Figure 1 : Modulation d'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 par les cellules mononucléées (CMN) de sujets allergiques aux venins d'Hyménoptères au cours de l'ITS.**

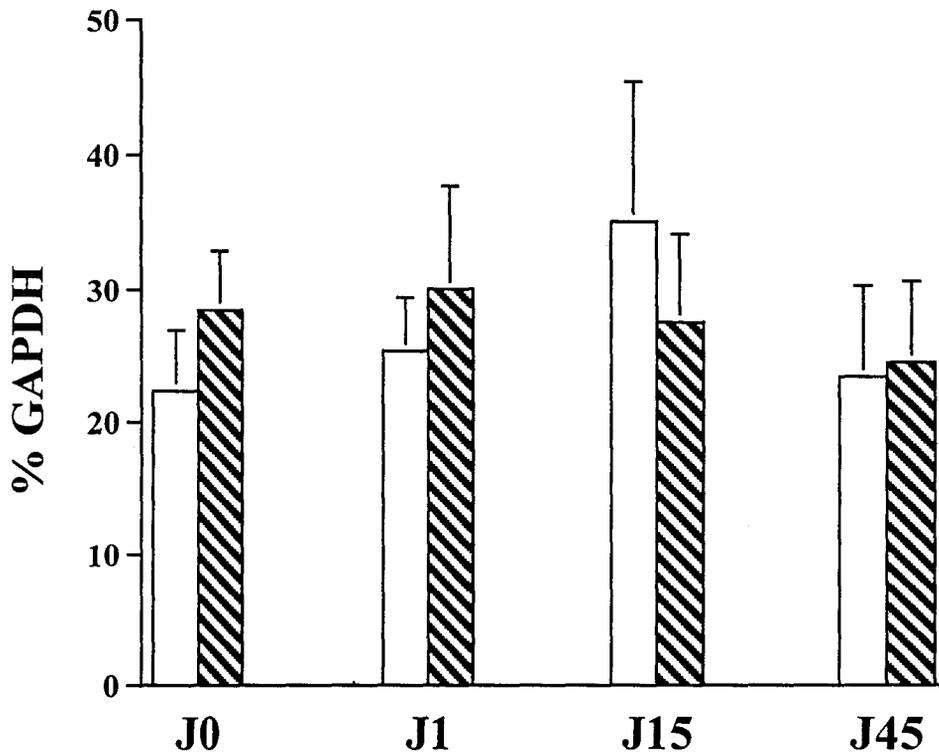
Valeurs moyennes d'expression d'IL-4 par les CMN, soit après extraction immédiate de l'ARN (▨), soit après 24hr de culture avec le milieu seul (□). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique de la GAPDH (moyenne  $\pm$  SEM; n=9).

\* : La variation est significative entre les différents temps du rush ( $p \leq 0,05$  par analyse de variance unilatérale).



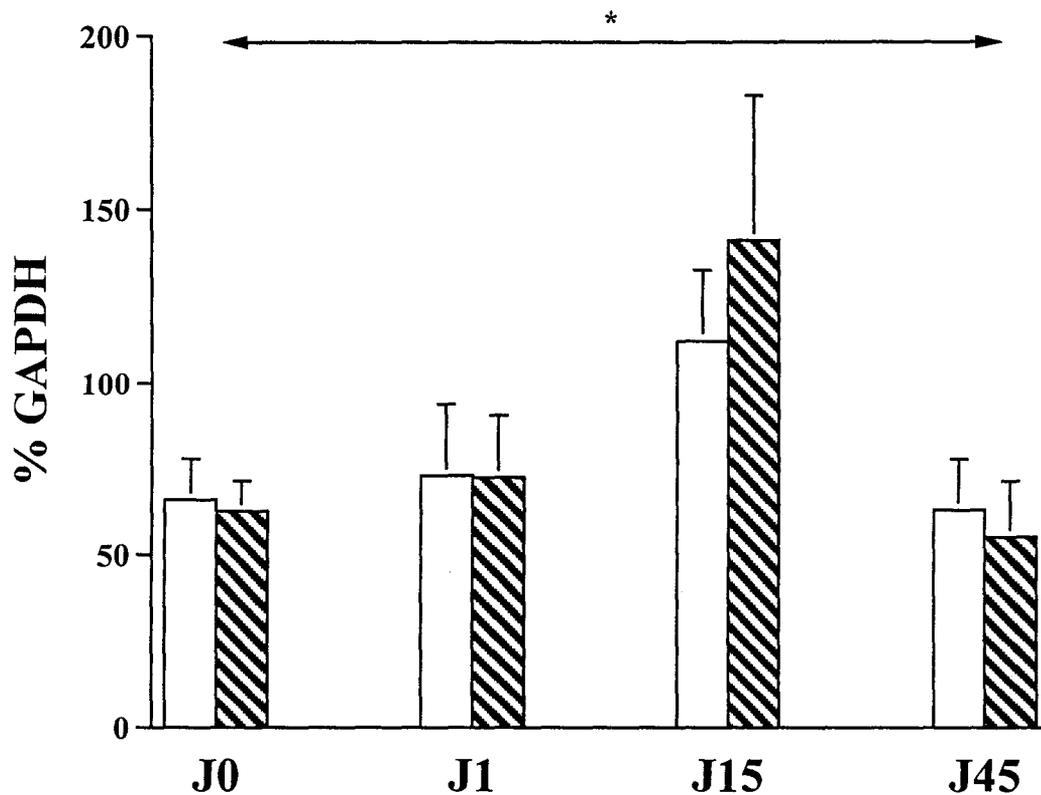
**Figure 2 : Modulation d'expression d'ARNm codant pour l'IL-13 par les cellules mononucléées (CMN) de sujets allergiques aux venins d'Hyménoptères au cours de l'ITS.**

Valeurs moyennes d'expression d'IL-13 par les CMN, soit après extraction immédiate de l'ARN (▨), soit après 24hr de culture avec le milieu seul (□). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique de la GAPDH (moyenne  $\pm$  SEM; n=9). Les différences entre les différents temps du rush ne sont pas statistiquement significatives.



**Figure 3 : Modulation d'expression du transcrit stérile (gε) codant pour l'IgE par les cellules mononucléées (CMN) de sujets allergiques aux venins d'Hyménoptères au cours de l'ITS.**

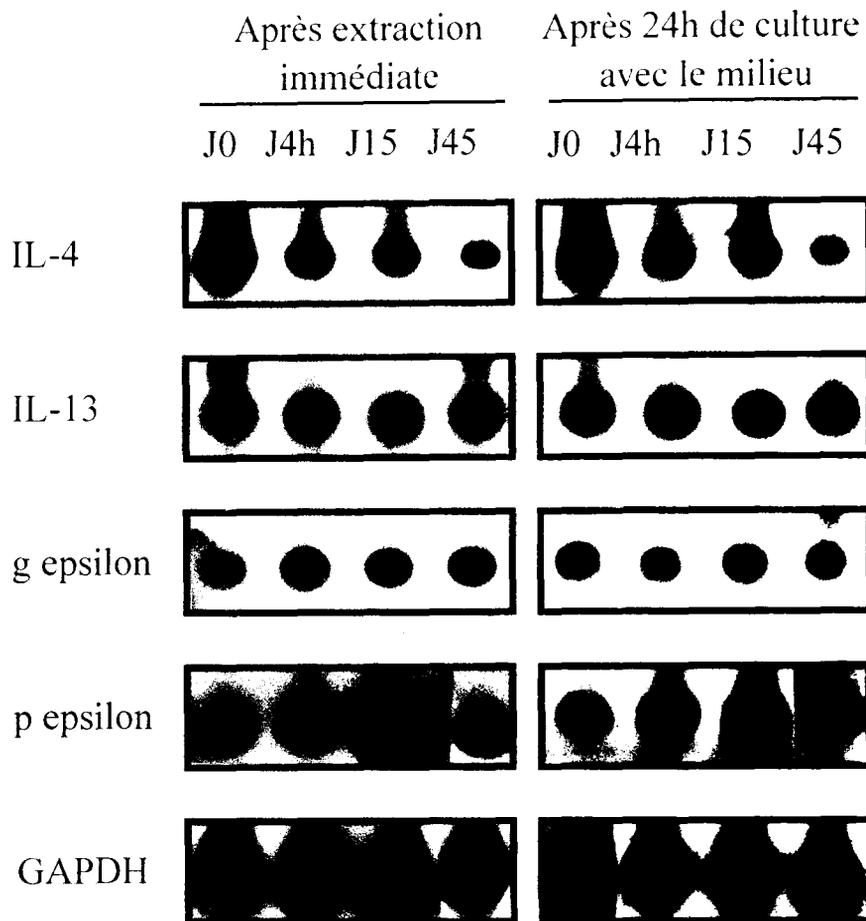
Valeurs moyennes d'expression de gε par les CMN, soit après extraction immédiate de l'ARN (▨), soit après 24hr de culture avec le milieu seul (□). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique de la GAPDH (moyenne ± SEM; n=9). Les variations entre les différents temps du rush ne sont pas statistiquement significatives.



**Figure 4 : Modulation d'expression du transcrit productif (pε) codant pour l'IgE par les cellules mononucléées (CMN) de sujets allergiques aux venins d'Hyménoptères au cours de l'ITS.**

Valeurs moyennes d'expression de pε par les CMN, soit après extraction immédiate de l'ARN (▨), soit après 24hr de culture avec le milieu seul (□). Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité optique de la GAPDH (moyenne ± SEM; n=9).

\* : la variation est significative entre les différents temps du rush (  $p \leq 0,05$  par analyse de variance unilatérale).



**Figure 5 : Expression des ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-13 ainsi que ceux codant pour les transcrits stérile (g $\epsilon$ ) et productif (p $\epsilon$ ) pour l'IgE, par les CMN de sujets allergiques aux venins d'Hyménoptères au cours de l'ITS.**

Les CMN ont été isolées à différents temps du rush (J0, J4h, J15 et J45). L'ARNm des CMN a été extrait soit immédiatement, soit après 24h de culture avec le milieu seul. Ensuite, l'ARNm a été rétrotranscrit et l'ADNc a été amplifié par la technique de RT-PCR semi-quantitative en présence d'un nucléotide marqué à la digoxygénine. Les produits amplifiés sont transférés sur membrane de nylon (Southern blot) et détectés au moyen d'un anticorps anti-digoxygénine marqué à la phosphatase alcaline. Les résultats sont analysés par densitométrie et exprimés en pourcentage de densité optique de la GAPDH.

***Discussion***

(Voir partie DISCUSSION / CONCLUSIONS)

***DISCUSSION***

**\*\*\*\***

***CONCLUSIONS***

En prenant comme modèle l'allergie aux venins d'hyménoptères (guêpe ou abeille), et en particulier l'immunothérapie spécifique (ITS) aux venins, trois axes de recherche ont été particulièrement développés afin de cerner les mécanismes immunologiques impliqués dans l'efficacité de ce traitement désensibilisant.

### **I- Profil de cytokines de type Th1 ou Th2 et prolifération lymphocytaire T spécifique d'allergène**

Dans le premier axe de recherche, notre étude visait à déterminer les conditions de régulation de la réponse immune, en quantifiant des cytokines produites par les lymphocytes T purifiés à partir du sang périphérique de sujets allergiques au venin d'hyménoptères avant et après désensibilisation. Nous avons choisi d'étudier les cellules T purifiées plutôt que les cellules mononucléées (CMN) parce que dans une étude antérieure, dans notre laboratoire, il a été démontré que les cellules T purifiées donnent de meilleurs résultats en terme de prolifération induite par le venin spécifique que les CMN [Ledru, 1988], et l'on sait que le nombre de cellules T spécifiques d'allergène est faible.

La réduction de la prolifération lymphocytaire T spécifique d'antigène au cours de l'ITS a été démontrée et confirmée dans plusieurs travaux [Gatien, 1975, Hiratani, 1981, Hsieh, 1984, Ledru, 1988]. Dans notre étude, la "tolérance" lymphocytaire T, observée très tôt après le début du traitement rush (à J15), correspond à la tolérance clinique obtenue par une IT de ce type. En effet, dès la fin du premier jour, les patients tolèrent de très fortes doses de venin montrant l'efficacité de ce type de protocole. Cette tolérance clinique est donc reflétée au niveau des cellules T qui ne réagissent plus à l'antigène spécifique tout au moins à la dose faible du venin qui a été utilisée. Le fait qu'une faible dose du venin est capable d'induire une prolifération lymphocytaire T pourrait être lié au fait qu'on a utilisé des lymphocytes T purifiés et à la présence d'un certain pourcentage de monocytes contaminants

comme CPA. Récemment, il a été démontré que les monocytes favorisent la prolifération cellulaire T spécifique d'allergène notamment quand il s'agit de faibles doses d'allergène [Secrist, 1995].

La tolérance périphérique consiste en un état physiologique acquis où le système immunitaire ne réagit pas vis-à-vis de l'organisme étranger. Différents mécanismes ont été mis en évidence, notamment la délétion clonale, l'anergie ou la suppression. *La délétion clonale* périphérique ou élimination physique des cellules T réactives peut être le résultat final d'une puissante réponse à l'Ag aboutissant à un processus de mort cellulaire, comme cela a été décrit après stimulation par les superantigènes [Mac Donald, 1991]. Dans le cas de l'ITS aux venins d'hyménoptères, l'on sait que si l'on arrête le traitement trop tôt, les réactions réapparaissent, laissant supposer que les cellules spécifiques d'Ag ne sont pas détruites. Par contre, ce mécanisme pourrait intervenir à long terme, en effet après plusieurs années d'ITS, dans ce modèle, on assiste à la négativation des tests cutanés et des RASTs. Quant à *l'anergie*, elle consiste en l'absence d'une réactivité des cellules T matures à l'Ag, due à des signaux inappropriés des cellules présentatrices d'Ag (CPA) non professionnelles. Ce mécanisme a été mis en évidence au niveau des clones T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'allergène tolérés *in vitro* par de fortes doses d'allergène [O'Hehir, 1991]. Lors de la stimulation antigène-spécifique des lymphocytes T, une absence de costimulation par des molécules accessoires comme le CD28 entraîne une anergie lymphocytaire. Or, il a été montré *in vitro* que la stimulation par de fortes doses de peptide d'acarien induit une abolition de la prolifération des clones T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'allergène qui est associée à une forte baisse de l'expression de CD28 [Lake, 1993]. Cet état d'anergie *in vitro* est théoriquement similaire à l'induction de l'absence de la réactivité des lymphocytes T par de fortes doses du venin injectées au cours du protocole rush. C'est pourquoi nous avons évalué l'expression du CD28 au cours de la désensibilisation accélérée. Nous avons observé une expression élevée de la population cellulaire T CD28<sup>+</sup> chez les patients allergiques aux venins d'hyménoptères mais nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de CD28 sur les T CD4<sup>+</sup> au cours de l'ITS. Les résultats obtenus peuvent avoir plusieurs explications :

\* Des études cinétiques ont montré que l'expression de CD28 à la surface des T CD4<sup>+</sup> activées diminue entre 12h et 24h après liaison de CD28 avec son ligand entraînant un état de non réponse au signal fourni par le CD28. Cette expression de CD28 retourne à l'état de base à 48h bien que les lymphocytes T restent aréactifs [Linsley, 1993]. Dans notre étude, l'expression de CD28 a été évaluée avant le début du traitement, juste à la fin des 3h30 du rush (à J4h), au premier rappel (à J15) et au deuxième rappel (à J45) et il est possible que nous ayons manqué des modifications à 24-48h.

\* Une autre explication concerne le modèle de costimulation de CD28, qui implique plusieurs molécules telles que le CTLA4 [Friccius, 1993] et leur ligands comme le CD86 (B7.2) et le CD80 (B7.1) qui peuvent être également impliquées dans la non réponse des cellules T à l'antigène spécifique. En effet, la présentation de l'antigène en absence de ces autres signaux costimulateurs induit également un état d'anergie des cellules T [Chen, 1994, Gimmi, 1991].

\* L'absence de variation dans l'expression de CD28 pourrait être également due au faible nombre de cellules T spécifiques d'allergène. Cependant, bien qu'ubiquitaire, une augmentation d'expression de CD28 est observée chez les patients allergiques aux venins d'hyménoptères, par rapport aux sujets contrôles, et de plus, dans notre précédente étude, nous avons pu mettre en évidence des modifications ne concernant que les cellules T spécifiques d'allergène dans une population totale [Akoum, 1996].

En ce qui concerne la sous-population lymphocytaire T CD8<sup>+</sup>, des études ont montré que les cellules CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> interviennent dans la suppression de la prolifération spécifique d'allergène des clones T humains [Li, 1990]. Dans notre étude, cette sous-population lymphocytaire est plus faible chez les allergiques non traités que chez les sujets contrôles non atopiques. Bien qu'une légère augmentation soit notée à J15, celle-ci n'était pas statistiquement significative. On peut conclure que l'anergie des lymphocytes T observée après ITS aux venins d'hyménoptères ne semble pas liée à une diminution d'expression de CD28.

Enfin, **la suppression des lymphocytes T** spécifiques de l'Ag est un mécanisme de tolérance périphérique qui a été déjà démontré dans plusieurs études au cours de l'ITS, notamment sur la prolifération lymphocytaire T spécifique d'Ag [Nagaya, 1985, Rocklin, 1980], sur la synthèse d'IgE [Tamir, 1987] et sur la réactivité plaquettaire [Tsicopoulos, 1990b]. Dans des résultats non publiés, nous avons mis en évidence que le facteur suppresseur de la réactivité plaquettaire pourrait être le TGF- $\beta$ 1. La présence de TGF- $\beta$ 1 a été recherchée dans les surnageants lymphocytaires T avant et après ITS aux venins, cependant, aucune différence significative n'a été montrée que ce soit au niveau protéique ou ARNm. Nous avons également évalué la production d'une autre cytokine potentiellement suppressive qu'est l'IL-10. Contrairement à ce que nous attendions, une diminution de production de cette cytokine est observée et uniquement à partir de J45 (résultats non montrés). En fait, la notion de suppression lymphocytaire T à long terme est probablement à replacer dans le contexte de la balance Th-1 / Th-2 qui se voit modifiée au cours de l'ITS.

Dans le contexte du profil de cytokines de type Th-1 et Th-2 produites par les lymphocytes T de sujets allergiques aux venins d'hyménoptères au cours de l'ITS, nous avons choisi l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  dont l'activité antagoniste en particulier au niveau de la synthèse d'IgE [Snapper, 1987], confère un rôle critique à l'équilibre des deux sous-populations Th-1 et Th-2. Ainsi, l'IL-4 exerce un effet inhibiteur sur la réponse Th-1 et l'IFN- $\gamma$  le même effet sur les Th-2 [Maggi, 1992, Swain, 1990]. Dans le cas d'ITS aux venins d'hyménoptères, les changements observés dans la production et l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 (diminution) et l'IFN- $\gamma$  (augmentation) ne sont pas concomitants à la non réponse proliférative des cellules T observée précocément après ITS, suggérant l'intervention d'autres mécanismes de façon précoce.

En ce qui concerne l'IL-4, dans notre étude, à J0, la stimulation des lymphocytes T de patients allergiques avec une faible dose de venin (1 ng/ml) induit une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 par rapport aux cellules non stimulées, ceci est en accord avec une autre étude déjà citée précédemment, où il a été

démontré que les faibles doses d'allergène sont plus efficaces que les fortes doses pour la synthèse et l'expression d'IL-4.

D'un autre côté, une expression d'ARNm n'équivaut pas forcément à une production de protéines. Dans un premier temps, nous avons dosé l'IL-4 dans les surnageants de culture de cellules T aux mêmes moments que l'ARNm, cependant, les résultats étaient difficilement interprétables à cause de la grande variabilité entre les patients et aux faibles niveaux d'IL-4 détectables (résultats non montrés). C'est pourquoi nous avons donc choisi d'utiliser une autre approche technique plus sensible : l'hybridation *in situ*. Il est à noter que Jutel et al ont confirmé la diminution protéique d'IL-4 après ITS au venin d'abeille et ceci dans un système d'amplification des cellules spécifiques d'allergène [Jutel, 1995b].

En ce qui concerne l'IFN- $\gamma$ , nous avons également dosé cette cytokine dans les surnageants de culture de cellules T purifiées, et les résultats obtenus étaient similaires à ceux observés en terme d'ARNm codant pour l'IFN- $\gamma$ . L'augmentation d'expression spontanée de cette cytokine à partir de trois mois après rush (à J90) et non à J15, à des niveaux similaires à ceux des sujets contrôles, est également observée à partir de J45 après le rush. Ces résultats suggèrent que les sujets allergiques n'expriment pas l'IFN- $\gamma$  à l'état de base, ceci a été également reporté dans d'autres études chez des sujets atopiques [Jujo, 1992, Reinhold, 1990, Rousset, 1991b]. La modification de la production et de l'expression d'IFN- $\gamma$  est relativement tardive et dissociée de l'absence de réponse proliférative des lymphocytes T au venin observée à J15 du rush, suggérant que l'IFN- $\gamma$  n'est pas impliqué dans la tolérance initiale induite par le rush mais n'exclut pas l'intervention plus précoce d'autres cytokines telle que l'IL-12 qui stimule la production d'IFN- $\gamma$  et inhibe la génération de la réponse Th-2 [Manetti, 1993]. En effet, dans notre étude, nous avons évalué la production d'IL-12 par les lymphocytes T (résultats non montrés). L'IL-12 n'a pas été retrouvée au niveau de ces surnageants de lymphocytes T sauf quand il persistait une contamination monocyttaire, ce qui est en accord avec la littérature car l'on sait maintenant que l'IL-12 n'est pas produite par les lymphocytes T. La production d'IFN- $\gamma$  est sous la dépendance directe de l'IL-12 et ceci pourrait expliquer l'absence de production d'IFN- $\gamma$  après stimulation par le venin spécifique

dans une population cellulaire ne comportant que les lymphocytes T. De plus, ceci peut être expliqué par le fait que nous avons utilisé une faible dose de venin (1ng/ml), et il a été montré que la stimulation de clones T spécifiques par de doses faibles de venin entraîne une production d'IL-4 mais pas d'IFN- $\gamma$ , alors que la stimulation par de fortes doses induit la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  [Carballido, 1992].

