

Université des Sciences et Technologies de Lille

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

*Catherine DUEZ*



**LA SOURIS SCID HUMANISÉE:  
MODELE D'ETUDE DE LA REACTION  
ASTHMATIQUE ALLERGIQUE**

**présentée le 4 Décembre 1997 devant la commission d'examen:**

Président:	Professeur X. Desbiens
Directeur de Thèse:	Professeur A-B. Tonnel
Rapporteurs:	Professeur A. Janin Professeur J. Kips
Examineurs:	Professeur P. Soler Docteur J. Pestel

*A mes parents*  
*A Eric, Sylvie et Christophe*

*Merci à Hikmat et Sophie  
(Elles savent pourquoi...)*

*A Monsieur le Professeur A-B. Tonnel,*

Vous m'avez accueillie chaleureusement dans votre laboratoire et m'avez permis d'y réaliser ce travail au sein d'un programme de recherche de grande qualité, et d'avenir. Que ce manuscrit soit le témoignage de ma respectueuse admiration et de ma sincère reconnaissance.

*A Monsieur le Professeur X. Desbiens,*

Vous me faites un très grand honneur en présidant ce jury de thèse. Je vous en suis vivement et sincèrement reconnaissante.

*A Madame le Professeur A. Janin,*

Vous avez accepté d'emblée d'être rapporteur de ce travail, et m'avez encouragée. J'ai également pu bénéficier à de multiples reprises au cours de cette thèse, de vos précieux conseils. Soyez assurée, Madame, de ma grande admiration et de ma profonde gratitude.

*A Monsieur le Professeur J. Kips,*

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 votre présence dans ce jury.

*A Monsieur le Professeur P. Soler,*

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.

*A Monsieur le Docteur J. Pestel,*

Tu as été un guide bienveillant, sans être omniprésent, durant ces quatre années. Ta confiance m'a toujours été d'un grand soutien, et nos discussions m'ont fait grandir pour que je puisse prendre mon envol vers d'autres cieux. Sois en infiniment remercié. Je sais ce que je te dois, je sais aussi que travailler sur la SCID n'est pas toujours facile, loin s'en faut, mais c'est un sujet porteur. Merci donc de m'avoir permis d'intégrer ce programme. J'ai pour toi un immense respect, et nos moments de rires ne vont pas à l'encontre de cette vérité. Merci de ta gentillesse et rendez-vous le quinze...

Un grand merci à tous ceux qui de près ou de loin ont participé ou encouragé ce travail.

Merci au Conseil Régional de la Région Nord-Pas de Calais et à l'Institut Pasteur de Lille qui m'ont soutenue financièrement au cours de ces trois années.

Merci aux membres de l'unité 416, en particulier:

*Philippe Marquillies* pour ta collaboration technique de grande qualité, ta disponibilité et ta gentillesse. Nous avons partagé les mêmes inquiétudes murines (!!!) et je te souhaite d'en avoir moins à l'avenir.

*Anne Tsicopoulos* pour tes conseils d'un haut niveau scientifique, et les grands moments de rires de bureau commun.

*Monsieur M. Joseph*; je suis entrée dans ce laboratoire grâce à vous et votre sens aigü du partage des connaissances. Je ne l'oublierai jamais.

*Monsieur B. Wallaert* pour votre foi (néanmoins réaliste) en la souris SCID et vos encouragements chaleureux.

*Philippe Gosset* pour la pertinence de tes critiques, tes conseils avisés. Tu as partagé nombre de nos instants de détente, d'amusements mais aussi de doutes.

*Gwenola Kervoaze et Philippe Lassalle* pour vos précieux conseils lorsque j'ai entamé la culture cellulaire et la production d'anticorps. Merci *Gwen* de ta patience d'ange devant mes questions de naïve. J'étais ravie de travailler un temps avec toi.

*Catherine Fourneau, Geneviève Marchandise, Han Vorng et Olivier Fahy* (je te souhaite bonne chance) pour votre aide précieuse, votre bonne humeur et tous ces moments partagés.

*Hikmat Akoum et Sophie Galand* (encore elles!) pour votre Amitié, votre soutien, vos encouragements et plein d'autres choses encore...

Et ceux qui ont traversé (plus ou moins longtemps) et enrichi le laboratoire, et m'ont surtout apporté soutien et instants de bonheur: *Sophie Molet, Agnès Boitelle* ("la collègue de travail"), *Odile Parmentier, Catherine Degros, Arnaud (de!) Sherperel et Dominique Vanhee*.

Merci au personnel de l'animalerie, et plus particulièrement *Emile Fleurbaix* qui fait de cet endroit un havre de paix, et *Jean-Pierre Decavel* pour ses conseils techniques.

Merci à *Caroline Bisiau* pour ton doigté en histologie, ta disponibilité et ton aide jusqu'aux derniers instants.

Merci à l'équipe du *Pr. R. Pauwels* à Gand pour sa maîtrise de l'analyse de l'hyperréactivité, et en particulier, merci à *Eliane Castrique*.

Merci aux membres du service de Pneumologie et d'Immunoallergologie du CHRU de Lille, et plus particulièrement au Docteur *Isabelle Tillie-Leblond* pour le recrutement d'une grande partie des patients, ainsi qu'aux infirmières.

Merci à *Chantal Kikonzolo* pour les recherches bibliographiques, notamment les nombreuses de dernière minute (!!), et à *Jean-Marc Merchez* pour son grand talent de photographe.

Merci à *Jamal Khalife* pour ta joie de vivre, ton dynamisme, tes conseils et ton enthousiasme à partager un projet qui n'a pas encore éclos.

Merci à *Georges Thyphronitis* pour m'avoir fait partagé ton expérience américaine.

Merci aussi à tous ceux qui ne considèrent pas le troisième étage comme le bout du monde, comme *P'tit Manu, Jean-Pierre, Joëlle, Fabrice*, et d'autres encore comme *Manu et Christelle, Karine, Caroline, Loïc, Franck*. Et particulièrement merci à toi, *Christine*, pour ta générosité.

Et puis merci à tous ceux qui ont croisé ma vie, un jour ou un peu plus longtemps, et l'ont embellie d'un sourire ou de quelques mots...

Enfin, merci aux patients qui ont fait don d'un peu d'eux-mêmes  
pour que ce travail puisse voir le jour. Il vous est destiné.  
Puisse-t-il humblement faire partie de l'édifice de la connaissance.

Merci à tous ceux qui croient en notre travail. Cette confiance permet  
d'affronter les doutes et interrogations et d'en générer d'autres.  
C'est là un reflet de l'équilibre de la Vie...

# **SOMMAIRE**

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION - GENERALITES</b>	<b>3</b>
<b>I- MECANISMES DE LA REACTION ALLERGIQUE: CAS DE L'ASTHME ALLERGIQUE</b>	<b>3</b>
1- la réponse IgE	4
2. La réaction inflammatoire	26
3. L'hyperréactivité bronchique	48
<b>II- LA SOURIS SCID</b>	
1- Caractéristiques de la souris SCID	61
2- Reconstitution immunologique de la souris SCID par transfert de cellules allo- et xénogéniques	66
3- Souris SCID et étude de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques	77
4- Souris SCID et étude de pathologies humaines	79
<b>CADRE ET OBJECTIFS</b>	<b>86</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>88</b>
RESULTATS 1: La réponse IgE chez les souris SCID	88
RESULTATS 2: La réaction inflammatoire chez les souris SCID	88
RESULTATS 3: L'hyperréactivité bronchique chez les souris SCID	88
<b>DISCUSSION - CONCLUSIONS</b>	<b>136</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>154</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>161</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>193</b>
ANNEXE 1: MATERIELS ET METHODES	193
ANNEXE 2: LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	198
ANNEXE 3: TABLES DES MATIERES	200



## ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMN	Cellules Mononucléées
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA-	Cytolytic T-Lymphocyte-Associated antigen-
Dpt	<i>Dermatophagoïdes ptéronyssinus</i>
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HEV	High Endothelial Venule
HLA-	Human Leucocyte Antigen-
HRB	HyperRéactivité Bronchique
hu-SCID	SCID greffée avec des cellules de sang périphérique
i.p	intrapéritonéal
ICAM-	InterCellular Adhesion Molecule-
IFN-	Interferon-
Ig-	Immunoglobuline
IL-	Interleukine-
IR	Index de Réactivité
LBA	Lavage BronchoAlvéolaire
LFA-	Leucocyte Function-Activated Antigen-
MBP	Major Basic Protein
MCP-	Monocyte Chemotactic Peptide-
MIP-	Macrophage Inhibitory Protein-
MIP-	Monocyte Inflammatory Peptide-
NANC	Non Adrénergique Non Cholinergique
OVA	Ovalbumine
PAF	Platelet Activating Factor
PG	Prostaglandine
RANTES	Regulated on Activation-Normal T Expressed
RT-PCR	ReverseTranscription-mediated Polymerase Chain Reaction
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
SCID-hu	SCID greffée avec des tissus foetaux
Th	T helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
VCAM-	Vascular Cell Adhesion Molecule-
VIP	VasoIntestinal Peptide
VLA-	Very Late Antigen-

## ***RESUME***

L'asthme est une pathologie environnementale majeure touchant près de 10% de la population mondiale. L'étude des mécanismes contrôlant la réaction allergique humaine conduisant aux manifestations cliniques observées est malheureusement encore limitée malgré l'analyse de divers prélèvements humains (biopsies, lavages bronchoalvéolaires, etc) et l'utilisation de modèles animaux. Au cours de ce travail, nous avons développé un modèle d'étude de la réaction asthmatique allergique chez la souris SCID humanisée (Severe Combined ImmunoDeficiency).

Nous avons montré que, seules des souris SCID reconstituées avec des cellules provenant de patients sensibles à *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt), et exposées à un aérosol de *cet allergène*:

1) produisent des IgE humaines spécifiques vis-à-vis de Dpt. Cette production transitoire semble régulée tardivement par une population de cellules CD8<sup>+</sup> suppressives.

2) développent un infiltrat pulmonaire de cellules humaines CD45<sup>+</sup> majoritairement de type CD4<sup>+</sup>, activées et mémoires, exprimant des ARNm codant pour des cytokines de type 2: l'IL-4 et l'IL-5. Malgré l'origine murine des éosinophiles recrutés, cette réaction de type inflammatoire est similaire à celle observée chez les patients asthmatiques allergiques.

3) et présentent une hyperréactivité bronchique au carbachol nécessitant l'activation, par l'aéroallergène, des cellules de patients asthmatiques.

Par conséquent, ces souris SCID humanisées "allergiques" présentent trois caractéristiques majeures de l'asthme, et peuvent donc être utilisées pour évaluer l'efficacité de molécules à visée thérapeutique, et étudier *in vivo* les mécanismes impliqués dans le développement de l'asthme allergique.

**INTRODUCTION**

**\*\*\***

**GENERALITES**

## I- MECANISMES DE LA REACTION ALLERGIQUE CAS DE L'ASTHME ALLERGIQUE

L'allergie est généralement causée par une surproduction d'IgE en réponse à des antigènes environnementaux communs, comme ceux présents dans le pollen, la nourriture, les acariens de la poussière de maison, les phanères d'animaux, les spores fongiques et les venins d'insectes. La prédisposition à l'allergie apparaît cependant résulter d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Les manifestations allergiques les plus communes sont l'asthme, la rhinite allergique, la dermatite atopique et les allergies alimentaires, bien que la plus dangeureuse soit le choc anaphylactique, habituellement provoqué par une piqûre d'insecte ou consécutif à l'administration de certains médicaments. L'allergie, sous une forme ou une autre, touche au moins 20% de la population dans les pays développés, et l'augmentation alarmante de sa prévalence, de sa morbidité et de sa mortalité au cours des 10 dernières années l'ont désignée comme la maladie environnementale majeure [Barnes, 1991].

Il est maintenant bien établi que dans l'asthme allergique l'inhalation de l'allergène peut induire une réponse inflammatoire pulmonaire qui est associée à une augmentation immédiate (dans les 20 min suivant l'exposition) de la résistance des voies aériennes, parfois suivie d'une augmentation tardive (dans les 4 à 12 heures). De plus, l'allergène inhalé peut induire une augmentation prolongée (de plusieurs semaines) de l'hyperréactivité bronchique non spécifique (HRB) [Platts Mills, 1991]. La réaction asthmatique immédiate est principalement due à une contraction des muscles lisses bronchiques et à un œdème de la muqueuse en réponse à des médiateurs d'origine principalement mastocytaire. La réaction tardive s'accompagne d'une inflammation bronchique caractérisée principalement par une augmentation du nombre de lymphocytes et d'éosinophiles.

## **1- LA REPONSE IgE**

Les anticorps (Ac) IgE spécifiques de l'allergène, qui peuvent se lier à leurs récepteurs de haute affinité (FcεRI) sur les mastocytes et les basophiles, jouent un rôle important dans la médiation de réactions allergiques immédiates, par la libération de médiateurs solubles (voir paragraphe 2.1.1-). La génération de lymphocytes Bε obéit à une séquence ordonnée d'évènements initiée par l'activation des cellules B spécifiques de l'allergène qui commutent leur synthèse d'Ac de la classe IgM vers la classe IgE (commutation isotypique ou switch). Les cellules B ainsi différenciées produisent alors des IgE en réponse à des antigènes qui se lient à des récepteurs immunoglobuliniques de surface, et en réponse à des signaux de costimulation fournis par les cellules T helper CD4<sup>+</sup> activées. Il a été démontré que l'IgG4, surproduite chez le patient allergique, est en relation avec une régulation isotypique anormale, puisque des Ac IgG4 spécifiques des patients allergiques sont corrélés avec le taux d'IgE spécifiques correspondant, sans que les taux d'IgG4 totales diffèrent entre les allergiques et les contrôles [Jeannin, 1994].

### **1.1- Les allergènes**

Les allergènes constituent un des acteurs à l'origine de la réponse IgE. Les principaux allergènes incriminés dans l'asthme allergique sont soit "intérieurs" comme les acariens de la poussière de maison, les poils de chats et les blattes (cause importante d'asthme dans les villes), soit "extérieurs" et saisonniers comme les pollens, ou encore l'un et l'autre en ce qui concerne les moisissures. De nombreuses études épidémiologiques suggèrent un rôle étiologique des allergènes d'acariens dans les manifestations allergiques respiratoires. Ainsi, on estime à 30 millions, le nombre de sujets dans le monde sensibles aux acariens. En France, 60 à 75 % des asthmes allergiques perannuels sont en relation avec une sensibilisation aux acariens [Platts Mills, 1991].

#### **1.1.1- Les allergènes d'acariens**

Responsables essentiels de l'allergie à la poussière de maison, les acariens appartenant à la famille des Pyroglyphidae (17 genres et 47 espèces) sont universellement répandus. Le genre

Dermatophagoïdes est surtout rencontré en Europe, au Japon et en Amérique du Nord. Les espèces *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt) et *farinae* (Df) sont les plus fréquentes en Europe. Ces arthropodes représentent une source complexe d'antigènes et d'allergènes [Arlian, 1987; Krilis, 1984; Le Mao, 1983; Lind, 1983]. La caractérisation des principaux allergènes majeurs a permis de préciser les séquences liant les Ac d'isotype IgE, et d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes immunologiques susceptibles d'intervenir au cours de l'allergie aux acariens [Pestel, 1995].

#### 1.1.1.1- Les principaux allergènes de Dermatophagoïdes

Une trentaine de molécules allergéniques isolées de Dermatophagoïdes (caractérisées par leur PM) sont reconnues par des IgE présentes dans les sérums de patients allergiques à Dpt [Balbo, 1991]. Parmi les 9 allergènes principaux actuellement utilisés, 4 classes d'allergènes majeurs ont été décrites:

a) Les allergènes de classe I incluant Der p 1 issu de Dpt (qui représente 10 à 20% des protéines d'extrait total d'acariens) et Der f 1 purifié à partir de Df [Chapman, 1980; Dandeu, 1982]. Ces 2 glycoprotéines globulaires de PM 25 kD qui se retrouvent surtout dans les déjections des acariens [Thompson, 1988], présentent une activité thiol-protéase [Dilworth, 1991].

b) Les allergènes de classe II incluant 2 glycoprotéines de PM 15 kD (Der p 2 issu de Dpt et Der f 2 issu de Df) proviennent surtout du corps des acariens [Heymann, 1989].

c) Les allergènes de classe III incluant les molécules Der p 3 et Der f 3 (ayant un PM de 29kD) présentent 45 à 50% d'homologie avec des sérine protéases (trypsine et chymotrypsine) [Stewart, 1989].

d) Les allergènes de classe IV incluant une molécule de 60kD ayant une activité amylasique qui est reconnue par les IgE présentes dans 46% des sérums de patients adultes allergiques à Dpt [Lake, 1991].

#### 1.1.1.2- Un exemple d'allergène recombinant: Der p 1

Deux observations permettent de définir Der p 1 comme un allergène majeur. Premièrement, plus de 75% des IgE sériques chez des patients atteints d'asthme, de rhinite ou de dermatite atopique reconnaissant Dpt sont spécifiques de Der p 1 [Chapman, 1980].

Deuxièmement, les taux d'IgE anti-Der p 1 sont corrélés aux valeurs de RAST anti-Dpt [Didierlaurent, 1991].

La purification puis la caractérisation de Der p 1 [Chapman, 1980; Stewart, 1987] ont permis l'obtention d'Ac monoclonaux spécifiques utilisés pour cribler des banques d'ADNc de Dpt construites dans différents vecteurs [Chua, 1992]. De plus, l'insertion de fragments d'ADNc codant pour Der p 1 dans le vecteur pGEX, a permis d'appréhender les séquences susceptibles de lier l'IgE [Greene, 1991; Greene, 1992] ainsi que les épitopes T potentiels [Yssel, 1992].

#### *\* Cartographie des épitopes B de Der p 1*

Différentes approches ont été utilisées pour caractériser l'allergénicité de Der p 1 recombinante, vis-à-vis des cellules B [Chapman, 1984; Greene, 1991; Greene, 1992]. L'une d'elles a consisté en l'analyse comparative de l'activité de peptides sythétiques de Der p 1 sur des cellules porteuses d'un récepteur pour l'IgE provenant de patients sensibles à Dpt. La sélection des peptides de Der p 1 a été faite d'une part en prenant en compte des critères thermodynamiques et statistiques (comme l'accessibilité, la flexibilité et l'hydrophilie) prédictifs pour l'existence d'épitopes T et B, en faisant appel à une modélisation tridimensionnelle de Der p 1 [Jeannin, 1992]. L'activité biologique de 4 peptides de Der p 1 a été évaluée en mesurant la réactivité plaquettaire induite ainsi que leur capacité à induire une histaminolibération [Cardot, 1992; Jeannin, 1993a]. Les résultats indiquent que l'intensité et la fréquence de la réponse dépendante de l'IgE est variable suivant les peptides, la dose de peptide et le patient; et qu'il n'existe pas de peptide immunodominant [Jeannin, 1992]. Leur pouvoir immunogénique intrinsèque a également été analysé [Jeannin, 1993b].

#### *\* Cartographie des épitopes T de Der p 1*

En présence de Der p 1, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> prolifèrent différemment en fonction du statut du donneur: la réponse proliférative est plus importante d'une part chez les patients sensibles à Dpt par rapport aux sujets sains [Rawle, 1984], et d'autre part chez les patients asthmatiques par rapport aux patients atteints de rhinite [O'Brien, 1992]. De plus, en présence de Der p 1 ou de peptides de Der p 1, des clones lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> spécifiques de Der p 1 peuvent produire de l'IL-4 et de l'IL-5, cytokines de type Th2 (caractérisation des profils de production de cytokines de type 1 ou 2: voir paragraphe 1.3.1.1-) [Yssel, 1992].

Des épitopes T ont donc pu être identifiés en analysant la prolifération lymphocytaire T et la production de cytokines induites par différentes protéines Der p 1 mutée par délétion [Jeannin, 1993b; Yssel, 1992].

De manière intéressante dans une optique d'inhibition sélective de la stimulation des lymphocytes spécifiques d'allergène, il a été montré que des clones lymphocytaires T, spécifiques de Dpt, incubés avec une dose optimale de peptide de Der p 1 prolifèrent et produisent de l'IL-4. Cependant, après préincubation de ces mêmes lymphocytes avec une dose supraoptimale du peptide, une absence de prolifération est observée: un état d'anergie lymphocytaire T a été induit [O'Hehir, 1991]. Enfin, l'inhalation de faibles concentrations d'un peptide contenant l'épitope T majeur de Der p 1 (résidus 111-139) induit une tolérance chez des souris naïves: elles deviennent non sensibles à un challenge ultérieur avec l'allergène intact [Hoyne, 1993].

### 1.1.2- Autres allergènes

D'autres aéroallergènes ont pu être analysés. La caractérisation d'allergènes majeurs et le développement d'Ac monoclonaux spécifiques a rendu possible leur mesure dans les échantillons de poussière et d'atmosphère. Ont été par exemple identifiés:

(1) Fel d 1, allergène majeur de chat [Ohman, 1987].

(2) Bla g 1 et Bla g 2, allergènes majeur de blattes [Pollart, 1991].

(3) Bet v 1, seul allergène majeur du pollen de bouleau [Ipsen, 1983]. Plus de 96% des patients allergiques aux pollens d'arbres présentent des IgE anti-Bet v 1, et 60% réagissent exclusivement avec *cet allergène* [Jarolim, 1989].