Par contre, la production spontanée d'IFN- $\gamma$  reflète l'activation *in vivo* des CMN et probablement la production d'IL-12 au cours de la désensibilisation. Dans une étude récente, une augmentation d'expression d'ARNm codant pour l'IL-12 au niveau des biopsies cutanées obtenues chez des sujets allergiques aux pollens 4 ans après ITS a été rapportée [Hamid, 1997].

Dans notre étude, l'origine exacte de production de ces cytokines n'a pas été déterminée. Nous avons utilisé les cellules T totales sans séparation en T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> et il est connu que l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  peuvent être produites par les deux sous-populations cellulaires [Bendelac, 1991, Taguchi, 1990] ainsi que par les cellules NK. En effet, comme on l'a déjà dit précédemment, les cellules CD8<sup>+</sup> ont été impliquées dans l'ITS. De plus, dans une étude déjà citée précédemment [Secrist, 1993], après ITS, les surnageants de lymphocytes T déplétés en CD8<sup>+</sup>, ne présentent pas de changement du taux d'IFN- $\gamma$ , alors que dans l'étude réalisée au niveau tissulaire [Varney, 1993], a été retrouvée une augmentation de l'ARNm pour l'IFN- $\gamma$  ainsi qu'une augmentation du nombre des T CD8<sup>+</sup>. Cependant, une autre étude très récente a montré que dans la désensibilisation accélérée aux acariens, il y a une augmentation de la fréquence de cellules T CD4<sup>+</sup> produisant l'IFN- $\gamma$  tandis que la fréquence des cellules T CD8<sup>+</sup> produisant l'IFN- $\gamma$  ne change pas avant et après rush [Lack, 1997]. Il est cependant à noter que le rapport CD4<sup>+</sup> : CD8<sup>+</sup> diminue au cours du rush traduisant une augmentation du nombre de T CD8<sup>+</sup>.

Les résultats obtenus dans notre étude, concernant les deux cytokines (IL-4 et IFN- $\gamma$ ) ont été également rapportés dans d'autres travaux sur l'ITS aux venins d'hyménoptères [Bellinghausen, 1997, Jutel, 1995b, McHugh, 1995].

*Cependant ces modifications tardives n'expliquent pas la tolérance clinique très précoce qui est observée lors de ces désensibilisations accélérées, puisque celle-ci est acquise dès la fin des 3h30 de rush. Nous nous sommes alors intéressés à d'autres mécanismes pouvant éventuellement intervenir de façon plus précoce au niveau des cellules effectrices déclenchant les réactions anaphylactiques.*

## II- Modifications précoces des chimiokines au cours de l'ITS

La tolérance clinique observée à la fin des 3h 30 du traitement rush ne peut être expliquée par des phénomènes de régulation lymphocytaire qui prennent du temps à s'établir mais doit plutôt être liée à des mécanismes de type pharmacologique empêchant les cellules effectrices de libérer leurs médiateurs anaphylactogènes. Le mastocyte et le basophile représentent une cible de choix. Donc, dans le deuxième axe de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des modifications de production et d'expression de chimiokines histamino-régulatrices telles l'IL-8, le MCP-1 et le RANTES par les CMN de sujets allergiques aux venins d'hyménoptères au cours de l'ITS.

Nous avons observé que pour l'IL-8 et le MCP-1, alors qu'il existe une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-8 et une expression constitutive de celui codant pour le MCP-1; au niveau protéique, une diminution est observée tout au long de l'ITS jusqu'à J45. Par contre, pour le RANTES, une augmentation du RANTES en protéine et en ARNm est observée dès J4h, qui diminue ensuite à J15 et J45 du rush.

En ce qui concerne le *MCP-1*, l'étude cinétique montre une production maximale à 48hr alors que le temps choisi dans notre étude est 24hr comme celui des autres chimiokines (IL-8 et RANTES). L'absence de modulation observée à 24hr pourrait être liée à une production plus tardive de MCP-1. Cependant, ces résultats suggèrent que le MCP-1 n'est pas impliqué dans la tolérance rapide observée juste à la fin des 3h30 du rush. La diminution de production de MCP-1 a été également observée dans une autre étude chez des enfants asthmatiques, ceci après 2 ans d'ITS [Hsieh, 1996].

Pour *l'IL-8*, un mécanisme de régulation post-transcriptionnel pourrait expliquer la différence entre la protéine et l'ARNm au cours de l'ITS. Des résultats similaires ont été retrouvés au niveau des clones T spécifiques d'allergène en état d'anergie [O'hehir, 1996]. A l'inverse, Hsieh et al ont reporté récemment que l'immunothérapie induit une augmentation de production d'IL-8 par les CMN chez des enfants asthmatiques [Hsieh, 1996]. La différence avec nos résultats pourrait être due à la durée et aux protocoles d'ITS utilisés (45 jours après protocole ultrarush dans la notre et 2 ans d'IT conventionnelle dans l'autre). Une autre

explication de l'absence de détection d'IL-8 dans les surnageants de culture pourrait être liée aux récepteurs d'IL-8 au niveau des CMN comme il a été décrit par Marie et al en cas de septicémie [Marie, 1997].

Le résultat essentiel de ce travail concerne les modulations de production et d'expression de **RANTES** aux temps précoces de l'ITS. Une augmentation est observée à **J4h** correspondant en fait à J28hr (4h de rush + 24h de culture). Les mêmes résultats ont été obtenus en condition d'extraction immédiate des ARNm à partir des CMN, ce qui suggère que les changements observés ne sont pas liés aux conditions de culture des CMN.

De façon surprenante, l'augmentation précoce de RANTES n'a pas été associée à des effets cliniques secondaires, comme aurait pû le laisser supposer son activité histaminolibératrice. A J45, une diminution de RANTES est observée, ceci en accord avec l'étude récente de Hsieh et al [Hsieh, 1996].

***En conclusion,** cette diminution générale des chimiokines à J45 pourrait contribuer à expliquer l'efficacité clinique de l'ITS bien que les mécanismes induisant la tolérance clinique précoce au cours du rush restent toujours non élucidés. Dans la poursuite de ces travaux, suite aux résultats obtenus pour le RANTES, nous avons voulu évaluer l'effet au cours du rush, de chimiokines histaminolibératrices sur les basophiles, cellules potentiellement impliquées dans la phase précoce des manifestations allergiques.*

En effet, les basophiles sont, dans ce type de réaction systémique, stimulés immédiatement par l'intermédiaire de leur récepteur de haute affinité pour l'IgE (FcεRI). Une inhibition fonctionnelle de ces cellules pourrait expliquer la tolérance observée dans les premières heures du rush. Nous nous sommes intéressés à certaines chimiokines (RANTES, MCP-1 et MCP-3) qui sont de puissants histaminolibérateurs, mais aussi des inhibiteurs de cette libération par des phénomènes de cross- ou d'auto-désensibilisation des récepteurs pour ces chimiokines.

Dans cette étude, nous avons démontré qu'à la fin d'une désensibilisation au venin sur 3h 30 (à J4h), certaines chimiokines telles le RANTES et à un moindre degré le MCP-3 ne sont plus capables d'induire une histaminolibération par les leucocytes enrichis en basophiles chez des sujets allergiques aux venins, ceci contrairement au MCP-1. Si on se réfère aux travaux qui ont étudié les phénomènes de désensibilisation des récepteurs basophiliques pour les chimiokines [Alam, 1992, Baggiolini, 1994, Dahinden, 1994, Kuna, 1995], ces résultats suggèrent pour le RANTES et pour les MCP-3, une désensibilisation homologue possible des leucocytes enrichis en basophiles par ces chimiokines elles-mêmes. Cela nécessiterait donc une libération précoce de ces chimiokines, par exemple sous forme préformée. Ceci est le cas pour le RANTES au niveau des plaquettes et pour le MCP-3 stocké dans certains types cellulaires tels les mastocytes [Kulmburg, 1992] et les plaquettes [Power, 1995]. Pour le MCP-1, aucune désensibilisation des basophiles n'a été observée au cours du rush, ce qui est contradictoire par rapport à la littérature (si l'on considère qu'il y a une libération de RANTES) où il a été démontré qu'en terme de libération d'histamine, le RANTES désensibilise les basophiles vis-à-vis du MCP-1 [Alam, 1992, Kuna, 1995]. Par contre, en terme de flux calcique intracellulaire, cet effet n'est pas observé [Baggiolini, 1994, Bischoff, 1993].

Nos résultats suggèrent une désensibilisation des récepteurs de chimiokines au cours de la désensibilisation et il serait intéressant d'évaluer leur expression à la surface cellulaire au cours du rush.

L'étape suivante était de démontrer qu'il y avait bien un relargage précoce de RANTES au cours du rush. Nous avons donc dosé cette chimiokine dans des surnageants de sang total. Chez des sujets allergiques avant désensibilisation, on observe une libération rapide de RANTES immédiatement après stimulation allergénique. Par contre, après rush (J4h), la stimulation par le venin n'entraîne plus de surproduction de RANTES. Deux candidats potentiels sont capables de libérer des médiateurs préformés, ce sont le basophile et la plaquette (connue comme une source de RANTES). La production de RANTES par les basophiles n'est pas décrite. Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons étudié la lignée basophilique humaine KU812 après stimulation IgE-dépendante. Une faible production de RANTES est obtenue mais seulement après 24h de stimulation alors que des plaquettes

purifiées et stimulées dans les mêmes conditions en produisent beaucoup et ce dès 30 min. En outre, le profil de libération d'histamine par les basophiles est différent de celui du RANTES dans le sang total. Il est à noter que, bien que la quantité absolue d'histamine libérée par les basophiles soit diminuée après ITS aux venins d'hyménoptères, la réactivité IgE-dépendante des basophiles n'est pas réduite. En accord avec une autre observation [Jutel, 1996], ces résultats indiquent que l'ITS n'affecte pas précocement la réactivité des basophiles dépendante de l'IgE.

*Donc, on peut imaginer que la désensibilisation accélérée induirait (peut-être de façon dose-dépendante) un relargage progressif de RANTES par les plaquettes, qui désensibiliserait les basophiles au RANTES, ce qui pourrait empêcher le relargage d'histamine induit par la production plus tardive de RANTES par les CMN.*

*En conclusion, l'induction de la tolérance clinique rapide et précoce au cours du rush pourrait être en partie liée au changement de la réactivité des basophiles dépendante des chimiokines.*

### III- Régulation de la synthèse d'IgE au cours de l'ITS

Dans le troisième axe de notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de la régulation de la synthèse d'IgE chez les sujets allergiques au cours de l'ITS aux venins d'hyménoptères. En raison de l'augmentation des IgE sériques spécifiques observée au premier rappel après rush (à J15), qui ne diminue qu'à partir du deuxième rappel (à J45) après désensibilisation, nous avons suivi au cours de l'ITS l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-13 qui sont fortement impliquées dans la synthèse d'IgE [Vercelli, 1989a, Vercelli, 1989c, Zurawski, 1994] ainsi que celle d'ARNm stérile (gε) et productif (pε) pour l'IgE, ceci à différents temps du rush (à J0, J1 J15 et J45) pour essayer de comprendre la raison de cette augmentation des IgE spécifiques à J15.

Nous avons observé le même profil de diminution d'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 que celui observé dans la première étude au niveau des cellules T. Ces résultats suggèrent que l'IL-4 n'est pas impliquée dans l'augmentation des IgE sériques à J15.

D'un autre côté, pour l'IL-13, la production et l'expression d'ARNm pour l'IL-13 par les CMN est identique à tous les temps du rush suggérant que l'IL-13 n'est pas responsable de l'augmentation des IgE à J15.

Dans un modèle murin *in vivo*, il a été rapporté que dans une réponse primaire, l'induction d'IL-4 et de gε sont nécessaires à la production d'IgE, alors que dans une réponse secondaire, la synthèse d'IgE peut être induite directement au niveau de pε [Thyphronitis, 1993]. Dans notre modèle du rush vis-à-vis du venin d'hyménoptères, on est dans le cadre d'une réponse secondaire, cependant, chez l'homme, *in vivo*, on ne sait pas si l'induction d'une réponse IgE secondaire passe ou non par l'induction d'un switch.

Dans notre étude, une augmentation significative du pε est observée à J15 du rush corroborant l'augmentation des IgE spécifiques (même faible) observée au même moment. Par contre, en ce qui concerne l'expression de gε pour l'IgE, on n'a pas observé de variations aux moments des prélèvements suggérant que l'augmentation des IgE au cours du traitement est

liée à une production de cellules  $B\epsilon^+$  préexistantes plutôt qu'à l'induction d'un switch induit par le processus de désensibilisation.

Cependant, nos résultats nécessitent d'être discutés en terme de cinétique. Notre étude a été effectuée à 4 heures puis 15 jours et 45 jours après rush, donc il serait possible que les modifications du g $\epsilon$ , s'il y en a, aient eu lieu entre la fin du rush et le premier rappel. Des expériences supplémentaires réalisées quelques jours après le rush sont à mettre en œuvre afin d'éclaircir ces points.

D'autre part, dans notre deuxième axe de recherche (voir RESULTAT III), nous avons rapporté une augmentation de RANTES par les CMN juste à la fin des 3h 30 du rush. Récemment, il vient d'être démontré que le RANTES est capable d'amplifier la synthèse d'IgE de cellules  $B\epsilon^+$  (ayant déjà switché) de sujets atopiques. Cinétiquement, l'augmentation de RANTES dès le premier jour du rush pourrait correspondre à l'augmentation des IgE spécifiques à J15. Des expériences de neutralisation sont nécessaires pour déterminer le rôle exact du RANTES dans cette production d'IgE.

***En conclusion, l'IL-4 et l'IL-13 ne semblent pas impliquées dans l'augmentation des IgE spécifiques du venin observée précocément après ITS selon la procédure accélérée. Les observations actuelles rapportées dans notre étude nécessitent d'être approfondies pour permettre de dégager une conclusion définitive quant à l'induction ou non d'un switch vers l'IgE.***

*Ainsi, les résultats de ce travail nous ont permis d'appréhender certains mécanismes pouvant potentiellement être impliqués dans l'efficacité de la désensibilisation spécifique au venin d'hyménoptères.*

*Bien que l'hypothèse Th-1 / Th-2 soit séduisante pour expliquer les modifications immunologiques induites par la désensibilisation, des études restent nécessaires pour les associer à l'efficacité clinique. Si cette corrélation est établie dans le futur, elle pourrait rendre compte de l'amélioration à long terme. Cette amélioration à long terme est aussi à mettre en relation avec l'installation d'une tolérance immunologique générale reflétée au niveau de la baisse générale d'un certain nombre de médiateurs dont les chimiokines. En ce qui concerne la tolérance clinique très précoce observée dans les protocoles de désensibilisation, notre étude apporte un premier élément de réponse en suggérant un mécanisme pharmacologique de désensibilisation des récepteurs aux chimiokines sur les basophiles notamment par la libération de RANTES. Cette augmentation de RANTES pourrait peut-être également expliquer d'autres phénomènes restés jusque là obscurs, telle l'augmentation précoce des IgE spécifiques au cours de la désensibilisation spécifique.*

***PERSPECTIVES***

Bien qu'utilisée depuis des dizaines d'années, la désensibilisation ne commence à être mieux comprise sur le plan mécanistique que depuis peu de temps. Les travaux menés au cours de cette thèse ont eu pour but d'explorer de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'efficacité de la désensibilisation accélérée de type rush chez des sujets allergiques aux venins d'hyménoptères.

En perspective, nous envisageons de répondre à certaines questions soulevées par l'analyse des résultats précédents dans chacun des différents axes.

### **I- Le profil de cytokines Th-1 / Th-2 au cours de l'ITS aux venins d'hyménoptères : Implication des Facteurs de transcription (STAT4 et STAT6)**

Nous avons montré précédemment que lors de l'ITS aux venins d'hyménoptères, il y avait une inversion de la polarisation Th-2 habituellement observée dans les réactions allergiques vers un profil de type Th-1. Nous avons observé une diminution de l'expression d'IL-4, alors qu'à l'inverse on assiste à une augmentation de l'expression et de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T périphériques de patients traités par désensibilisation accélérée [Akoum, 1996].

De nombreuses fonctions cellulaires sont régulées par la signalisation cellulaire induite par les cytokines par l'intermédiaire de leurs récepteurs. Ces récepteurs sont associés avec les Janus kinases (JAKs) qui permettent la phosphorylation de protéines particulières recrutées au niveau du complexe associé au récepteur. En particulier les STATs (signaux transducteurs et activateurs de la transcription) représentent une famille particulière de facteurs de transcription qui contribuent à la diversité des réponses aux cytokines [Ihle, 1995]. En réponse aux cytokines, il y a souvent une certaine spécificité de l'activation des STATs. Ainsi au niveau du lymphocyte, l'IL-4 active STAT 6 alors que l'IL-12 active STAT 4. Cette

spécificité de fonction a été récemment mise en évidence grâce aux souris knockout Stat 4 et Stat 6 qui ont montré l'impossibilité d'induction d'une réponse de type Th-1 pour les Stat 4<sup>-/-</sup> [Kaplan, 1996a, Thierfelder, 1996] et d'une réponse Th-2 pour les Stat 6<sup>-/-</sup> [Kaplan, 1996b, Shimoda, 1996, Takeda, 1996].

Afin d'évaluer l'éventuelle implication de STAT 4 et STAT 6 dans les modifications de polarisation Th-1 / Th-2 observée au cours de l'ITS, nous allons étudier leur activation cinétiquement au niveau de cellules mononucléées (CMN) avant et après ITS aux venins d'hyménoptères.

Trois approches seront utilisées, d'abord la mise en évidence de la présence de ces deux facteurs de transcription sera évaluée par **Western blot** sur des extraits nucléaires et cytoplasmiques, grâce à des Ac anti-STAT 6 et anti-STAT 4 (disponibles commercialement). D'autre part la mise en évidence de leur activation sera effectuée par **retardement sur gel** (EMSA) sur des extraits nucléaires en utilisant des sondes oligonucléotidiques correspondant aux séquences GAS reconnues par les STATs. La spécificité d'interaction sera vérifiée en utilisant des compétiteurs et des Ac anti-STAT. Enfin l'expression de l'ARNm pour STAT 6 sera évaluée par RT-PCR semi-quantitative.

*La spécificité de ces STATs in vivo et la démonstration de leur éventuelle implication dans les modifications induites par l'ITS pourraient conduire à envisager leur utilisation thérapeutique (anti-STAT 6) dans les manifestations allergiques dépendantes de l'IL-4.*

## **II- Modifications précoces de la production et de l'expression des chimiokines :**

Afin de confirmer la désensibilisation des récepteurs basophiliques au RANTES au cours du rush, nous envisageons :

1- d'étudier l'expression du récepteur pour le RANTES à la surface des leucocytes enrichis en basophiles au cours du rush. Etant donné que les Ac anti-récepteurs spécifiques des chimiokines ne sont pas encore commercialisés et que l'on sait que le RANTES se fixe sur plusieurs récepteurs différents, nous envisageons d'utiliser une technique de "**Binding**" en marquant le RANTES à la biotine. La fixation de RANTES marqué sera évaluée par **FACS** (Fluorescence-activated cell sorter). Des doubles marquages avec des Ac spécifiques de basophiles (Ac anti-récepteur d'IgE) et de lymphocytes T (Ac anti-CD3) et de lymphocytes B (Ac anti-CD19) seront effectués afin d'identifier les populations cellulaires modifiées.

2- d'affiner sur le plan mécanistique, la désensibilisation précoce des basophiles par le RANTES au cours du rush. La désensibilisation basophilique sera évaluée en analysant le flux calcique intracellulaire avant et juste après ITS accélérée. Pour cela, des basophiles purifiés à partir de sujets allergiques aux venins d'hyménoptères vont être recrutés avant et juste à la fin des 3h 30 du rush. L'approche technique utilisable consiste en l'utilisation d'une **sonde fura-2 fluorescente**. Le taux du calcium sera déduit de l'intensité de la fluorescence obtenue.

3- d'évaluer l'effet de RANTES sur d'autres populations cellulaires exprimant un récepteur pour cette chimiokine et prélevées avant et après rush, telles les monocytes, les lymphocytes T et les éosinophiles. En effet, l'on sait que les récepteurs pour le RANTES sont exprimés non seulement sur les basophiles, mais également sur les éosinophiles, les monocytes et les lymphocytes T. La désensibilisation par le récepteur du RANTES a été décrite au niveau des monocytes conduisant à une inhibition de la réponse chimioattractante vis-à-vis du RANTES lui-même [Wang, 1993] et au niveau des éosinophiles conduisant à une inhibition du flux calcique, avec une désensibilisation croisée entre le RANTES et le MCP-3 [Dahinden, 1994]. Au niveau des lymphocytes T, le phénomène de désensibilisation homologue n'a pas été décrit jusqu'à maintenant, cependant, le RANTES active rapidement ces cellules par deux voies de signalisation différentes, l'une entraînant la chimiotaxie, l'autre la

libération des cytokines (IL-2, IL-5) et la prolifération cellulaire [Bacon, 1995]. L'étude de l'effet du rush sur le recrutement et l'activation d'autres cellules induits par le RANTES, et exprimant ce récepteur à leur surface serait intéressant dans le cadre des mécanismes précoces intervenant dans la désensibilisation accélérée. Donc, nous envisageons d'étudier l'effet du RANTES sur la réponse chimioattractante des monocytes de sujets allergiques aux venins d'hyménoptères avant et après désensibilisation spécifique accélérée, son effet sera évalué également sur les éosinophiles en analysant le flux calcique intracellulaire avant et juste après ITS chez les mêmes patients. En ce qui concerne les lymphocytes T, nous envisageons d'étudier l'effet du RANTES en analysant la production de cytokines telles que l'IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  et l'IL-5 ainsi que la prolifération cellulaire, et ceci avant et après rush.