(4) Amb a 1, allergène majeur du pollen d'ambrosie (herbacée). Il représente 6% des protéines totales d'un extrait de pollen [Zeiss, 1973].

(5) Lol p 1, allergène majeur du pollen d'ivraie (graminée) [Perez, 1990].

(6) Alt a 1, Cla h 1, allergène majeur des moisissures *Alternaria alternata* et *Cladosporium herbatum* [Achatz, 1995]. La sensibilisation aux moisissures touche 10% de la population allergique. Cependant, seules 10 à 20 espèces sont allergisantes [Karlsson Borga, 1989].

Jusqu'à présent, les études concernant ces allergènes ont été moins développées que celles portant sur les Acariens. Cependant, il a été montré que des clones lymphocytaires T



spécifiques de Fel d 1, provenant de patients sensibles aux allergènes de chats, sont fréquemment de type Th2, indiquant que ces cellules jouent un rôle important dans la pathophysiologie des réponses allergiques vis-à-vis des allergènes de chats [Joost Van Neerven, 1994].

Tous ces allergènes sont à l'origine d'une réponse IgE chez l'allergique. La réponse Ac est initiée dans les ganglions, où se retrouvent l'antigène et les cellules dendritiques qui ont capté l'antigène, pouvant alors retenir les lymphocytes T spécifiques qui autrement ne feraient que traverser les ganglions. Dans le cortex de ces ganglions se développent les follicules lymphoïdes à centre germinatif, réseau de cellules dendritiques colonisé par quelques lymphocytes T et B spécifiques dont l'activation a été déclenchée suite à la reconnaissance de l'antigène avant qu'ils n'atteignent le cortex ganglionnaire. Dans le centre germinatif, les cellules B spécifiques prolifèrent (centroblastes de la zone sombre du follicule) puis migrent vers la zone claire où a lieu la commutation isotypique, puis vers la zone basale, et enfin vers la zone apicale où elles se différencient (centrocytes) [Dessaint, 1994].

## **1.2- Induction de la synthèse d'IgE**

Au cours d'une réponse immune, le lymphocyte B peut exprimer différents isotypes de chaîne lourde des immunoglobulines (Ig), portant la même région variable VDJ. Ce phénomène (commutation isotypique) permet à un seul clone B de produire des Ac avec la même spécificité, mais différentes fonctions effectrices. Pour commuter vers un isotype particulier, une cellule B a besoin de recevoir 2 signaux délivrés par l'intermédiaire de séries complexes d'interactions. Les cellules B spécifiques de l'allergène capturent l'antigène via leurs molécules Ig de surface, l'internalisent et le transforment en peptides qui sont alors présentés à la surface des cellules B en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II. La reconnaissance du complexe antigène/CMH de type II par le récepteur des cellules T (TCR) conduit à 2 événements cruciaux: la sécrétion de lymphokines (en particulier l'IL-4 qui fournit le premier signal pour l'induction de la synthèse d'IgE), et l'expression du ligand du CD40 (CD40L) [Vercelli, 1995].

## 1.2.1- Les 2 signaux nécessaires à la synthèse d'IgE

### 1.2.1.1- Premier signal: l'IL-4 ou l'IL-13

De nombreuses observations montrent que l'IL-4 est essentielle pour la production d'IgE: (1) l'IL-4 est capable d'induire la synthèse d'IgE *in vitro* [Lundgren, 1989], (2) une molécule recombinante soluble correspondant au domaine extracellulaire du récepteur pour l'IL-4 (IL-4R) bloque la commutation vers l'IgE de cellules mononucléées humaines stimulées par l'IL-4 [Garrone, 1991]. Les mêmes résultats ont pu être obtenus en utilisant une IL-4 mutée [Aversa, 1993]. Une autre preuve (3) provient de l'utilisation de souris chez lesquelles le gène de l'IL-4 est inactivé par recombinaison homologue. De telles souris sont incapables de développer une réponse IgE; la réponse IgG1 est également supprimée, alors que la production des autres isotypes n'est pas affectée [Kuhn, 1991]. Une étude épidémiologique a montré que l'IL-4 ou un gène proche dans le chromosome 5q31.1 est responsable de la régulation de la production d'IgE indépendamment de l'antigène. D'éventuels polymorphismes dans la région régulatrice de ces gènes pourrait résulter en une prédisposition à sécréter des taux anormalement élevés de cytokines induisant une production d'IgE [Marsh, 1994].

L'IL-13 partage de nombreuses propriétés avec l'IL-4 et en particulier, chez l'homme, la capacité à induire la synthèse d'IgE [DeFrance, 1994; Punnonen, 1993].

L'IL-4 et l'IL-13 stimulent également le switch vers l'IgG4 [Punnonen, 1993].

### 1.2.1.2- Deuxième signal: l'interaction CD40-CD40L

L'engagement du CD40 des cellules B par le CD40L exprimé sur les cellules T fournit le second signal nécessaire à la commutation isotypique vers l'IgE. Le CD40L peut être remplacé *in vitro* par des Ac monoclonaux anti-CD40. Ainsi, l'engagement du CD40 des cellules B au moyen d'un Ac, en présence d'IL-4 recombinante induit une intense production d'IgE, mais une modeste synthèse d'IgG, par des cellules B purifiées [Jabara, 1990].

Le CD40 est une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules B humaines, les monocytes activés par les cytokines, les cellules folliculo-dendritiques, les cellules épithéliales (incluant l'épithélium thymique), les cellules endothéliales [Hollenbaugh, 1995], certaines cellules de carcinomes et mélanomes, mais pas par les cellules T [Banchereau, 1994]. Le CD40L est une glycoprotéine membranaire transitoirement exprimée à la surface des cellules

Th2 murines activées [Armitage, 1992]. Des transcrits pour le CD40L ont été également mis en évidence dans les cellules T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, les cellules T  $\gamma\delta$ , les cellules NK, les thymocytes fœtaux [Cocks, 1993]. Le CD40L est aussi exprimé par les basophiles [Yanagihara, 1997], les éosinophiles [Gauchat, 1995], ainsi que les cellules B activées par la PMA (phorbol myristate acétate) et l'ionomycine [Grammer, 1995]. Le CD40L peut être clivé et un facteur soluble: TRAP (TNF-Related Activation Protein) est rapidement libéré après activation des cellules T [Graf, 1995].

Des cellules transfectées avec le CD40L induisent la synthèse d'IgE en présence d'IL-4, alors qu'une protéine de fusion CD40-Ig soluble inhibe la synthèse d'IgE dépendante de l'IL-4 par des cellules mononucléées humaines [Fanslow, 1992]. L'importance du rôle de l'interaction CD40/CD40L est renforcée par l'observation que la commutation isotypique, quelle qu'elle soit, est défectueuse chez des patients présentant le syndrome d'hyper-IgM lié au X, qui est induite par une mutation du CD40L aboutissant à une altération de l'interaction CD40/CD40L [Fuleihan, 1993]. La stimulation par l'IL-4 et un anti-CD40 induit également la synthèse d'IgG4 [Gascan, 1991].

Le CD40L est plus fortement exprimé à la surface des cellules naïves CD45RA<sup>+</sup> que des cellules mémoires CD45RO<sup>+</sup>. Ainsi dans des conditions physiologiques, les sous-populations de cellules CD45 semblent jouer des rôles significatifs mais distincts dans l'induction de la production d'IgE: les cellules T CD45RO<sup>+</sup> fournissent l'IL-4, et les cellules T CD45RA<sup>+</sup> fournissent le second signal via le CD40L [Patel, 1996].

La complexité des interrelations entre cellules T, cellules B et cytokines impliquées dans l'induction de l'IgE rend difficile l'établissement d'une chronologie des événements conduisant à la synthèse d'IgE. Cependant, les études moléculaires désignent clairement la hiérarchie dans les étapes de l'induction de l'IgE, et dans les signaux qui déclenchent ces étapes.

## **1.2.2- Aspects moléculaires de la commutation vers l'IgE (figure 1)**

### **1.2.2.1- Structure du gène codant pour la partie constante des IgE**

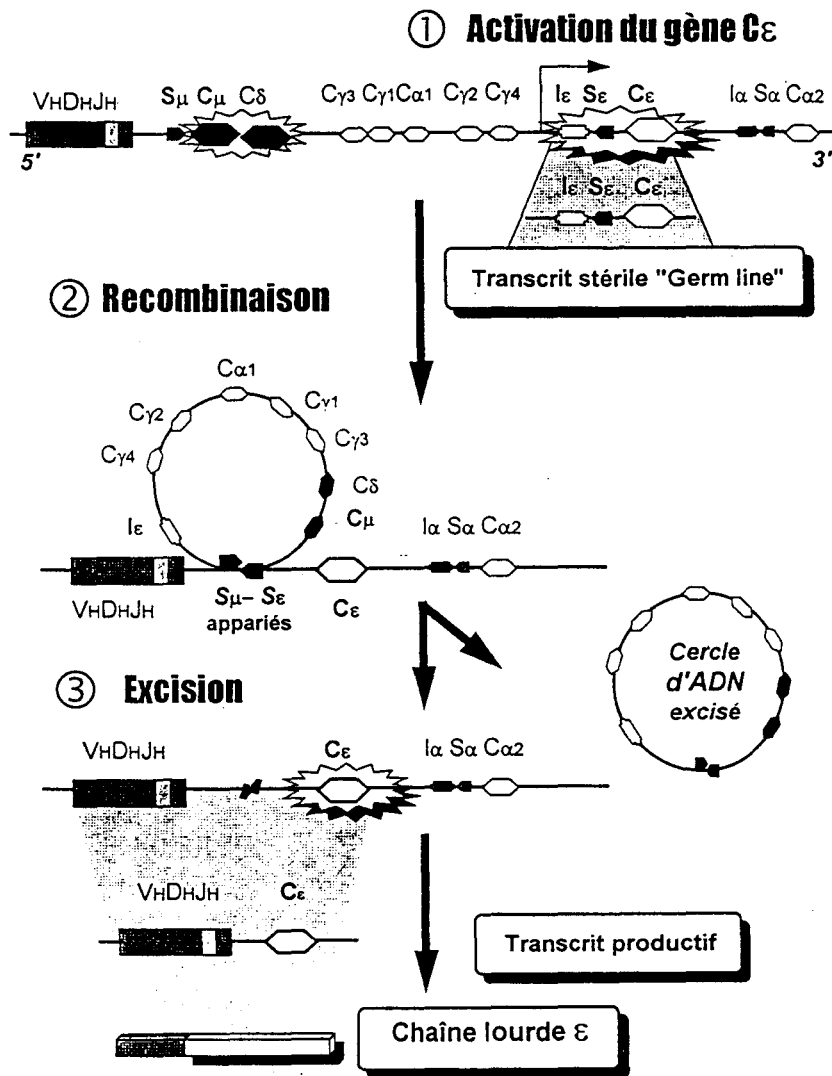
Les gènes des régions constantes des chaînes lourdes des immunoglobulines (CH) sont localisées en 3' des gènes codants pour les régions variables des chaînes lourdes (VH). Le locus CH humain s'étend sur 300kb sur le chromosome 14, et est composé de 9 gènes fonctionnels et de 2 pseudogènes, dont 1 pseudogène  $\epsilon$  [Hofker, 1989]. Le gène C $\epsilon$  est précédé par son promoteur, un exon initial non codant (I $\epsilon$ ) et une séquence de commutation ou séquence switch (S $\epsilon$ ) complémentaire des autres séquences SH homologues, localisées en amont des autres gènes CH. Le gène C $\epsilon$  consiste en 4 exons C (CH1 à CH4) et 2 exons de membrane (M1 et M2); ces derniers codant pour les parties transmembranaire et intracytoplasmique de l'IgE membranaire [Ishida, 1982; Max, 1982].

Il existe un autre gène C $\epsilon$  localisé sur le chromosome 9. Ce pseudogène ne contient ni intron, ni région switch en 5', et pourrait correspondre à l'intégration d'un ARN transcrit à partir du gène fonctionnel, transformé et transféré à une nouvelle localisation chromosomale [Battey, 1982].

La commutation de C $\mu$  et C $\delta$  vers des isotypes situés en aval implique une recombinaison qui élimine les gènes CH, et positionne le nouveau gène CH directement en 3' du gène VH déjà assemblé [Davis, 1980].

### **1.2.2.2- Mécanisme de la commutation isotypique vers l'IgE**

L'addition d'IL-4 à une culture de cellules mononucléées (CMN) conduit à une synthèse d'IgE. Des taux significatifs d'IgE ont été détectés au bout de 7 jours de culture, et des taux maximum ont été observés à environ 13 jours de culture. Deux types d'ARNm  $\epsilon$  cytoplasmiques majeurs ont pu être détectés. Le plus long, d'environ 2,2kb, est détecté après 7 jours de culture, et l'expression maximale est observée au jour 11. Il représente le transcrit mature ou productif (p $\epsilon$ ). Un transcrit plus court, d'environ 1,7kb, est détecté dès la deuxième heure d'incubation avec l'IL-4. L'expression maximale est également observée au bout de 11



**Figure 1: La commutation isotypique ou switch sélectionne les gènes CH en 3 étapes.** La première consiste en l'activation du gène C $\epsilon$  qui aboutit à la transcription d'un ARNm qui n'est pas traduit (transcrit stérile). Lors de la seconde étape, la recombinaison a lieu par appariement S $\mu$ -S $\epsilon$ ; une boucle d'ADN se forme alors. Cette boucle est excisée au cours de la troisième étape; ce qui a pour conséquence la juxtaposition du gène variable et du gène constant. L'ARNm ainsi obtenu sera traduit en protéine, d'où son nom de transcrit productif. Dans le cas de l'IgE, la commutation est dirigée par des cytokines qui provoquent une déméthylation des segments d'ADN flanquants les séquences switch SH. L'IL-4 et l'IL-13 favorisent la transcription du gène C $\epsilon$  et donc l'obtention du transcrit stérile. Ces 2 cytokines sont appelées facteurs de switch. Le deuxième signal nécessaire est un signal de switch délivré suite à l'interaction CD40-CD40L. (d'après [Dessaint, 1995])

jours de culture. Il représente le transcrite stérile ou germline, et n'est pas présent dans les cellules qui ont déjà commuté vers l'IgE [Gauchat, 1990]. La pertinence *in vivo* de ce mécanisme a été vérifiée: l'augmentation des taux d'ARNm codant pour l'IL-4 chez des souris ayant subi une injection avec un Ac anti-IgD, est suivie, dans les 24 heures, par une augmentation des ARNm g $\epsilon$ , et 1 ou 2 jours plus tard, par l'augmentation des ARNm p $\epsilon$  et des taux d'IgE. Des antagonistes pour l'IL-4 bloquent ces 3 dernières étapes [Thyphronitis, 1993] (figure 1).

Les cellules B peuvent commuter séquentiellement de  $\mu$  vers  $\gamma$  puis vers  $\epsilon$ . Ainsi, des régions composites de switch: S $\mu$ -S $\gamma$ -S $\epsilon$ , ont été mises en évidence dans des lymphocytes B humains traités avec l'IL-4. Ceci suggère qu'une commutation séquentielle (de  $\mu$  vers  $\gamma$ , puis de  $\gamma$  vers  $\epsilon$ ) peut se produire dans les lymphocytes B humains à une fréquence non négligeable [Mills, 1992]. Les 4 loci  $\gamma$  humains peuvent participer, à fréquence égale, au switch séquentiel [Mills, 1995]. Le switch peut aussi s'effectuer de manière séquentielle en 3 étapes: de  $\mu$  vers  $\epsilon$  en passant par  $\alpha$  et  $\gamma$  [Zhang, 1994a]. Il ne semble pas que la fréquence de commutation isotypique vers l'IgE soit influencée par une précédente commutation vers d'autres classes d'Ig [Jung, 1994].

### **1.2.2.3- Nécessité absolue du transcrite stérile pour la commutation isotypique vers l'IgE**

Les transcrits germline ont un rôle crucial dans les événements de recombinaison qui aboutissent à la commutation isotypique. Ainsi, le remplacement du promoteur sensible à l'IL-4 par un promoteur homologue, peut induire la formation d'un transcrite germline artificiel lorsque ce promoteur est spécifiquement activé. Ce transcrite est suffisant pour diriger la commutation isotypique. Il a été avancé que le g $\epsilon$  pourrait être partie intégrante de la recombinaison du switch, lui fournissant alors la spécificité pour diriger le switch vers les différents isotypes [Lorenz, 1995].

### **1.2.2.4- Obtention de différents transcrits productifs après épissage alternatif**

Neuf ARNm codant pour 6 isoformes différentes de la chaîne lourde  $\epsilon$  ont été décrits. Deux ARNm codent pour des formes membranaires, bien que l'une d'elle soit extrêmement

rare. La forme membranaire commune contient une région riche en proline entre les 2 résidus transmembranaires hydrophobes, et le domaine Ig. Les autres ARNm  $\epsilon$  codent pour 4 formes de chaînes  $\epsilon$  potentiellement sécrétées, puisque les domaines transmembranaires hydrophobes sont absents. Deux ARNm codent pour la même protéine  $\epsilon$  classique, sécrétée. Les 5 autres codent pour 3 formes de chaîne  $\epsilon$ ; leur taille est soit de 6 à 134 aa plus grande que la protéine classique sécrétée, soit de 10 aa plus courte [Zhang, 1994b; Zhang, 1992]. Les quantités de ces isoformes d'ARNm  $\epsilon$  sont différenciellement régulées *in vivo* et *in vitro*. Cependant, d'autres auteurs ont montré, qu'après expression des transcrits  $\epsilon$  dans des lignées myéломateuses, seule la forme d'IgE membranaire classique est détectée dans les extraits cellulaires, et seule la forme sécrétée classique est détectée dans les surnageants. Ceci suggère que certaines des isoformes d'ARNm  $\epsilon$  soit sont rapidement éliminées, soit sont des ARNm épissés de manière aberrante; leurs produits protéiques étant éliminés par des événements post-translationnels [Batista, 1995].

### 1.3- Régulation de la réponse IgE

La réponse IgE est étroitement contrôlée; 4 mécanismes au moins sont impliqués:

- (1) une élimination rapide de l'isotype (demi-vie de l'IgE: 2-3 jours) [Waldmann, 1969]
- (2) une régulation par le biais du réseau anti-idiotypique. Une synthèse d'IgE après stimulation de cellules B purifiées par de l'IL-4 et un Ac anti-CD40 est inhibée par des Ac anti-IgE. Les anti-IgE régulent négativement le p $\epsilon$ , sans affecter l'expression du g $\epsilon$ . Seules les cellules B $\epsilon$  sont une cible pour ces Ac. Par conséquent, les anti-IgE ne modulent pas une induction de synthèse comme des cytokines telles que le TGF- $\beta$ , mais inhibe une synthèse d'IgE en cours, ce qui leur confère un potentiel thérapeutique très important [Stampfli, 1994].
- (3) une régulation par des facteurs solubles, dont les plus importants sont les cytokines, et en particulier les cytokines de type Th1 et Th2 (paragraphe 1.3.1-).
- (4) une régulation par des contacts cellulaires faisant intervenir des molécules accessoires (paragraphe 1.3.2-).

### **1.3.1- Régulation par des facteurs solubles**

#### **1.3.1.1- Les cytokines de type 1 et 2**

Le taux de transcription de g $\epsilon$  est corrélé avec le niveau de synthèse consécutive d'IgE *in vitro* et *in vivo*, et les cytokines qui modulent la transcription du g $\epsilon$ , modulent également la production d'IgE. Ainsi, les cytokines de type 2 comme l'IL-4 et l'IL-13 induisent la synthèse du g $\epsilon$  [Punnonen, 1995], alors qu'une cytokine de type 1 comme l'IFN- $\gamma$  réduit le niveau de g $\epsilon$  induit par l'IL-4 [Gauchat, 1990].

#### **\* Définition des cellules Th1 et Th2**

Les lymphocytes Th1 et Th2 murins ont été définis sur la base de leur profil de production de cytokines (tableau 1). En l'absence de signaux polarisants, des sous-populations de cellules T CD4+ présentant un profil de sécrétion de cytokines moins différencié que les Th1 et Th2, désignés par le terme Th0, entraînent des effets intermédiaires dépendants du rapport des cytokines produites et de la nature des cellules qui leur répondent. Les cellules Th0 représentent certainement une population hétérogène de cellules effectrices. Chen *et al* ont proposé l'existence d'un autre type de cellules Th: les cellules Th3, caractérisées par une production de TGF- $\beta$ 1 [Chen, 1994a].

Les cellules Th1 et Th2 humaines présentent des propriétés comparables aux cellules Th1 et Th2 murines [Romagnani, 1994; Romagnani, 1995], bien que chez l'homme, l'expression de certaines cytokines telles que l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 soit moins restreinte. Deux marqueurs d'activation, CD30 et LAG-3, semblent préférentiellement associés avec des réponses Th2 et Th1 respectivement [Annunziato, 1996; Del Prete, 1995].