*Enfin, l'ensemble de ces expériences pourraient également être étendues au MCP-3 au vu des résultats observés. Sa présence au sein des mastocytes et des plaquettes rend hautement probable sa possible implication dans les phénomènes précoces de l'ITS.*

### **III- Régulation de la synthèse d'IgE au cours de l'ITS**

En étudiant la régulation de la synthèse d'IgE au cours du rush, nous avons observé une augmentation des IgE spécifiques du venin au premier rappel (à J15) après rush, et nous n'avons observé aucune variation d'IL-4 ou d'IL-13 pouvant expliquer cette augmentation.

1- Compléter les expériences concernant le g $\epsilon$  avec un temps situé entre J0 et J15 pour conclure définitivement sur l'existence ou non d'un switch *in vivo*, ce qui semble cependant peu probable étant donné l'absence de variation de l'IL-4.

2- L'augmentation de RANTES par les CMN observée à J4h du rush pourrait expliquer l'augmentation précoce des IgE spécifiques à J15. En effet, cette chimiokine a été récemment décrite comme capable *in vitro* d'amplifier directement la synthèse d'IgE de cellules

Be<sup>+</sup> de sujets atopiques, sans autre costimulant mais pas de cellules B n'ayant pas encore switché vers l'IgE [Kimata, 1996]. Sur le plan expérimental, nous envisageons de vérifier cette hypothèse par utilisation d'anticorps neutralisants anti-RANTES dans un système de synthèse d'IgE spécifiques *in vitro* par des cellules B purifiées et prélevées chez des sujets allergiques aux venins d'hyménoptères avant et juste après les 3h 30 du rush. Les cellules B seront purifiées par déplétion positive selon la procédure MACS et stimulées dans un système IL-4 / anti-CD40. Les dosages des IgE spécifiques seront effectués par ELISA.

A titre de contrôle, l'effet d'Ac neutralisants anti-IL-13 et anti-IL-4 dans le système de synthèse d'IgE sera également appréhendé.

*Ces travaux permettront de mieux appréhender les mécanismes impliqués dans l'établissement de la tolérance allergénique, et à plus long terme de proposer d'autres solutions thérapeutiques mais dénuées d'effets secondaires dans les maladies allergiques.*

***REFERENCES***  
***BIBLIOGRAPHIQUES***

- Aalberse, R. C., van der Gaag, R. and van Leeuwen, J.** Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. 1983. *J Immunol* 130:722.
- Abehsira Amar, O., Gibert, M., Jolij, M., Theze, J. and Jankovic, D. L.** IL-4 plays a dominant role in the differential development of Th0 into Th1 and Th2 cells. 1992. *J Immunol* 148:3820.
- Abrecht, I., Eichler, G., Muller, U. and Hoigne, R.** On the significance of severe local reactions to Hymenoptera stings. 1980. *Clin Allergy* 10:675.
- Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer Fogy, I. and Busslinger, M.** Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. 1992. *Genes Dev* 6:1589.
- Adema, G., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., Bacon, K. and Figdor, C.** A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. 1997. *Nature* 387:713.
- Ahuja, S. K., Gao, J. L. and Murphy, P. M.** Chemokine receptors and molecular mimicry. 1994. *Immunol Today* 15:281.
- Akdis, C. A., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S. S., Muller, U. and Blaser, K.** Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. 1996. *J Clin Invest* 98:1676.
- Akoum, H., Tsicopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B., Dessaint, J. P., Joseph, M., Hamid, Q. and Tonnel, A. B.** Venom immunotherapy modulates Interleukin-4 and Interferon- $\gamma$  messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. 1996. *Immunology* 87:593.
- Alam, R., Forsythe, P., Stafford, S., Heinrich, J., Bravo, R., Proost, P. and Van Damme, J.** Monocyte chemotactic protein-2, monocyte chemotactic protein-3, and fibroblast-induced cytokine. Three new chemokines induce chemotaxis and activation of basophils. 1994. *J Immunol* 153:3155.
- Alam, R., Forsythe, P. A., Lett, B. M. and Grant, J. A.** Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. 1992. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:427.
- Alam, R., Stafford, S., Forsythe, P., Harrison, R., Faubion, D., Lett, B. M. and Grant, J. A.** RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. 1993. *J Immunol* 150:3442.
- Alam, R., York, J., Boyars, M., Stafford, S., Grant, J. A., Lee, J., Forsythe, P., Sim, T. and Ida, N.** Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1 $\alpha$  in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. 1996. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1398.
- Annunziato, F., Manetti, R., Tomasevic, I., Guidizi, M. G., Biagiotti, R., Gianni, V., Germano, P., Mavilia, C., Maggi, E. and Romagnani, S.** Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4<sup>+</sup> T cells are associated with IFN- $\gamma$  production. 1996. *Faseb J* 10:769.
- Armerding, D. and Hren, A.** Phorbol ester, prostaglandin E2, forskolin and okadaic acid differentially modulate interleukin-4-versus interleukin-2-dependent immunoglobulin induction in human cellular models, in contrast to other selected modifiers of cellular activation. 1993a. *Int Arch Allergy Immunol* 101:143.
- Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Davis Smith, T., Maliszewski, C. R. and et al.** Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. 1992. *Nature* 357:80.
- Armitage, R. J., Goff, L. K. and Beverley, P. C.** Expression and functional role of CD23 on T cells. 1989. *Eur J Immunol* 19:31.
- Arnoux, B., Jouvin Marche, E., Arnoux, A. and Benveniste, J.** Release of PAF-acether from human blood monocytes. 1982. *Agents Actions* 12:713.
- Arock, M., Merle Beral, H., Dugas, B., Ouaz, F., Le Goff, L., Vouldoukis, I., Mencia Huerta, J. M., Schmitt, C., Leblond Missenard, V., Debre, P. and et al.** IL-4 release by human leukemic and activated normal basophils. 1993. *J Immunol* 151:1441.
- Aubry, J. P., Pochon, S., Graber, P., Jansen, K. U. and Bonnefoy, J. Y.** CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. 1992. *Nature* 358:505.

- Aubry, J. P., Shields, J. G., Jansen, K. U. and Bonnefoy, J. Y. A multiparameter flow cytometric method to study surface molecules involved in interactions between subpopulations of cells. 1993. *J Immunol Methods* 159:161.
- Aversa, G., Punnonen, J., Cocks, B. G., de Waal Malefyt, R., Vega, F., Jr., Zurawski, S. M., Zurawski, G. and de Vries, J. E. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. 1993. *J Exp Med* 178:2213.
- Azzawi, M., Bradley, B., Jeffery, P. K., Frew, A. J., Wardlaw, A. J., Knowles, G., Assoufi, B., Collins, J. V., Durham, S. and Kay, A. B. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. 1990. *Am Rev Respir Dis* 142:1407.
- Bacon, C., Petricoin, E., Ortaldo, J., Rees, R., Lerner, A., Johnston, J. and O'Shea, J. Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. 1995a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7307.
- Bacon, K., Gauchat, J. F., Aubry, J. P., Pochon, S., Graber, P., Henchoz, S. and Bonnefoy, J. Y. CD21 expressed on basophilic cells is involved in histamine release triggered by CD23 and anti-CD21 antibodies. 1993. *Eur J Immunol* 23:2721.
- Bacon, K. B., Flores Romo, L., Aubry, J. P., Wells, T. N. and Power, C. A. Interleukin-8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers. 1994. *Immunology* 82:473.
- Bacon, K. B., Premack, B. A., Gardner, P. and Schall, T. J. Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. 1995. *Science* 269:1727.
- Baggiolini, M. and Clark Lewis, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. 1992. *FEBS Lett* 307:97.
- Baggiolini, M. and Dahinden, C. A. CC chemokines in allergic inflammation. 1994. *Immunol Today* 15:127.
- Badolato, R., Ponzi, A., Millesimo, M., Notarangelo, L. and Musso, T. Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. 1997. *Blood* 90:2804.
- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., Liu, Y. J., Rousset, F. and Saeland, S. The CD40 antigen and its ligand. 1994. *Annu Rev Immunol* 12:881.
- Banchereau, J. and Rousset, F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation, and differentiation. 1992. *Adv Immunol* 52:125.
- Bass, D. A. The functions of eosinophils [editorial]. 1979. *Ann Intern Med* 91:120.
- Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A. and Schall, T. J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. 1997. *Nature* 385: 640.
- Beck, L., Stellato, C., Beall, L., Schall, T., Leopold, D., Bickel, C., Baroody, F., Bochner, B. and Schleimer, R. Detection of the chemokine RANTES and endothelial adhesion molecules in nasal polyps. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 98:766.
- Beil, W. J., Weller, P. F., Tzizik, D. M., Galli, S. J. and Dvorak, A. M. Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor-alpha to the matrix compartment of eosinophil secondary granules in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. 1993. *J Histochem Cytochem* 41:1611.
- Bellinghausen, I., Metz, G., Enk, A. H., Christmann, S., Knop, J. and Saloga, J. Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. 1997. *Eur J Immunol* 27:1131.
- Bendelac, A. and Schwartz, R. CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. 1991. *Nature* 353:68.
- Bentley, A. M., Meng, Q., Robinson, D. S., Hamid, Q., Kay, A. B. and Durham, S. R. Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. 1993. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:35.

- Bentley, A. M., Menz, G., Storz, C., Robinson, D. S., Bradley, B., Jeffery, P. K., Durham, S. R. and Kay, A. B. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. 1992. *Am Rev Respir Dis* 146:500.
- Bernstein, D. I., Mittman, R. J., Kagen, S. L., Korbee, L., Enrione, M. and Bernstein, I. L. Clinical and immunologic studies of rapid venom immunotherapy in Hymenoptera-sensitive patients. 1989. *J Allergy Clin Immunol* 84:951.
- Bieber, T. IgE-binding molecules on human Langerhans cells. 1992b. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 176:54.
- Bieber, T. Fc epsilon RI on human Langerhans cells: a receptor in search of new functions. 1994. *Immunol Today* 15:52.
- Bieber, T., de la Salle, H., Wollenberg, A., Hakimi, J., Chizzonite, R., Ring, J., Hanau, D. and de la Salle, C. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). 1992a. *J Exp Med* 175:1285.
- Bieber, T., Rieger, A., Neuchrist, C., Prinz, J. C., Rieber, E. P., Boltz Nitulescu, G., Scheiner, O., Kraft, D., Ring, J. and Stingl, G. Induction of Fc epsilon R2/CD23 on human epidermal Langerhans cells by human recombinant interleukin 4 and gamma interferon. 1989. *J Exp Med* 170:309.
- Birnbaum, J., Charpin, D. and Vervloet, D. Rapid hymenoptera venom immunotherapy : comparative safety of three protocols. 1993. *Clin Exp Allergy* 23:226.
- Bischoff, S. C., Krieger, M., Brunner, T. and Dahinden, C. A. Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. 1992. *J Exp Med* 175:1271.
- Bischoff, S. C., Krieger, M., Brunner, T., Rot, A., von, T. V., Baggiolini, M. and Dahinden, C. A. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. 1993. *Eur J Immunol* 23:761.
- Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H. and Kinet, J. P. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. 1989. *Nature* 337:187.
- Blank, U., Ra, C. S. and Kinet, J. P. Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. 1991. *J Biol Chem* 266:2639.
- Blaser, K., Nakagawa, T. and de Weck, A. L. Investigation of a syngeneic murine model for the study of IgE antibody regulation with isologous antiidiotypic antibodies. 1981a. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 64:42.
- Bochner, B. S., Klunk, D. A., Sterbinsky, S. A., Coffman, R. L. and Schleimer, R. P. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. 1995. *J Immunol* 154:799.
- Bonnefoy, J. Y., Aubry, J. P., Gauchat, J. F., Graber, P., Life, P., Flores Romo, L. and Mazzei, G. Receptors for IgE. 1993a. *Curr Opin Immunol* 5:944.
- Bonnefoy, J. Y., Defrance, T., Peronne, C., Menetrier, C., Rousset, F., Pene, J., De Vries, J. E. and Banchereau, J. Human recombinant interleukin 4 induces normal B cells to produce soluble CD23/IgE-binding factor analogous to that spontaneously released by lymphoblastoid B cell lines. 1988b. *Eur J Immunol* 18:117.
- Bonnefoy, J. Y., Guillot, O., Spits, H., Blanchard, D., Ishizaka, K. and Banchereau, J. The low-affinity receptor for IgE (CD23) on B lymphocytes is spatially associated with HLA-DR antigens. 1988a. *J Exp Med* 167:57.
- Bonnefoy, J. Y., Henchoz, S., Hardie, D., Holder, M. J. and Gordon, J. A subset of anti-CD21 antibodies promote the rescue of germinal center B cells from apoptosis. 1993b. *Eur J Immunol* 23:969.
- Bonnefoy, J. Y., Pochon, S., Aubry, J. P., Graber, P., Gauchat, J. F., Jansen, K. and Flores Romo, L. A new pair of surface molecules involved in human IgE regulation. 1993c. *Immunol Today* 14:1.
- Borish, L., Mascali, J. J. and Rosenwasser, L. J. IgE-dependent cytokine production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. 1991. *J Immunol* 146:63.

**Bose, R., Marsh, D. G. and Delespesse, G.** Anti-idiotypes to anti-Lol p I (rye) antibodies in allergic and non allergic individuals. Influence of immunotherapy. **1986.** *Clin. exp. Immunol.* 66:231.

**Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony Lafontaine, J., Godard, P. and et al.** Eosinophilic inflammation in asthma [see comments]. **1990b.** *N Engl J Med* 323:1033.

**Bousquet, J., Hejjaoui, A. and Michel, F. B.** Specific immunotherapy in asthma. **1990a.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 86:292.

**Bousquet, J., Hejjaoui, A., Skassa Brociek, W., Guerin, B., Maasch, H. J., Dhivert, H. and Michel, F. B.** Double-blind, placebo-controlled immunotherapy with mixed grass-pollen allergoids. I. Rush immunotherapy with allergoids and standardized orchard grass-pollen extract. **1987.** *J Allergy Clin Immunol* 80:591.

**Bousquet, J., Menardo, J. L., Allouche, J. and Michel, F. B.** [Allergy to Hymenoptera venom (author's transl)]. **1982.** *Nouv Presse Med* 11:2405.

**Bradding, P., Feather, I. H., Howarth, P. H., Mueller, R., Roberts, J. A., Britten, K., Bews, J. P., Hunt, T. C., Okayama, Y., Heusser, C. H. and et al.** Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. **1992.** *J Exp Med* 176:1381.

**Bradding, P., Feather, I. H., Wilson, S., Bardin, P. G., Heusser, C. H., Holgate, S. T. and Howarth, P. H.** Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. **1993.** *J Immunol* 151:3853.

**Bradding, P., Okayama, Y., Howarth, P. H., Church, M. K. and Holgate, S. T.** Heterogeneity of human mast cells based on cytokine content. **1995.** *J Immunol* 155:297.

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

**Broide, D. H., Paine, M. M. and Firestein, G. S.** Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. **1992.** *J Clin Invest* 90:1414.

**Brunet, C., Bedard, P. M., Lavoie, A., Jobin, M. and Hebert, J.** Allergic rhinitis to ragweed pollen. II. Modulation of histamine releasing factor production by specific immunotherapy. **1992.** *J Allergy Clin Immunol* 89:87.

**Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G. and Golstein, P.** A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. **1987.** *Nature* 328:267.

**Burd, P. R., Thompson, W. C., Max, E. E. and Mills, F. C.** Activated mast cells produce interleukin 13. **1995.** *J Exp Med* 181:1373.

**Callard, R. E., Matthews, D. J. and Hibbert, L.** IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? **1996.** *Immunol Today* 17:108.

**Capron, M., Capron, A., Dessaint, J. P., Torpier, G., Johansson, S. G. and Prin, L.** Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. **1981.** *J Immunol* 126:2087.

**Capron, M., Jouault, T., Prin, L., Joseph, M., Ameisen, J. C., Butterworth, A. E., Papin, J. P., Kusnierz, J. P. and Capron, A.** Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc epsilon R2) of eosinophils, platelets, and macrophages. **1986.** *J Exp Med* 164:72.

**Capron, M., Morita, M., Woerly, G., Lengrand, F., Gounni, A. S., Delaporte, E. and Capron, A.** Differentiation of eosinophils from cord blood cell precursors: kinetics of Fc epsilon RI and Fc epsilon RII expression. **1997.** *Int Arch Allergy Immunol* 113:48.

**Carballido, J. M., Carballido Perrig, N., Kagi, M. K., Meloen, R. H., Wuthrich, B., Heusser, C. H. and Blaser, K.** T cell epitope specificity in human allergic and nonallergic subjects to bee venom phospholipase A2. **1993.** *J Immunol* 150:3582.

**Carballido, J. M., Carballido Perrig, N., Terres, G., Heusser, C. H. and Blaser, K.** Bee venom phospholipase A2-specific T cell clones from human allergic and non-allergic individuals: cytokine patterns change in response to the antigen concentration. **1992.** *Eur J Immunol* 22:1357.

- Carr, M., Roth, S., Luther, E., Rose, S. and Springer, T.** Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. **1994.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3652.
- Castracane, J. M. and Rocklin, R. E.** Detection of human auto-anti-idiotypic antibodies (Ab2). II. Generation of Ab2 in atopic patients undergoing allergen immunotherapy. **1988.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 86:295.
- Cavaillon, J.M., Fitting, C., Guinnepain, M.T., Rassemont, R., David, B.** Lymphocyte proliferative responses to the purified *Dermatophagoides farinae* major allergen in untreated and hyposensitized atopic patients. **1988.** *Allergy* 43: 146.
- Cavaillon, J. M.** Cytokines et allergie. **1996.** Dans "Les cytokines". 2ème édition. Chapitre 33 :523
- Chan, S. H., Perussia, B., Gupta, J. W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H. A., Wolf, S. F., Young, D., Clark, S. C. and Trinchieri, G.** Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **1991.** *J Exp Med* 173:869.
- Chanez, P., Campbell, A., Lacoste, J., Damon, M., Vignola, A., Bousquet, J., Michel, F. and Godart, P.** Airway macrophage in asthma. **1992.** In *Advances in Allergology and Clinical Immunology*. (Edited by Godart P., Bousquet J., and Michel F.B.) The Parthenon Publishing Group, New Jersey. 251.
- Charpin, D., Birnbaum, J., Lanteaume, A. and Vervloet, D.** Prevalence of allergy to Hymenoptera stings in different samples of the general population. **1992.** *J Allergy Clin Immunol* 90:331.
- Chen, C. Y. and Nabavi, N.** In vitro induction of T cell anergy by blocking B7 and early T cell costimulatory molecule ETC-1/B7-2. **1994.** *Immunity* 1:147.
- Chen, S. S., Bohn, J. W., Liu, F. T. and Katz, D. H.** 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). **1981.** *J Immunol* 127:166.
- Cherwinski, H. M., Schumacher, J. H., Brown, K. D. and Mosmann, T. R.** Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **1987.** *J Exp Med* 166:1229.
- Chihara, J., Yamada, H., Takamura, E., Yoshino, K. and Nakajima, S.** Possible presence of RANTES in tears of patients with allergic conjunctivitis [letter]. **1995.** *Int Arch Allergy Immunol* 106:428.
- Cines, D. B., van der Keyl, H. and Levinson, A. I.** In vitro binding of an IgE protein to human platelets. **1986.** *J Immunol* 136:3433.
- Claasen, J. J., Levine, A. D., Schiff, S. E. and Buckley, R. H.** Mononuclear cells from patients with the hyper-IgE syndrome produce little IgE when they are stimulated with recombinant human interleukin-4. **1991.** *J Allergy Clin Immunol* 88:713.
- Cluzel, M., Damon, M., Chanez, P., Bousquet, J., Crastes de Paulet, A., Michel, F. B. and Godard, P.** Enhanced alveolar cell luminol-dependent chemiluminescence in asthma. **1987.** *J Allergy Clin Immunol* 80:195.
- Cocks, B. G., de Waal Malefyt, R., Galizzi, J. P., de Vries, J. E. and Aversa, G.** IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by the CD40 ligand. **1993.** *Int Immunol* 5:657.
- Coffman, R. L., Ohara, J., Bond, M. W., Carty, J., Zlotnik, A. and Paul, W. E.** B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. **1986.** *J Immunol* 136:4538.
- Collins, P. D., Marleau, S., Griffiths Johnson, D. A., Jose, P. J. and Williams, T. J.** Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. **1995.** *J Exp Med* 182:1169.
- Constant, S., Sant'Angelo, D., Pasqualini, T., Taylor, T., Levin, D., Flavell, R. and Bottomly, K.** Peptide and protein antigens require distinct antigen-presenting cell subsets for the priming of CD4+ T cells. **1995.** *J Immunol* 154:4915.
- Costa, J. J., Matossian, K., Resnick, M. B., Beil, W. J., Wong, D. T., Gordon, J. R., Dvorak, A. M., Weller, P. F. and Galli, S. J.** Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. **1993.** *J Clin Invest* 91:2673.

- Coyle, A. J., Erard, F., Bertrand, C., Walti, S., Pircher, H. and Le Gros, G. Virus-specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. **1995.** *J Exp Med* 181:1229.
- Croft, M., Carter, L., Swain, S. L. and Dutton, R. W. Generation of polarized antigen-specific CD8 effector populations: reciprocal action of interleukin (IL)-4 and IL-12 in promoting type 2 versus type 1 cytokine profiles. **1994.** *J Exp Med* 180:1715.
- D'Andrea, A., Aste Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M. and Trinchieri, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **1993.** *J Exp Med* 178:1041.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S. H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E. and et al. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. **1992.** *J Exp Med* 176:1387.
- Daëron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S. and Fridman, W. H. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of FcγRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and Fc-dependent cell activation. **1995b.** *Immunity* 3:635.
- Daëron, M., Malbec, O., Latour, S., Arock, M. and Fridman, W. H. Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. **1995a.** *J Clin Invest* 95:577.
- Dahinden, C. A., Geiser, T., Brunner, T., Vontscharner, V., Caput, D., Ferrara, P., Minty, A. and Baggiolini, M. Monocyte Chemotactic Protein 3 Is a Most Effective Basophil- and Eosinophil-Activating Chemokine. **1994.** *J Exp Med* 179:751.
- Dahinden, C. A., Kurimoto, Y., De Weck, A. L., Lindley, I., Dewald, B. and Baggiolini, M. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. **1989.** *J Exp Med* 170:1787.
- Damon, M., Chavis, C., Crastes de Paulet, A., Michel, F. B. and Godard, P. Arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages. A comparison of cells from healthy subjects, allergic asthmatics, and chronic bronchitis patients. **1987.** *Prostaglandins* 34:291.
- Davis, M. M., Kim, S. K. and Hood, L. E. DNA sequences mediating class switching in alpha-immunoglobulins. **1980.** *Science* 209:1360.
- de Boer, M., Kasran, A., Kwekkeboom, J., Walter, H., Vandenberghe, P. and Ceuppens, J. L. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. **1993.** *Eur J Immunol* 23:3120.
- De Monchy, J., Kauffman, H., Venge, P., Koeter, G., Jansen, H., Sluiter, H. and De Vries, K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. **1985.** *Am Rev Respir Dis* 131:373.
- De Monte, L., Thienes, C., Monticelli, S., Busslinger, M., Gould, H. and Vercelli, D. Regulation of human epsilon germline transcription: role of B-cell-specific activator protein. **1997.** *Int Arch Allergy Immunol* 11:335.
- de Vries, J. E. Molecular and biological characteristics of interleukin-13. **1996.** *Chem Immunol* 63:204.
- de Vries, J. E., Gauchat, J. F., Aversa, G. G., Punnonen, J., Gascan, H. and Yssel, H. Regulation of IgE synthesis by cytokines. **1991.** *Curr Opin Immunol* 3:851.
- de Vries, J. E. and Zurawski, G. Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease. **1995.** *Int Arch Allergy Immunol* 106:175.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. and de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **1991.** *J Exp Med* 174:1209.
- de Waal Malefyt, R., Figdor, C. G., Huijbens, R., Mohan Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J., Dang, W., Zurawski, G. and de Vries, J. E. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. **1993.** *J Immunol* 151:6370.
- Defrance, T., Carayon, P., Billian, G., Guillemot, J. C., Minty, A., Caput, D. and Ferrara, P. Interleukin 13 is a B cell stimulating factor. **1994.** *J Exp Med* 179:135.

- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R. and Romagnani, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. 1993b. *J Immunol* 150:353.
- Del Prete, G., De Carli, M., D'Elcios, M. M., Daniel, K. C., Almerigogna, F., Alderson, M., Smith, C. A., Thomas, E. and Romagnani, S. CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. 1995. *J Exp Med* 182:1655.
- Del Prete, G., Maggi, E., Parronchi, P., Chretien, I., Tiri, A., Macchia, D., Ricci, M., Banchereau, J., De Vries, J. and Romagnani, S. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. 1988. *J Immunol* 140:4193.
- Del Prete, G. F., De Carli, M., D'Elcios, M. M., Maestrelli, P., Ricci, M., Fabbri, L. and Romagnani, S. Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. 1993a. *Eur J Immunol* 23:1445.
- Delespesse, G., Hofstetter, H. and Sarfati, M. Low-affinity receptor for IgE (FcERII, CD23) and its soluble fragments. 1989a. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1:41.
- Delespesse, G., Sarfati, M. and Hofstetter, H. Human IgE-binding factors. 1989b. *Immunol Today* 10:159.
- Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J. F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A. and Capron, M. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. 1992. *J Exp Med* 175:293.
- Dessaint, J., Capron, A., Joseph, M. and Bazin, H. Cytophilic binding of IgE to the macrophage. II. Immunologic release of lysosomal enzyme from macrophages by IgE and anti-IgE in the rat: a new mechanism of macrophage activation. 1979. *Cell Immunol* 46:24.
- Dessaint, J. and Labalette, M. Commutation isotypique vers l'IgE: une séquence ordonnée de contacts intercellulaires et de cytokines appropriées dirige le switch. 1995. *Rev fr Allergol* 35:554.
- Dessaint, J., Labalette, M. and Capron, A. L'immunoglobuline E: d'une cible cellulaire unique à une multiplicité de cibles et de fonctions. 1993. *Rev Fr Allergol* 33:1.
- Dessaint, J., Tscopoulos, A., Pancré, V., Joseph, M., Ameisen, J., Tonnel, A. and Capron, A. Platelets in asthma. Asthma. Its pathology and treatment. 1991. Kaliner MA, Barnes PJ, Persson CGA. eds, Marcel Dekker Inc., New York 262.
- Dhillon, M., Roberts, C., Nunn, T. and Kuo, M. Mapping human T cell epitopes on phospholipase A2: the major bee-venom allergen. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 90:42.
- Diaz Sanchez, D., Chegini, S., Zhang, K. and Saxon, A. CD58 (LFA-3) stimulation provides a signal for human isotype switching and IgE production distinct from CD40. 1994. *J Immunol* 153:10.
- Djurup, R. The subclass nature and clinical significance of the IgG antibody response in patients undergoing allergen-specific immunotherapy. 1985. *Allergy* 40:469.
- Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H. and Kinet, J. P. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. 1993. *Cell* 75:969.
- Dominguez, M. A., Sanz, M. L., Lobera, T. and Oehling, A. T helper and T suppressor subpopulations in pollinosis. Effect of specific immunotherapy. 1983. *Allergol Immunopathol Madr* 11:415.
- Douglass, J. A., Dhami, D., Gurr, C. E., Bulpitt, M., Shute, J. K., Howarth, P. H., Lindley, I. J., Church, M. K. and Holgate, S. T. Influence of interleukin-8 challenge in the nasal mucosa in atopic and nonatopic subjects. 1994. *Am J Respir Crit Care Med* 150:1108.
- Dudler, T., Machado, D. C., Kolbe, L., Annand, R. R., Rhodes, N., Gelb, M. H., Koelsch, K., Suter, M. and Helm, B. A. A link between catalytic activity, IgE-independent mast cell activation, and allergenicity of bee venom phospholipase A2. 1995. *J Immunol* 155:2605.
- Dugas, B., Mossalayi, M. D., Damais, C. and Kolb, J. P. Nitric oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23. 1995. *Immunol Today* 16:574.
- Durham, S. R., Dawes, J. and Kay, A. B. Platelets in asthma [letter]. 1985. *Lancet* 2:36.

- Durham, S. R., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Mackay, I. S., Kay, A. B. and Hamid, Q. A. Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. 1992. *J Immunol* 148:2390.
- Durham, S. R., Ying, S., Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Mackay, I. S., Kay, A. B. and Hamid, Q. A. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 97:1356.
- Ebisawa, M., Yamada, T., Bickel, C., Klunk, D. and Schleimer, R. P. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES. 1994. *J Immunol* 153:2153.
- Ebner, C., Schenk, S., Najafian, N., Siemann, U., Steiner, R., Fischer, G. W., Hoffmann, K., Szeffalusi, Z., Scheiner, O. and Kraft, D. Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. 1995. *J Immunol* 154:1932.
- Egesten, A., Alumets, J., von Mecklenburg, C., Palmegren, M. and Olsson, I. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxidase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. 1986. *J Histochem Cytochem* 34:1399.
- Eiseman, E. and Bolen, J. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. 1992. *Nature* 355:78.
- Elovic, A., Wong, D. T., Weller, P. F., Matossian, K. and Galli, S. J. Expression of transforming growth factors-alpha and beta 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. 1994. *J Allergy Clin Immunol* 93:864.
- Evans, R., Pence, H., Kaplan, H. and Rocklin, R. E. The effect of immunotherapy on humoral and cellular responses in ragweed hayfever. 1976. *J. Clin. Invest.* 57:1378.
- Ewan, P. W., Deighton, J., Wilson, A. B. and Lachmann, P. J. Venom-specific IgG antibodies in bee and wasp allergy: lack of correlation with protection from stings. 1993. *Clin Exp Allergy* 23:647.
- Fagan, D. L., Slaughter, C. A., Capra, J. D. and Sullivan, T. J. Monoclonal antibodies to immunoglobulin G4 induce histamine release from human basophils in vitro. 1982. *J Allergy Clin Immunol* 70:399.
- Fang, K. S., Vitale, M., Fehlner, P. and King, T. P. cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:895.
- Fanslow, W. C., Anderson, D. M., Grabstein, K. H., Clark, E. A., Cosman, D. and Armitage, R. J. Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells. 1992. *J Immunol* 149:655.
- Ferrick, D. A., Schrenzel, M. D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W. G. and Lepper, H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. 1995. *Nature* 373:255.
- Finkelman, F. D., Holmes, J., Katona, I. M., Urban, J. F., Jr., Beckmann, M. P., Park, L. S., Schooley, K. A., Coffman, R. L., Mosmann, T. R. and Paul, W. E. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. 1990. *Annu Rev Immunol* 8:303.
- Finkelman, F. D., Katona, I. M., Urban, J. F., Jr., Snapper, C. M., Ohara, J. and Paul, W. E. Suppression of in vivo polyclonal IgE responses by monoclonal antibody to the lymphokine B-cell stimulatory factor 1. 1986. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9675.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. and O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. 1991. *J Immunol* 147:3815.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W. and O'Garra, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. 1991. *J Immunol* 146:3444.
- Fling, J. A., Ruff, M. E., Parker, W. A. and al, e. Suppression of the late cutaneous response by immunotherapy. 1989. *J allergy Clin Immunol* 83:101.

- Flores Romo, L., Shields, J., Humbert, Y., Graber, P., Aubry, J. P., Gauchat, J. F., Ayala, G., Allet, B., Chavez, M., Bazin, H. and et al. Inhibition of an in vivo antigen-specific IgE response by antibodies to CD23. 1993. *Science* 261:1038.
- Fournier, S., Tran, I. D., Suter, U., Biron, G., Delespesse, G. and Sarfati, M. The in vivo expression of type B CD23 mRNA in B-chronic lymphocytic leukemic cells is associated with an abnormally low CD23 upregulation by IL-4: comparison with their normal cellular counterparts. 1991. *Leuk Res* 15:609.
- Forssmann, U., Uguccioni, M., Loetscher, P., Dahinden, C., Langen, H., Thelen, M. and Baggiolini, M. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. 1997. *J Exp Med* 185:2171.
- Freeman, G. J., Boussiotis, V. A., Anumanthan, A., Bernstein, G. M., Ke, X. Y., Rennert, P. D., Gray, G. S., Gribben, J. G. and Nadler, L. M. B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. 1995. *Immunity* 2:523.
- Friccius, H., Siegels, H. P., Rehbein, A., Schlotz, E. and Pawelec, G. Induction of hyporesponsiveness in human lymphocytes-T despite their expression of both the co-receptor CD28 and its ligand B7. 1993. *Cell Immunol* 151:283.
- Frigas, E. and Gleich, G. J. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. 1986. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77:527.
- Frigas, E., Loegering, D. A., Solley, G. O., Farrow, G. M. and Gleich, G. J. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. 1981. *Mayo Clin Proc* 56:345.
- Frigeri, L. G. and Liu, F. T. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. 1992. *J Immunol* 148:861.
- Frigeri, L. G., Zuberi, R. I. and Liu, F. T. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. 1993. *Biochemistry* 32:7644.
- Fujieda, S., Zhang, K. and Saxon, A. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells gamma subclass-specific isotype switch: switching to gamma 1, gamma 3, and gamma 4, but not gamma 2. 1995. *J Immunol* 155:2318.
- Fujisawa, T., Abu Ghazaleh, R., Kita, H., Sanderson, C. J. and Gleich, G. J. Regulatory effect of cytokines on eosinophil degranulation. 1990. *J Immunol* 144:642.
- Fukaura, H., Kent, S. C., Pietrusewicz, M. J., Khoury, S. J., Weiner, H. L. and Hafler, D. A. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. 1996. *J Clin Invest* 98:70.
- Fukuda, T., Ackerman, S. J., Reed, C. E., Peters, M. S., Dunnette, S. L. and Gleich, G. J. Calcium ionophore A23187 calcium-dependent cytolytic degranulation in human eosinophils. 1985. *J Immunol* 135:1349.
- Fuleihan, R., Ramesh, N., Loh, R., Jabara, H., Rosen, R. S., Chatila, T., Fu, S. M., Stamenkovic, I. and Geha, R. S. Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2170.
- Funk, C. D. and FitzGerald, G. A. Eicosanoid forming enzyme mRNA in human tissues. Analysis by quantitative polymerase chain reaction. 1991. *J Biol Chem* 266:12508.
- Furin, M. J., Norman, P. S., Creticos, P. S., Proud, D., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M. and Naclerio, R. M. Immunotherapy decreases antigen-induced cell migration into the nasal cavity. 1991. *J. allergy Clin. Immunol.* 88:.
- Gajewski, T. F., Joyce, J. and Fitch, F. W. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. 1989. *J Immunol* 143:15.
- Galli, S. J., Dvorak, A. M., Ishizaka, T., Nabel, G., Der Simonian, H., Cantor, H. and Dvorak, H. F. A cloned cell with NK function resembles basophils by ultrastructure and expresses IgE receptors. 1982. *Nature* 298:288.

- Garcia Zepeda, E. A., Rothenberg, M. E., Ownbey, R. T., Celestin, J., Leder, P. and Luster, A. D.** Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. 1996. *Nat Med* 2:449.
- Gascan, H., Gauchat, J. F., Roncarolo, M. G., Yssel, H., Spits, H. and de Vries, J. E.** Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. 1991. *J Exp Med* 173:747.
- Gatien, J., Merler, E. and Colten, H.** Allergy to ragweed antigen E: effect of specific immunotherapy on the reactivity of human T lymphocytes *in vitro*. 1975. *Clin Immunol Immunopathol* 4:32.
- Gauchat, J. F., Aversa, G., Gascan, H. and de Vries, J. E.** Modulation of IL-4 induced germline epsilon RNA synthesis in human B cells by tumor necrosis factor-alpha, anti-CD40 monoclonal antibodies or transforming growth factor-beta correlates with levels of IgE production. 1992. *Int Immunol* 4:397.
- Gauchat, J. F., Henchoz, S., Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J. P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R., Aldebert, D. and et al.** CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. 1995. *Eur J Immunol* 25:863.
- Gauchat, J. F., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J. P., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores Romo, L., Thompson, J. and et al.** Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. 1993. *Nature* 365:340.
- Gauchat, J. F., Lebman, D. A., Coffman, R. L., Gascan, H. and de Vries, J. E.** Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. 1990. *J Exp Med* 172:463.
- Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M., Clark-Lewis, I. and Baggiolini, M.** The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. 1993. *J Biol Chem* 268:15419.
- Gervais, P. and Brioux, G.** Les accidents consécutifs aux piqûres d'hyménoptères. 1971. *Concours médical* 93-26:4849.
- Gimmi, C. D., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Sugita, K., Freedman, A. S., Morimoto, C. and Nadler, L. M.** B-cell surface antigen B7 provides a costimulatory signal that induces T cells to proliferate and secrete interleukin 2. 1991. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6575.
- Gmachl, M., Sagan, S., Ketter, S. and Kreil, G.** The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. 1993. *FEBS Lett* 336:545.
- Godiska, R., Chantry, D., Raport, C., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A. and Gray, P.** Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. 1997. *J Exp Med* 185:1595.
- Golden, D. B., Lawrence, I. D., Hamilton, R. H., Kagey, S. A., Valentine, M. D. and Lichtenstein, L. M.** Clinical correlation of the venom-specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy. 1992. *J. Allergy Clin. Immunol.* 90:386.
- Golden, D. B., Meyers, D. A., Kagey Sobotka, A., Valentine, M. D. and Lichtenstein, L. M.** Clinical relevance of the venom-specific immunoglobulin G antibody level during immunotherapy. 1982. *J Allergy Clin Immunol* 69:489.
- Goodwin, J. S., Ceuppens, J. L. and Rodriguez, M. A.** Administration of nonsteroidal anti-inflammatory agents in patients with rheumatoid arthritis. Effects on indexes of cellular immune status and serum rheumatoid factor levels. 1983. *Jama* 250:2485.
- Gordon, J., Burd, P. and Galli, S.** Mast cells as a source of multifunctional cytokines. 1990. *Immunol Today* 11:458.
- Gorski, J. P., Hugli, T. E. and Muller Eberhard, H. J.** C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. 1979. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5299.
- Gosset, P., Lassalle, P., Tonnel, A., Dessaint, J., Wallaert, B., Prin, L., Pestel, J. and Capron, A.** Production of an interleukin-1 inhibitory factor by human alveolar macrophages from normals and allergic asthmatic patients. 1988. *Am Rev Respir Dis* 138:40.
- Gosset, P., Tillie Leblond, I., Malaquin, F., Durieu, J., Wallaert, B. and Tonnel, A. B.** Interleukin-8 secretion in patients with allergic rhinitis after an allergen challenge: interleukin-8 is not the main chemotactic factor present in nasal lavages. 1997. *Clin Exp Allergy* 27:379.

- Gosset, P., Tonnel, A. B., Joseph, M., Prin, L., Mallart, A., Charon, J. and Capron, A. Secretion of a chemotactic factor for neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages from asthmatic patients. 1984. *J Allergy Clin Immunol* 74:827.
- Gosset, P., Tsiopoulos, A., Wallaert, B., Joseph, M., Capron, A. and Tonnel, A. B. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. 1992. *Am Rev Respir Dis* 146:768.
- Gounni, A. S., Lamkhieoued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, J. P. and Capron, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. 1994. *Nature* 367:183.
- Graft, D. Stinging insect hypersensitivity in children. 1996. *Curr Opin Pediatr* 8:597.
- Grant, J. A., Humbert, M., Taborda Barata, L., Sihra, B. S., Kon, O. M., Rajakulasingam, K., Durham, S. R. and Kay, A. B. High-affinity IgE receptor Fc epsilon RI expression in allergic reactions. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:376.
- Green, A. W., Reisman, R. E. and Arbesman, C. E. Clinical and immunologic studies of patients with large local reactions following insect stings. 1980. *J Allergy Clin Immunol* 66:186.
- Gross, A., Ben Sasson, S. Z. and Paul, W. E. Anti-IL-4 diminishes in vivo priming for antigen-specific IL-4 production by T cells. 1993. *J Immunol* 150:2112.
- Groux, H., Sornasse, T., Cottrez, F., de Vries, J. E., Coffman, R. L., Roncarolo, M. G. and Yssel, H. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. 1997a. *J Immunol* 158:5627.
- Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E. and Roncarolo, M.G. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. 1997b. *Nature* 389: 737.
- Guerder, S. and Flavell, R. A. T-cell activation. Two for T. 1995. *Curr Biol* 5:866.
- Gwynn, C. M., Smith, J. M., Leon, G. L. and Stanworth, D. R. IgE and IgG4 subclass in atopic families. 1979. *Clin Allergy* 9:119.
- Hagermark, O., Hokfelt, T. and Pernow, B. Flare and itch induced by substance P in human skin. 1978. *J Invest Dermatol* 71:233.
- Hakansson, L., Westerlund, D. and Venge, P. New method for the measurement of eosinophil migration. 1987. *J Leukoc Biol* 42:689.
- Hakimi, J., Seals, C., Kondas, J. A., Pettine, L., Danho, W. and Kochan, J. The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding. 1990. *J Biol Chem* 265:22079.
- Halonen, M., Palmer, J. D., Lohman, I. C., McManus, L. M. and Pinckard, R. N. Differential effects of platelet depletion on the physiologic alterations of IgE anaphylaxis and acetyl glyceryl ether phosphorylcholine infusion in the rabbit. 1981. *Am Rev Respir Dis* 124:416.
- Hamann, D., Hilkens, C. M., Grogan, J. L., Lens, S. M., Kapsenberg, M. L., Yazdanbakhsh, M. and van Lier, R. A. CD30 expression does not discriminate between human Th1- and Th2-type T cells. 1996. *J Immunol* 156:1387.
- Hamid, Q., Barkans, J., Meng, Q., Ying, S., Abrams, J. S., Kay, A. B. and Moqbel, R. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. 1992. *Blood* 80:1496.
- Hamid, Q., Boguniewicz, M. and Leung, D. Y. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. 1994. *J Clin Invest* 94:870.
- Hamid, Q. A., Schotman, E., Jacobson, M. R., Walker, S. M. and Durham, S. R. Increases in IL-12 messenger RNA<sup>+</sup> cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy [see comments]. 1997. *J Allergy Clin Immunol* 99:254.
- Haskill, S., Peace, A., Morris, J., Sporn, S., Anisowicz, A., Lee, S., Smith, T., Martin, G., Ralph, P. and Sager, R. Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. 1990. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7732.

- Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P. and Hodes, R. J.** Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. **1994.** *J Exp Med* 180:631.
- Hauser, C., Snapper, C. M., Ohara, J., Paul, W. E. and Katz, S. I.** T helper cells grown with hapten-modified cultured Langerhans' cells produce interleukin 4 and stimulate IgE production by B cells. **1989.** *Eur J Immunol* 19:245.
- He, Y. W. and Malek, T. R.** The IL-2 receptor gamma c chain does not function as a subunit shared by the IL-4 and IL-13 receptors. Implication for the structure of the IL-4 receptor. **1995.** *J Immunol* 155:9.
- Hebert, J., Bernier, D. and Mourad, W.** Detection of auto-anti-idiotypic antibodies to Lol p I (rye I) IgE antibodies in human sera by the use of murine idiotypes: levels in atopic and non atopic subjects and effects of immunotherapy. **1990.** *Clin. Exp. Immunol.* 80:413.
- Hedlin, G., Graff-Lonnevig, V., Heilborn, H., Lilja, G., Norrlind, K., Pegelow, K., Sundin, B. and Lowenstein, H.** Immunotherapy with cat- and dog-dander extracts. **1991.** *J. allergy Clin. Immunol.* 87:955.
- Hedrick, J., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T. and Zlotnik, A.** Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. **1997.** *J Immunol* 158:1533.
- Heeger, P., Wolf, G., Meyers, C., Sun, M., O'Farrell, S., Krensky, A. and Neilson, E.** Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine Rantes. **1992.** *Kidney Int* 41:220.
- Heinen, E., Cormann, N., Braun, M., Kinet Denoel, C., Vanderschelden, J. and Simar, L. J.** Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. VI. Analysis of prostaglandin secretion. **1986.** *Ann Inst Pasteur Immunol* 3:369.
- Heinzel, F. P., Schoenhaut, D. S., Rerko, R. M., Rosser, L. E. and Gately, M. K.** Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **1993.** *J Exp Med* 177:1505.
- Heyman, B., Tianmin, L. and Gustavsson, S.** In vivo enhancement of the specific antibody response via the low-affinity receptor for IgE. **1993.** *Eur J Immunol* 23:1739.
- Hiratani, M., Muto, K., Oshida, Y., Ito, S. and Kasei, M.** Lymphocyte responsiveness to *Dermatophagoides farinae* extract in mite-sensitive patients: effect of immunotherapy on cellular proliferative response and specific immunoglobulin E antibody (RAST score). **1981.** *J Allergy Clin Immunol* 68:205.
- Hiratsuka, S., Yoshida, A., Ishioka, C. and Kimata, H.** Enhancement of in vitro spontaneous IgE production by topical steroids in patients with atopic dermatitis. **1996.** *J Allergy Clin Immunol* 98:107.
- Ho, I. C., Hodge, M. R., Rooney, J. W. and Glimcher, L. H.** The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. **1996.** *Cell* 85:973.
- Hodge, M. R., Ranger, A. M., Charles de la Brousse, F., Hoey, T., Grusby, M. J. and Glimcher, L. H.** Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. **1996.** *Immunity* 4:397.
- Hodgson, C. M., Dearman, R. J., Morris, A. G. and Kimber, I.** Accessory cell requirements for T lymphocyte activation and interferon-gamma production in peripheral lymph nodes. **1996.** *Immunol Lett* 49:49.
- Hoffman, D.** Allergens in Hymenoptera venom. XXV: The amino acid sequences of antigen 5 molecules and the structural basis of antigenic cross-reactivity. **1993.** *J Allergy Clin Immunol* 92:707.
- Hoffman, D.** The structure of vespid phospholipases and the basis for their immunologic cross-reactivity. [abstract]. **1994b.** *J Allergy Clin Immunol* 93:223.
- Hoffman, D. R.** Allergens in Hymenoptera venom XIII: Isolation and purification of protein components from three species of vespid venoms. **1985.** *J Allergy Clin Immunol* 75:599.
- Hoffman, D. R.** Allergens in hymenoptera venom. XXVI: The complete amino acid sequences of two vespid venom phospholipases. **1994a.** *Int Arch Allergy Immunol* 104:184.
- Hofker, M. H., Walter, M. A. and Cox, D. W.** Complete physical map of the human immunoglobulin heavy chain constant region gene complex. **1989.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5567.

- Holt, P. G., Schon Hegrad, M. A., Phillips, M. J. and McMenamin, P. G.** Ia-positive dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. 1989. *Clin Exp Allergy* 19:597.
- Horner, A. A., Jabara, H., Ramesh, N. and Geha, R. S.** gamma/delta T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. 1995. *J Exp Med* 181:1239.
- Howell, C. J., Pujol, J. L., Crea, A. E., Davidson, R., Gearing, A. J., Godard, P. and Lee, T. H.** Identification of an alveolar macrophage-derived activity in bronchial asthma that enhances leukotriene C4 generation by human eosinophils stimulated by ionophore A23187 as a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. 1989. *Am Rev Respir Dis* 140:1340.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. and Murphy, K. M.** Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages [see comments]. 1993. *Science* 260:547.
- Hsieh, K. H.** Changes of lymphoproliferative responses of T cell subsets to allergen and mitogen after hyposensitization in asthmatic children. 1984. *J Allergy Clin Immunol* 74:34.
- Hsieh, K. H., Chou, C. C. and Chiang, B. L.** Immunotherapy suppresses the production of monocyte chemotactic and activating factor and augments the production of IL-8 in children with asthma. 1996. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:580.
- Humbert, M., Durham, S. R., Ying, S., Kimmitt, P., Barkans, J., Assoufi, B., Pfister, R., Menz, G., Robinson, D. S., Kay, A. B. and Corrigan, C. J.** IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against "intrinsic" asthma being a distinct immunopathologic entity. 1996a. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1497.
- Humbert, M., Ying, S., Corrigan, C., Menz, G., Barkans, J., Pfister, R., Meng, Q., Van Damme, J., Opdenakker, G., Durham, S. R. and Kay, A. B.** Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3. 1997. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:1.
- Hunt, K. J., Valentine, M. D., Sobotka, A. K., Benton, A. W., Amodo, F. J. and Lichtenstein, L. M.** A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. 1978. *N Engl J Med* 299:157.
- Ihle, J.** Cytokine receptor signalling. 1995. *Nature* 377:591.
- Iliopoulos, O., Proud, D., Adkinson, N. F., Creticos, P. S., Norman, P. S., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L. M. and Naclerio, R. M.** Effects of immunotherapy on the early, late, and rechallenge nasal reaction to provocation with allergen: changes in inflammatory mediators and cells. 1991. *J. Allergy Clin. Immunol.* 87:855.
- Irani, A. M. and Schwartz, L. B.** Mast cell heterogeneity. 1989. *Clin Exp Allergy* 19:143.
- Ishida, N., Ueda, S., Hayashida, H., Miyata, T. and Honjo, T.** The nucleotide sequence of the mouse immunoglobulin epsilon gene: comparison with the human epsilon gene sequence. 1982. *Embo J* 1:1117.
- Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Nakanishi, M., Tomizawa, K., Oshika, E., Kojima, K., Taguchi, Y., Kandil, E. and Matsumoto, S.** The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. 1990. *Clin Exp Immunol* 79:392.
- Ishizaka, K., Tomioka, H. and Ishizaka, T.** Mechanisms of passive sensitization. I. Presence of IgE and IgG molecules on human leukocytes. 1970. *J Immunol* 105:1459.
- Jabara, H. H., Ahern, D. J., Vercelli, D. and Geha, R. S.** Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human B cells. 1991. *J Immunol* 147:1557.
- Jabara, H. H., Fu, S. M., Geha, R. S. and Vercelli, D.** CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. 1990a. *J Exp Med* 172:1861.
- Jabara, H. H., Schneider, L. C., Shapira, S. K., Alfieri, C., Moody, C. T., Kieff, E., Geha, R. S. and Vercelli, D.** Induction of germ-line and mature C epsilon transcripts in human B cells stimulated with rIL-4 and EBV. 1990b. *J Immunol* 145:3468.

- Jankovic, D., Kullberg, M., Dombrowicz, D., Barbieri, S., Caspar, P., Wynn, T., Paul, W., Cheever, A., Kinet, J. and Sher, A. Fc $\epsilon$ RI-deficient mice infected with *schistosoma mansoni* mount normal Th2-type responses while displaying enhanced liver pathology. 1997. *J Immunol* 159:1868.
- Jeannin, P., Delneste, Y., Tillie Leblond, I., Wallaert, B., carlier, A., Pestel, J. and Tonnel, A. B. Abnormal IgG4 antibody response to aeroallergens in allergic patients. 1994. *Int Arch Allergy Immunol* 104:191.
- Jenkins, M., Pardoll, D., Mizuguchi, J., Quill, H. and Schwartz, R. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. 1987. *Immunol Rev* 95:113.
- Jia, G. Q., Gonzalo, J. A., Lloyd, C., Kremer, L., Lu, L., Martinez, A. C., Wershil, B. K. and Gutierrez Ramos, J. C. Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. 1996. *J Exp Med* 184:1939.
- Jimeno, L., Lombardero, M., Carreira, J. and Moscoso Del Prado, J. Presence of IgG4 on the membrane of human basophils. Histamine release is induced by monoclonal antibodies directed against the Fab but not the Fc region of the IgG4 molecule. 1992. *Clin Exp Allergy* 22:1007.
- Johnson, G. D., Hardie, D. L., Ling, N. R. and MacLennan, I. C. Human follicular dendritic cells (FDC): a study with monoclonal antibodies (MoAb). 1986. *Clin Exp Immunol* 64:205.
- Joseph, M., Capron, A., Ameisen, J. C., Capron, M., Vorng, H., Pancre, V., Kusnierz, J. P. and Auriault, C. The receptor for IgE on blood platelets. 1986. *Eur J Immunol* 16:306.
- Joseph, M., Soussi Gounni, A., Kusnierz, J., Vorng, H., Sarfati, M., Kinet, J., Tonnel, A., Capron, A. and Capron, M. Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. 1997. *Eur J Immunol* 27:2212.
- Joseph, M., Tonnel, A. B., Capron, A. and Voisin, C. Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. 1980. *Clin Exp Immunol* 40:416.
- Joseph, M., Tonnel, A. B., Torpier, G., Capron, A., Arnoux, B. and Benveniste, J. Involvement of immunoglobulin E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. 1983. *J Clin Invest* 71:221.
- Jujo, K., Renz, H., Abe, J. and Gelfand, E. Decreased interferon gamma and increased IL-4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 90:323.
- June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. and Thompson, C. B. The B7 and CD28 receptor families. 1994. *Immunol Today* 15:321.
- Jutel, M., Müller, U. R., Fricker, M., Rihs, S., Pichler, W. J. and Dahinden, C. Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:1112.
- Jutel, M., Pichler, W. J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C. and Muller, U. R. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. 1995b. *J Immunol* 154:4187.
- Jutel, M., Skrbic, D., Pichler, W. J. and Muller, U. R. Ultra rush bee venom immunotherapy does not reduce cutaneous weal responses to bee venom and codeine phosphate. 1995a. *Clin Exp Allergy* 25:1205.
- Kameyoshi, Y., Dorschner, A., Mallet, A. I., Christophers, E. and Schroder, J. M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. 1992. *J Exp Med* 176:587.
- Kaplan, A. P., Kuna, P. and Reddigari, S. R. Chemokines as allergic mediators - relationship to histamine-releasing factors. 1994. *Allergy* 49:495.
- Kaplan, M., Schindler, U., Smiley, S. and Grusby, M. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. 1996b. *Immunity* 4:313.
- Kaplan, M., Sun, Y., Hoey, T. and Grusby, M. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. 1996a. *Nature* 382:174.

- Karpus, W. J., Lukacs, N. W., Kennedy, K. J., Smith, W. S., Hurst, S. D. and Barrett, T. A.** Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. **1997.** *J Immunol* 158:4129.
- Katamura, K., Shintaku, N., Yamauchi, Y., Fukui, T., Ohshima, Y., Mayumi, M. and Furusho, K.** Prostaglandin E2 at priming of naive CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. **1995.** *J Immunol* 155:4604.
- Kay, A. B. and Corrigan, C. J.** Asthma. Eosinophils and neutrophils. **1992.** *Br Med Bull* 48:51.
- Kay, A. B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S. R., Moqbel, R., Wardlaw, A. J. and Hamid, Q.** Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. **1991.** *J Exp Med* 173:775.
- Keane Myers, A., Gause, W. C., Linsley, P. S., Chen, S. J. and Wills Karp, M.** B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. **1997.** *J Immunol* 158:2042.
- Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bazan, J. F., Moore, K. W., Schall, T. J. and et al.** Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. **1994.** *Science* 266:1395.
- Kelso, A., Troutt, A. B., Maraskovsky, E., Gough, N. M., Morris, L., Pech, M. H. and Thomson, J. A.** Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro. **1991.** *Immunol Rev* 123:85.
- Kemeny, D. M., Harries, M. G., Youtlen, L. J., Mackenzie Mills, M. and Lessof, M. H.** Antibodies to purified bee venom proteins and peptides. I. Development of a highly specific RAST for bee venom antigens and its application to bee sting allergy. **1983.** *J Allergy Clin Immunol* 71:505.
- Kemeny, D. M. and Lessof, M. H.** Immune response to bee venom. II. Quantitation of the absolute amounts of IgE and IgG antibodies by saturation analysis. **1987.** *Int Arch Allergy Appl Immunol* 83:113.
- Kemeny, D. M., Noble, A., Holmes, B. J., Diaz Sanchez, D. and Lee, T. H.** The role of CD8+ T cells in immunoglobulin E regulation. **1995.** *Allergy* 50:9.
- Kemeny, D. M., Tomioka, H., Tsutsumi, A., Koike, T., Lessof, M. H. and Lee, T. H.** The relationship between anti-IgE auto-antibodies and the IgE response to wasp venom during immunotherapy. **1990.** *Clin. Exp. Allergy* 20:67.
- Kimata, H., Lindley, I. and Furusho, K.** Selective inhibition of spontaneous IgE and IgG4 production by interleukin-8 in atopic patients. **1995.** *Blood* 85:3191.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Fujimoto, M., Lindley, I. and Furusho, K.** RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha selectively enhance immunoglobulin (IgE) and IgG4 production by human B cells. **1996.** *J Exp Med* 183:2397.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Lindley, I. and Mikawa, H.** Interleukin 8 (IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells. **1992.** *J Exp Med* 176:1227.
- King, C. L., Stupi, R. J., Craighead, N., June, C. H. and Thyphronitis, G.** CD28 activation promotes Th2 subset differentiation by human CD4+ cells. **1995b.** *Eur J Immunol* 25:587.
- King, T. P.** Sensitivity of immunoassays for detecting cross-reactivity of homologous venom proteins of yellow jackets. **1987b.** *J Allergy Clin Immunol* 79:113.
- King, T. P., Kochoumian, L. and Lu, G.** Murine T and B cell responses to natural and recombinant hornet venom allergen Dol m 5.02 and its recombinant fragments. **1995a.** *J Immunol* 154:577.
- King, T. P. and Lu, G.** Hornet venom allergen antigen 5, Dol m 5: its T-cell epitopes in mice and its antigenic cross-reactivity with a mammalian testis protein. **1997.** *J Allergy Clin Immunol* 99:630.
- King, T. P., Lu, G., Gonzalez, M., Qian, N. and Soldatova, L.** Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. **1996.** *J Allergy Clin Immunol* 98:588.
- King, T. P., Sobotka, A. K., Kochoumian, L. and Lichtenstein, L. M.** Allergens of honey bee venom. **1976.** *Arch Biochem Biophys* 172:661.

**King, T. P. and Valentine, M. D.** Allergens of hymenopteran venoms. 1987a. *Clin Rev Allergy* 5:137.

**King, T.P., Hoffman, D., Lowenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E. and Thomas W.** WHO/IUS Allergen Nomenclature Subcommittee World Health Organization, Geneva, Switzerland. Allergen Nomenclature. 1995c. *Clin Exp Allergy* 25: 27.

**Kiniwa, M., Gately, M., Gubler, U., Chizzonite, R., Fargeas, C. and Delespesse, G.** Recombinant interleukin-12 suppresses the synthesis of immunoglobulin E by interleukin-4 stimulated human lymphocytes. 1992. *J Clin Invest* 90:262.

**Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J. S. and Gleich, G. J.** Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. 1991. *J Exp Med* 174:745.

**Klaus, S. J., Pinchuk, L. M., Ochs, H. D., Law, C. L., Fanslow, W. C., Armitage, R. J. and Clark, E. A.** Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-CD40L interaction. 1994. *J Immunol* 152:5643.

**Knauer, K. A., Lichtenstein, L. M., Adkinson, N. F., Jr. and Fish, J. E.** Platelet activation during antigen-induced airway reactions in asthmatic subjects. 1981. *N Engl J Med* 304:1404.

**Kolb, J., Paul-Eugène, N., Quaaz, F., Yamaoka, K., Mossalayi, D. and Dugas, B.** Physiopathological role of low affinity IgE receptor (CD23) in hematopoietic cells. 1994. *C R Seances Soc Biol Fil* 188:59.

**Kolb, J. P., Abadie, A., Paul Eugene, N., Capron, M., Sarfati, M., Dugas, B. and Delespesse, G.** Ligation of CD23 triggers cyclic AMP generation in human B lymphocytes. 1993. *J Immunol* 150:4798.

**Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H. and Kohler, G.** Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. 1993. *Nature* 362:245.

**Koulova, L., Clark, E. A., Shu, G. and Dupont, B.** The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. 1991. *J Exp Med* 173:759.

**Kruse, N., Tony, H. P. and Sebald, W.** Conversion of human interleukin-4 into a high affinity antagonist by a single amino acid replacement. 1992. *Embo J* 11:3237.

**Kubin, M., Chow, J. M. and Trinchieri, G.** Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. 1994. *Blood* 83:1847.

**Kuchroo, V. K., Das, M. P., Brown, J. A., Ranger, A. M., Zamvil, S. S., Sobel, R. A., Weiner, H. L., Nabavi, N. and Glimcher, L. H.** B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. 1995. *Cell* 80:707.

**Kuhn, R., Rajewsky, K. and Muller, W.** Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. 1991. *Science* 254:707.

**Kulmburg, P. A., Huber, N. E., Scheer, B. J., Wrann, M. and Baumruker, T.** Immunoglobulin E plus antigen challenge induces a novel intercrine/chemokine in mouse mast cells. 1992. *J Exp Med* 176:1773.

**Kuna, P., Alam, R., Kuzminska, B. and Rozniecki, J.** The effect of preseasonal immunotherapy on the production of histamine-releasing factor (HRF) by mononuclear cells from patients with seasonal asthma : Results of a double-blind, placebo-controlled, randomized study. 1989. *J Allergy Clin Immunol* 83:816.

**Kuna, P., Reddigari, S. R., Kornfeld, D. and Kaplan, A. P.** IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptideIII, and IL-3. 1991. *J Immunol* 147:1920.

**Kuna, P., Reddigari, S. R., Rucinski, D., Oppenheim, J. J. and Kaplan, A. P.** Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils. 1992a. *J Exp Med* 175:489.

- Kuna, P., Reddigari, S. R., Rucinski, D., Schall, T. J. and Kaplan, A. P.** Chemokines of the alpha, beta-subclass inhibit human basophils' responsiveness to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. **1995.** *J Allerg Clin Immunol* 95:574.
- Kuna, P., Reddigari, S. R., Schall, T. J., Rucinski, D., Viksman, M. Y. and Kaplan, A. P.** RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. **1992b.** *J Immunol* 149:636.
- Kurland, J. I. and Bockman, R.** Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages. **1978.** *J Exp Med* 147:952.
- Kwon, O. J., Jose, P. J., Robbins, R. A., Schall, T. J., Williams, T. J. and Barnes, P. J.** Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. **1995.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:488.
- Laberge, S., Cruikshank, W., Beer, D. and Center, D.** Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. **1996.** *J Immunol* 156:310.
- Lack, G., Nelson, H. S., Amran, D., Oshiba, A., Jung, T., Bradley, K. L., Giclas, P. C. and Gelfand, E. W.** Rush immunotherapy results in allergen-specific alterations in lymphocyte function and interferon-gamma production in CD4+ T cells. **1997.** *J Allergy Clin Immunol* 99:530.
- Lake, R. A., O'Hehir, R. E., Verhoef, A. and Lamb, J. R.** CD28 mRNA rapidly decays when activated T cells are functionally anergized with specific peptide. **1993.** *Int Immunol* 5:461.
- Lamkhioed, B., Aldebert, D., Gounni, A. S., Delaporte, E., Goldman, M., Capron, A. and Capron, M.** Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. **1995a.** *Int Arch Allergy Immunol* 107:122.
- Lamkhioed, B., Gounni, A. S., Gruart, V., Pierce, A., Capron, A. and Capron, M.** Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. **1995b.** *Eur J Immunol* 25:117.
- Lanzavecchia, A.** Antigen-specific interaction between T and B cells. **1985.** *Nature* 314:537.
- Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J. and Matsushima, K.** The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. **1989.** *Science* 243:1464.
- Ledru, E., Pestel, J., Tsiropoulos, A., Joseph, M., Wallaert, B., Tonnel, A. B. and Capron, A.** Lymphocyte-mediated regulation of platelet activation during desensitization in patients with hymenoptera venom hypersensitivity. **1988.** *Clin Exp Immunol* 73:198.
- Lee, T., Lenihan, D. J., Malone, B., Roddy, L. L. and Wasserman, S. I.** Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. **1984.** *J Biol Chem* 259:5526.
- Lee, T. H. and Lane, S. J.** The role of macrophages in the mechanisms of airway inflammation in asthma. **1992.** *Am Rev Respir Dis* 145:S27.
- Lenschow, D. J., Su, G. H., Zuckerman, L. A., Nabavi, N., Jellis, C. L., Gray, G. S., Miller, J. and Bluestone, J. A.** Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. **1993.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11054.
- Leonard, E. D., Skeel, A. and Yoshimura, T.** Biological aspects of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). In Westwick, J., S.L. Kunkel, I. Lundley, eds. Chemotactic cytokines : biology of the inflammatory peptide supergene family. **1991.** *New York : Plenum* 305:57.
- Lesourd, A., Gossot, D., de Roquancourt, A., Aillet, G., Dubost, C. and Brocheriou, C.** [Carcinoid tumor of the breast. Apropos of a case with immunohistochemical and ultrastructural study]. **1987.** *Arch Anat Cytol Pathol* 35:279.
- Letellier, M., Nakajima, T., Pulido Cejudo, G., Hofstetter, H. and Delespesse, G.** Mechanism of formation of human IgE-binding factors (soluble CD23): III. Evidence for a receptor (Fc epsilon RII)-associated proteolytic activity. **1990.** *J Exp Med* 172:693.
- Levi-Schaffer, F., Barkans, J., Newman, T., Ying, S., Wakelin, M., Hohenstein, R., Barak, V., Lacy, P., Kay, A. and Moqbel, R.** Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. **1996.** *Immunology* 87:155.
- Leynadier, F., Abuaf, N., Halpern, G. M., M., M., Garcia-Duarte, C. and Dry, J.** Blocking IgG antibodies after rush immunotherapy with mites. **1986.** *Ann. Allergy* 57:325.