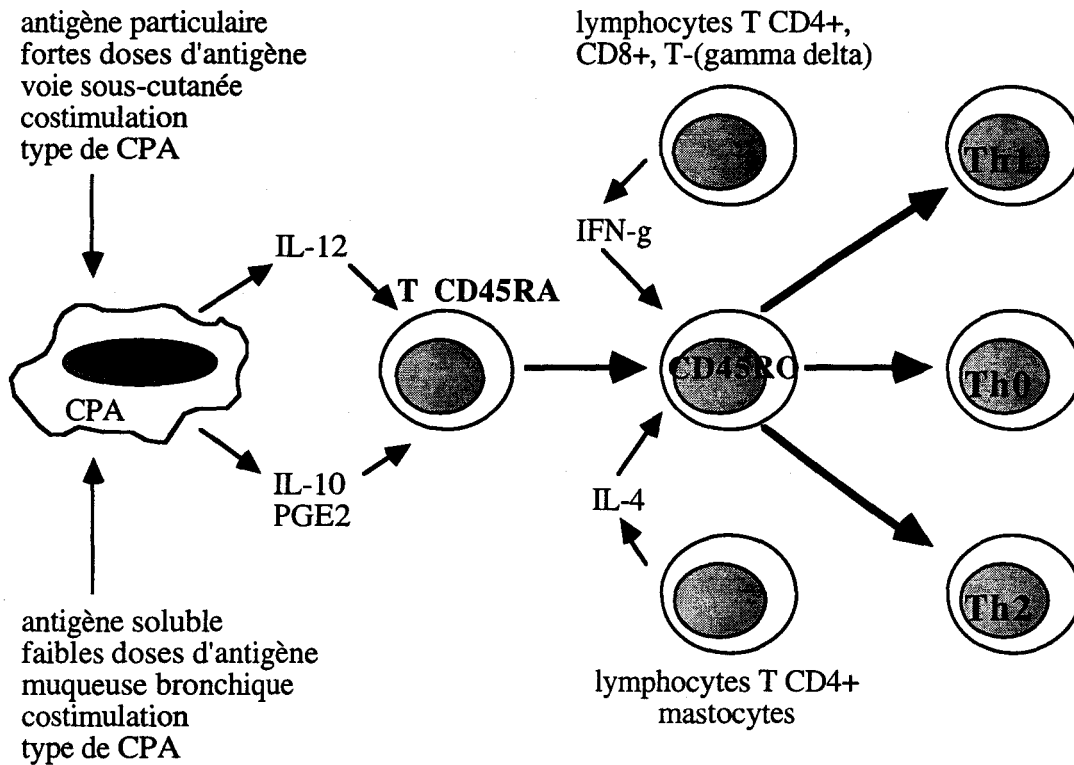
#### **\* Nature des signaux polarisant vers le type Th1 ou Th2**

La sélection d'un phénotype Th se produit à un stade très précoce de la réponse immune et est déterminé par un certains nombre de facteurs incluant (1) l'environnement en cytokines au moment de la sensibilisation, (2) la dose d'antigène, (3) la nature et l'intensité des signaux d'activation médiés par le récepteur T (TCR), (4) les signaux costimulateurs fournis par les molécules de surface exprimés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), (5) le type de CPA présentant l'antigène aux cellules naïves, et (6) le fond génétique du donneur des cellules T [Delespesse, 1997; Seder, 1994]. Les données obtenues chez l'homme en utilisant des



**Tableau 1:** CARACTERISTIQUES ET PROPRIETES DES SOUS-POPULATIONS Th1 ET Th2 murines (d'après [Cavaillon, Les cytokines, 2ème édition])

	Th1	Th2
<i>Cytokines</i>		
IL-2	+	-
IFN- $\gamma$	+	-
TNF- $\beta$	+	-
IL-4	-	+
IL-5	-	+
IL-6	-	+
IL-10	-	+
IL-13	-	+
IL-3	+	+
GM-CSF	+	+
TNF- $\alpha$	+	+
<i>Fonctions</i>		
Hypersensibilité retardée	+	-
Prolifération et différenciation des éosinophiles	-	+
Collaboration avec les lymphocytes B		
IgM et IgG3	+	+
IgG2a	+	-
IgG1	+	++
IgE	-	+



**Figure 2: Facteurs et cellules impliqués dans l'induction d'une réponse Th1, Th0 et Th2.**

Des facteurs dérivés des cellules présentatrices (CPA), des cytokines dérivées des lymphocytes T, le type de CPA, la dose et la voie d'administration de l'allergène peuvent fortement influencer la réponse T spécifique de l'allergène.  
(d'après [Joost Van Neerven, 1996])

modèles *in vitro* ont suggéré un rôle critique des cytokines dans le développement des cellules Th vers un profil de sécrétion de cytokines ou un autre, au moment de la présentation de l'antigène (figure 2). Mingari *et al* ont suggéré que les thymocytes humains CD4<sup>+</sup> possèdent la capacité de se développer en cellules produisant des cytokines de type 2 comme l'IL-4 et l'IL-5, alors que la capacité à produire des cytokines de type 1 est acquise uniquement après une sensibilisation par l'IL-12 [Mingari, 1996].

#### **\* *Th1/Th2 et allergie***

Différentes observations supportent le concept que les pathologies allergiques reflètent une réponse dominée par les Th2: (1) les allergènes provoquent l'expansion des cellules T CD4<sup>+</sup> présentant un profil Th2 chez les atopiques, alors que chez les non atopiques les cellules de type Th1 prédominent; (2) les cellules de type Th2 s'accumulent dans les organes cibles des patients allergiques; (3) la stimulation allergénique de rappel entraîne une activation locale et un recrutement des cellules de type Th2 spécifiques de l'allergène; (4) les cellules Th2 CD30<sup>+</sup> spécifiques de l'allergène sont présentes durant la période d'exposition à l'allergène [Romagnani, 1997]; (5) une immunothérapie spécifique réussie est associée à des changements dans le profil de cytokines produites par les cellules Th spécifiques de l'allergène. Ainsi, alors que les lymphocytes T de sang périphérique de patients sensibles aux venins d'hyménoptères produisent des cytokines de type 2; après immunothérapie spécifique, le profil d'expression des ARNm codant pour les cytokines est altéré, pour les cellules T stimulées par l'allergène, au profit des cellules de type Th1 [Akoum, 1996]. Tout ceci suggère que les individus atopiques présentent des altérations du développement de leurs cellules Th. L'observation que des clones T CD4<sup>+</sup> générés à partir de sang de cordon ombilical de nouveau-nés de parents atopiques produisent de plus fortes concentrations d'IL-4 que des nouveau-nés de parents non atopiques [Piccinni, 1996], confirme cette hypothèse.

#### **\* *Lymphocytes CD8<sup>+</sup> de type 1 et 2***

Bien que la plus grande majorité des cellules T CD8<sup>+</sup> produisent de l'IFN- $\gamma$  mais pas d'IL-4, des clones T CD8<sup>+</sup> produisant de l'IL-4 ont pu être générés après stimulation de cellules CD8<sup>+</sup> murines par de l'IL-4, de l'IL-2 et un anti-CD3 fixé [Seder, 1992]. Il est ainsi possible de subdiviser la population de CD8<sup>+</sup> en Tc1 et Tc2, lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> produisant des cytokines de type 1 ou de type 2 [Sad, 1995]. Comme pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, les cytokines présentes durant la stimulation des lymphocytes CD8<sup>+</sup> naïfs

influencent le profil de sécrétion des cytokines par les cellules effectrices. Ainsi, une sensibilisation avec de l'IL-12 génère des cellules effectrices produisant de l'IFN- $\gamma$ ; alors qu'une sensibilisation avec de l'IL-4 génère des cellules effectrices produisant de l'IL-4 et de l'IL-5 [Croft, 1994].

### **1.3.1.2- Autres cytokines**

L'effet promoteur de l'IL-4 sur le switch est amplifié par l'IL-5, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 [Gauchat, 1992b; Gauchat, 1992a; Vercelli, 1989]. Mais la production d'IgE par des cellules mononucléées, induite par l'IL-4 est bloquée de manière dépendante de la dose par les IFN- $\alpha$  et - $\gamma$  [Pene, 1988], et le TGF- $\beta$  [Punnonen, 1995]. L'IL-1Ra (IL-1 receptor antagonist) ou un anti-IL-1 $\beta$  inhibent la synthèse d'IgE dans une culture de cellules mononucléées stimulées par l'allergène [Sim, 1994].

Enfin, certaines chimiokines (définition paragraphe 2.3.1.1-) régulent la synthèse d'IgE. Ainsi, le RANTES et le MIP-1 $\alpha$  augmentent la production d'IgE et d'IgG4 induite par l'IL-4 et un Ac anti-CD40 [Kimata, 1996]. A l'inverse, l'IL-8 inhibe sélectivement la production d'IgE et d'IgG4 induite par l'IL-4 [Kimata, 1992].

### **1.3.1.2- Autres facteurs solubles**

La production d'IgE est favorisée par un grand nombre de facteurs solubles tels que (1) le virus d'Epstein-Barr (EBV) [Jabara, 1990] capable de se lier au CD21 des cellules B [Fingerth, 1984], (2) des glucocorticoïdes comme l'hydrocortisone [Jabara, 1991; Wu, 1991], (3) l'hormone de croissance (GH) et l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) [Kimata, 1994], (4) le leucotriène B4 (LTB4) [Yamaoka, 1994] et la prostaglandine E2 [Roper, 1992].

A l'inverse, le PAF inhibe la synthèse d'IgE dans un système de stimulation dépendant des cellules T, en bloquant l'expression des transcrits stériles et matures [Deryckx, 1992].

## **1.3.2- Régulation par des contacts cellulaires: rôle des molécules accessoires**

Des interactions entre les molécules de surface sont nécessaires pour stabiliser la formation de conjugués cellulaires et optimiser la communication et l'activation consécutive. De

nombreuses paires de molécules accessoires (CD28/B7, LFA-1/ICAM-1, CD2/CD58) participent aux interactions entre les cellules T et B, conduisant à la synthèse d'IgE. Les interactions entre ces paires de ligands/récepteurs complètent et/ou régulent l'activation des cellules B, dépendante des cellules T, qui suit l'interaction du CD40 avec le CD40L. Ces molécules de surface des cellules T, autres que le CD40L, peuvent être impliquées plus directement dans l'induction de la synthèse d'IgE: certains clones T issus de patients présentant une hypergammaglobulinémie de type IgM liée à l'expression d'un CD40L non fonctionnel sont capables d'induire une synthèse d'IgE en présence d'IL-4 *in vitro* [Life, 1994].

### 1.3.2.1- Rôle des familles de récepteurs CD28 et B7

Le rôle accessoire majeur semble être joué par les paires CD28-CTLA4/B7-1-B7-2. La famille des récepteurs B-7 contient au moins 4 membres: B7-1, B7-2, B70 (B7-2 et B70 sont codées par le même gène), et B7-3 [June, 1994]. B7-1 (ou CD80) et B7-2 (CD86) [Lenschow, 1993] sont tous deux membres de la superfamille des immunoglobulines, et sont exprimés par les cellules T et les monocytes activés, les cellules B et les cellules dendritiques.

La famille des récepteurs CD28 contient 2 membres, exprimés par les lymphocytes T: le CD28, et le CTLA-4 (Cytolytic T-Lymphocyte-Associated antigen) [June, 1994]. Le CTLA-4 est exprimé uniquement à la surface de lymphocytes T activés (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>), mais son expression est plus faible que celle du CD28. Cependant, des Ac anti-CD28 et anti-CTLA-4 agissent en synergie pour costimuler des cellules T CD4<sup>+</sup> préactivées [Linsley, 1992].

L'interaction CD28/B7 entretient des connexions avec d'autres mécanismes de régulation de la réponse IgE. Ainsi, l'engagement du CD40 augmente l'expression de B7 par les cellules B [Ranheim, 1993]; et l'engagement du CD28 a pour conséquence l'expression accrue de CD40L sur les cellules T [Klaus, 1994], l'augmentation de la sécrétion d'IL-4, et le développement de cellules produisant des cytokines de type Th2 [Webb, 1993]. L'IL-4 en retour, et dans une moindre mesure l'IL-2, augmentent l'expression de B-7 à la surface de cellules B activées [Valle, 1991]. La production d'IgE par les cellules B, dépendante des cellules T, est inhibée en bloquant l'interaction avec un Ac anti-CD28 [Life, 1995; Van der Pouw-Kran, 1995]. L'interaction CD28/B-7 semblerait avoir un rôle amplificateur préférentiel sur les réponses immunes secondaires [Valle, 1991].

### 1.3.2.2- Rôle de l'interaction CD23/CD21

L'engagement du CD21 à la surface des cellules B grâce à des Ac monoclonaux anti-CD21, ou par un traitement avec le CD23 soluble augmente la production d'IgE induite par l'IL-4, en augmentant le niveau de transcription du gène, chez des cellules mononucléées [Aubry, 1992]. Le blocage de l'interaction CD23/CD21 par un Ac anti-CD21, inhibe sélectivement la production d'IgE et d'IgG4 induite par l'IL-4 [Henchoz, 1994]. Comme une stimulation allergénique augmente l'expression du CD23, l'interaction CD23/CD21 apparaît contrôler la synthèse d'IgE de manière dépendante de l'isotype [Gagro, 1995]. De plus, un Ac anti-CD21 possède un effet synergique sur l'expression du transcrit productif  $\epsilon$  induit par un anti-CD40 [Henchoz, 1994].

L'expression de ces 2 molécules est modulée par l'activation cellulaire. Ainsi, la stimulation *in vitro* par l'allergène Dpt augmente l'expression du CD21 et du CD23 à la surface de cellules de patients allergiques [Gagro, 1994]. L'IL-13 et l'IL-4 augmentent l'expression de CD23 sur les cellules B au repos [Defrance, 1994; Punnonen, 1993].

### 1.3.2.3- Rôle de l'interaction ICAM-1/LFA-1

La stimulation de cellules B purifiées par l'IL-4 et un anti-CD40 conduit à l'augmentation de l'expression de l'ICAM-1 (CD54), et le changement d'avidité du LFA-1 (CD11a-CD18, ligand de l'ICAM-1). L'addition, à une culture de lymphocytes B, d'un Ac anti-ICAM-1 augmente la synthèse d'IgE induite par l'IL-4 et un Ac anti-CD40; à l'inverse, un Ac anti-CD11a l'inhibe, tandis qu'un Ac anti-CD18 n'a pas d'effet [Katada, 1996]. De même, si l'ICAM-1 de cellules T fixées est bloqué par un Ac, la synthèse d'IgE dépendante de l'IL-4 est inhibée [Armerding, 1996]. En fait, un Ac anti-ICAM-1 augmente l'expression de gène induite par l'IL-4 et un anti-CD40, alors qu'un anti-CD11a (chaîne légère du LFA-1, ligand de l'ICAM-1) l'inhibe [Katada, 1996].

### 1.3.2.4- Rôle de l'interaction CD58/CD2

L'interaction du CD58 (LFA-3) à la surface des cellules B avec le CD2 porté par les cellules T, et la stimulation par l'IL-4 induisent une production d'IgE par des cellules B purifiées. Cette production est indépendante de la voie du CD40. L'addition d'Ac anti-CD58 et

d'Ac anti-CD40 à des cellules B en présence d'IL-4 n'a pas d'effet synergique, et la voie du CD40 induit toujours une réponse IgE plus élevée [Diaz Sanchez, 1994]. De plus, si le CD2 de cellules T fixées est bloqué par un Ac, la synthèse d'IgE dépendante de l'IL-4 est inhibée [Armerding, 1996]. L'interaction CD58/CD2 apparaît jouer un rôle important dans la production d'IgE au niveau des surfaces muqueuses [Diaz Sanchez, 1994].

### **1.3.3- Intervention d'autres cellules que les lymphocytes T CD4+ dans la régulation de la synthèse d'IgE**

#### **1.3.3.1- Les cellules T $\gamma/\delta$ et la régulation d'IgE**

Le CD40L est exprimé par les cellules T activées  $\alpha/\beta$  et  $\gamma/\delta$ , bien que l'expression soit plus faible sur les  $\gamma/\delta$  [Horner, 1995]. Des souris déficientes en cellules T  $\alpha/\beta$  produisent des Ig de tous les isotypes, avec des taux élevés d'IgE et d'IgG1, suggérant que les cellules T  $\gamma/\delta$  pourraient diriger la commutation isotypique *in vivo* [Wen, 1994]. Les cytokines produites par les T  $\gamma/\delta$  pourraient contribuer à établir un environnement de cytokines qui influencent la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en Th1 ou Th2 [Ferrick, 1995].

#### **1.3.3.1- Les basophiles/mastocytes et la régulation d'IgE**

Les basophiles et mastocytes humains sécrètent de l'IL-4 et de l'IL-13 [Burd, 1995] et expriment le CD40L [Gauchat, 1993]. Le stimulus physiologique optimal pour la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 semble être le cross-linking, par l'allergène, des IgE spécifiques liés à leurs récepteurs [Burd, 1995]. Ces cellules amplifient donc la synthèse d'IgE, plus qu'elles ne l'induisent.

## **1.4- Les récepteurs de l'IgE**

Les récepteurs de l'IgE jouent un rôle important dans les manifestations cliniques de l'allergie, mais également dans la régulation de la synthèse d'IgE. D'un côté, l'IgE subit un rétrocontrôle isotypique par ses récepteurs en favorisant la présentation de l'allergène: la liaison de complexes IgE-allergène à Fc $\epsilon$ RI ou RII, est suivie d'une internalisation, puis d'une

présentation par le CMH de classe II; ce qui favorise l'activation des T CD4<sup>+</sup> spécifiques de l'allergène. D'un autre côté, le CD23 engagé avec l'IgE bloque la boucle de rétrocontrôle positif.

### **1.4.1- Le récepteur de haute affinité: FcεR I**

#### **1.4.1.1- Structure et localisation du FcεR I**

Le FcεRI consiste en 4 polypeptides transmembranaires: αβγ<sub>2</sub>. La chaîne α lie l'IgE, et les chaînes β et γ sont nécessaires à l'insertion de la chaîne α dans la membrane et pour la transduction du signal. La portion extracellulaire de la chaîne α contient 2 domaines caractéristiques de la superfamille des Ig [Sutton, 1993]. Seule la chaîne α du récepteur lie l'IgE (au niveau des domaines Cε2 et Cε3) par le biais du second domaine: α<sub>2</sub> [Robertson, 1993; Zheng, 1991].

Classiquement décrite sur les mastocytes et les basophiles, l'expression du FcεRI a été démontrée sur les cellules épidermales de Langherhans [Bieber, 1992], les éosinophiles [Gounni, 1994], les monocytes [Maurer, 1994], et les plaquettes [Joseph, 1997].

#### **1.4.1.2- Fonctions du FcεR I**

Le récepteur de haute affinité sur les mastocytes tissulaires et les basophiles sanguins, est responsable des réactions d'hypersensibilité immédiate. Quand un allergène multivalent s'associe avec l'IgE lié au FcεRI, il induit un crosslinking des récepteurs entraînant une libération rapide des médiateurs stockés, notamment l'histamine, et la production de cytokines qui attirent et activent les cellules inflammatoires [Galli, 1991].

Le FcεRI semble posséder également un rôle dans la régulation de la synthèse d'IgE, puisque l'addition de la chaîne α sous forme soluble (rsFcεRIα), inhibe de manière dépendante de la dose la production d'IgE par des lymphocytes B IgE<sup>+</sup>, activés par l'IL-4 et un Ac anti-CD40. L'IgE de membrane, après interaction avec rsFcεRIα, fournit un signal négatif responsable de l'inhibition de l'accumulation du transcrite mature conduisant à la suppression de la synthèse d'IgE [Yanagihara, 1994].

Mais le FcεRI intervient également dans la présentation de l'antigène aux cellules T. Ainsi, Maurer *et al* ont montré que le FcεRI était le récepteur majeur des monocytes sanguins



qui permettait une présentation de l'antigène dépendante de l'IgE, suggérant que l'endocytose via le FcεRI est plus efficace que la capture et que la transformation de l'allergène [Maurer, 1995].

### **1.4.1.3- FcεR I et allergie**

L'analyse de l'expression du FcεRI à la surface des leucocytes périphériques de patients atopiques révèle que le FcεRI est 500 à 5000 fois plus fortement exprimé à la surface des basophiles que des monocytes et éosinophiles; et que son expression est plus élevée chez les atopiques que chez les sujets contrôles [Grant, 1997]. De plus, la quantité de cellules FcεRI<sup>+</sup> est plus élevée dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques que dans celles d'individus normaux. Les mastocytes constituent la majorité des cellules FcεRI<sup>+</sup> tissulaires (70%), suivis par les macrophages (25%) et les éosinophiles (3%). Enfin, l'expression du FcεRI dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques est corrélée avec le taux d'IgE sérique [Humbert, 1996].

## **1.4.2- Le récepteur de faible affinité: CD23 ou FcεR II**

### **1.4.2.1- Structure du CD23**

Glycoprotéine de 45kD, le CD23 est une molécule membranaire de type II composée d'une courte queue intracytoplasmique N-terminale (23 résidus), d'un domaine transmembranaire unique (20 résidus), et d'une large région extracytoplasmique C-terminale (277 résidus) [Kikutani, 1986a]. Son extrémité NH<sub>2</sub> cytoplasmique est alternativement codée chez l'homme par 2 types d'exons donnant 2 isoformes: le CD23a et le CD23b. Le CD23a est exprimé uniquement par les cellules B, et ceci, de manière constitutive; alors que le CD23b est exprimé sur de nombreux types cellulaires chez l'homme et la souris, et est inducible par l'IL-4 [Yokota, 1988]. L'extrémité COOH, exposée à l'environnement extracellulaire, est un domaine de type lectinique agissant comme un récepteur Fc en liant les domaines Cε3 de l'IgE [Bettler, 1989; Sutton, 1993]. Les monomères de CD23 de 45kD s'associent pour former des homotrimères à la surface cellulaire [Dierks, 1993; Sutton, 1993]. L'IL-4 et l'IL-13 induisent l'expression de CD23 à la surface de cellules mononucléées de sang périphérique [Konig, 1995; McKenzie, 1993], alors que l'IFN-γ, l'IFN-α, le TGF-β l'inhibent [Pene, 1988].

Le CD23 de surface est clivé en fragments solubles par un mécanisme autocatalytique [Letellier, 1990; Peterson, 1985]. Le taux de clivage est réduit par l'IgE et augmenté par des agents prévenant une glycosylation de la molécule. Il existe différents points de clivage du CD23 permettant la libération de différents fragments solubles du CD23 de poids moléculaire 37, 33, 27 et 25kD; les 2 derniers fragments étant issus des 2 premiers après action d'une thiolestérase spécifique des cellules CD23<sup>+</sup> [Letellier, 1989]. Une protéolyse ultérieure est possible, mais seuls les fragments de taille supérieure à 25kD restent des trimères. Les molécules solubles de CD23 (sCD23) conservent leur domaine lectinique, et donc lient l'IgE [Saxon, 1990].

#### **1.4.2.2- Distribution cellulaire du CD23**

Le CD23 est retrouvé sur une large variété de cellules humaines incluant les cellules B [Suemura, 1986], certains lymphocytes T [Yodoi, 1979], les monocytes [Melewicz, 1980], les éosinophiles et les plaquettes [Capron, 1986], les macrophages alvéolaires [Melewicz, 1982], les cellules folliculo-dendritiques [Johnson, 1986], les cellules de Langerhans stimulées par de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  [Bieber, 1989], une sous-population de cellules NK (CD3<sup>-</sup> NKH-1<sup>+</sup>) incubées avec des complexes IgE-anti-IgE [Kimata, 1988], et des cellules épithéliales de carcinome du nasopharynx contenant de l'EBV [Billaud, 1989]. Le CD23, exprimé à la surface des cellules B, est observé uniquement sur les cellules matures  $\mu+$ ,  $\delta+$ , mais est perdu après une commutation isotypique induisant des cellules  $\gamma+$ ,  $\alpha+$  ou  $\epsilon+$  [Kikutani, 1986b].

#### **1.4.2.3- Action régulatrice du CD23 sur la synthèse d'IgE**

Le CD23 possède de très nombreuses fonctions dont celle de réguler la synthèse d'IgE: le CD23 exerce son influence régulatrice sur le réseau IgE, en liant l'IgE et les complexes immuns contenant des IgE. De forts taux de complexes immuns contenant des IgE se liant au CD23 des cellules B inhibent la prolifération cellulaire B induite par un anti-IgM et de l'IL-4 [Luo, 1991]. De plus, des Ac monoclonaux anti-CD23 inhibe la production d'IgE dépendante de l'IL-4 par des cellules mononucléées de sang périphérique [Bonnefoy, 1990]. Cette action est à mettre en rapport avec le rôle activateur que joue l'interaction CD23-CD21 sur la production d'IgE (voir paragraphe 1.3.2.2-).

Les fragments solubles du CD23 supérieurs à 29kD, augmentent la synthèse d'IgE par les cellules B [Saxon, 1990] à un stade de réponse indépendant de l'IL-4, suggérant que le sCD23 régule l'activité des cellules B après la commutation vers l'IgE.

Le CD23 joue également un rôle dans la présentation de l'antigène: des cellules B transformées par l'EBV sont capables, en présence de complexes Der p 2 - IgE spécifiques de Der p 2, de présenter l'antigène à des clones cellulaires T CD4<sup>+</sup> spécifiques de Der p 2. Cette présentation d'antigène implique le CD23 des cellules B, puisqu'elle est inhibée en préincubant les cellules B avec un Ac anti-CD23 [van der Heijden, 1993].

#### 1.4.2.4- CD23 et allergie

Le CD23 est surexprimé chez les patients allergiques [Melewicz, 1981; Spiegelberg, 1979], et les taux sériques de sCD23 sont significativement plus élevés que chez les contrôles [Yanagihara, 1990]. De plus, les niveaux de sCD23 sont faiblement mais significativement corrélés à ceux d'IgE [Yanagihara, 1990]. Ces observations ont été effectuées chez des patients allergiques présentant des taux d'IgE supérieurs à 200 kU/l; mais lorsque des patients présentant des taux inférieurs sont inclus dans l'étude, aucune augmentation ou corrélation n'est mise en évidence [Wilhelm, 1994].

Les lymphocytes d'enfants asthmatiques allergiques expriment un plus fort pourcentage de cellules CD23<sup>+</sup>, et davantage de CD23 membranaire que les sujets contrôles. Durant une crise d'asthme, le pourcentage de lymphocytes B CD23<sup>+</sup> est accru dans la circulation périphérique. Cette augmentation est suivie de celle des IgE totales spécifiques de l'allergène. De plus les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> expriment transitoirement à leur surface le CD23, après culture des cellules mononucléées avec l'allergène spécifique et/ou de l'IL-4 recombinante [Gagro, 1995]. Les cellules épithéliales bronchiques des patients présentant un asthme allergique expriment du CD23 à leur surface, contrairement à celles de patients asthmatiques non allergiques, ou à des sujets contrôles [Campbell, 1994].

Enfin, Der p 1, allergène majeur de *Dermatophagoides pteronyssinus*, possède une activité protéasique [Chua, 1988] qui lui permet de cliver sélectivement le CD23 à la surface des cellules B. Ce clivage prive alors les cellules B d'un important mécanisme de limite de la synthèse d'IgE, et génère du sCD23 qui augmente directement la synthèse d'IgE [Hewitt, 1995].

### 1.4.3- Mac-2 ou $\epsilon$ BP (epsilon Binding Protein)

La molécule  $\epsilon$  BP possède 2 domaines: l'extrémité carboxy-terminale est constituée d'un domaine lectinique, alors que l'extrémité amino-terminale est composée de répétitions de séquences hautement conservées de 9 acides aminés, formant une structure hélicoïdale hypothétique [Liu, 1993]. Cette lectine soluble est capable de former des oligomères non stables en solution; leur stabilité semble dépendante d'une liaison à des ligands multivalents comme l'IgE [Hsu, 1992]. L' $\epsilon$  BP a une distribution tissulaire large [Flotte, 1983]; en particulier, les neutrophiles humains expriment l' $\epsilon$  BP, et peuvent ainsi être activés par des Ac IgE [Truong, 1993].

L' $\epsilon$  BP pourrait jouer un rôle important dans l'inflammation allergique: chez le rat, il a été montré que l' $\epsilon$  BP reconnaissait le Fc $\epsilon$ RI des mastocytes [Frigeri, 1993]. Ainsi, l' $\epsilon$  BP pourrait relier le Fc $\epsilon$ RI et l'IgE lié au récepteur, ou réaliser un pontage entre le Fc $\epsilon$ RI et l'IgE; et comme l' $\epsilon$  BP a la capacité de se polymériser, il pourrait aussi induire l'aggrégation des récepteurs, et donc l'activation des mastocytes [Liu, 1993].

*La production d'IgE par les cellules B spécifiques est donc le résultat (1) de la présentation de l'allergène aux cellules T aboutissant à une production de cytokines, et (2) de l'interaction entre les cellules T et B stabilisée par des molécules accessoires. Bien que la fixation de l'IgE à ses récepteurs de haute affinité présents à la surface des mastocytes soit responsable de la réaction immédiate observée dans l'asthme (augmentation de la perméabilité vasculaire, œdème et bronchospasme), ses rôles dans le développement de la réaction retardée (liée à l'inflammation bronchique) et de l'HRB restent encore méconnus.*

## 2. LA REACTION INFLAMMATOIRE

L'infiltration tissulaire par les éosinophiles, les lymphocytes et les neutrophiles est une caractéristique des pathologies allergiques telles que l'asthme bronchique, la rhinite allergique et la dermatite atopique. Bien que leur rôle dans l'inflammation allergique soit encore mal connu, ces cellules peuvent entraîner des altérations tissulaires par l'intermédiaire de la libération de

protéines cytotoxiques dérivées des granules et de métabolites de l'oxygène. Le recrutement de cellules inflammatoires au niveau des sites inflammatoires allergiques implique une série d'évènements incluant l'adhésion aux cellules endothéliales, le passage de la barrière endothéliale et la migration tissulaire consécutive à un gradient chimiotactique. Ces processus sont régulés par la libération de médiateurs et de cytokines proinflammatoires.

La compréhension de la pathophysiologie de l'asthme a été améliorée grâce à l'analyse du tissu bronchique des patients par le moyen de bronchoscopie permettant l'obtention de biopsies et de lavages bronchoalvéolaires (LBA).

## **2.1- Les cellules impliquées dans l'inflammation pulmonaire allergique**

### **2.1.1- Les mastocytes**

Les mastocytes sont présents de manière physiologique dans les bronches de sujets normaux, mais sont plus nombreux chez les patients asthmatiques [Pesci, 1993]. Ils sont activés chez les asthmatiques: les taux de tryptase, d'histamine et de prostaglandine D2 (PGD2) sont augmentés dans le liquide de LBA. Les mastocytes apparaissent jouer un rôle critique au cours de la réponse bronchoconstrictrice précoce qui suit l'inhalation de l'allergène, par la libération d'histamine et d'autres médiateurs vaso-actifs qui induisent une bronchoconstriction aiguë, un œdème et une sécrétion de mucus. Cependant, les mastocytes libèrent également des cytokines de type 2 (IL-4 et IL-5), et des médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) [Bradding, 1992] pouvant réguler l'inflammation des voies aériennes.

### **2.1.2- Les éosinophiles**

En cas d'asthme chronique, le nombre d'éosinophiles détectés dans les biopsies bronchiques est augmenté. Ces cellules sont généralement localisées sous la membrane basale et sont activées; l'activation est corrélée avec la sévérité de l'asthme [Bousquet, 1995; Bradley, 1991]. De plus, les éosinophiles sont capables d'interagir avec d'autres cellules, en particulier les lymphocytes T en augmentant l'expression d'ICAM-1, de LFA-3 et d'HLA-DR [Mengelers, 1994].

Les éosinophiles jouent un rôle destructeur important dans l'asthme par la libération de produits hautement toxiques capables de désquamer l'épithélium: la MBP (major basic protein), l'ECP (eosinophil cationic protein), l'EPO (eosinophil peroxidase) et des radicaux libres d'oxygène. Les éosinophiles libèrent également des cystéinyl-leucotriènes possédant des propriétés vaso-actives, de nombreuses cytokines et des facteurs de croissance; mais leur rôle dans la régulation de l'inflammation des voies aériennes et dans le remodellement tissulaire est encore mal connu [Gleich, 1993].

### **2.1.3- Les lymphocytes**

Les lymphocytes T représentent un autre type cellulaire majeur présent dans l'infiltrat des voies aériennes des patients asthmatiques [Corrigan, 1992]. Ils sont majoritairement de type CD4<sup>+</sup> par rapport aux CD8<sup>+</sup>, le rapport CD4:CD8 est plus élevé chez les asthmatiques par rapport aux sujets sains [Azzawi, 1990], et le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> dans les LBA est corrélé avec le nombre d'éosinophiles et la sévérité de l'asthme [Walker, 1991]. Les lymphocytes T sont activés comme l'atteste la présence des marqueurs CD25, HLA-DR et VLA-1, dont l'expression est accrue chez les asthmatiques [Bradley, 1991; Walker, 1991]. A l'inverse, peu de cellules B sont présentes dans les bronches des asthmatiques.

Les lymphocytes T des biopsies bronchiques et des LBA produisent des cytokines de type Th2. Des lymphocytes issus du LBA d'individus allergiques et asthmatiques présentent des niveaux d'expression accrus d'ARNm codant pour l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF par rapport aux sujets contrôles [Robinson, 1992]. L'ARNm codant pour l'IL-5 a également été identifié par hybridation *in situ* sur des biopsies bronchiques; les cellules positives sont localisées sous la membrane basale de l'épithélium [Hamid, 1991]. Dans un modèle de souris sensibilisée par voie aérienne, la déplétion *in vivo* des cellules T diminue la production de cytokines de type Th2, et l'éosinophilie pulmonaire; suggérant un rôle des cellules T dans l'accumulation des éosinophiles au niveau des voies aériennes [Garlisi, 1995].

### **2.1.4- Les macrophages**

Les macrophages sont constitutivement présents en grande quantité dans la lumière bronchique. Les macrophages alvéolaires du LBA d'asthmatiques sont hyperréactifs: ils sont hypodenses et leur niveau d'activation est corrélé avec la sévérité de l'asthme [Cluzel, 1987].

Une stimulation allergénique (challenge) au niveau alvéolaire induit une activation rapide des macrophages alvéolaires [Tonnel, 1983]. Ils sont alors capables de synthétiser des médiateurs pouvant être destructeurs pour la bronche (des enzymes, des éicosanoïdes et des radicaux oxygénés), des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  [Gosset, 1991], anti-inflammatoires comme l'IL-10 [Borish, 1996] ou impliquées dans la différenciation des mastocytes et des éosinophiles comme le GM-CSF [Howell, 1989; Tachimoto, 1997; Welker, 1997].

### **2.1.5- Les neutrophiles**

En réponse à certains stimuli, les neutrophiles produisent de nombreux médiateurs comme des protéases capables de détruire le tissu pulmonaire [Kay, 1989], ainsi que des chimiokines comme l'IL-8, le MIP-1 $\alpha$  et le MIP-1 $\beta$  (voir paragraphe 2.3.1.1-).

Dans différents modèles animaux, parmi les nombreuses cellules retrouvées dans le LBA après inhalation d'allergène se trouvent les neutrophiles [Gallin, 1993; Underwood, 1995]. Chez l'homme, le rôle des neutrophiles dans l'asthme allergique reste controversé, bien qu'une augmentation de l'afflux des neutrophiles puisse être observé dans la muqueuse bronchique après provocation allergénique [Beasley, 1989].

### **2.1.6- Les plaquettes**

Les plaquettes peuvent générer un grand nombre de médiateurs impliqués dans l'asthme, comme le PAF (Platelet Activating Factor) [Benveniste, 1982] ou des facteurs histaminolibérateurs, comme le PF4 (platelet factor 4) [Brindley, 1983]. Cependant, d'autres types cellulaires sont capables de produire ces molécules (macrophages, éosinophiles, plaquettes) et la contribution des plaquettes est ainsi difficile à évaluer [Djukanovic, 1990].

### **2.1.7- Les cellules épithéliales**

Pendant longtemps, les cellules épithéliales ont été considérées comme ayant un simple rôle de barrière participant à la sécrétion du mucus, et à l'élimination des agents nocifs grâce aux mouvements continus de leurs cils. Plus récemment, il a été démontré que ces cellules avaient une activité plus étendue.

Chez des patients décédés d'une crise d'asthme, l'épithélium bronchique est généralement desquamé. La perte de l'épithélium met à nu les nerfs et les mastocytes. La désquamation semble avoir des conséquences importantes puisque la présence de lésions épithéliales caractérisées par une augmentation de l'espace intercellulaire a été corrélée avec l'hyperréactivité bronchique [Bousquet, 1995].

Les cellules épithéliales peuvent être activées par des polluants comme le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et l'ozone [Devalia, 1993], par de l'histamine, du PAF, certaines cytokines, et même par les IgE puisque le CD23 ou FcεRII a été détecté sur des cellules épithéliales d'asthmatiques [Campbell, 1994]. En outre, les cellules épithéliales d'asthmatiques présentent les marqueurs d'activation ICAM-1 et HLA-DR [Vignola, 1993], augmentent spontanément leur libération de médiateurs proinflammatoires (15-HETE: 15-hydroxyeicosatétranoic acid, PGE-2) [Campbell, 1993], et sont capables de produire des facteurs chimioattractants pour les lymphocytes [Bellini, 1993].

## **2.2- Intervention des molécules d'adhérence dans l'inflammation pulmonaire allergique**

Les leucocytes circulants du sang doivent adhérer puis traverser la barrière endothéliale pour entrer dans les différents tissus lymphoïdes impliqués dans leur recirculation. La rate constitue une exception puisque des petites artérioles se terminent dans le parenchyme par des extrémités ouvertes, permettant un accès continu et ininterrompu des leucocytes sanguins. Dans tous les autres organes lymphoïdes secondaires, un fort pourcentage d'extravasation des lymphocytes se produit au niveau de veinules postcapillaires histologiquement distinctes, les HEV (High Endothelial Venules). La plupart des lymphocytes recirculants se lient sélectivement aux HEV, mais ignorent l'endothélium vasculaire normal; ce qui est fortement en opposition avec ce qui se passe au niveau des sites inflammatoires. Dans ces conditions, le tissu endommagé apparaît induire de nouvelles propriétés adhésives à l'endothélium adjacent; ce qui aboutit à une extravasation locale de leucocytes. Les molécules d'adhérence ont été identifiées et appartiennent à différentes familles: la famille des sélectines, des intégrines, la superfamille des immunoglobulines, et un groupe consistant en des molécules fortement glycosylées [Imhof, 1995].



## 2.2.1- Les différentes molécules d'adhérence

### 2.2.1.1- Les sélectines

Les sélectines désignées sous les termes de L- P- et E-sélectines (tableau 2) [Bevilacqua, 1991] sont une famille de récepteurs trouvées à la surface des leucocytes (L) [Lasky, 1989; Tedder, 1989], des plaquettes et des cellules endothéliales (P) [Johnston, 1989], et des cellules endothéliales seules (E) [Bevilacqua, 1989]. Ces récepteurs appartiennent à une même famille parce qu'ils partagent une structure mosaïque commune consistant en un domaine N-terminal lectinique de type C (liant les sucres), un domaine unique de type EGF (Epidermal Growth Factor), plusieurs répétitions consensus (SRC) et un court domaine C-terminal cytoplasmique. Les niveaux d'homologie de séquence entre les différents groupes de sélectines, au niveau des domaines lectiniques et des domaines de type EGF, sont de 60-70%, alors qu'elles ne sont que de 40% au niveau des domaines SRC; la différence principale étant le nombre de SRC.

Les sélectines se lient à des ligands carbohydrates via leur domaine lectinique. En fait, les carbohydrates anioniques sont capables de bloquer *in vitro* l'adhésion des leucocytes aux HEV des ganglions lymphatiques, et les tétrasaccharides: sialyl Lewis X et sialyl Lewis A (sLex, sLea), ou leurs formes sulfatées, se lient aux 3 types de sélectines. Le domaine de liaison des carbohydrates aux sélectines a été cartographié après mutation simple d'acides aminés, et la conformation protéique correcte semble dépendre d'une liaison de cations  $Ca^{2+}$  [Erbe, 1993; Graves, 1994].

### 2.2.1.2- Les intégrines

Les intégrines sont impliquées dans de nombreux processus biologiques incluant le développement embryonnaire, le maintien de l'intégrité tissulaire et le homing des leucocytes [Holzmann, 1989; Sonnenberg, 1993]. Ce sont des protéines hétérodimériques formées de l'association de 2 sous-unités:  $\alpha$  (150 kD) et  $\beta$  (100 kD). Pour l'instant, 15 chaînes  $\alpha$  et 8 chaînes  $\beta$  sont connues, et 21 hétérodimères différents ont été trouvés. Les populations leucocytaires peuvent exprimer 13 intégrines différentes, et 6 d'entre elles sont importantes dans l'interaction leucocytes-endothélium: elles appartiennent aux sous-familles des intégrines  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 7$  (tableau 3).

**Tableau 2: LES SELECTINES ET LA REACTION INFLAMMATOIRE** (d'après la revue de [Imhof, 1995]).

Type de Sélectine	Localisation	Régulation	Ligands	Fonctions
<b>L-Sélectine</b>	tous les leucocytes, sauf les lymphocytes activés et mémoires	- <i>négative</i> : chimiokines, PMA (phorbol myristate acétate) - <i>positive</i> : IFN- $\gamma$	- sLex, sLea - GlyCAM-1 (HEV des ganglions lymphatiques périphériques) - CD34 (vaisseaux sanguins et progéniteurs hémato-poïétiques) - MadCAM-1 (HEV des plaques de Peyer, veinules de la lamina propria intestinale)	Entrée des lymphocytes et neutrophiles dans les sites inflammatoires
<b>P-Sélectine</b>	Cellules endothéliales  Plaquettes	- augmentation du transport intracellulaire induite par: l'histamine, la thrombine, le facteur du complément C5a, des radicaux oxygénés et divers neuropeptides - augmentation de la transcription par le TNF- $\alpha$	- sLex, sLea - L-Sélectine - PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1, exprimé sur de nombreux leucocytes) - une protéine de 120 kD	Initiation de la phase précoce de recrutement au niveau des sites inflammatoires  Recrutement des leucocytes au niveau des thrombi, induction de production de fibrine durant l'hémostase
<b>E-Sélectine</b>	Cellules endothéliales	- <i>induction</i> transcriptionnelle par l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , des neuropeptides et le LPS (lipopolysaccharide) - <i>inhibition</i> de l'expression induite par les cytokines, par le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et des agents anti-oxydants	- sLex, sLea - L-Sélectine - antigènes de lymphocytes cutanés: le CLA (Cutaneous Leukocyte Antigen), une protéine de 250 kD, et le SSEA-1 (Sialyl Stage-specific Embryonic Antigen)	Adhésion des neutrophiles, des monocytes et des lymphocytes T vers les sites inflammatoires

**Tableau 3: PRINCIPALES INTEGRINES IMPLIQUEES DANS LES INTERACTIONS LEUCOCYTE-ENDOTHELIUM**

(d'après la revue de [Imhof, 1995]).