- Li, H., Sim, T., Grant, J. and Alam, R.** The production of macrophage inflammatory protein-1 alpha by human basophils. **1996.** *J Immunol* 157:1207.
- Li, H., Sim, T. C. and Alam, R.** IL-13 released by and localized in human basophils. **1996.** *J Immunol* 156:4833.
- Li, S. G., Ottenhoff, T. H., Van den Elsen, P., Koning, F., Zhang, L., Mak, T. and De Vries, R. R.** Human suppressor T cell clones lack CD28. **1990.** *Eur J Immunol* 20:1281.
- Liao, F., Rabin, R., Yannelli, J., Koniaris, L., Vanguri, P. and Farber, J.** Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. **1995.** *J Exp Med* 182:1301.
- Life, P., Aubry, J. P., Estoppey, S., Schnuriger, V. and Bonnefoy, J. Y.** CD28 functions as an adhesion molecule and is involved in the regulation of human IgE synthesis. **1995.** *Eur J Immunol* 25:333.
- Light, W. C., Reisman, R. E., Shimizu, M. and Arbesman, C. E.** Unusual reactions following insect stings. Clinical features and immunologic analysis. **1977.** *J Allergy Clin Immunol* 59:391.
- Lim, K. G., Wan, H. C., Bozza, P. T., Resnick, M. B., Wong, D. T., Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., Center, D. M. and Weller, P. F.** Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. **1996.** *J Immunol* 156:2566.
- Lin, Y., Kimmel, L. H., Myles, D. G. and Primakoff, P.** Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. **1993.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10071.
- Lindley, I., Aschauer, H., Seifert, J. M., Lam, C., Brunowsky, W., Kownatzki, E., Thelen, M., Peveri, P., Dewald, B., Tscherner, V. v., Walz, A. and Baggiolini, M.** Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor. **1988.** *Proc Natl Acad Sci* 85:9199.
- Lindstein, T., June, C., Ledbetter, J., Stella, G. and Thompson, C.** Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. **1989.** *Science* 244:339.
- Linsley, P. S., Bradshaw, J., Urnes, M., Grosmaire, L. and Ledbetter, J. A.** CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signaling. **1993.** *J Immunol* 150:3161.
- Linsley, P. S., Clark, E. A. and Ledbetter, J. A.** T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. **1990.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:5031.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A. and Peach, R.** Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors [published erratum appears in *Immunity* 1995 Feb;2(2):following 203]. **1994.** *Immunity* 1:793.
- Liu, F. T.** S-type mammalian lectins in allergic inflammation. **1993.** *Immunol Today* 14:486.
- Liu, F. T. and Orida, N.** Synthesis of surface immunoglobulin E receptor in *Xenopus* oocytes by translation of mRNA from rat basophilic leukemia cells. **1984.** *J Biol Chem* 259:10649.
- Loveless, M. H. I.** The presence of two antibodies related to the same pollen antigen in the serum of treated hay fever patients. **1940.** *J. Immunol.* 38:25.
- Lu, G., Kochoumian, L. and King, T. P.** Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. **1995.** *J Biol Chem* 270:4457.
- Lu, G., Villalba, M., Coscia, M. R., Hoffman, D. R. and King, T. P.** Sequence analysis and antigenic cross-reactivity of a venom allergen, antigen 5, from hornets, wasps, and yellow jackets. **1993.** *J Immunol* 150:2823.
- Lundgren, M., Persson, U., Larsson, P., Magnusson, C., Smith, C. I., Hammarstrom, L. and Severinson, E.** Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. **1989.** *Eur J Immunol* 19:1311.
- M'Rini, C., Pipy, B., Rami, J. and Besombes, J. P.** Arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages from actively sensitized guinea-pigs: effects of sensitization and specific allergen. **1994.** *Biochim Biophys Acta* 1213:46.

- M'Rini Puel, C., Thardin, J. F., Forgue, M. F., Cambon, C., Seguelas, M. H. and Pipy, B. Arachidonic acid metabolism of rat peritoneal macrophages after passive sensitization and allergen challenge. 1993. *Biochim Biophys Acta* 1167:165.
- Mac Donald, H., Baschieri, S. and Lees, R. Clonal expansion precedes anergy and death of V $\beta$ 8+ peripheral T cells responding to staphylococcal enterotoxin B *in vivo*. 1991. *Eur J Immunol* 21:1963.
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M. and O'Garra, A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. 1995. *J Immunol* 154:5071.
- Maekawa, N., Kawabe, T., Sugie, K., Kawakami, T., Maeda, Y., Uchida, A. and Yodoi, J. Induction of Fc epsilon RII/CD23 on PHA-activated human peripheral blood T lymphocytes and association of fyn tyrosine kinase with Fc epsilon RII/CD23. 1992. *Int J Tissue React* 14:121.
- Maestrelli, P., Del Prete, G. F., De Carli, M., D'Elia, M. M., Saetta, M., Di Stefano, A., Mapp, C. E., Romagnani, S. and Fabbri, L. M. CD8 T-cell clones producing interleukin-5 and interferon-gamma in bronchial mucosa of patients with asthma induced by toluene diisocyanate. 1994. *Scand J Work Environ Health* 20:376.
- Maggi, E., Biswas, P., Del Prete, G., Parronchi, P., Macchia, D., Simonelli, C., Emmi, L., De Carli, M., Tiri, A., Ricci, M. and et al. Accumulation of Th-2-like helper T cells in the conjunctiva of patients with vernal conjunctivitis. 1991. *J Immunol* 146:1169.
- Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Ruggi, F. S., De Carli, M., Ricci, M. and Romagnani, S. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. 1992. *J Immunol* 148:2142.
- Mahmood, T., Wall, H., Sobus, S., Stechshulte, D. J. and Abdou, N. I. Modulation of venom-induced leukocyte histamine release by mononuclear cells. 1982. *J Allergy Clin Immunol* 70:445.
- Malling, H. J. and Stahl Skov, P. Diagnosis and immunotherapy of mould allergy. VIII. Qualitative and quantitative estimation of IgE in Cladosporium immunotherapy. 1988. *Allergy* 43:228.
- Malynn, B. A., Romeo, D. T. and Wortis, H. H. Antigen-specific B cells efficiently present low doses of antigen for induction of T cell proliferation. 1985. *J Immunol* 135:980.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M. P., Maggi, E., Trinchieri, G. and Romagnani, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. 1993. *J Exp Med* 177:1199.
- Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T. J., Galanaud, P. and Emilie, D. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  and inhibition by IL-4 and IL-13. 1995. *J Immunol* 154:1870.
- Marie, C., Fitting, C., Cheval, C., Losser, M.R., Carlet, J., Payen, D., Foster, K. and Cavillon, J.M. Presence of high levels of leukocyte-associated interleukin-8 upon cell activation and in patients with sepsis syndrome. 1997. *Infect Immun* 65: 865.
- Marini, M., Vittori, E., Hollemborg, J. and Mattoli, S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 89:1001.
- Marsh, D. G., Neely, J. D., Breazeale, D. R., Ghosh, B., Freidhoff, L. R., Ehrlich Kautzky, E., Schou, C., Krishnaswamy, G. and Beaty, T. H. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. 1994. *Science* 264:1152.
- Masuda, A., Kasajima, T., Mori, N. and Oka, K. Immunohistochemical study of low affinity Fc receptor for IgE in reactive and neoplastic follicles. 1989. *Clin Immunol Immunopathol* 53:309.
- Matloff, S. M., Kisielis, I. K. and Rocklin, R. E. Reduced production of histamine-induced suppressor factor (HSF) by atopic mononuclear cells and decreased prostaglandin E2 output by HSF-stimulated atopic monocytes. 1983. *J Allergy Clin Immunol* 72:359.
- Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C. and Oppenheim, J. J. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. 1989. *J Exp Med* 169:1485.

- Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, S. and Lavu, S.** Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. **1988.** *J Exp Med* 167:1883.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolff-Winiski, B., Jouvin, M., Kilgus, O., Kinet, J. and Stingl, G.** Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (FcεRI) on monocytes of atopic individuals. **1994.** *J Exp Med* 179:745.
- Maurer, D., Fiebiger, S., Ebner, C., Reininger, B., Fischer, G. F., Wichlas, S., Jouvin, M. H., Schmitt Egenolf, M., Kraft, D., Kinet, J. P. and Stingl, G.** Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. **1996.** *J Immunol* 157:607.
- Max, E. E., Battey, J., Ney, R., Kirsch, I. R. and Leder, P.** Duplication and deletion in the human immunoglobulin epsilon genes. **1982.** *Cell* 29:691.
- McHugh, S. M., Deighton, J., Stewart, A. G., Lachmann, P. J. and Ewan, P. W.** Bee venom immunotherapy induces a shift in cytokine responses from a TH-2 to a TH-1 dominant pattern: comparison of rush and conventional immunotherapy. **1995.** *Clin Exp Allergy* 25:828.
- McHugh, S. M. and Ewan, P. W.** Reduction of increased serum neutrophil chemotactic activity following effective hyposensitization in house dust mite allergy. **1989.** *Clin Exp Allergy* 19:327.
- McHugh, S. M., Lavelle, B., Kemeny, D. M., Patel, S. and Ewan, P. W.** A placebo-controlled trial of immunotherapy with two extracts of dermatophagoides pteronyssinus in allergic rhinitis, comparing clinical outcome with changes in antigen-specific IgE, IgG, and IgG subclasses. **1990.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 86:521.
- McKenzie, A. N., Culpepper, J. A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B. G., Menon, S. and et al.** Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. **1993.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3735.
- McManus, L. M., Morley, C. A., Levine, S. P. and Pinckard, R. N.** Platelet activating factor (PAF) induced release of platelet factor 4 (PF4) in vitro and during IgE anaphylaxis in the rabbit. **1979.** *J Immunol* 123:2835.
- McMenamin, C. and Holt, P. G.** The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. **1993.** *J Exp Med* 178:889.
- McMenamin, C., Pimm, C., McKersey, M. and Holt, P. G.** Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells. **1994.** *Science* 265:1869.
- Melewicz, F. M. and Spiegelberg, H. L.** Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. **1980.** *J Immunol* 125:1026.
- Metzger, W. J., Hunninghake, G. W. and Richerson, H. B.** Late asthmatic responses: inquiry into mechanisms and significance. **1985.** *Clin Rev Allergy* 3:145.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M., Dumont, X., Guillemot, J. C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B. and et al.** Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **1993.** *Nature* 362:248.
- Miyajima, H., Hirano, T., Hirose, S., Karasuyama, H., Okumura, K. and Ovary, Z.** Suppression by IL-2 of IgE production by B cells stimulated by IL-4. **1991.** *J Immunol* 146:457.
- Molkhou, P. and Pinon, C.** Allergie aux insectes. **1992.** Dans *Allergologie*, Charpin, J. and Vervloet, D. *Medecine-sciences*, Flammarion, 3ème édition, chapitre 65 : 882.
- Möller, A., Lippert, U., Lessmann, D., Kolde, G., Hamann, K., Welker, P., Schadendorf, D., Rosenbach, T., Luger, T. and Czarnetzki, B. M.** Human mast cells produce IL-8. **1993.** *J Immunol* 151:3261.
- Monteiro, R. C., Hostoffer, R. W., Cooper, M. D., Bonner, J. R., Gartland, G. L. and Kubagawa, H.** Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. **1993.** *J Clin Invest* 92:1681.

- Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A. and Mosmann, T. R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRFI [published erratum appears in *Science* 1990 Oct 26;250(4980):494]. 1990. *Science* 248:1230.
- Moqbel, R., Hamid, Q., Ying, S., Barkans, J., Hartnell, A., Tsiopoulos, A., Wardlaw, A. J. and Kay, A. B. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. 1991. *J Exp Med* 174:749.
- Moqbel, R., Ying, S., Barkans, J., Newman, T. M., Kimmitt, P., Wakelin, M., Taborda Barata, L., Meng, Q., Corrigan, C. J., Durham, S. R. and et al. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. 1995. *J Immunol* 155:4939.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 136:2348.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. 1989. *Adv Immunol* 46:111.
- Mossalayi, M., Paul-Eugene, N., Ouaz, F., Arock, M., Kolb, J., Kilchherr, E., Debre, P. and Dugas, B. Involvement of Fc epsilon RII/CD23 and L-arginine-dependent pathway in IgE-mediated stimulation of human monocyte functions. 1994. *Int Immunol* 6:931.
- Mudde, G. C., Bheekha, R. and Bruijnzeel Koomen, C. A. Consequences of IgE/CD23-mediated antigen presentation in allergy. 1995. *Immunol Today* 16:380.
- Mudde, G. C., Hansel, T. T., von Reijssen, F. C., Osterhoff, B. F. and Bruijnzeel Koomen, C. A. IgE: an immunoglobulin specialized in antigen capture? [see comments]. 1990. *Immunol Today* 11:440.
- Mueller, H. L. Diagnosis and treatment of insect sensitivity. 1966. *J Asthma Res* 3:331.
- Müller, U. R., Helbling, A. and Bischof, M. Predictive value of venom-specific IgE, IgG, and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honey bee venom. 1989. *Allergy* 44:412.
- Murphy, E. E., Terres, G., Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Mattson, J., Lanier, L., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. and O'Garra, A. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. 1994. *J Exp Med* 180:223.
- Nagata, M., Shibasaki, M., Sakamoto, Y., Fukuda, T., Makino, S., Yamamoto, K. and Dohi, Y. Specific immunotherapy reduces the antigen-dependent production of eosinophil chemotactic activity from mononuclear cells in patients with atopic asthma. 1994. *J Allergy Clin Immunol* 94:160.
- Nagaya, H. Induction of antigen-specific suppressor cells in patients with hay fever receiving immunotherapy. 1985. *J Allergy Clin Immunol* 75:388.
- Nagy, L., Lee, T. H. and Kay, A. B. Neutrophil chemotactic activity in antigen-induced late asthmatic reactions. 1982. *N Engl J Med* 306:497.
- Nakagawa, T. IgG subclass antibodies in response to house dust mite immunotherapy. 1987. *N Engl Reg Allergy Proc* 8:423.
- Nakagawa, T. and de Weck, A. L. Membrane receptors for the IgG4 subclass on human basophils and mast cells. 1983. *Clin Rev Allergy* 1:197.
- Nakagawa, T., Kozeki, H., Katagiri, J., Fujita, Y., Yamashita, N., Miyamoto, T. and Skvaril, F. Changes of house dust mite-specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies during immunotherapy in patients with perennial rhinitis. 1987. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 82:95.
- Nataf, P., Guinépain, M. T. and Herman, D. Rush venom immunotherapy: a 3-day programme for hymenoptera sting allergy. 1984. *Clin Allergy* 14:269.
- Nish, W. A., Charlesworth, E. N., Davis, T. L., Whisman, B. A., Valtier, S., Charlesworth, M. G. and Leiferman, K. M. The effect of immunotherapy on the cutaneous late phase response to antigen. 1994. *J Allergy Clin Immunol* 93:484.
- Nonaka, M., Nonaka, R., Woolley, K., Adelroth, E., Miura, K., Okhawara, Y., Glibetic, M., Nakano, K., O'Byrne, P., Dolovich, J. and et al. Distinct immunohistochemical localization of

- IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. **1995.** *J Immunol* 155:3234.
- Noon, L. and Cantar, B. C. Prophylactic inoculation against hay fever. **1911.** *Lancet* 1:1572.
- Norman, P. and Barnes, P. Is there a role for immunotherapy in the treatment of asthma? (Editorial). **1996.** *Am J Respir Crit Care Med* 154:1225.
- Norman, P. S. Immunotherapy. **1981.** *Prog. Allergy* 32:318.
- Norman, P. S., Winkenwerder, W. L. and Lichtenstein, L. M. Immunotherapy of hay fever with ragweed antigen E: comparisons with whole pollen extract and placebos. **1968.** *J Allergy* 42:93.
- Noso, N., Proost, P., Van Damme, J. and Schroder, J. M. Human monocyte chemotactic proteins-2 and 3 (MCP-2 and MCP-3) attract human eosinophils and desensitize the chemotactic responses towards RANTES. **1994.** *Biochem Biophys Res Commun* 200:1470.
- Nusslein, H. G. and Baenkler, H. W. Spontaneous loss of hypersensitivity in patients allergic to bee or wasp stings; detection by venom-induced histamine release. **1985.** *Ann Allergy* 54:516.
- Nusslein, H. G. and Spiegelberg, H. L. Interleukin-4 induces both IgG4 and IgE secretion by peripheral blood B cells. **1990.** *J Clin Lab Anal* 4:414.
- O'Byrne, P. M., Leikauf, G. D., Aizawa, H., Bethel, R. A., Ueki, I. F., Holtzman, M. J. and Nadel, J. A. Leukotriene B4 induces airway hyperresponsiveness in dogs. **1985.** *J Appl Physiol* 59:1941.
- O'hehir, R. E., Lake, R. A., Schall, T. J., Yssel, H., Panagiotopoulou, E. and Lamb, J. R. Regulation of cytokine and chemokine transcription in a human TH2 type T-cell clone during the induction phase of anergy. **1996.** *Clin Exp Allergy* 26:20.
- O'Hehir, R. E., Yssel, H., Verma, S., de Vries, J. E., Spits, H. and Lamb, J. R. Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy. **1991.** *Int Immunol* 3:819.
- Ochensberger, B., Daepf, G. C., Rihs, S. and Dahinden, C. A. Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and -independent activation. **1996.** *Blood* 88:3028.
- Ohkawara, Y., Yamauchi, K., Tanno, Y., Tamura, G., Ohtani, H., Nagura, H., Ohkuda, K. and Takishima, T. Human lung mast cells and pulmonary macrophages produce tumor necrosis factor-alpha in sensitized lung tissue after IgE receptor triggering. **1992.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:385.
- Ohman, J. L., Findlay, S. R. and Leitermann, K. M. Immunotherapy in cat-induced asthma. Double-blind trial with evaluation of in vivo and in vitro responses. **1984.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 74:230.
- Ohmori, H., Hikida, M. and Takai, T. Prostaglandin E2 as a selective stimulator of antigen-specific IgE response in murine lymphocytes. **1990.** *Eur J Immunol* 20:2499.
- Okayama, Y., Petit-Frère, C., Kassel, O., Quint, D., Semper, A., Holgate, S. and Church, M. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA in human mast cells via FcεRI in the presence of SCF. [abstract]. **1994.** *Allergy Clin Immunol News* 37:131.
- Opdenakker, G., Froyen, G., Fiten, P., Proost, P. and Van Damme, J. Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. **1993.** *Biochem Biophys Res Commun* 191:535.
- Oppenheim, J. J., Zachariae, C. O., Mukaida, N. and Matsushima, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. **1991.** *Annu Rev Immunol* 9:617.
- Otsuka, H., Mezawa, A., Ohnishi, M., Okubo, K., Seki, H. and Okudo, M. Changes in metachromatic cells during allergen immunotherapy. **1991.** *Clin. Exp. Allergy* 21:115.
- Ouaaz, F., Sola, B., Issaly, F., Kolb, J. P., Davi, F., Mentz, F., Arock, M., Paul Eugene, N., Korner, M., Dugas, B. and et al. Growth arrest and terminal differentiation of leukemic myelomonocytic cells induced through ligation of surface CD23 antigen. **1994.** *Blood* 84:3095.
- Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J. and Spits, H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. **1988a.** *J Immunol* 141:849.