Familles d'Intégrines	Nom du récepteur	Localisation	Ligands	Fonctions
<b>Intégrines <math>\beta</math> 1</b> (ou VLA: Very Late Antigen)	$\alpha 4\beta 1$ ou VLA-4	Leucocytes (sauf neutrophiles)	VCAM-1 (cellules endothéliales) fibronectine (composant de la matrice extracellulaire)	- adhésion des leucocytes à l'endothélium au niveau des sites inflammatoires - différenciation des lymphocytes
	$\alpha 6\beta 1$	Cellules endothéliales	ND	- homing des progéniteurs T vers le thymus - homing des leucocytes dans les tissus normaux non inflammatoires
<b>Intégrines <math>\beta</math> 2</b>	$\alpha 1\beta 2$ ou LFA-1	Leucocytes	ICAM-1, -2, -3	- interaction leucocyte-endothélium - autres interactions cellules-cellules telles que: activation des cellules T par les CPA, ou destruction des cellules infectées par des virus par des lymphocytes T cytotoxiques
	$\alpha m\beta 2$ ou Mac1	granulocytes et macrophages	ICAM-1, fibrinogène, C3bi (composant du complément), facteur X (facteur de coagulation)	recrutement des cellules myéloïdes au niveau des sites inflammatoires
<b>Intégrines <math>\beta</math> 7</b>	$\alpha 4\beta 7$ ou LPAM-1	lymphocytes colonisant l'intestin et les tissus lymphoïdes associés	MadCAM-1 (Adressine des cellules endothéliales de la muqueuse)	homing des lymphocytes aux plaques de Peyer: en situation normale
			VCAM-1 et fibronectine	en situation inflammatoire
	$\alpha E\beta 7$ ou $\alpha IEL\beta 7$ ou $\alpha HML\beta 7$	lymphocytes de l'intestin	E-Cadhérine (cellules épithéliales)	interaction des lymphocytes et de l'épithélium intestinal

Les 2 sous-unités sont des glycoprotéines transmembranaires, et plusieurs domaines cytoplasmiques des sous-unités  $\beta$  interagissent directement avec les filaments d'actine du cytosquelette. A l'extrémité N-terminale de la sous-unité  $\alpha$  se trouvent 7 domaines homologues répétés en tandem [Stanley, 1994]. Les 3 ou 4 derniers domaines répétés sont essentiels aux fonctions de l'intégrine, puisqu'il existerait un site de liaison aux cations  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ ; or la nature du cation peut affecter l'affinité et la spécificité vis-à-vis des ligands [Dransfield, 1992; Masumoto, 1993]. La spécificité des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  vis-à-vis de leur ligand dépend principalement de la chaîne  $\alpha$  associée (voir tableau 2). Enfin, dans beaucoup de cellules, les chaînes d'intégrines  $\beta 1$  immatures sont associées à des molécules chaperones, qui interviennent dans la rétention des chaînes  $\beta 1$  à l'intérieur de la cellule et dans l'assemblage des intégrines. L'expression d'hétérodimères matures à la surface cellulaire est alors régulée par la biosynthèse, l'assemblage et le transport de la chaîne  $\alpha$  [Lenter, 1994].

Un des mécanismes de fonctionnement des intégrines les plus importants est la transition rapide d'un état de faible affinité, non-adhésif, à un état transitoire de haute affinité, probablement suite à un changement conformationnel causé par une activation de la cellule [Hynes, 1992]. Cette caractéristique permet aux intégrines d'intervenir dans l'arrêt et l'adhésion ferme des leucocytes circulants sur l'endothélium vasculaire, rapidement suivie par l'adhésion intermédiaire durant la migration transendothéliale et finalement, la dé-adhésion et l'extravasation [Mackay, 1993]. En plus de la modulation d'affinité des intégrines, régulée par des signaux générés à l'intérieur des cellules (inside-out signalling), des études ont indiqué que les intégrines elles-mêmes peuvent transmettre des signaux aux cellules (outside-in signalling). Ainsi, la ligation des récepteurs intégrines peut initier de nombreuses réponses cellulaires incluant la différenciation, la prolifération, l'expression différentielle de gènes, l'assemblage du cytosquelette, la migration et la contraction de gels [Sastry, 1993].

### **2.2.1.3- Les molécules de la superfamille des immunoglobulines**

La superfamille des immunoglobulines (Ig) englobe un large groupe de molécules contenant plusieurs domaines de type immunoglobulinique. Chaque domaine est généralement codé par un exon et consiste en une séquence primaire de 60-70 acides aminés avec un pont disulfure reliant les résidus 50 et 70; d'autres résidus conservés sont impliqués dans l'établissement de la structure tertiaire. Cinq membres de cette famille sont impliqués dans les

interactions leucocytes-cellules endothéliales: l'InterCellular Adhesion Molecule-1 ou ICAM-1 (CD54a), l'ICAM-2 (CD54b), l'ICAM-3 (CD54c), le Vascular Cell Adhesion Molecule-1 ou VCAM-1 (CD106), et le Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 ou PECAM-1 (CD31). Quatre d'entre eux sont des ligands endothéliaux pour les leucocytes.

**\* Les molécules d'ICAM**

Les ICAM-1 et -2 sont des produits de gènes distincts mais homologues contenant, respectivement, 5 et 2 domaines Ig [Staunton, 1989].

L'ICAM-1 est faiblement exprimé à la surface de l'endothélium au repos, mais son expression s'accroît considérablement après quelques heures de stimulation par l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou l'IFN- $\gamma$  [Rothlein, 1988]. A l'inverse, l'ICAM-2 est exprimé constitutivement à un niveau élevé sur les cellules endothéliales au repos, et son expression n'est pas augmentée par l'activation des cellules [Nortamo, 1991]. Les ligands de l'ICAM-1 sont le LFA-1 (leucocyte function-activated antigen-1, CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18). L'affinité de l'ICAM-2 pour le LFA-1 semble être plus faible que celle de l'ICAM-1 [Staunton, 1989]; ce qui tend à impliquer l'ICAM-2 dans un trafic leucocytaire transendothélial constitutif mais faible, alors qu'une expression de novo d'ICAM-1 régule le trafic inflammatoire principal, comme le montre une étude réalisée sur des souris déficientes pour l'ICAM-1 [Sligh, 1993].

A la surface des leukocytes, l'expression des molécules d'ICAM est très différente: l'ICAM-1 est largement exprimée après induction, l'ICAM-2 est absente, et l'ICAM-3 est fortement exprimée à la surface des lymphocytes au repos et des monocytes. Ces 3 ICAM contribuent à la stabilisation des interactions entre cellules spécifiques de l'antigène: des anticorps dirigés contre ces 3 molécules sont nécessaires pour bloquer une réponse T spécifique de l'antigène et dépendante du LFA-1 [de Fougerolles, 1994].

**\* VCAM-1**

Un seul gène de VCAM-1 donne naissance à différentes isoformes après épissage alternatif; la forme majeure chez l'homme contient 7 domaines Ig [Hession, 1991]. L'intégrine VLA-4 lie le VCAM-1 par l'intermédiaire du premier et du quatrième domaine Ig [Osborn, 1992].

Le VCAM-1 est absent sur les cellules endothéliales au repos, mais les cellules répondent à l'IL-1 et au TNF en augmentant l'expression du VCAM-1, dont l'activité maximale est atteinte au bout de 6-12 heures [Swerlick, 1992]. De façon intéressante, l'IL-4 agit sur les

cellules endothéliales pour augmenter l'expression du VCAM-1, mais pas de la E-sélectine ou de l'ICAM-1 [Masinovski, 1990]. Ces observations suggèrent que le VCAM-1, tout comme l'ICAM-1, sont des régulateurs de l'extravasation au niveau des sites de l'inflammation.

Le VCAM-1 est également exprimé sur certaines populations de cellules dendritiques [Freedman, 1990], et après interaction avec son ligand sur la cellules B, participe à l'induction de la lymphopoïèse [Miyake, 1991].

#### **\* PECAM-1 ou CD31**

Le PECAM-1 / CD31 est exprimé sur les plaquettes et la plupart des leucocytes, et est présent constitutivement sur la paroi endothéliale *in vivo*. Cette molécule intervient à la fois dans l'adhésion des leucocytes et des plaquettes aux cellules endothéliales et la migration transendothéliale, essentiellement par le biais d'interactions homophiliques [De Lisser, 1993; Muller, 1993; Newman, 1990]. L'interaction du CD31 avec son ligand aboutit également à l'activation des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , conférant au CD31 un rôle critique dans la régulation de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium [Piali, 1993; Tanaka, 1992]. De plus, le CD31 est redistribué vers les bords des cellules endothéliales, lorsque celles-ci entrent en contact les unes avec les autres. Ceci laisse supposer que le CD31 peut participer aux interactions entre les cellules endothéliales limitant la perméabilité vasculaire [Ferrero, 1995].

### **2.2.1.3- Autres molécules impliquées dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium**

#### **\* CD44**

Le protéoglycane CD44 est une protéine de surface largement exprimée, et présente sous de nombreuses isoformes générées par épissage alternatif, dont 5 ont été détectées sur les leucocytes [Gunthert, 1993]. Le CD44 intervient dans l'adhésion cellulaire principalement par sa liaison aux acides hyaluroniques (HA), mais il peut également interagir avec des molécules de la matrice extracellulaire: le collagène, la laminine et la fibronectine [Jalkanen, 1992].

Le CD44 a été supposé participer à la liaison des lymphocytes aux HEV, principalement au niveau des plaques de Peyer, et à la liaison des lymphocytes aux cellules endothéliales activées; cependant les données sont trop controversées pour fournir une preuve définitive. L'injection *in vivo* d'anticorps anti-CD44, aboutissant à la perte du CD44 à la membrane des lymphocytes, n'a aucun effet sur l'extravasation des lymphocytes vers les organes lymphoïdes

au cours d'une circulation normale chez la souris; mais inhibe la formation d'un œdème et l'infiltration de leucocytes au niveau cutané, 24 heures après une stimulation antigénique [Camp, 1993]. Ces résultats indiquent que le CD44 n'est pas nécessaire à la circulation normale des leucocytes, mais l'est pour l'extravasation des leucocytes aux sites inflammatoires impliquant des tissus non lymphoïdes.

Le CD44 est également impliqué dans la maturation de précurseurs lymphoïdes et myéloïdes au niveau de la moëlle osseuse [Miyake, 1990], et dans la migration des prothymocytes vers leur lieu de maturation: le thymus [Horst, 1990]. Enfin, une fonction supposée du CD44, lorsqu'il est exprimé à la surface des cellules endothéliales, est la capacité à lier et présenter des chimiokines (comme le MIP-1 $\alpha$ ) aux leucocytes en contact avec l'endothélium [Tanaka, 1993].

#### \* *VAP-1 et L-VAP-2*

VAP-1 (vascular adhesion protein-1, 90kD) est une molécule d'adhérence endothéliale fortement exprimée au niveau des HEV de la plupart des organes lymphoïdes humains excepté les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, et sur les cellules dendritiques des centres germinatifs. Son expression est augmentée au cours d'une réaction inflammatoire [Salmi, 1992; Salmi, 1993].

L-VAP-2 (lymphocyte-vascular adhesion protein-2, 70 kD) est exprimé par une sous-population de veinules dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes, ainsi que dans quelques HEV de tissus lymphoïdes. L-VAP-2 est également présent sur 20% des lymphocytes du sang périphérique, préférentiellement les cellules B et les cellules CD8<sup>+</sup> [Airas, 1993].

### **2.2.2- Recrutement des leucocytes au cours de l'inflammation**

La migration transendothéliale des leucocytes au niveau du site inflammatoire s'effectue en 4 étapes: (1) l'adhérence faible ou rolling, (2) l'activation des leucocytes qui induit l'expression d'autres molécules d'adhérence, qui met fin au processus de rolling et conduit à (3) l'adhésion forte, et enfin, (4) la migration au travers de l'endothélium [Imhof, 1995].

Les leucocytes adhèrent faiblement aux cellules endothéliales au repos. Au cours de l'inflammation, le phénotype de l'endothélium est dramatiquement modifié suite à l'activation par des cytokines telles que l'IL-1, le TNF et l'IFN- $\gamma$ . L'IL-1 et le TNF sont principalement produites par les macrophages stimulés par des produits bactériens, et l'IFN- $\gamma$  est libéré par les

cellules NK et les cellules T qui ont rencontré leur antigène spécifique. Ces différentes cytokines proinflammatoires induisent l'expression de molécules d'adhérence à la surface de l'endothélium. La première à apparaître, est la P-sélectine, qui permet l'étape d'adhérence faible ou rolling des leucocytes au site de lésion du tissu. La E-sélectine est trouvée de manière prédominante au niveau des sites inflammatoires cutanés, après induction de sa synthèse par l'IL-1 ou le TNF, mais son expression maximale ne peut être atteinte que 4 à 6 heures après la stimulation endothéliale. La E-sélectine favorise l'attachement des neutrophiles, monocytes et lymphocytes. Quelques minutes après l'activation par des cytokines, les cellules endothéliales produisent des chimiokines, du leucotriène B4 et du PAF; tous sont des agents proinflammatoires pouvant favoriser l'expression des intégrines sur les leucocytes en phase de rolling [Springer, 1994]. Les intégrines des leucocytes activés se lient alors aux molécules de la superfamille des Ig: l'ICAM-1 et le VCAM-1, dont l'expression augmente en quelques heures suite à la stimulation par les cytokines proinflammatoires.

L'augmentation de la perméabilité est également une composante importante de l'inflammation. Des médiateurs tels que la thrombine et l'histamine, induisant une rétraction cellulaire endothéliale et augmentant la perméabilité, pourraient agir au niveau de la redistribution du CD31 [Ferrero, 1995].

### **2.2.3- Molécules d'adhérence et asthme**

Les modifications d'expression des différentes molécules d'adhérence chez l'asthmatique allergique par rapport au sujet sain sont encore très controversées. Ainsi, Gosset *et al* ont montré que, chez des patients asthmatiques par rapport à des sujets contrôles, une expression accrue d'ICAM-1 est observée au niveau de l'épithélium et de l'endothélium, alors que la E-sélectine et le VCAM-1 ne sont surexprimés que sur l'endothélium. L'expression des molécules d'adhérence sur l'endothélium est corrélée à l'infiltrat leucocytaire total, et à celui d'éosinophiles en particulier [Gosset, 1995]. De même, Ohkawara *et al* ont démontré une surexpression de ces 3 molécules d'adhérence endothéliales [Ohkawara, 1995], la présence de VCAM-1 étant corrélée avec les taux d'IL-4 dans le LBA [Fukuda, 1996]. A l'inverse, d'autres auteurs n'ont pas trouvé de différence d'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 entre les asthmatiques et les contrôles [Bentley, 1993; Montefort, 1992], bien que les molécules d'adhérence endothéliales ICAM-1 et E-sélectine, mais pas VCAM-1, soient augmentées 6 heures après un challenge allergénique [Montefort, 1994]. L'expression du



CD44, du LFA-1, de VLA-4 et de Mac-1 est plus élevée dans la muqueuse bronchique des asthmatiques, le nombre de cellules LFA-1<sup>+</sup> étant corrélé à celui des éosinophiles activés EG2<sup>+</sup> [Ohkawara, 1995; Peroni, 1996]. Par contre, l'expression de la L-sélectine est réduite après un challenge allergénique chez l'asthmatique [Georas, 1992].

La contribution des différentes molécules d'adhérence dans le recrutement des leucocytes au cours de l'inflammation pulmonaire a pu être analysée dans des modèles animaux. Chez le rat, un anticorps anti-ICAM-1 n'a pas d'effet sur l'afflux des cellules inflammatoires induit par un antigène, sauf sur celui des éosinophiles [Asakura, 1996; Sun, 1994], alors qu'un Ac anti-VLA-4 inhibe le recrutement des éosinophiles et des lymphocytes [Richards, 1996]. De même, chez le singe, un anticorps anti-ICAM-1 inhibe la migration des éosinophiles induite par l'antigène [Wegner, 1990]. Chez des souris Balb/c sensibilisées à l'ovalbumine (OVA), seul le blocage *in vivo* de l'interaction VCAM-1/VLA-4 prévient l'infiltrat d'éosinophiles dans la trachée, et le blocage de l'interaction VCAM-1/VLA-4 inhibe l'afflux de cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> plus puissamment que le blocage de l'interaction ICAM-1/LFA-1 [Nakajima, 1994]. Enfin, des souris double mutantes pour ICAM-1/P-sélectine ont un afflux de neutrophiles dans le poumon identique à celui des souris de type sauvage après infection par *Streptococcus pneumoniae* [Bullard, 1995].

Des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , régulant l'expression des molécules d'adhérence sont également détectées en quantité plus importante chez les asthmatiques comme en témoigne l'augmentation de l'expression des ARNm correspondants dans les cellules du LBA [Krishnaswamy, 1993; Ying, 1991]. De plus, des souris CBA/J inhalant l'antigène SEA (l'antigène soluble de l'œuf de *Schistosoma mansoni*) développent une inflammation pulmonaire caractérisée par un afflux précoce de neutrophiles (8-24h) et un afflux tardif d'éosinophiles (48-72h). La neutralisation du TNF- $\alpha$  diminue significativement le recrutement des leucocytes [Lukacs, 1995]. Enfin, l'IL-4 cytokine de type 2 dont l'expression est accrue chez l'asthmatique [Robinson, 1992], peut augmenter l'expression de VCAM-1 et ainsi contribuer à l'extravasation des lymphocytes, éosinophiles et monocytes [Masinowski, 1990].

## **2.3- Intervention des molécules chimioattractantes dans l'inflammation pulmonaire allergique**

Des molécules solubles interviennent également dans le recrutement leucocytaire au site de l'inflammation: elles sont principalement soit des cytokines, soit des médiateurs lipidiques.

### **2.3.1- Les différentes molécules chimioattractantes**

#### **2.3.1.1- Les chimiokines**

Les chimiokines constituent un groupe de cytokines chimiotactiques identifiées comme des polypeptides basiques liant l'héparine, et d'un poids moléculaire de l'ordre de 8-9 kD. Les chimiokines ont été classées en 2 sous-familles: les chimiokines CXC et les chimiokines CC, selon leur séquence en acides aminés. Les 2 cystéines des chimiokines CXC sont séparées par un acide aminé, alors que les 2 cystéines des chimiokines CC sont adjacentes. La découverte d'une nouvelle molécule connue comme une lymphotactine, suggère que les chimiokines pourraient avoir une sous-famille additionnelle: la/les chimiokine(s) C [Kelner, 1994]. Cette molécule, isolée à partir des cellules pro-T, ne possède pas 2 des 4 cystéines caractérisant les chimiokines, est produite par les cellules T CD8<sup>+</sup> et les thymocytes  $\alpha\beta^+$  CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> et est chimiotactique pour les thymocytes CD8<sup>+</sup>.

##### **\* Les chimiokines CXC**

Les chimiokines CXC (tableau 4) ont pour caractéristique fonctionnelle majeure la capacité à attirer les neutrophiles. Leur chef de file est l'IL-8 [Teran, 1996b]. Deux récepteurs pour l'IL-8 ont été caractérisés: l'IL-8-RA ou CXCR1 lie l'IL-8 avec une forte affinité et d'autres chimiokines CXC avec une faible affinité, alors que l'IL-8-RB ou CXCR2 lie, aussi bien l'IL-8 que d'autres chimiokines CXC, avec une forte affinité [Lee, 1992].

##### **\* Les chimiokines CC**

Les membres de la sous-famille des chimiokines CC sont chimiotactiques pour les éosinophiles, les monocytes et les lymphocytes. Cette famille comprend au moins 16 molécules distinctes (les principales sont résumées dans le tableau 5) [Teran, 1996b]. Trois récepteurs pour les chimiokines CC ont été identifiés: (1) un récepteur pour le MCP-1 qui lie le MCP-1 et

**Tableau 4:** PRINCIPALES CHIMIOKINES CXC humaines, ou chimiokines- $\alpha$

<b>Chimiokines</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Sources cellulaires</b>
<b>IL-8</b>	attire et active les neutrophiles, les lymphocytes et les basophiles	monocytes/macrophages, cellules T fibroblastes, cellules endothéliales kératinocytes, neutrophiles cellules épithéliales
<b>GRO<math>\alpha</math></b> ou <b>MGSA</b>	- attire les neutrophiles et les basophiles - active les neutrophiles - stimule la prolifération des cellules de mélanome humain	monocytes/macrophages, cellules T fibroblastes, neutrophiles cellules épithéliales bronchiques
<b>GRO<math>\beta</math></b>	- attire les neutrophiles et les basophiles - active les neutrophiles	monocytes
<b>GRO<math>\gamma</math></b>	- attire les neutrophiles et les basophiles - active les neutrophiles	monocytes
<b>NAP-2</b> ou <b>CTAP-III</b> ou <b><math>\beta</math>-TG</b>	attire et active les neutrophiles	plaquettes
<b>ENA 78</b>	attire et active les neutrophiles	cellules épithéliales (A549), plaquettes, monocytes, cellules endothéliales
<b>GCP-2</b>	active et attire les granulocytes	
<b>IP-10</b>	attire et active les neutrophiles et les lymphocytes T	monocytes, fibroblastes, cellules endothéliales kératinocytes
<b>mig</b>	attire et active les lymphocytes T	monocytes/macrophages

(GRO $\alpha$  = Granulocyte Activating Factor, MGSA = Melanoma Growth-Stimulating Activity, NAP-2 = Neutrophil Activating Peptide-2, CTAP-III = Connective Tissue Activating peptide III,  $\beta$ -TG =  $\beta$ -ThromboGlobulin, ENA 78 = Epithelial Neutrophil Activating peptide-78, GCP-2 = granulocyte chemotactic protein 2, IP-10 = Interferon  $\gamma$ -Inducible protein 10)

(d'après [Terran, 1996], [Haskill, 1990], [Proost, 1993], [Geiser, 1993] et [liao, 1995])

**Tableau 5: PRINCIPALES CHIMIOKINES CC humaines, ou chimiokines- $\beta$**

<b>Chimiokines</b>	<b>Fonctions</b>	<b>Sources cellulaires</b>
<b>RANTES</b>	- attire les lymphocytes, les monocytes et les éosinophiles - attire, active et induit la libération d'histamine par les basophiles	cellules T, macrophages, fibroblastes, épithélium rénal et bronchique, cellules mésangiales
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	- attire les monocytes, les lymphocytes et les éosinophiles - inhibe la prolifération précoce des cellules souches hématopoïétiques - induit la libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes - stimule l'adhésion des cellules T aux cellules endothéliales	cellules T, cellules B, monocytes, fibroblastes, mastocytes murins
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	- attire les monocytes et les cellules T - induit l'adhésion des cellules T aux cellules endothéliales via les intégrines $\beta$ 1	cellules T, cellules B, monocytes, fibroblastes, mastocytes murins
<b>MCP-1</b>	- attire les monocytes et les lymphocytes - régule l'expression des molécules d'adhérence et la production de cytokines par les monocytes - active les basophiles	monocytes/macrophages, fibroblastes, cellules B, cellules musculaires lisses, cellules de glioblastome, cellules endothéliales, cellules épithéliales
<b>MCP-2</b>	attire les monocytes, les lymphocytes et les éosinophiles	monocytes cellules d'ostéosarcome
<b>MCP-3</b>	- attire les monocytes, les lymphocytes et les éosinophiles - active les basophiles	cellules d'ostéosarcome
<b>MCP-4</b>	- attire les monocytes, les lymphocytes T et les éosinophiles - stimule la libération d'histamine par les basophiles	cellules épithéliales et endothéliales
<b>Eotaxine</b>	attire les éosinophiles	épithélium des polypes nasaux
<b>Eotaxine-2</b>	- attire les éosinophiles et les basophiles - induit la libération d'histamine de leucotriène C4 par les basophiles	monocytes

(RANTES = regulated on activation-normal T expressed, MIP- = monocyte inflammatory peptide-, MCP- = monocyte chemotactic peptide-)

(d'après [terran, 1996], [Stellato, 1995] et [Garcia-Zepeda, 1996])

le MCP-3 et est exprimé sur les basophiles mais pas les éosinophiles ; (2) un récepteur pour le RANTES qui lie le RANTES et le MCP-3; et (3) un récepteur pour le MIP-1 $\alpha$  qui lie le MIP-1 $\alpha$ , le RANTES, et avec une affinité moindre, le MCP-3. Ces récepteurs possèdent 7 domaines transmembranaires et sont couplés à une protéine G [Baggiolini, 1994].

**\* Rôle des chimiokines dans la migration leucocytaire transendothéliale**

Les chimiokines jouent un rôle important dans le recrutement cellulaire au cours de l'inflammation: elles régulent l'expression de certaines molécules d'adhérence et leur redistribution, et induisent la chimiotaxie de différents leucocytes.

Les chimiokines sont capables de réguler certaines molécules d'adhérence impliquées dans la circulation leucocytaire. Par exemple, les chimiokines CXC comme l'IL-8, NAP-2 et GRO- $\alpha$ , augmente l'expression du CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles [Detmers, 1991; Huber, 1991]. L'IL-8 comme d'autres chimioattractants induit la perte de la L-sélectine à la surface des leucocytes [Huber, 1991]. Les chimiokines CC ont également été démontrées intervenir dans la régulation de la capacité d'adhérer des monocytes, des lymphocytes et des éosinophiles. Ainsi, le MIP-1 $\alpha$ , le MCP-1 et le RANTES augmentent l'expression du CD11b/CD18 et du CD11c/CD18 à la surface des monocytes, et accroît leur liaison à l'endothélium stimulé ou non par l'IL-1 [Vaddi, 1994]. De manière similaire, le MIP-1 $\alpha$ , le MIP-1 $\beta$  et l'IP-10 induisent l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales [Taub, 1993b; Taub, 1993a]. Le RANTES, quant à lui, stimule la migration transendothéliale des éosinophiles, processus inhibé par des anticorps anti-CD18 et anti-VLA-4 [Ebisawa, 1994].

Un des mécanismes impliqué dans ce processus semble être lié à une des caractéristiques majeures des chimiokines: leur capacité à lier les protéoglycanes, polypeptides sur lesquels sont attachés, de manière covalente, des glycosaminoglycanes. Il a été proposé que les chimiokines pourraient être exprimées à la surface luminale des cellules endothéliales par l'intermédiaire d'une liaison aux protéoglycanes, permettant à ces cytokines d'activer directement les leucocytes et les intégrines, au cours de l'adhésion leucocyte-endothélium. Ce processus est connu sous le nom d'haptotaxie [Rot, 1993]. Une observation étaye cette hypothèse: l'activité chimiotactique de l'IL-8 vis-à-vis des neutrophiles est augmentée lorsque la chimiokine est liée à des héparanes sulfates [Webb, 1993].

De plus, l'activation des leucocytes conduit à une polarisation cellulaire impliquant le développement de projections cytoplasmiques appelées uropodes, exprimant en quantités importantes des molécules d'adhérence comme l'ICAM-3, l'ICAM-1, le CD43, le CD44 et la

L-sélectine, et permettant la mobilité et l'adhérence [del Pozo, 1996]. Les chimiokines libérées au cours de l'interaction leucocyte-cellule endothéliale apparaissent être responsables de l'induction d'uropodes: le MCP-1, le RANTES, et dans une moindre mesure l'IL-8, le MIP-1 $\alpha$  et le MIP-1 $\beta$  induisent la formation d'uropodes et la redistribution de l'ICAM-3, de l'ICAM-1, du CD43 et du CD44 après l'adhésion des cellules T aux cellules endothéliales (VCAM-1 et ICAM-1) ou aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine [del Pozo, 1995].

Enfin, la polarisation de l'expression des récepteurs pour les chimiokines sur les lymphocytes migrants apparaît agir comme un capteur du gradient chimiotactique, pour diriger la migration leucocytaire. Ainsi, *in vitro*, les récepteurs des chimiokines CC: CCR2 et CCR5, mais pas les récepteurs de cytokines comme l'IL-2R $\alpha$  (IL-2 Récepteur  $\alpha$ ), l'IL-2R $\beta$ , le TGF- $\beta$ R ou le TNF-R1, sont redistribués à un pôle des cellules T qui migrent en réponse au RANTES, au MCP-1 ou à l'IL-8. Des cytokines comme l'IL-2 et l'IL-15, ainsi que des Ac anti-ICAM-3 et anti-CD43 provoquent également une redistribution du CCR2, indiquant que la polarisation des leucocytes est liée à l'acquisition du phénotype migrant [Nieto, 1997].

Durant leur migration tissulaire, les leucocytes sont donc polarisés: les récepteurs des chimiokines sont localisés au niveau du "bord d'attaque", alors qu'à "l'arrière" se situent les uropodes où les récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire favorisent le recrutement d'autres leucocytes [del Pozo, 1997].

#### \* *Chimiokines et asthme*

Ces diverses molécules chimioattractantes semblent impliquées dans l'inflammation allergique: elles ont été détectées au niveau de la muqueuse bronchique des patients asthmatiques et leur neutralisation par des Ac inhibe le recrutement cellulaire pulmonaire dans des modèles animaux.

L'immunoréactivité de l'IL-8 est augmentée dans les biopsies de patients asthmatiques, en comparaison avec celles de sujets contrôles, et dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires (LBA) de patients asthmatiques, après un challenge allergénique [Teran, 1995]]. De plus, l'IL-8 est libérée dans le surnageant de culture de cellules épithéliales bronchiques de patients asthmatiques [Marini, 1992].

Le RANTES et le MIP-1 $\alpha$  sont produits par les cellules de LBA de patients asthmatiques [Alam, 1996], et des patients asthmatiques exposés à un challenge allergénique endobronchial libèrent des concentrations accrues de RANTES et de MIP-1 $\alpha$  dans les liquides de LBA, 4 heures après le challenge. Le taux de RANTES est corrélé avec le nombre

d'éosinophiles du LBA, suggérant que cette chimiokine pourrait être directement impliquée dans le recrutement d'éosinophiles qui caractérise la réaction tardive chez l'asthmatique [Teran, 1996a]. L'analyse de biopsies bronchiques révèle que l'expression de l'ARNm codant pour le MCP-3 est augmentée dans les biopsies bronchiques provenant de patients présentant un asthme modéré [Humbert, 1997], et l'immunoréactivité pour le MCP-1 est accrue au niveau de l'épithélium bronchique de biopsies prélevées sur des sujets asthmatiques [Sousa, 1994]. Dans un modèle d'inflammation chez la souris CBA/J induit après sensibilisation puis inhalation de SEA (antigène d'œuf de *Shistosoma mansoni*), la neutralisation *in vivo* du MIP-1 $\alpha$  ou du RANTES, mais pas de MCP-1, réduit significativement le recrutement des éosinophiles dans les voies aériennes. D'un autre côté, la neutralisation du MCP-1 réduit le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [Lukacs, 1997].

L'éotaxine a été, à l'origine, identifiée dans le liquide de LBA de cobayes sensibilisés à l'OVA [Jose, 1994]. *In vivo*, un challenge des cobayes avec l'éotaxine induit un afflux d'éosinophiles dans les voies aériennes [Griffiths Johnson, 1993]. Une expression accrue d'ARNm codant pour l'éotaxine a été mise en évidence dans les poumons de cobayes sensibilisés par l'antigène [Rothenberg, 1995a]. L'éotaxine et l'IL-5 agissent en synergie pour induire le recrutement des éosinophiles chez le cobaye [Collins, 1995]. L'équivalent murin de l'éotaxine a été cloné [Rothenberg, 1995b], et plus récemment, le gène codant pour l'éotaxine humaine a été identifié; sa séquence d'acides aminés est identique à 61,8% et 63,2%, respectivement à celle du cobaye et de la souris [Ponath, 1996]. Ces homologies de séquences laissent supposer une homologie de fonction qui reste néanmoins à déterminer.

### 2.3.1.2- Autres molécules chimioattractantes

#### \* *Les cytokines*

L'IL-5, cytokine de type 2, est un chimioattractant majeur pour les éosinophiles dans les poumons d'asthmatiques. Les liquides de LBA réalisés pendant la saison pollinique, chez des patients asthmatiques, ont une activité chimiotactique *in vitro* vis-à-vis des éosinophiles, qui est inhibée par un anticorps anti-IL-5 [Venge, 1996]. L'instillation d'IL-5 dans une zone limitée du poumon d'asthmatique, augmente le recrutement et l'activation des éosinophiles dans la muqueuse bronchique et le LBA [Shi, 1997].

L'**IL-2** est un chimioattractant, *in vitro*, pour les lymphocytes T activés et les éosinophiles [Kornfeld, 1985; Rand, 1991].

L'**IL-15** est produite par un grand nombre de cellules (monocytes sanguins, lignées fibroblastiques et épithéliales et cellules dendritiques obtenues à partir de cellules du sang périphérique) et de tissus (placenta, muscles squelettiques, cœur, poumon, foie et rein), et agit par le biais d'un récepteur possédant une chaîne commune avec le récepteur de l'**IL-2** [Grabstein, 1994; Jonuleit, 1997]. *In vitro*, l'**IL-15** stimule la locomotion et le chimiotactisme des lymphocytes T du sang périphérique, la locomotion semblant avoir un rôle capital pour les interactions cellules T-cellules accessoires [Wilkinson, 1995]. Enfin, de fortes concentrations d'**IL-15** ont été détectées dans les liquides synoviaux de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, pathologie caractérisée par un infiltrat de cellules T. L'injection d'**IL-15** à des souris induit un infiltrat de cellules inflammatoires, majoritairement CD3<sup>+</sup> [McInnes, 1997]. L'intervention éventuelle de l'**IL-15** dans l'établissement de l'inflammation pulmonaire dans l'asthme reste encore à étudier.

Décrit à l'origine comme un facteur chimioattractant des lymphocytes T (LCF) [Center, 1982], l'**IL-16** est produite par les cellules T CD8<sup>+</sup> [Laberge, 1996a], les cellules T CD4<sup>+</sup> [Center, 1996], les éosinophiles [Lim, 1996], les mastocytes [Rumsaeng, 1997] et les cellules épithéliales de voies aériennes [Bellini, 1993]. Sa synthèse est augmentée en réponse à des antigènes, des mitogènes, l'histamine [Bellini, 1993] ou la sérotonine [Laberge, 1996a]. Le récepteur de l'**IL-16** est la molécule CD4 [Cruikshank, 1994]. Au niveau de biopsies bronchiques, l'**IL-16** est présente principalement dans les cellules épithéliales chez les asthmatiques et les sujets contrôles; cependant, l'expression d'**IL-16** est significativement plus élevée chez les asthmatiques [Laberge, 1994]. Enfin, l'**IL-16** a été détectée dans les LBA de patients asthmatiques 6 heures après une stimulation allergénique [Cruikshank, 1995].

#### \* *Autres peptides chimioattractants*

Le produit du complément **C5a**, peptide de 74 aa, est chimiotactique pour les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages, mais pas les lymphocytes [Gallin, 1993]. Sur les neutrophiles, les récepteurs du C5a sont les plus abondants avec 1 à 2x10<sup>5</sup> sites par cellule. En comparaison, les récepteurs pour les chimiokines sont exprimés à une densité de 2 à 4x10<sup>4</sup> [Gerard, 1993].



Isolé, à l'origine, à partir du tractus gastrointestinal de porc, le **VIP** (VasoIntestinal Peptide), peptide de 28 aa, est un puissant relaxant des muscles lisses. Il a été localisé au niveau des systèmes nerveux central et périphérique [Sirinek, 1991]. Le VIP exerce un puissant effet chimioattractant sur les lymphocytes T, et l'activation par du VIP, de cellules T non stimulées, augmente leur adhérence à l'ICAM, au VCAM et à la fibronectine [Johnston, 1994].

*\* Les médiateurs lipidiques*

Le **PAF** (platelet-activating factor) entraîne l'agrégation plaquettaire, la libération d'enzymes lysosomales et de dérivés oxygénés par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages, et est un puissant chimioattractant pour les cellules phagocytaires. Il est produit par les plaquettes, les mastocytes, les basophiles et les cellules endothéliales; son récepteur possède une structure à 7 domaines transmembranaires, tout comme ceux des chimiokines, mais il est monospécifique [Gallin, 1993].

Le **leucotriène B4** est un lipide chimiotactique pour les neutrophiles et n'a pas d'effet sur les lymphocytes. Le LTB4 est produit par les macrophages alvéolaires et les mastocytes activés, son récepteur ressemble à celui du PAF [Gallin, 1993; Martin, 1984].

*L'inflammation pulmonaire, une des trois caractéristiques majeures observées dans l'asthme allergique, est donc le résultat de l'intervention complexe de nombreux facteurs: des molécules d'adhérence, des cytokines proinflammatoires et/ou chimioattractantes et des facteurs de croissance.*

### **3. L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE**

L'asthme est, en outre, caractérisé par des symptômes tels qu'une sensation périodique d'oppression thoracique et des sifflements; qui s'accompagnent d'une obstruction variable des voies aériennes, mesurée par l'analyse du pic expiratoire maximal et par spirométrie. La variabilité de l'obstruction des voies aériennes peut être reproduite au laboratoire par l'administration d'un bronchodilatateur, qui met en évidence la réversibilité de l'obstruction, ou

en utilisant un stimulus bronchoconstricteur, permettant ainsi la mesure de l'hyperréactivité bronchique (HRB). L'HRB est évaluée chez l'homme en mesurant la PC20: concentration de stimuli causant 20% de diminution du FEV1 (Volume Expiratoire Forcé en 1seconde) [NIH, 1992].

### **3.1- Caractéristiques de l'HRB**

La pathophysiologie de l'HRB n'est pas complètement comprise. Normalement, l'HRB est définie comme une augmentation de la sensibilité des voies aériennes à des stimuli bronchoconstricteurs. L'HRB est évaluée au moyen de courbes dose-réponse obtenues avec des agents pharmacologiques ou des stimuli physiques. Une stimulation à l'histamine ou à la méthacholine est le plus couramment utilisée pour mesurer l'HRB, bien que certains aient avancé qu'une stimulation non pharmacologique, comme l'exercice, puisse être cliniquement plus pertinente et plus spécifique pour distinguer l'asthme d'autres maladies chroniques des voies aériennes, en particulier chez l'enfant [Godfrey, 1991]. Cependant, une augmentation de l'HRB à l'exercice indique l'existence d'une variabilité anormale des voies aériennes indépendamment de la présence ou de l'absence de symptômes respiratoires [Backer, 1992]. La mesure de l'HRB ne semble donc pas constituer une valeur prédictive de la présence d'un asthme. Outre l'HRB, l'asthme se caractérise par une augmentation du rétrécissement maximal des voies aériennes [Sterk, 1989]. De plus en plus de preuves montrent que ces 2 défauts sont déterminés par des mécanismes partiellement indépendants, indiquant que la réponse des asthmatiques à des stimuli bronchoconstricteurs correspond à une physiopathologie complexe.

Plusieurs étapes séparent la rencontre du stimulus de l'augmentation de la résistance au flux d'air dans les voies aériennes. D'abord, les muscles lisses sont activés suite à l'interaction d'un agoniste avec son récepteur. Cette activation aboutit un raccourcissement du muscle qui est déterminé par des facteurs mécaniques, tels que la contractilité, et par la pression du tissu environnant: le parenchyme. Puis la contraction des muscles lisses induit un rétrécissement de la lumière bronchique, lui-même dépendant d'un gonflement de la sous-muqueuse et de l'adventice, et de sécrétions intra-luminales. Finalement, l'augmentation de la résistance dans les voies aériennes est déterminée par le débit du flux d'air dans la lumière bronchique [Moreno, 1986]. Chaque étape peut jouer un rôle indépendant dans le développement de l'HRB dans l'asthme [James, 1989].

La présence et la sévérité de l'HRB varient selon les patients quel que soit le stimulus utilisé [O'Byrne, 1988], et surtout, bien que la méthode de mesure soit reproductible, l'HRB varie au fil du temps chez un même patient [Josephs, 1989]. L'HRB est non seulement variable spontanément, mais aussi consécutivement à une infection virale ou une intervention thérapeutique [Cockcroft, 1988]. Par exemple l'utilisation régulière de stéroïdes inhalés améliore l'HRB chez les asthmatiques, mais la normalisation est peu observée [van Essen Zandvliet, 1994]. En particulier, l'asthme d'enfants ne répondant pas favorablement aux corticoïdes, apparaît être associé à une infection virale persistante ou latente au niveau des voies aériennes [Macek, 1994]. Il pourrait donc exister une composante réversible et une composante non réversible de l'HRB, et il n'est pas exclu que ces composantes puissent être liées à des mécanismes distincts, comme l'inflammation aigüe et chronique, respectivement.

Ces observations indiquent que des mesures simples de l'HRB n'ont qu'une valeur limitée pour conforter le diagnostic de l'asthme, et sous-entendent que cette mesure physiologique est liée à de nombreux phénomènes.

## **3.2- Mécanismes impliqués dans l'HRB**

### **3.2.1- Rôle de l'inflammation pulmonaire**

La mesure de l'HRB n'est que modérément corrélée avec les signes pathologiques observés au niveau des voies aériennes [Djukanovic, 1990]. L'HRB à la métacholine apparaît être plus en relation avec l'infiltrat éosinophilique, qu'avec des indices cliniques tels les symptômes, l'usage des  $\beta$ -agonistes, la mesure du pic expiratoire maximal ou la spirométrie [Sont, 1995].

Ainsi, après une exposition allergénique chez le patient asthmatique, un afflux d'éosinophiles persiste pendant plusieurs jours et est associé avec une obstruction bronchique progressive caractéristique clinique de la réaction tardive chez l'asthmatique [De Monchy, 1985]. Selon les études, il existe ou non, une corrélation entre l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB, et une corrélation entre le degré de lésions épithéliales et l'HRB [Djukanovic, 1990; Ohashi, 1992]. Le rôle des éosinophiles dans l'établissement de l'HRB est suggéré par le fait que certains de ses médiateurs sont toxiques pour les tissus, dont l'épithélium bronchique. Par exemple, *in vitro*, la MBP (major basic protein) est responsable du détachement et de la

destruction des cellules ciliées de la lamina propria [Frigas, 1986]. Ces lésions épithéliales pourraient contribuer à l'augmentation de l'HRB à cause de l'absence de l'EDRF (epithelial-derived relaxant factor) ou de l'activation des terminaisons nerveuses intraépithéliales mises à nu [Barnes, 1986a].