- Palmer-Crocker, R., Hughes, C. and Pober, J.** IL-4 and IL-13 activate the JAK2 tyrosine kinase and Stat6 in cultured human vascular endothelial cells through a common pathway that does not involve the gamma c chain. **1996.** *J Clin Invest* 98:604.
- Pancre, V., Auriault, C., Joseph, M., Cesbron, J. Y., Kusnierz, J. P. and Capron, A.** A suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. **1986.** *J Immunol* 137:585.
- Parronchi, P., De Carli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Macchia, D., Maggi, E., Del Prete, G., Ricci, M. and Romagnani, S.** Aberrant interleukin (IL)-4 and IL-5 production in vitro by CD4+ helper T cells from atopic subjects. **1992.** *Eur J Immunol* 22:1615.
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccinni, M. P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A. A. and Romagnani, S.** Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. **1991.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4538.
- Parronchi, P., Mohapatra, S., Sampognaro, S., Giannarini, L., Wahn, U., Chong, P., Mohapatra, S., Maggi, E., Renz, H. and Romagnani, S.** Effects of interferon-alpha on cytokine profile, T cell receptor repertoire and peptide reactivity of human allergen-specific T cells. **1996.** *Eur J Immunol* 26:697.
- Parronchi, P., Tiri, A., Macchia, D., De Carli, M., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Del Prete, G., Ricci, M. and Romagnani, S.** Noncognate contact-dependent B cell activation can promote IL-4-dependent in vitro human IgE synthesis. **1990.** *J Immunol* 144:2102.
- Paul Eugene, N., Kolb, J. P., Abadie, A., Gordon, J., Delespesse, G., Sarfati, M., Mencia Huerta, J. M., Braquet, P. and Dugas, B.** Ligation of CD23 triggers cAMP generation and release of inflammatory mediators in human monocytes. **1992.** *J Immunol* 149:3066.
- Paul Eugene, N., Kolb, J. P., Sarfati, M., Arock, M., Ouaz, F., Debre, P., Mossalayi, D. M. and Dugas, B.** Ligation of CD23 activates soluble guanylate cyclase in human monocytes via an L-arginine-dependent mechanism. **1995a.** *J Leukoc Biol* 57:160.
- Peltz, G.** A role for CD4+ T-cell subsets producing a selective pattern of lymphokines in the pathogenesis of human chronic inflammatory and allergic diseases. **1991.** *Immunol Rev* 123:23.
- Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J. Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N., Arai, K., Banchereau, J. and et al.** IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. **1988b.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6880.
- Pene, J., Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Wideman, J., Bonnefoy, J. Y. and De Vries, J. E.** Interleukin 5 enhances interleukin 4-induced IgE production by normal human B cells. The role of soluble CD23 antigen. **1988a.** *Eur J Immunol* 18:929.
- Peterson, L. and Conrad, D.** Fine specificity, structure and proteolytic susceptibility of the human lymphocyte receptor for IgE. **1985.** *J Immunol* 135:2654.
- Pfeiffer, C., Stein, J., Southwood, S., Ketelaar, H., Sette, A. and Bottomly, K.** Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation in vivo. **1995.** *J Exp Med* 181:1569.
- Pforte, A., Breyer, G., Prinz, J. C., Gais, P., Burger, G., Haussinger, K., Rieber, E. P., Held, E. and Ziegler Heitbrock, H. W.** Expression of the Fc-receptor for IgE (Fc epsilon RII, CD23) on alveolar macrophages in extrinsic allergic alveolitis. **1990.** *J Exp Med* 171:1163.
- Pienkowski, M. M., Norman, P. S. and Lichtenstein, L. M.** Suppression of late-phase skin reactions by immunotherapy with ragweed extract. **1985.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 76:729.
- Platts-Mills, T. A. E., Von Maur, R. K., Ishizaka, K., Norman, P. S. and Lichtenstein, L. M.** IgA and IgG anti-ragweed antibodies in nasal secretion : quantitative measurements of antibodies and correlation with inhibition of histamine release. **1976.** *J. Clin. Invest.* 57:1041.
- Plaut, M., Pierce, J. H., Watson, C. J., Hanley Hyde, J., Nordan, R. P. and Paul, W. E.** Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. **1989.** *Nature* 339:64.
- Ponath, P. D., Qin, S., Ringler, D. J., Clark Lewis, I., Wang, J., Kassam, N., Smith, H., Shi, X., Gonzalo, J. A., Newman, W., Gutierrez Ramos, J. C. and Mackay, C. R.** Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. **1996.** *J Clin Invest* 97:604.

- Poudrier, J. and Owens, T.** CD54/intercellular adhesion molecule 1 and major histocompatibility complex II signaling induces B cells to express interleukin 2 receptors and complements help provided through CD40 ligation. **1994.** *J Exp Med* 179:1417.
- Powell, N., Humbert, M., Durham, S. R., Assoufi, B., Kay, A. B. and Corrigan, C. J.** Increased expression of mRNA encoding RANTES and MCP-3 in the bronchial mucosa in atopic asthma. **1996.** *Eur Respir J* 9:2454.
- Power, C. A., Clemetson, J. M., Clemetson, K. J. and Wells, T. N.** Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets. **1995.** *Cytokine* 7:479.
- Pruzansky, J. and Patterson, R.** Immunologic changes during hyposensitization therapy. **1968.** *JAMA* 203:289.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal Malefyt, R. and de Vries, J. E.** Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. **1993.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3730.
- Punnonen, J., de Waal Malefyt, R., van Vlasselaer, P., Gauchat, J. F. and de Vries, J. E.** IL-10 and viral IL-10 prevent IL-4-induced IgE synthesis by inhibiting the accessory cell function of monocytes. **1993a.** *J Immunol* 151:1280.
- Purkerson, J. and Isakson, P.** A two-signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. **1992b.** *Faseb J* 6:3245.
- Ra, C., Jouvin, M. H. and Kinet, J. P.** Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. **1989.** *J Biol Chem* 264:15323.
- Rajakulasingam, K., Durham, S., O'Brien, F., Humbert, M., Barata, L., Reece, L., Kay, A. and Grant, J.** Enhanced expression of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha chain in human allergen-induced rhinitis with co-localization to mast cells, macrophages, eosinophils, and dendritic cells. **1997.** *J Allergy Clin Immunol* 100:78.
- Rak, S., Björnson, A., Hakanson, A., Sörenson, S. and Venge, P.** The effect of immunotherapy on eosinophil accumulation and production of eosinophil chemotactic activity in the lung of subjects with asthma during natural pollen exposure. **1991.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 88:878.
- Rak, S., Hakanson, L. and Venge, P.** Immunotherapy abrogates the generation of eosinophil and neutrophil chemotactic activity during pollen season. **1990.** *J. Allergy Clin. Immunol.* 86:706.
- Rak, S., Hallden, G., Sorenson, S., Margari, V. and Scheynius, A.** The effect of immunotherapy on T-cell subsets in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid in pollen-allergic patients. **1993.** *Allergy* 48:460.
- Ralph, P., Nakoinz, I., Sampson Johannes, A., Fong, S., Lowe, D., Min, H. Y. and Lin, L.** IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. **1992.** *J Immunol* 148:808.
- Ranheim, E. A. and Kipps, T. J.** Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. **1993.** *J Exp Med* 177:925.
- Rankin, J. A., Hitchcock, M., Merrill, W., Bach, M. K., Brashler, J. R. and Askenase, P. W.** IgE-dependent release of leukotriene C4 from alveolar macrophages. **1982.** *Nature* 297:329.
- Rathanaswami, P., Hachicha, M., Sadick, M., Schall, T. and McColl, S.** Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. **1993.** *J Biol Chem* 268:5834.
- Redington, A., Bradding, P., Douglass, J., Teran, L., Roberts, J., Holgate, S. and Howarth, P.** Bronchial epithelial cytokine production in asthmatics and non-asthmatics. [abstract]. **1993.** *Thorax* 48:1081.
- Reiner, S. L., Wang, Z. E., Hatam, F., Scott, P. and Locksley, R. M.** TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. **1993.** *Science* 259:1457.
- Reinhold, U., Wehrmann, W., Kukel, S. and Kreysel, H.** Evidence that defective interferon-gamma production in atopic dermatitis patients is due to intrinsic abnormalities. **1990.** *Clin Exp Immunol* 79:374.

- Reisman, R. E. and Livingston, A.** Venom immunotherapy: 10 years of experience with administration of single venoms and 50 micrograms maintenance doses. **1992.** *J Allergy Clin Immunol* 89:1189.
- Reisman, R. E., Mueller, U., Wypych, J., Elliott, W. and Arbesman, C. E.** Comparison of the allergenicity and antigenicity of yellow jacket and hornet venoms. **1982a.** *J Allergy Clin Immunol* 69:268.
- Reisman, R. E., Muller, U. R., Wypych, J. I. and Lazell, M. I.** Studies of coexisting honeybee and vespid-venom sensitivity. **1984.** *J Allergy Clin Immunol* 73:246.
- Reisman, R. E., Wypych, J. I., Mueller, U. R. and Grant, J. A.** Comparison of the allergenicity and antigenicity of Polistes venom and other vespid venoms. **1982b.** *J Allergy Clin Immunol* 70:281.
- Renz, H., Saloga, J., Bradley, K. L., Loader, J. E., Greenstein, J. L., Larsen, G. and Gelfand, E. W.** Specific V beta T cell subsets mediate the immediate hypersensitivity response to ragweed allergen. **1993.** *J Immunol* 151:1907.
- Ricci, M., Rossi, O., Bertoni, M. and Matucci, A.** The importance of Th2-like cells in the pathogenesis of airway allergic inflammation. **1993.** *Clin Exp Allergy* 23:360.
- Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. and Flavell, R. A.** Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. **1997.** *J Exp Med* 185:461.
- Riske, F., Hakimi, J., Mallamaci, M., Griffin, M., Pilson, B., Tobkes, N., Lin, P., Danho, W., Kochan, J. and Chizzonite, R.** High affinity human IgE receptor (Fc epsilon RI). Analysis of functional domains of the alpha-subunit with monoclonal antibodies. **1991.** *J Biol Chem* 266:11245.
- Robinson, D., Hamid, Q., Bentley, A., Ying, S., Kay, A. B. and Durham, S. R.** Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. **1993a.** *J Allergy Clin Immunol* 92:313.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B.** Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **1992.** *N Engl J Med* 326:298.
- Robinson, D. S., Ying, S., Bentley, A. M., Meng, Q., North, J., Durham, S. R., Kay, A. B. and Hamid, Q.** Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. **1993b.** *J Allergy Clin Immunol* 92:397.
- Rocklin, R. E., Pence, H., Kaplan, H. and Evans, R.** Cell-mediated immune response of ragweed-sensitive patients to ragweed antigen E. In vitro lymphocyte transformation and elaboration of lymphocyte mediators. **1974.** *J Clin Invest* 53:735.
- Rocklin, R. E., Sheffer, A. L., Greineder, D. K. and Melmon, K. L.** Generation of antigen-specific suppressor cells during allergy desensitization. **1980.** *N Engl J Med* 302:1213.
- Rogge, L., Barberis-Maino, L., Biffi, M., Passini, N., Presky, D.H., Gubler, U. and Sinigaglia, F.** Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. **1997.** *J Exp Med* 185:825.
- Rollins, B. J., Stier, P., Ernst, T. and Wong, G. G.** The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. **1989.** *Mol Cell Biol* 9:4687.
- Romagnani, S.** Lymphokine production by human T cells in disease states. **1994.** *Annu Rev Immunol* 12:227.
- Romagnani, S.** Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. **1994.** *Curr Opin Immunol* 6:838.
- Romagnani, S.** Short analytical review. TH1 and TH2 in human diseases. **1996.** *Clin Immunol Immunopathol.* 80: 225.
- Rosenwasser, L. J., Klemm, D. J., Dresback, J. K., Inamura, H., Mascali, J. J., Klinnert, M. and Borish, L.** Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. **1995.** *Clin Exp Allergy* 2:74.
- Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S., Schall, T. and Dahinden, C.** RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. **1992.** *J Exp Med* 176:1489.

- Rousset, F., Garcia, E. and Banchereau, J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. **1991a.** *J Exp Med* 173:705.
- Rousset, F., Robert, J., Andary, M., Bonnin, J. P., Souillet, G., Chretien, I., Briere, F., Pene, J. and de Vries, J. E. Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. **1991b.** *J Allergy Clin Immunol* 87:58.
- Rouzer, C. A., Scott, W. A., Hamill, A. L., Liu, F. T., Katz, D. H. and Cohn, Z. A. Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes. **1982.** *J Exp Med* 156:1077.
- Sad, S., Marcotte, R. and Mosmann, T. R. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. **1995.** *Immunity* 2:271.
- Sadick, M. D., Heinzl, F. P., Holaday, B. J., Pu, R. T., Dawkins, R. S. and Locksley, R. M. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. **1990.** *J Exp Med* 171:115.
- Sager, N., Feldmann, A., Schilling, G., Kreitsch, P. and Neumann, C. House dust mite-specific T cells in the skin of subjects with atopic dermatitis: frequency and lymphokine profile in the allergen patch test [see comments]. **1992.** *J Allergy Clin Immunol* 89:801.
- Salgame, P., Abrams, J. S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R. L. and Bloom, B. R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **1991.** *Science* 254:279.
- Sallusto, F., Mackay, C. and Lanzavecchia, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. **1997.** *Science* 277:2005.
- Sarafi, M. N., Garcia Zepeda, E. A., MacLean, J. A., Charo, I. F. and Luster, A. D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. **1997.** *J Exp Med* 185:99.
- Sarfati, M. and Delespesse, G. Possible role of human lymphocyte receptor for IgE (CD23) or its soluble fragments in the in vitro synthesis of human IgE. **1988a.** *J Immunol* 141:2195.
- Sarfati, M., Rector, E., Rubio Trujillo, M., Wong, K., Schon, A. H. and Delespesse, G. In vitro synthesis of IgE by human lymphocytes. III. IgE-potentiating activity of culture supernatants from Epstein-Barr virus (EBV) transformed B cells. **1984.** *Immunology* 53:207.
- Sato, T. A., Widmer, M. B., Finkelman, F. D., Madani, H., Jacobs, C. A., Grabstein, K. H. and Maliszewski, C. R. Recombinant soluble murine IL-4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. **1993.** *J Immunol* 150:2717.
- Saxon, A., Ke, Z., Bahati, L. and Stevens, R. H. Soluble CD23 containing B cell supernatants induce IgE from peripheral blood B-lymphocytes and costimulate with interleukin-4 in induction of IgE. **1990.** *J Allergy Clin Immunol* 86:333.
- Schall, T. and Bacon, K. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. **1994.** *Curr Opin Immunol* 6:865.
- Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J. and Goeddel, D. V. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **1990.** *Nature* 347:669.
- Schall, T. J., Jongstra, J., Dyer, B. J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M. M. and Krensky, A. M. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. **1988.** *J Immunol* 141:1018.
- Scharenberg, A.M. and Kinet, J.P. Fc epsilon RI and the FcR-beta amplifier. **1997.** *Int Arch Allergy Immunol* 113: 42.
- Schröder, J. M., Mrowietz, U. and Christophers, E. Purification and partial biological characterization of a human lymphocyte derived peptide with potent neutrophil stimulating activity. **1988.** *J Immunol* 140:3524.
- Schröder, J. M., Noso, N., Sticherling, M. and Christophers, E. Role of eosinophil-chemotactic C-C chemokines in cutaneous inflammation. **1996.** *J Leukoc Biol* 59:1.

- Schroeder, J. T., MacGlashan, D. W., Jr., Kagey Sobotka, A., White, J. M. and Lichtenstein, L. M. IgE-dependent IL-4 secretion by human basophils. The relationship between cytokine production and histamine release in mixed leukocyte cultures. **1994a.** *J Immunol* 153:1808.
- Schroeder, J. T., MacGlashan, D. W., Jr., Kagey Sobotka, A., White, J. M. and Lichtenstein, L. M. Cytokine generation by human basophils. **1994b.** *J Allergy Clin Immunol* 94:1189.
- Schrum, S., Probst, P., Fleischer, B. and Zipfel, P. F. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. **1996.** *J Immunol* 157:3598.
- Scodras, J. M., Parhar, R. S., Kennedy, T. G. and Lala, P. K. Prostaglandin-mediated inactivation of natural killer cells in the murine decidua. **1990.** *Cell Immunol* 127:352.
- Scott, D. L., Otwinowski, Z., Gelb, M. H. and Sigler, P. B. Crystal structure of bee-venom phospholipase A2 in a complex with a transition-state analogue [published erratum appears in *Science* 1991 May 10;252(5007):764]. **1990.** *Science* 250:1563.
- Secrist, H., Chelen, C. J., Wen, Y., Marshall, J. D. and Umetsu, D. T. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. **1993.** *J Exp Med* 178:2123.
- Secrist, H., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T. Interleukin 4 production by CD4+ T cells from allergic individuals is modulated by antigen concentration and antigen-presenting cell type. **1995.** *J Exp Med* 181:1081.
- Seder, R. A., Gazzinelli, R., Sher, A. and Paul, W. E. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **1993.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10188.
- Seder, R. A., Germain, R. N., Linsley, P. S. and Paul, W. E. CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. **1994.** *J Exp Med* 179:299.
- Seder, R. A. and Paul, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **1994.** *Annu Rev Immunol* 12:635.
- Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M. and Fazekas de St. Groth, B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. **1992.** *J Exp Med* 176:1091.
- Seder, R. High-dose IL-2 and IL-15 enhance the in vitro priming of naive CD4+ T cells for IFN-gamma but have differential effects on priming for IL-4. **1996.** *J Immunol* 156:2413.
- Semper, A. E. and Hartley, J. A. Dendritic cells in the lung: what is their relevance to asthma? [editorial]. **1996.** *Clin Exp Allergy* 26:485.
- Settipane, G. A., Newstead, G. J. and Boyd, G. K. Frequency of Hymenoptera allergy in an atopic and normal population. **1972.** *J Allergy Clin Immunol* 50:146.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kundig, T. M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B. and Mak, T. W. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. **1993.** *Science* 261:609.
- Shakib, F., McLaughlan, P., Stanworth, D. R., Smith, E. and Fairburn, E. Elevated serum IgE and IgG4 in patients with atopic dermatitis. **1977.** *Br J Dermatol* 97:59.
- Sher, A., Oswald, I. P., Hieny, S. and Gazzinelli, R. T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **1993.** *J Immunol* 150:3982.
- Sherr, E., Macy, E., Kimata, H., Gilly, M. and Saxon, A. Binding the low affinity Fc epsilon R on B cells suppresses ongoing human IgE synthesis. **1989.** *J Immunol* 142:481.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M., Sarawar, S., Carson, R., Tripp, R., Chu, C., Quelle, F., Nosaka, T., Vignali, D., Doherty, P., Grosveld, G., Paul, W. and Ihle, J. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. **1996.** *Nature* 380:630.
- Shipolini, R. A., Callewaert, G. L., Cottrell, R. C. and Vernon, C. A. The amino-acid sequence and carbohydrate content of phospholipase A2 from bee venom. **1974.** *Eur J Biochem* 48:465.

- Shute, J.** Interleukin-8 is a potent eosinophil chemo-attractant [editorial]. 1994. *Clin Exp Allergy* 24:203.
- Shute, J. K., Lindley, I., Peichl, P., Holgate, S. T., Church, M. K. and Djukanovic, R.** Mucosal IgA is an important moderator of eosinophil responses to tissue-derived chemoattractants. 1995. *Int Arch Allergy Immunol* 107:340.
- Sim, T. C., Reece, L. M., Hilsmeier, K. A., Grant, J. A. and Alam, R.** Secretion of chemokines and other cytokines in allergen-induced nasal responses: inhibition by topical steroid treatment. 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 152:927.
- Slater, D., Martin, J. and Trowbridge, A.** The platelet in asthma [letter]. 1985. *Lancet* 1:110.
- Snapper, C. M. and Paul, W. E.** Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. 1987. *Science* 236:944.
- Snijdewint, F. G., Kalinski, P., Wierenga, E. A., Bos, J. D. and Kapsenberg, M. L.** Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. 1993. *J Immunol* 150:5321.
- Soldatova, L., Kochoumian, L. and King, T. P.** Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases. 1993. *FEBS Lett* 320:145.
- Soloway, P., Fish, S., Passmore, H., Gefter, M., Coffee, R. and Manser, T.** Regulation of the immune response to peptide antigens: differential induction of immediate-type hypersensitivity and T cell proliferation due to changes in either peptide structure or major histocompatibility complex haplotype. 1991. *J Exp Med* 174:847.
- Song, Z., Casolaro, V., Chen, R., Georas, S. N., Monos, D. and Ono, S. J.** Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. 1996. *J Immunol* 156:424.
- Sousa, A. R., Lane, S. J., Nakhosteen, J. A., Yoshimura, T., Lee, T. H. and Poston, R. N.** Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. 1994. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10:142.
- Sozzani, S., Luini, W., Molino, M., Jilek, P., Bottazzi, B., Cerletti, C., Matsushima, K. and Mantovani, A.** The signal transduction pathway involved in the migration induced by a monocyte chemotactic cytokine. 1991. *J Immunol* 147:2215.
- Sparholt, S. H., Olsen, O. T. and Schou, C.** The allergen specific B-cell response during immunotherapy. 1992. *Clin. Exp. Allergy* 22:648.
- Specht, C. and Kolsch, E.** The murine (H-2k) T-cell epitopes of bee venom phospholipase A2 lie outside the active site of the enzyme. Implications with respect to a paracrine activation of Th2 cells for an IgE antibody response. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 112:226.
- Stadler, B.** Anti-IgE autoantibodies: a possible specific feedback on the cytokine network in allergy? 1992. *Eur. Cytokine Netw.* 3:437.
- Starr, M. S. and Weinstock, M.** Studies of pollen allergy. III. The relationship between blocking antibody levels and symptomatic relief following hyposensitization with alpryal in hayfever subjects. 1970. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 38:514.
- Stellato, C., Beck, L. A., Gorgone, G. A., Proud, D., Schall, T. J., Ono, S. J., Lichtenstein, L. M. and Schleimer, R. P.** Expression of the chemokine RANTES by a human bronchial epithelial cell line. Modulation by cytokines and glucocorticoids. 1995. *J Immunol* 155:410.
- Stephan, V., Kuhr, J. and Urbanek, R.** Relevance of basophil histamine release changes during venom immunotherapy. 1989. *Allergy* 44:453.
- Sullivan, S. and Broide, D.** Compartmentalization of eosinophil granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in patients with asthma. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 97:966.
- Swain, S. L., Huston, G., Tonkonogy, S. and Weinberg, A.** Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. 1991. *J Immunol* 147:2991.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. and Huston, G.** IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. 1990. *J Immunol* 145:3796.

- Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U. and Murphy, K.M. Regulation of the interleukin (IL)-12R  $\beta$ 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. 1997. *J Exp Med* 185:817.
- Taguchi, T., McGhee, J., Coffman, R., Beagley, K., Eldridge, J., Takatsu, K. and Kiyono, H. Analysis of Th1 and Th2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4+ T cells that secrete IFN-gamma and IL-5. 1990. *J Immunol* 145:68.
- Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H. and Ravetch, J. V. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc $\gamma$ RII-deficient mice. 1996. *Nature* 379:346.
- Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. 1996. *Nature* 380:627.
- Takenaka, M., Tanaka, Y., Anan, S., Yoshida, H. and Ra, C. High affinity IgE receptor-mediated prostaglandin E2 production by monocytes in atopic dermatitis. 1995. *Int Arch Allergy Immunol* 108:247.
- Takizawa, F., Adamczewski, M. and Kinet, J. P. Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages as Fc gamma RII and Fc gamma RIII. 1992. *J Exp Med* 176:469.
- Tamir, R., Castracane, J. M. and Rocklin, R. E. Generation of suppressor cells in atopic patients during immunotherapy that modulate IgE synthesis. 1987. *J Allergy Clin Immunol* 79:591.
- Teran, L. M. and Davies, D. E. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:1005.
- Thierfelder, W., van Deursen, J., Yamamoto, K., Tripp, R., Sarawar, S., Carson, R., Sangster, M., Vignali, D., Doherty, P., Grosveld, G. and Ihle, J. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. 1996. *Nature* 382:171.
- Thyphronitis, G., Katona, I. M., Gause, W. C. and Finkelman, F. D. Germline and productive C epsilon gene expression during in vivo IgE responses. 1993. *J Immunol* 151:4128.
- Thyphronitis, G., Tsokos, G. C., June, C. H., Levine, A. D. and Finkelman, F. D. IgE secretion by Epstein-Barr virus-infected purified human B lymphocytes is stimulated by interleukin 4 and suppressed by interferon gamma. 1989. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5580.
- Tilmant, L., Dessaint, J. P., Tsiocopoulos, A., Tonnel, A. B. and Capron, A. Concomitant augmentation of CD4+ CD45R+ suppressor/inducer subset and diminution of CD4+ CDw29+ helper/inducer subset during rush hyposensitization in hymenoptera venom allergy. 1989. *Clin Exp Immunol* 76:13.
- Tomalski, M. D., King, T. P. and Miller, L. K. Expression of hornet genes encoding venom allergen antigen 5 in insects. 1993. *Arch Insect Biochem Physiol* 22:303.
- Tomioka, H. and Ishizaka, K. Mechanisms of passive sensitization. II. Presence of receptors for IgE on monkey mast cells. 1971. *J Immunol* 107:971.
- Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. 1989. *Adv Immunol* 47:187.
- Trinchieri, G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. 1993. *Immunol Today* 14:335.
- Truong, M. J., Gruart, V., Kusnierz, J. P., Papin, J. P., Loiseau, S., Capron, A. and Capron, M. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/epsilon BP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. 1993a. *J Exp Med* 177:243.
- Truong, M. J., Gruart, V., Liu, F. T., Prin, L., Capron, A. and Capron, M. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. 1993b. *Eur J Immunol* 23:3230.
- Tsai, L. C., Tang, R. B., Hung, M. W. and Chang, Z. N. Changes in the levels of house dust mite specific IgG4 during immunotherapy in asthmatic children. 1991. *Clin. Exp. Allergy* 21:367.
- Tsiocopoulos, A., Hamid, Q., Haczku, A., Jacobson, M. R., Durham, S. R., North, J., Barkans, J., Corrigan, C. J., Meng, Q., Moqbel, R. and et al. Kinetics of cell infiltration and cytokine messenger RNA expression after intradermal challenge with allergen and tuberculin in the same atopic individuals. 1994. *J Allergy Clin Immunol* 94:764.

- Tsicopoulos, A., Hamid, Q., Varney, V., Ying, S., Moqbel, R., Durham, S. R. and Kay, A. B.** Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. 1992. *J Immunol* 148:2058.
- Tsicopoulos, A., Labalette, M., Akoum, H., Duez, C., Wallaert, B., Dessaint, J. P. and Tonnel, A. B.** CD28 expression is increased in venom allergic patients but is not modified by specific immunotherapy. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:1119.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A. B., Vorng, H., Joseph, M., Wallaert, B., Kusnierz, J. P., Pestel, J. and Capron, A.** Lymphocyte-mediated inhibition of platelet cytotoxic functions during Hymenoptera venom desensitization: characterization of a suppressive lymphokine. 1990b. *Eur J Immunol* 20:1201.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A. B., Wallaert, B., Joseph, M., Ameisen, J. C., Ramon, P., Dessaint, J. P. and Capron, A.** Decrease of IgE-dependent platelet activation in Hymenoptera hypersensitivity after specific rush desensitization. 1988. *Clin Exp Immunol* 71:433.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A. B., Wallaert, B., Joseph, M., Ramon, P. and Capron, A.** A circulating suppressive factor of platelet cytotoxic functions after rush immunotherapy in Hymenoptera venom hypersensitivity. 1989. *J Immunol* 142:2683.
- Tsicopoulos, A., Tonnel, A. B., Wallaert, B., Ramon, P., Joseph, M. and Capron, A.** Short term decrease of skin test sensitivity after rush desensitization in Hymenoptera hypersensitivity. 1990a. *Clin. Exp. Allergy* 20:289.
- Tsubata, T., Wu, J. and Honjo, T.** B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. 1993. *Nature* 364:645.
- Uguccioni, M., Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S. H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M. and Baggiolini, M.** Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. 1996. *J Exp Med* 183:2379.
- Urbanek, P., Wang, Z. Q., Fetka, I., Wagner, E. F. and Busslinger, M.** Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP [see comments]. 1994. *Cell* 79:901.
- van Bever, H. P., Bridts, C. H., Moens, M. M., De Rijck, T. E., Mertens, A. V., De Clerck, L. S. and Stevens, W. J.** Lymphocyte transformation test with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) in normal children, asthmatic children and asthmatic children receiving hyposensitization. 1993. *Clin Exp Allergy* 23:661.
- Van Bever, H. P. and Stevens, W. J.** Suppression of the late asthmatic reaction by hyposensitization in asthmatic children allergic to house dust mite. 1989. *Clin. Exp. Allergy* 19:399.
- Van Bever, H. P. and Stevens, W. J.** Evolution of the late asthmatic reaction during immunotherapy and after stopping immunotherapy. 1990. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86:141.
- Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J. P. and Opdenakker, G.** Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. 1992. *J Exp Med* 176:59.
- van der Giessen, M., Homan, W. L., van Kernbeek, G., Aalberse, R. C. and Dieges, P. H.** Subclass typing of IgG antibodies formed by grass pollen-allergic patients during immunotherapy. 1976. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 50:625.
- van der Heijden, F. L., Joost van Neerven, R. J., van Katwijk, M., Bos, J. D. and Kapsenberg, M. L.** Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. 1993. *J Immunol* 150:3643.
- van der Stoep, N., Korver, W. and Logtenberg, T.** In vivo and in vitro IgE isotype switching in human B lymphocytes: evidence for a predominantly direct IgM to IgE class switch program. 1994. *Eur J Immunol* 24:1307.
- van der Zwan, J. C., Flinterman, J., Jankowski, I. G. and Kerckhaert, J. A.** Hyposensitisation to wasp venom in six hours. 1983. *Br Med J Clin Res Ed* 287:1329.
- Van Metre, T. E., Marsh, D., Adkinson, N. F., Kagey-Sobotka, A., Khattignavong, A., Norman, P. S. and Rosenberg, G. L.** Immunotherapy decreases skin sensitivity to cat extract. 1989. *J. Allergy Clin. Immunol.* 83:888.

- van Neerven, R. J., Ebner, C., Yssel, H., Kapsenberg, M. L. and Lamb, J. R. T-cell responses to allergens: epitope-specificity and clinical relevance. 1996. *Immunol Today* 17:526.
- van Reijssen, F. C., Bruijnzeel Koomen, C. A., Kalthoff, F. S., Maggi, E., Romagnani, S., Westland, J. K. and Mudde, G. C. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 90:184.
- Varney, V. A., Hamid, Q. A., Gaga, M., Sun Ying, Jacobson, M., Frew, A. J., Kay, A. B. and Durham, S. R. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. 1993. *J. Clin. Invest.* 92:644.
- Varney, V. A., Jacobson, M. R., Sudderick, R. M., Robinson, D. S., Irani, A. M., Schwartz, L. B., Mackay, I. S., Kay, A. B. and Durham, S. R. Immunohistology of the nasal mucosa following allergen-induced rhinitis. Identification of activated T lymphocytes, eosinophils, and neutrophils. 1992. *Am Rev Respir Dis* 146:170.
- Vercelli, D., Jabara, H. H., Arai, K. and Geha, R. S. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. 1989a. *J Exp Med* 169:1295.
- Vercelli, D., Jabara, H. H., Arai, K., Yokota, T. and Geha, R. S. Endogenous interleukin 6 plays an obligatory role in interleukin 4-dependent human IgE synthesis. 1989b. *Eur J Immunol* 19:1419.
- Vercelli, D., Leung, D. Y., Jabara, H. H. and Geha, R. S. Interleukin 4 dependent induction of IgE synthesis and CD23 expression by the supernatants of a human helper T cell clone. 1989c. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88:119.
- Walker, C., Bode, E., Boer, L., Hansel, T. T., Blaser, K. and Virchow, J. C., Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. 1992. *Am Rev Respir Dis* 146:109.
- Walker, C., Virchow, J. C., Jr., Bruijnzeel, P. L. and Blaser, K. T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. 1991. *J Immunol* 146:1829.
- Walter, H., Schepens, S., Van Wauwe, J. and de Boer, M. Ligation of CD28 on resting T cells by its ligand B7 results in the induction of both Th1- and Th2-type cytokines. 1994. *Eur Cytokine Netw* 5:13.
- Wang, J. H., Devalia, J. L., Xia, C., Sapsford, R. J. and Davies, R. J. Expression of RANTES by human bronchial epithelial cells in vitro and in vivo and the effect of corticosteroids. 1996. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:27.
- Wang, J. M., McVicar, D. W., Oppenheim, J. J. and Kelvin, D. J. Identification of RANTES receptors on human monocytic cells: competition for binding and desensitization by homologous chemotactic cytokines. 1993. *J Exp Med* 177:699.
- Wantke, F., Götz, M. and Jarisch, R. Spontaneous histamine release in whole blood in patients before and after 4 months of specific immunotherapy. 1993. *Clinical and Experimental Allergy* 23:992.
- Wardlaw, A. J., Moqbel, R., Cromwell, O. and Kay, A. B. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. 1986. *J Clin Invest* 78:1701.
- Warringa, R., Koenderman, L., Kok, P., Kreukniet, J. and Bruijnzeel, P. Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. 1991. *Blood* 77:2694.
- Warringa, R. A., Mengelers, H. J., Raaijmakers, J. A., Bruijnzeel, P. L. and Koenderman, L. Upregulation of formyl-peptide and interleukin-8-induced eosinophil chemotaxis in patients with allergic asthma. 1993. *J Allergy Clin Immunol* 91:1198.
- Wedderburn, L. R., O'Hehir, R. E., Hewitt, C. R., Lamb, J. R. and Owen, M. J. In vivo clonal dominance and limited T-cell receptor usage in human CD4+ T-cell recognition of house dust mite allergens. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8214.
- Weller, P. F., Rand, T. H., Barrett, T., Elovic, A., Wong, D. T. and Finberg, R. W. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. 1993. *J Immunol* 150:2554.
- Wen, L., Roberts, S. J., Viney, J. L., Wong, F. S., Mallick, C., Findly, R. C., Peng, Q., Craft, J. E., Owen, M. J. and Hayday, A. C. Immunoglobulin synthesis and generalized autoimmunity in mice congenitally deficient in alpha beta(+) T cells. 1994. *Nature* 369:654.

- Wierenga, E. A., Snoek, M., Bos, J. D., Jansen, H. M. and Kapsenberg, M. L. Comparison of diversity and function of house dust mite-specific T lymphocyte clones from atopic and non-atopic donors. **1990a.** *Eur J Immunol* 20:1519.
- Wierenga, E. A., Snoek, M., de Groot, C., Chretien, I., Bos, J. D., Jansen, H. M. and Kapsenberg, M. L. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. **1990b.** *J Immunol* 144:4651.
- Wilson, J. W., Djukanovic, R., Howarth, P. H. and Holgate, S. T. Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthma. **1992.** *Am Rev Respir Dis* 145:958.
- Wodnar Filipowicz, A., Heusser, C. H. and Moroni, C. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. **1989.** *Nature* 339:150.
- Wong, D. T., Elovic, A., Matossian, K., Nagura, N., McBride, J., Chou, M. Y., Gordon, J. R., Rand, T. H., Galli, S. J. and Weller, P. F. Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor beta 1. **1991.** *Blood* 78:2702.
- Wu, C., Sarfati, M., Heusser, C., Fournier, S., Rubio-Trujillo, M., Peleman, R. and Delespesse, G. Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes. **1991.** *J Clin Invest* 87:870.
- Ying, S., Durham, S. R., Barkans, J., Masuyama, K., Jacobson, M., Rak, S., Lowhagen, O., Moqbel, R., Kay, A. B. and Hamid, Q. A. T cells are the principal source of interleukin-5 mRNA in allergen-induced rhinitis. **1993.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:356.
- Ying, S., Durham, S. R., Jacobson, M. R., Rak, S., Masuyama, K., Lowhagen, O., Kay, A. B. and Hamid, Q. A. T lymphocytes and mast cells express messenger RNA for interleukin-4 in the nasal mucosa in allergen-induced rhinitis. **1994.** *Immunology* 82:200.
- Ying, S., Humbert, M., Barkans, J., Corrigan, C. J., Pfister, R., Menz, G., Larche, M., Robinson, D. S., Durham, S. R. and Kay, A. B. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. **1997.** *J Immunol* 158:3539.
- Ying, S., Meng, Q., Tabordabarata, L., Corrigan, C. J., Barkans, J., Assoufi, B., Moqbel, R., Durham, S. R. and Kay, A. B. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. **1996.** *Eur J Immunol* 26:70.
- Ying, S., Taborda Barata, L., Meng, Q., Humbert, M. and Kay, A. B. The kinetics of allergen-induced transcription of messenger RNA for monocyte chemoattractant protein-3 and RANTES in the skin of human atopic subjects: relationship to eosinophil, T cell, and macrophage recruitment. **1995.** *J Exp Med* 181:2153.
- Yokota, A., Kikutani, H., Tanaka, T., Sato, R., Barsumian, E. L., Suemura, M. and Kishimoto, T. Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. **1988.** *Cell* 55:611.
- Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y., Iwakura, Y. and Nakanishi, K. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. **1997.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3948.
- Yoshimura, T., Robinson, E., Tanaka, S., Appella, E. and Leonard, E. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. **1989a.** *J Immunol* 142:1956.
- Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S. K., Appella, E., Lerman, M. I. and Leonard, E. J. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. **1989b.** *FEBS Lett* 244:487.
- Yousefi, S., Hemmann, S., Weber, M., Holzer, C., Hartung, K., Blaser, K. and Simon, H. U. IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils. Evidence for increased secretion in asthma. **1995.** *J Immunol* 154:5481.
- Yssel, H., De Waal Malefyt, R., Roncarolo, M. G., Abrams, J. S., Lahesmaa, R., Spits, H. and de Vries, J. E. IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. **1992.** *J Immunol* 149:2378.

**Yssel, H., Johnson, K. E., Schneider, P. V., Wideman, J., Terr, A., Kastelein, R. and De Vries, J. E.** T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. **1992.** *J Immunol* 148:738.

**Zhang, K., Clark, E. and Saxon, A.** CD40 stimulation provides an IFN-gamma-independent and IL-4-dependent differentiation signal directly to human B cells for IgE production. **1991.** *J Immunol* 146:1836.

**Zhang, K., Mills, F. C. and Saxon, A.** Switch circles from IL-4-directed epsilon class switching from human B lymphocytes. Evidence for direct, sequential, and multiple step sequential switch from mu to epsilon Ig heavy chain gene. **1994.** *J Immunol* 152:3427.

**Zurawski, G. and de Vries, J.** Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. **1994.** *Immunol today* 15:19.

**Zurawski, S. M., Vega, F., Jr., Huyghe, B. and Zurawski, G.** Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. **1993.** *Embo J* 12:2663.

***ANNEXE :***  
***Liste des Publications***  
***et Communications***

## PUBLICATIONS

- 1996-1 **Akoum, H.**, Tscopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B., Dessaint, J-P., Joseph, M., Hamid, Q. & Tonnel, A.B.  
Venom immunotherapy modulates IL-4 and IFN- $\gamma$  messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes.  
*Immunology*, 1996, 87: 593-598.
- 1996-2 Tscopoulos, A., Labalette, M., **Akoum, H.**, Duez, C., Wallaert, B., Dessaint, J.P., Tonnel, A.B.  
CD28 expression is increased in venom allergic patients but is not modified by specific immunotherapy.  
*Clin. Exp. Allergy*, 1996, 26: 1119-1124.
- 1997-1 Minshall, E.M, Tscopoulos, A., Yasruel, Z., Wallaert, B., **Akoum, H.**, Vorng, H., Tonnel, A.B. & Hamid Q.  
High expression of cytokine gene transcripts in active pulmonary sarcoidosis compared to non-active pulmonary sarcoidosis and normal controls.  
*Eur. Resp. J.*, 1997, 10, 2034-2039.
- 1997-2 Tscopoulos, A., **Akoum, H.** and Tonnel A.B.  
Mécanismes immunologiques de la désensibilisation.  
*Revue Française d'allergologie*, 1997, sous presse.
- 1997-3 Duez, C., **Akoum, H.**, Marquillies, P., Tonnel A.B. and Pestel, J.  
Allergen-induced migration of human cells in allergic SCID mice.  
*Scan. J. Immunol.*, 1997, sous presse.
- 1997-4 Tscopoulos, A., Janin, A., **Akoum, H.**, Vorng, H., Hamid, Q., Tonnel, A.B. & Wallaert, B.  
IL-4 but not IL-5 is expressed in minor salivary glands from patients with bronchial asthma.  
1997, soumis.
- 1997-5 **Akoum, H.**, Duez, C., Vorng, H., Wallaert, B., Tonnel, A.B. and Tscopoulos, A.  
Early modifications of chemokine Production and mRNA Expression during Rush Venom Immunotherapy  
1997, soumis.
- 1997-6 **Akoum, H.**, Duez, C., Vorng, H., Wallaert, B., Tonnel, A.B. and Tscopoulos, A.  
Rush venom immunotherapy induces *in vivo* basophil desensitization to RANTES.  
1997, soumis.
- 1997-7 **Akoum, H.**, Vorng, H., Wallaert, B., Tonnel, A.B. and Tscopoulos, A.  
Regulation of IgE synthesis during rush venom immunotherapy.  
manuscrit en préparation.

- 1997-8 Anne Tsicopoulos, Joël Pestel, Olivier Fahy, Han Vorng, Françoise Vandebuschet, Henri Porte, Luciano Eraldi, Alain Wurtz, **Hikmat Akoum**, Qutayba Hamid, Benoit Wallaert, and André-Bernard Tonnel.  
Tuberculin-induced delayed-type hypersensitivity reaction in a model of hu-PBMC-SCID mice grafted with autologous skin.  
1997, soumis.

COMMUNICATIONS

- 1994 **Akoum, H.**, Tsicopoulos, A., Vorng, H., Joseph, M., Capron, A. & Tonnel, A-B  
Increased production of IFN- $\gamma$  by T lymphocytes from patients undergoing rush  
venom immunotherapy.  
American Academy of Allergy Asthma and Immunology,  
4-9 march 1994, Anaheim.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1994, 93 : 224.
- 1995-1 **Akoum, H.**, Tsicopoulos, A., Vorng, H., Joseph, M., Capron, A. & Tonnel, A.B.  
Modulation of IL-4 and IFN- $\gamma$  mRNA expression during rush venom  
immunotherapy  
American Academy of Allergy Asthma and Immunology,  
24 february-1 march 1995, New York.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1995, 95: 306.
- 1995-2 Tsicopoulos, A., Labalette, M., **Akoum, H.**, Wallaert, B., Capron, A., Dessaint,  
J.P., & Tonnel, A.B.  
CD28 expression in patients undergoing rush venom immunotherapy.  
American Academy of Allergy Asthma and Immunology,  
24 february-1 march 1995, New York.  
*J. Allergy Clin. Immunol.* 1995, 95: 321.
- 1996-1 **Akoum, H.**, Tsicopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B. and Tonnel, A.B.  
Chemokine production by peripheral blood mononuclear cells during rush venom  
immunotherapy.  
American Academy of Allergy Asthma and Immunology,  
15-20 march, 1996, New Orleans.  
*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 97: A183.
- 1996-2 **Akoum, H.**, Tsicopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B. and Tonnel, A.B.  
Production précoce de RANTES par les plaquettes au cours de l'immunothérapie  
spécifique aux venins d'hyménoptères.  
Journées des jeunes chercheurs, 18 novembre 1996  
*Institut Pasteur de Lille.*
- 1997-1 **Akoum, H.**, Tsicopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B. and Tonnel, A.B.  
Early release of RANTES by platelets during rush venom immunotherapy.  
American Academy of Allergy Asthma and Immunology,  
21-26 february, 1997, San Francisco.  
*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, 99: A283.
- 1997-2 Tonnel, A. B., **Akoum, H.**, Tsicopoulos, A.  
Profil de cytokines et désensibilisation.  
Journées nationales de la société d'allergologie et d'immunologie clinique.  
Reims, Juin 1997.