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> participent indirectement au développement de l'HRB, et ceci probablement en induisant un infiltrat d'éosinophiles: le transfert de lymphocytes CD4<sup>+</sup>, provenant de rats sensibilisés par injection i.p et inhalation d'OVA, à des rats naïfs, induit une éosinophilie pulmonaire et une HRB après exposition à un aérosol d'OVA, les 2 paramètres étant corrélés. Par contre, un transfert de cellules CD8<sup>+</sup> sensibilisées, ou de cellules CD4<sup>+</sup> naïves ne provoque ni inflammation, ni HRB [Haczku, 1997b]. De plus, l'injection de cellules CD8<sup>+</sup> provenant d'un animal sensibilisé, normalise la réactivité des voies aériennes chez un autre animal sensibilisé par l'OVA; et ceci, probablement par l'intermédiaire de l'IFN- $\gamma$  [Lack, 1994; Renz, 1994a]. Cependant, la déplétion *in vivo* en cellules CD8<sup>+</sup> augmente l'inflammation pulmonaire, mais ne modifie pas l'HRB de rats sensibilisés à l'OVA [Laberge, 1996b]. De plus, des souris déplétées *in vivo* en cellules CD8<sup>+</sup>, puis sensibilisées à l'OVA, ne développent pas d'HRB, ni d'infiltrat éosinophilique pulmonaire, ni de production locale d'IL-5. Ces fonctions sont restaurées par le transfert de cellules CD8<sup>+</sup> naïves, au cours de la sensibilisation, suggérant un rôle des cellules CD8<sup>+</sup> dans la production d'IL-5 et le développement d'une HRB [Hamelmann, 1996].

Les mastocytes ne semblent pas jouer un rôle dans l'établissement d'une HRB. En effet, des souris déficientes en mastocytes, sensibilisées par voie intrapéritonéale (i.p) puis par aérosol, par l'OVA, développent une réponse IgE spécifique, une augmentation du nombre d'éosinophiles dans le LBA et le tissu pulmonaire, et une augmentation de l'HRB à la métacholine, tout comme les souris de type sauvage [Nagai, 1996; Takeda, 1997].

### 3.2.2- Les médiateurs impliqués dans l'HRB

De nombreux médiateurs ont été impliqués dans l'asthme; ils ont des effets variés sur les voies aériennes.

#### \* *Les médiateurs lipidiques*

Des médiateurs tels que l'histamine, les prostaglandines et les leucotriènes contractent directement les muscles lisses des voies aériennes, augmentent les fuites microvasculaires,

attirent et activent les cellules inflammatoires, elles-mêmes produisant des médiateurs. L'histamine n'augmente pas l'HRB; contrairement à la prostaglandine D<sub>2</sub>, aux leucotriènes C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> et E<sub>4</sub>, et au PAF [Barnes, 1989]. Cependant, seul le PAF induit une augmentation prolongée de l'HRB.

Le PAF semble être un médiateur important pour initier les événements suivant l'inhalation de l'allergène: il est un puissant bronchoconstricteur et peut induire une HRB chez des sujets normaux [Cuss, 1986]. Même si des patients asthmatiques répondent au PAF de la même façon que des sujets normaux, plusieurs de ces patients maintiennent une réactivité bronchique accrue 3 jours après l'inhalation de PAF [Wardlaw, 1990]. De plus, 6 heures après un challenge allergénique, des patients présentant une réaction tardive possèdent des taux plasmatiques accrus de lyso-PAF, métabolite du PAF [Nakamura, 1987]. Cependant, une autre étude a échoué à démontrer que le PAF puisse être libéré dans les 4 heures suivant un challenge spécifique aux acariens [Menz, 1987]. Ces observations sont à mettre en relation avec une augmentation du nombre de plaquettes (produisant du PAF) dans le LBA immédiatement et durant 96 heures après un challenge antigénique localisé [metzer, agents actions, 1987, 21: 151]. Différents mécanismes d'action du PAF ont été analysés chez l'homme et chez l'animal [Townley, 1989] et permettent d'avancer l'hypothèse que le PAF pourrait diminuer les réponses bronchodilatatrices  $\beta$ -adrénergiques, conduisant alors à l'HRB non spécifique [Bergren, 1987].

#### \* *Les cytokines*

Les cytokines chimioattractantes semblent également jouer un rôle dans l'établissement d'une HRB. Dans un modèle d'inflammation chez la souris CBA/J induit après sensibilisation puis inhalation de SEA (antigène d'œuf de *Schistosoma mansoni*), la neutralisation *in vivo* du MCP-1 réduit le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et diminue l'HRB qui atteint un niveau semblable à ceux des témoins, mais ne modifie pas le recrutement des éosinophiles dans les voies aériennes [Lukacs, 1997]. D'autre part, chez des souris sensibilisée par l'OVA, un Ac anti-IL-16 inhibe l'HRB et l'augmentation de la production d'IgE spécifiques, mais n'affecte pas l'infiltrat d'éosinophiles [Hessel, 1997b]. Par conséquent, certains médiateurs peuvent moduler l'HRB sans changer l'infiltrat éosinophilique, ce qui n'est pas en faveur d'un rôle des éosinophiles dans l'établissement de l'HRB.

Les cytokines de type 1 ou 2 peuvent également moduler l'HRB. Ainsi, l'injection d'IL-12 recombinante à des souris sensibilisées puis exposées à des aérosols d'OVA, abolit l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB sans influencer la production d'IgE spécifiques [Kips, 1996]. La neutralisation *in vivo* de l'IFN- $\gamma$  abolit complètement le développement d'une HRB, sans agir sur l'éosinophilie [Hessel, 1997a]. A l'inverse, le traitement avec de l'IFN- $\gamma$  recombinant sous forme d'aérosol, au cours de la sensibilisation à l'OVA, normalise la fonction respiratoire [Lack, 1994] et inhibe l'induction de la production d'IgE. Ainsi, l'absence d'HRB pourrait être le résultat de l'absence d'IgE plus que d'un effet direct sur le développement de l'HRB. Ces résultats amènent à considérer l'IFN- $\gamma$  comme directement activateur ou indirectement inhibiteur de l'HRB.

L'intervention des cytokines de type 2 dans l'établissement de l'HRB est également très complexe. Des souris déficientes pour l'IL-4, sensibilisées à l'OVA, ne présentent aucune des caractéristiques décrites pour la souche sauvage, i.e la synthèse d'IgE spécifique, l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB [Kips, 1995a]. De plus, l'injection d'un anticorps anti-IL-4 récepteur avant le challenge intratrachéal de souris A/J sensibilisées par des globules rouges de mouton, réduit significativement l'HRB et prévient l'augmentation du nombre d'éosinophiles dans le LBA [Gavett, 1997]. La neutralisation *in vivo* de l'IL-4 et l'IL-5 apporte des résultats contradictoires. Ainsi, l'injection d'Ac anti-IL-4, au moment du challenge allergénique, n'inhibe pas l'HRB de souris sensibilisées à l'OVA [Hessel, 1997a], alors que l'injection de l'Ac anti-IL-4 pendant la période d'immunisation systémique, inhibe l'HRB mais n'a que très peu d'effet sur l'afflux d'éosinophiles [Corry, 1996]. Par conséquent, l'IL-4 semble jouer un rôle indirect dans l'établissement de l'HRB, puisqu'il faut injecter l'Ac anti-IL-4 au moment de l'immunisation, i.e avant le développement de la réponse IgE, pour inhiber l'HRB. D'autre part, l'injection d'Ac anti-IL-5, pendant la période de challenge allergénique, inhibe ou n'inhibe pas l'HRB, selon le protocole de sensibilisation utilisé (nombre d'injections et d'aérosols d'OVA, et durée de l'expérience) [Eum, 1995; Hessel, 1997a]. D'un autre côté, en absence de challenge antigénique, des souris transgéniques exprimant l'IL-5 au niveau de l'épithélium bronchique présentent une accumulation péribronchique d'éosinophiles, une expansion des tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT), une hyperplasie des cellules caliciformes, une hypertrophie épithéliale, un dépôt de collagène, et une HRB à la métacholine [Lee, 1997]. L'IL-5 apparaît donc intervenir dans le développement d'une HRB en favorisant le recrutement et l'activation des éosinophiles, bien qu'une action directe ne puisse être totalement exclue.

Enfin, l'intervention du TNF- $\alpha$  dans l'HRB est soulignée par la mise en évidence d'une augmentation de la réactivité bronchique induite après l'inhalation de cette cytokine par des sujets normaux [Thomas, 1995]. De plus, des analyses immunohistochimiques de biopsies bronchiques d'asthmatiques allergiques modérés révèle que l'augmentation du nombre de cellules produisant du TNF- $\alpha$  est corrélée avec l'HRB [Hosselet, 1994]. Chez le rat, l'exposition au TNF- $\alpha$  augmente l'HRB, et induit une faible inflammation pulmonaire [Kips, 1992a]; alors que l'injection d'Ac anti-TNF- $\alpha$  à des souris sensibilisées par l'OVA, inhibe partiellement l'HRB [Hessel, 1997a]. Bien que le mécanisme d'HRB induit par le TNF- $\alpha$  ne soit pas connu actuellement, il a été suggéré qu'il pourrait agir directement sur les muscles lisses bronchiques, comme cela a été montré *in vitro* avec des muscles lisses vasculaires [Warner, 1989], et/ou qu'il pourrait agir indirectement en libérant des médiateurs inflammatoires comme le PAF [Sun, 1988].

Des agents pharmacologiques sont également susceptibles de moduler l'HRB consécutive à l'inhalation d'allergène: le cromoglycate et les glucocorticoïdes oraux ou inhalés inhibent HRB, alors que les  $\beta$ 2-agonistes inhibent la réponse précoce, mais pas la réponse tardive ni l'HRB [O'Byrne, 1988].

### **3.2.3- Les contacts cellulaires impliqués dans l'HRB**

#### **\* les molécules d'adhérence**

Différents modèles animaux où l'ICAM-1 était neutralisé, présentaient une HRB diminuée. Ainsi, le traitement avec un Ac anti-ICAM-1 de rats sensibilisés à l'OVA par voie i.p puis par aérosol, inhibe l'HRB sans modification de l'afflux de cellules inflammatoires [Sun, 1994]. Chez le singe, un Ac anti-ICAM-1 inhibe la migration des éosinophiles induite par l'antigène, ainsi que l'HRB [Wegner, 1990].

La neutralisation du LFA-1 et du VLA-4 chez des rats sensibilisés à l'OVA prévient également l'augmentation de l'HRB, mais seule l'injection d'Ac anti-LFA-1 réduit le nombre d'éosinophiles dans le LBA [Laberge, 1995]. Chez des cobayes, l'injection d'Ac anti-VLA-4 une heure avant et 4 heures après le challenge allergénique, inhibe l'HRB et le recrutement pulmonaire d'éosinophiles [Pretolani, 1994].

Par conséquent, les molécules d'adhérence semblent jouer un rôle dans le développement de l'HRB principalement en modulant l'infiltrat cellulaire pulmonaire.

**\* les molécules de costimulation**

L'importance de la voie de costimulation CD28-CTLA4:CD80 a été évaluée dans un modèle d'inflammation induite par l'OVA chez les souris Balb/c. Le blocage de l'interaction par une protéine de fusion CTLA4-Ig inhibe la réponse IgE spécifique de l'OVA, l'infiltrat inflammatoire et l'HRB [Krinzman, 1996]. L'analyse du liquide de LBA met en évidence une diminution du niveau d'IL-4, suggérant que la costimulation CD28:CD80, nécessaire à une réponse de type Th2, pourrait intervenir dans le développement de l'HRB [Keane Myers, 1997].

**3.2.4- Intervention de la réponse IgE dans l'HRB**

Une corrélation entre le taux d'IgE totales et l'HRB chez l'enfant a été démontrée [Burrows, 1992; Postma, 1995]. De plus, il existe une liaison entre l'HRB à l'histamine et le chromosome 5q dans l'asthme. Or, le chromosome 5q, région codant pour de nombreuses cytokines intervenant dans l'allergie comme l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-12, l'IL-13 et le GM-CSF, est également lié au taux d'IgE totales [Bleecker, 1995; Postma, 1995].

Différents modèles animaux ont permis d'explorer la nécessité de l'IgE dans l'établissement d'une HRB. (1) Des rats Brown-Norway sensibilisés par voie i.p puis exposés de façon répétée à l'OVA, produisent des IgE spécifiques, développent une réaction inflammatoire pulmonaire caractérisée par une augmentation de l'expression de CD25 à la surface des cellules T CD4<sup>+</sup>, et présentent une HRB après provocation à l'acétylcholine. Il existe une forte corrélation entre l'expression du CD25 et le nombre d'éosinophiles dans le LBA, et entre l'HRB et les taux d'IgE spécifiques [Haczku, 1995]. (2) Les IgE sont nécessaires à l'établissement d'une HRB dans un modèle de souris sensibilisées par aérosols d'OVA. En effet, des souris normales et déficientes en cellules B ainsi traitées présentent des réactions différentes: les 2 souches de souris produisent des cytokines de type 2 en quantité accrue et développent une accumulation d'éosinophiles dans le tissu bronchique, mais seules les souris de type sauvage produisent des IgE spécifiques et développent une HRB. L'HRB est rétablie dans la souche déficientes en cellules B lorsqu'une sensibilisation passive avec des IgE murines anti-OVA est réalisée lors du challenge antigénique [Hamelmann, 1997]. (3)



L'injection d'Ac anti-IgE à des souris sensibilisées à l'OVA inhibe l'infiltrat d'éosinophiles et l'HRB [Heusser, 1997]. Tous ces résultats sont en faveur d'une action des IgE pour établir l'HRB.

Le CD23 joue un rôle complexe dans l'établissement de l'HRB. Le traitement avec un Ac anti-CD23, de souris sensibilisées avec l'OVA par voie i.p puis par aérosol, diminue significativement la réponse IgE spécifique, le nombre d'éosinophiles dans le LBA et le tissu pulmonaire, et l'HRB à la métacholine. A l'inverse, des souris déficientes pour le CD23, soumises à une même sensibilisation, ont une réponse IgE spécifique, un recrutement d'éosinophiles, et une HRB augmentés [Haczku, 1997a]. Ces résultats en apparence contradictoires sont à mettre en relation avec les fonctions opposées du CD23 sur la réponse IgE (voir paragraphe 1.4.2.3-). En effet, la liaison de complexes immuns au CD23 inhibe la prolifération cellulaire B, alors que le sCD23 stimule la production d'IgE.

### **3.2.5- Mécanismes nerveux impliqués dans l'HRB**

Il est depuis longtemps considéré qu'il pourrait exister un contrôle nerveux autonome anormal dans l'asthme, avec déséquilibre entre les voies inhibitrices et excitatrices, aboutissant à une contractilité excessive des voies aériennes. En plus des systèmes classiques cholinergique et adrénérergique, il existe un système non adrénérergique et non cholinergique (NANC) incluant plusieurs types de nerfs et neurotransmetteurs. Il est difficile de déterminer si les phénomènes nerveux anormaux observés dans l'asthme sont la cause ou la conséquence de la maladie et de ses traitements. Néanmoins, il est fortement probable que les mécanismes nerveux contribuent au développement des symptômes dans l'asthme [Barnes, 1989].

Comme l'inflammation joue un rôle clé dans l'asthme, il a été suggéré qu'il pourrait y avoir des interactions entre les mécanismes nerveux et inflammatoires. Plusieurs médiateurs inflammatoires sont capables d'agir sur la libération de neurotransmetteurs des nerfs des voies aériennes, ou d'agir en tant que récepteur du système autonome; et de manière similaire, les mécanismes nerveux peuvent contribuer à la réaction inflammatoire. En effet, des neuropeptides comme le VIP ou la substance P régulent certains aspects de la différenciation dans le thymus, stimulent l'adhérence et la migration des lymphocytes, et modulent les réponses prolifératives de divers antigènes [Goetzl, 1995]. La mise en évidence de telles interactions a donné naissance au concept "d'inflammation neurogénique" [Barnes, 1989].

**\* Mécanismes cholinergiques**

Le système nerveux cholinergique est la voie nerveuse bronchoconstrictrice dominante dans les voies aériennes humaines. L'exagération de ces mécanismes est donc suspectée dans l'asthme. Cette hypothèse est supportée par l'observation que de nombreux stimuli produisant des bronchospasmes (tels que le SO<sub>2</sub>, les prostaglandines, l'histamine et la bradykinine) stimulent également les récepteurs afférents et pourraient conduire à une bronchoconstriction réflexe cholinergique [Barnes, 1986b].

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de l'activité cholinergique dans l'asthme. (1) Une augmentation du nombre de récepteurs muscariniques a été envisagée mais est peu probable [Robertson, 1988]. (2) Des récepteurs muscariniques inhibiteurs (autorécepteurs) ont été mis en évidence au niveau des voies aériennes [Minette, 1988], ils inhibent la libération d'acétylcholine et ainsi limitent la bronchoconstriction vagale. Leurs fonctions pourraient être altérées dans l'asthme [Minette, 1989].

**\* Mécanismes adrénérgiques**

Comme les agonistes adrénérgiques suppriment la bronchoconstriction dans l'asthme, il a été suggéré que les mécanismes adrénérgiques pourraient être défectueux dans cette pathologie. Les mécanismes adrénérgiques impliquent les nerfs sympathiques, les cathécholamines circulantes et les adrénorécepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  [Barnes, 1989].

Plusieurs mécanismes anormaux pourraient contribuer à l'HRB. (1) Des catécholamines circulantes comme l'épinéphrine pourraient jouer un rôle important dans la régulation du tonus bronchomoteur: un exercice suffisant pour déclencher une bronchoconstriction n'arrive pas à augmenter l'épinéphrine plasmatique chez les asthmatiques contrairement aux sujets contrôles, suggérant une mobilisation défectueuse de l'épinéphrine dans l'asthme [Barnes, 1986c]. (2) Les voies aériennes des patients asthmatiques n'arrivent pas à se relacher normalement à l'isoprotérénol, suggérant un mauvais fonctionnement des récepteurs  $\beta$  [Cerrina, 1986]. Il est possible que l'inflammation puisse conduire à de telles anomalies.

**\* Mécanismes NANC et neuropeptides**

De plus en plus de preuves sont en faveur d'une action des neuropeptides en tant que neurotransmetteurs des nerfs NANC; de plus, de nombreux neuropeptides possédant de puissants effets sur la fonction respiratoire ont été identifiés dans les voies aériennes humaines [Barnes, 1987].

Un défaut dans le système nerveux NANC inhibiteur, seule voie nerveuse bronchodilatatrice des voies aériennes humaines, pourrait être causé par un effondrement du taux de neurotransmetteur, comme le VIP. Le VIP induit un relâchement des bronches humaines *in vitro* [Palmer, 1986]. Cependant, du VIP nébulisé chez des patients asthmatiques n'a aucun effet bronchodilatateur; mais ceci peut être expliqué par le fait que le peptide n'atteint probablement pas les récepteurs des muscles lisses des voies aériennes [Barnes, 1984]. Le NO (monoxyde d'azote) est également un médiateur du système NANC inhibiteur des voies aériennes humaines [Bai, 1993], et peut contribuer à une inflammation pulmonaire neurogénique [Kuo, 1992]. L'exposition de rats F344 à de l'endotoxine (LPS: lipopolysaccharide) induit une augmentation transitoire de l'HRB suivie d'une hyporéactivité; celle-ci est inhibée par un inhibiteur de la NO synthase. Par conséquent, l'induction d'une synthèse de NO (médiateur bronchodilatateur), suite à une inhalation de LPS, peut entraîner une hyporéactivité chez le rat [Kips, 1995b]. Cependant, la bronchodilatation dépendante du système NANC n'apparaît pas défectueuse dans l'asthme modéré [Lammers, 1988].

Il est plus probable que l'anormalité soit liée à une augmentation de l'activité du système nerveux NANC excitateur, due à la libération à l'extrémité des nerfs sensitifs de neuropeptides comme la substance P ou la neurokinine A. Dans le poumon, les nerfs dont le neuromédiateur est la substance P sont en contact étroit avec l'épithélium bronchique et les muscles lisses. De plus, la substance P et la neurokinine A ont de puissants effets contractiles sur les muscles lisses des voies aériennes de plusieurs espèces, dont l'homme [Black, 1988].

*L'HRB semble donc être déterminée par au moins 2 composantes: une composante inflammatoire et une composante nerveuse. La difficulté d'en aborder les mécanismes régulateurs chez l'homme a favorisé le développement de modèles animaux, nombreux mais pouvant fournir des résultats contradictoires.*

*En conclusion, l'asthme allergique est la conséquence de différents phénomènes complexes (réponse IgE, réaction inflammatoire et HRB) présentant entre eux des interconnexions. Il est possible de les étudier d'une part in vitro ou ex vivo, à partir de cellules humaines, ce qui limite les acteurs intervenant dans le processus étudié, et d'autre part in vivo, à l'aide de modèles animaux. Cependant, les modèles animaux ne reproduisent pas toutes les manifestations de la pathologie humaine. Par exemple, chez les patients, la pathologie de l'asthme implique en général seulement les bronches, alors que dans les modèles animaux, la pathologie s'étend souvent au parenchyme pulmonaire. Le degré d'hyperréactivité bronchique est aussi moins marqué chez l'animal que chez l'homme. Néanmoins, il n'est pas possible de pratiquer des analyses complètes chez les patients, en raison du danger de la procédure. Dans cette optique, il apparaît intéressant de disposer d'un modèle alliant des cellules humaines à un environnement physiologique facilement manipulable, comme celui de la souris SCID.*

II. LA SOURIS SCID  
MODELE D'ETUDE *IN VIVO* DE LA  
REGULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Les souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) ont été découvertes et identifiées par Bosma *et al.* [Bosma, 1983] au sein d'un élevage de souris. Cette mutation spontanée, autosomale et récessive altère la lymphopoïèse ce qui conduit à une absence de lymphocytes T et B matures et fonctionnels.

En dehors de l'approche fondamentale consistant à caractériser la mutation scid, les souris SCID ont largement été utilisées comme un outil de dissection de la régulation *in vivo* du système immunitaire. Le rôle des cellules NK et des macrophages peut être facilement abordé en absence de lymphocytes T et B. La comparaison des conséquences d'une infection chez des souris normales et des souris SCID peut donner des informations intéressantes sur les processus infectieux. De plus, les souris SCID peuvent être sélectivement reconstituées avec différentes sous-populations de lymphocytes provenant de souris normales, et ainsi peuvent permettre l'étude *in vivo* de la fonction des lymphocytes transférés. De manière plus importante, les souris SCID reconstituées avec des cellules lymphoïdes humaines fournissent un excellent modèle animal pour étudier des pathologies humaines comme celles relatives aux tumeurs malignes, au SIDA (Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquis), aux maladies auto-immunes, aux maladies parasitaires et à l'allergie [McCune, 1988; Mosier, 1988; Spiegelberg, 1994; Stanley, 1993].

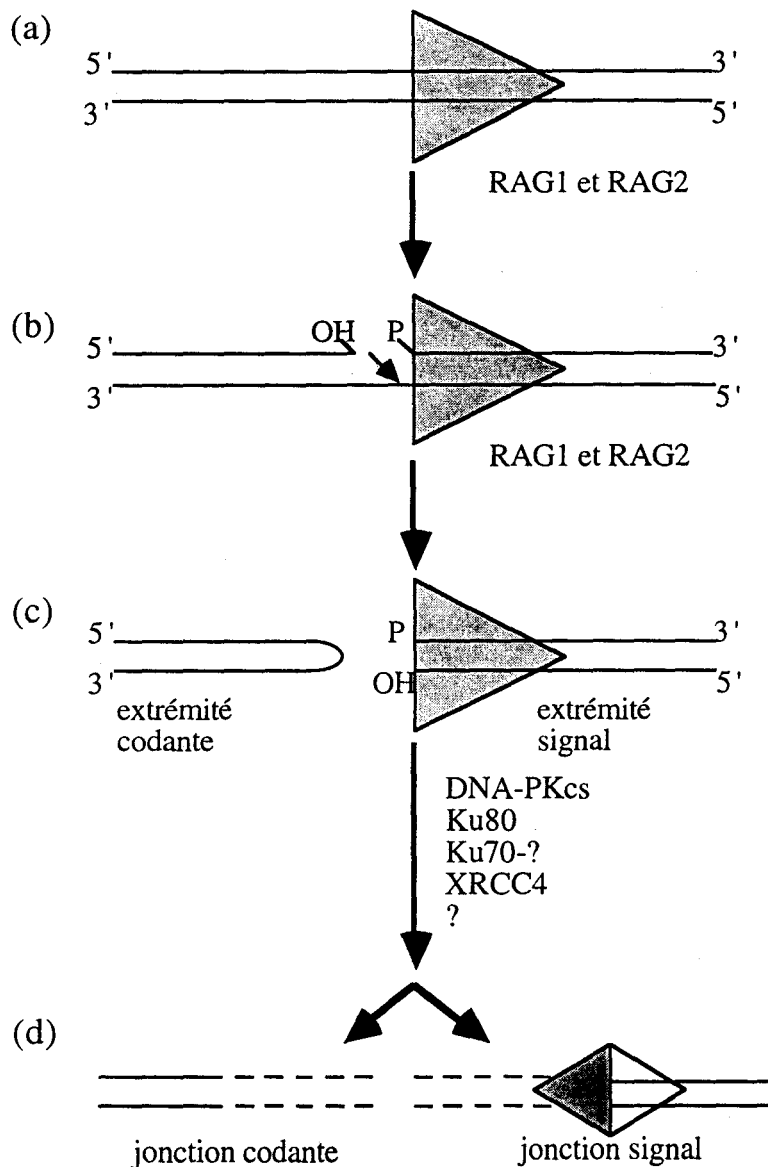
## 1- CARACTERISTIQUES DE LA SOURIS SCID

Les anomalies histologiques sont constantes chez la souris SCID. Elles sont caractérisées par une lymphopénie, une médulla thymique rudimentaire, des follicules spléniques et des ganglions lymphatiques relativement vides ainsi que des foyers lymphocytaires bronchiques et gastrointestinaux non développés. Les cellules lymphoïdes largement disséminées dans ces sites varient en taille et apparaissent souvent immatures. A l'inverse, excepté pour une absence apparente d'une ou plusieurs petites populations cellulaires, la moëlle osseuse ne peut être morphologiquement distinguée de celle d'une souris normale. Enfin, l'apparition de lymphomes, essentiellement intrathymiques, a lieu chez la souris SCID dans 15% des cas [Custer, 1985]. Ces anomalies histologiques sont liées à des anomalies immunologiques, elles-mêmes consécutives à des anomalies génétiques.

### 1.1- Anomalies immunologiques

Les anomalies immunologiques observées chez la souris SCID affectent la différenciation aussi bien des cellules T que des cellules B, à l'étape de recombinaison des récepteurs à antigène [bosma, 1983]. De ce fait, les souris SCID ne possèdent pas de lymphocytes T et B matures. La méthode de cytométrie en flux n'a permis de détecter ni cellules B Ig+ B220+, ni cellules T TCR+ CD3+. Des cellules pré-B contenant une chaîne  $\mu$  cytoplasmique sont également absentes. Le développement des thymocytes est arrêté au stade double négatif (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>). Cependant des cellules pro-B et des cellules T immatures Thy-1<sup>+</sup> sont présentes. Les immunoglobulines sériques sont de plus généralement indétectables. Enfin, les réponses à un mitogène de cellules T (comme la Concanavaleine A) et à un mitogène de cellules B (comme le Lipopolysaccharide ou LPS) sont largement diminuées, et les réponses prolifératives aux lymphocytes allogéniques (par une réaction lymphocytaire mixte) sont absentes [Bosma, 1983].

Le défaut de différenciation lymphocytaire chez la souris SCID est causé par un système de recombinaison (VDJ) défectueux. La région variable des immunoglobulines et des récepteurs T, c'est à dire le site liant l'antigène, est codée par les gènes V(D)J (Variable, Diversité, Jonction) qui sont séparés dans l'ADN génomique. Leurs ARN transcrits sont assemblés après le réarrangement qui s'opère pendant la différenciation des lymphocytes précurseurs (figure 3).



**Figure 3: Modèle de recombinaison V(D)J**, d'après [Oettinger, 1996]. (a) Dans la première étape de la réaction de clivage, les protéines RAG1 et RAG2 introduisent une coupure (nick) à l'extrémité 5' de l'heptamère signal. (b) Dans une seconde étape, l'extrémité 3' OH de la séquence codante à l'endroit de la coupure, attaque le phosphate du brin opposé par une trans-estérification. RAG1, RAG2 et la séquence signal de recombinaison sont nécessaires aux 2 étapes. (c) Ceci aboutit à la formation d'une extrémité codante avec une structure en épingle à cheveux, et d'une extrémité signal phosphorylée en 5'. La figure présente le clivage d'une seule séquence signal; une recombinaison complète nécessite 2 cassures semblables: une au niveau du signal-12, l'autre au niveau du signal-23. (d) Ensuite, les 2 extrémités codantes en épingle à cheveux sont ouvertes, une addition ou une perte de nucléotides peut avoir lieu, et les extrémités sont réparées et jointes. Les 2 signaux de recombinaison sont également joints par la fusion précise heptamère-heptamère. Différents facteurs apparaissent être impliqués dans ces dernières étapes, en particulier, la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) et les protéines Ku80 et XRCC4. Les lignes pointillées et les triangles blancs représentent les séquences signal de recombinaison, et les lignes pleines et triangles gris représentent les produits de réaction du second clivage.

Les segments V(D)J présentent à leurs extrémités des séquences palindromiques conservées (sous forme d'heptamères ou de nonamères) et sont séparés par des régions non conservées de 12 (signal-12) ou 23 (signal-23) paires de bases. Ces séquences de reconnaissance sont la cible d'un système enzymatique: la "recombinase (VDJ)" codée par les gènes RAG1 et RAG2 (Recombination Activating Gene). L'assemblage des segments des gènes de la région variable s'effectue en 2 étapes. La première consiste en une coupure endonucléasique entre les 2 fragments codants. La seconde permet la jonction des brins codants. Celle-ci est souvent imprécise à cause de la perte de nucléotides aux points de jonction, ce qui permet une grande diversité dans les spécificités des récepteurs (figure 3) [Oettinger, 1996].

L'analyse de cellules pré-B transformées par l'AMuLV (Abelson Murine Leukemia Virus) et de cellules de lymphomes T spontanés, révèle que presque tous les événements de réarrangement des gènes (VDJ) sont aberrants chez la souris SCID, et s'accompagnent de délétions de tailles variées [Bosma, 1988; Kim, 1988; Schuler, 1986]. Le système recombinase défectueux coupe et recolle de manière aberrante les segments des gènes codant pour les récepteurs, réduisant considérablement l'efficacité de production de récepteurs fonctionnels. Plus précisément, il a été montré que les lymphocytes SCID peuvent initier le réarrangement (VDJ) en formant une cassure du double brin et une jonction RSS (Recombination Signal Sequence) précises et relativement normales, mais sont profondément incapables de former une jonction codante [Lieber, 1988; Malynn, 1988]. Cette incapacité à former des jonctions codantes pourrait expliquer la recombinaison défectueuse qui se traduit par l'absence de production d'immunoglobulines ou d'expression de récepteur T.

Cependant, chez la souris SCID, le nombre et les fonctions des cellules NK [Dorshkind, 1985], des cellules présentatrices d'antigène [Czitrom, 1985], des neutrophiles et des cellules de Langherhans des épithéliums muqueux et épidermaux [Watanabe, 1996] sont normaux.

## **1.2- Réparation défectueuse de l'ADN**

En plus de la lymphopoïèse défectueuse, les souris SCID possèdent une radiosensibilité accrue et un défaut dans la réparation de l'ADN [Fulop, 1990]. En effet une large proportion de souris SCID meurt après irradiation avec une dose qui est subléthale pour une souris normale. Pour les souris SCID, la dose de rayons X induisant 50% de mortalité (LD50)



est seulement de 3 Gray, soit moins de la moitié de la LD50 observée pour les souris normales. Cette sensibilité accrue à l'irradiation a été observée non seulement dans les cellules lymphoïdes, mais aussi dans toutes les cellules de la souris SCID, incluant les cellules myéloïdes et les fibroblastes.

Les souris SCID sont également sensibles à la bléomycine, qui produit, tout comme les rayons X, des cassures doubles brin dans l'ADN [Biedermann, 1991]. A l'inverse, la sensibilité à la mitomycine C et à l'irradiation par les UV, qui sont des agents induisant un crosslinking de l'ADN, n'est pas augmenté. Ceci suggère que l'augmentation de la radiosensibilité est causée par une réparation inefficace des cassures double brin de l'ADN.

Ces observations suggèrent qu'un simple défaut affectant à la fois la recombinaison (VDJ) et la réparation des cassures dans l'ADN double brin est impliqué dans la mutation scid [Fulop, 1990]. Cette mutation est réversible dans une certaine mesure, puisqu'elle autorise l'existence de souris "leaky".

### **1.3- Réversion de la mutation ou phénomène leaky**

Des analyses plus détaillées de la souche murine originale C.B-17, exprimant la mutation scid, ont montré que quelques souris SCID (2 à 23%) produisaient des niveaux détectables d'immunoglobuline sérique [Bosma, 1988]. Ces souris SCID "leaky" possèdent un nombre détectable de cellules T et B matures et fonctionnelles [Carroll, 1989], mais oligoclonales [Bosma, 1988]. D'un point de vue histologique, les organes lymphoïdes des souris SCID leaky présentent les mêmes caractéristiques que les souris SCID ayant une déficience lymphocytaire sévère, hormis le fait que des foyers disséminés et irréguliers de lymphocytes se différenciant en plasmocytes produisent des concentrations anormalement élevées d'immunoglobulines de différents isotypes. Les cellules T fonctionnelles confèrent aux souris SCID leaky la capacité à rejeter des greffes de peau allogénique, réaction dépendante des cellules T. Enfin, environ 40% des souris SCID leaky peuvent développer des lymphomes thymiques [Bosma, 1988].

L'apparition de souris leaky suggère que la mutation scid n'induit pas un blocage complet, mais permet, de façon limitée, le développement de lymphocytes T et B matures. Plusieurs facteurs, tels que l'âge, les mauvaises conditions d'élevage, le transfert néonatal de cellules T et l'irradiation de souris SCID nouveaux-nés, augmentent la fréquence d'apparition

de souris SCID leaky [Bosma, 1988], suggérant que l'effet de la mutation scid est variable et peut être contrôlé par des signaux exogènes.

#### 1.4- Gène candidat pour l'anomalie scid

Des études de la génétique murine ont initialement localisé le gène SCID dans la région centromérique du chromosome 16 [Bosma, 1989]. Récemment, plusieurs laboratoires ont suggéré l'importance de la p350, une composante d'une protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) [Blunt, 1995; Kirchgessner, 1995].

La DNA-PK possède 2 composantes protéiques: l'autoantigène Ku et la p350. L'autoantigène Ku est un dimère formé de 2 sous-unités de 70 et 80 kD, considéré comme la composante de la DNA-PK qui se lie à l'ADN. La p350 est un long polypeptide d'environ 350 Kd, et est considérée comme la composante catalytique de la DNA-PK. La DNA-PK est une sérine-thréonine protéine kinase qui est activée suite à sa liaison avec les extrémités double brin de l'ADN. Elle phosphoryle *in vivo* de nombreux substrats comme des facteurs de transcription (Sp1, Oct1, Oct2, SRF, Fos et Jun), des protéines impliquées dans la réponse des cellules aux altérations de l'ADN (p53, Ku et la protéine A de réplication), la protéine heat-shock de 90 kD (hsp90) et l'ARN polymérase. Ceci suggère un rôle important de la DNA-PK dans la régulation de la transcription et de l'initiation de la cascade de signaux enclenchée en réponse à une altération de l'ADN. La perte de la p350, composante catalytique de la DNA-PK, pourrait donc aboutir à un défaut d'induction d'une réponse cellulaire appropriée suite à une altération de l'ADN chez la souris SCID. La p350 est également importante pour la recombinaison (VDJ). Chez la souris SCID, la jonction de 2 segments codants (jonction codante) est fortement altérée, alors que la génération de jonctions RSS est affectée dans une moindre mesure. A l'inverse, une lignée défectueuse pour l'autoantigène Ku présente des jonctions codantes et RSS sévèrement altérées. Ces résultats suggèrent que la p350 est essentielle uniquement pour les jonctions codantes, alors que Ku est indispensable à la fois pour les jonctions codantes et RSS. Cependant, le rôle précis de la p350 dans le système de recombinaison n'est pas encore très clair. Il a été suggéré que la perte d'activité de la DNA-PK pourrait résulter en une accessibilité réduite du système recombinase aux molécules en épingle à cheveux [Roth, 1992](voir figure 3).

Le gène de la DNA-PK a été plus récemment localisé sur le chromosome 16 murin, ce qui conforte le fait qu'il pourrait s'agir du gène défectueux dans les cellules SCID murines.

Plusieurs mutations ont été identifiées; la plus intéressante semble être localisée à la position correspondant à l'acide aminé 4045. Il s'agit d'une mutation T→A aboutissant à la création d'un codon stop ocre. De ce fait, l'extrémité carboxyl terminale de la DNA-PK est tronquée: les cellules SCID ne possèdent pas les 83 acides aminés terminaux hautement conservés de la protéine DNA-PK. L'absence absolue du fragment "wild-type" dans les cellules SCID confirme que ces cellules sont homozygotes pour la mutation. Le fait que les souris SCID peuvent devenir leaky (voir paragraphe II.1.2-) pourrait s'expliquer par la suppression du codon stop ocre [Blunt, 1996].

*La mutation SCID est donc responsable d'un défaut sévère qui rend la souris SCID tolérante aux greffes de cellules allo- et xénogéniques. De telles reconstitutions permettent d'étudier in vivo de nombreux mécanismes cellulaires.*

## **2- RECONSTITUTION IMMUNOLOGIQUE DE LA SOURIS SCID PAR TRANSFERT DE CELLULES ALLO- ET XENOGENIQUES**

L'utilisation des souris SCID humanisées s'est plus largement répandue que celles des souris SCID reconstituées avec des cellules murines. En effet, l'expérimentation *in vivo* du système immunitaire humain est difficile tant d'un point de vue technique qu'éthique. Par conséquent, des souris présentant des caractéristiques du système immunitaire humain seraient d'une grande utilité pour la recherche biomédicale.

### **2.1- Transfert de lymphocytes murins dans la souris SCID**

Les souris SCID sont capables de supporter le transfert adoptif de lymphocytes obtenus chez des souris congéniques (C.B-17, Balb/c). Après injection intraveineuse de cellules spléniques de souris congéniques, les souris SCID parviennent à développer un système immunitaire presque normal. Les souris SCID ainsi reconstituées produisent des immunoglobulines sériques à un niveau comparable à ceux des animaux donneurs [Reimann, 1991]. L'injection de cellules obtenues, cette fois à partir de ganglions lymphatiques de souris permet la survie des cellules T et B du donneur pendant au moins 10 mois. De telles souris

SCID sont capables de répondre à de nombreux antigènes différents au moins au cours des 6 premiers mois [Sprent, 1991].

Ce système expérimental fournit une excellente opportunité pour étudier la fonction *in vivo* des différentes sous-populations lymphocytaires dans un système autologue.

## **2.2- Tranfert de cellules humaines dans la souris SCID**

Deux modèles animaux ont été développés: des chimères SCID-hu, dont le système immunitaire humain dérive de greffes de tissus fœtaux [McCune, 1988], et des chimères hu-PBL-SCID, des souris SCID greffées de manière stable avec des lymphocytes de sang périphérique humain [Mosier, 1988].

### **2.2.1- Greffe d'organes humains**

Les souris SCID peuvent être reconstituées avec différents organes hématolymphoïdes humains comprenant: le foie fœtal et la moëlle osseuse (dans lesquels résident des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes), le thymus (là où se différencient les cellules T), et les organes lymphoïdes périphériques tels les ganglions lymphatiques, la rate et la peau (dans lesquels sont présentes des cellules T et B, et des cellules présentatrices d'antigène).

#### **2.2.1.1- Greffe d'organes hématolymphoïdes**

Les diverses combinaisons d'organes hématolymphoïdes humains qui sont implantés chez la souris SCID donnent naissance à une hématopoïèse humaine à long terme, auto-alimentée et à lignées multiples. Une réaction de greffon contre hôte ne peut pas se produire chez ces animaux et des transformants d'EBV n'ont pas été observés [Namikawa, 1990].

La greffe conjointe d'un fragment d'os et de cellules de moëlle osseuse et le traitement pendant 4 mois avec du SCF (Stem Cell Factor), de l'IL-3, du GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor) et du G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), permet le maintien d'une hématopoïèse humaine jusqu'à 1 an après la transplantation [Heike, 1995].

Dans le cas particulier d'une greffe sous-cutanée de thymus et moëlle osseuse fœtaux, des cellules T doublement positives CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, des cellules T CD4<sup>+</sup> ou T CD8<sup>+</sup>, ainsi que

leurs précurseurs thymocytaires CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> ont été identifiés au niveau de la greffe indiquant une lymphopoïèse cellulaire T en cours. Les cellules B de la greffe présentent le phénotype immature typique de la moëlle osseuse. En fait, la greffe thymus - moëlle osseuse fournit un environnement favorable à une leucopoïèse efficace. Après maturation de la structure thymus - moëlle osseuse, des lymphocytes humains T et B sont détectés dans le sang périphérique de telles SCID-hu. Les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> peuvent être clonées et répondent aussi bien aux allo-antigènes, aux mitogènes et à l'anticorps anti-CD3. Les cellules B sont HLA-DR<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> et environ 20% sont CD23<sup>+</sup>; elles sont donc plus matures que les populations B introduites au moment de la greffe, mais cependant moins que les cellules B du sang périphérique d'individus humains adultes. Des cellules humaines sont également détectées dans les rates de ces souris. Enfin, dans les 3 premiers mois après la transplantation, des IgM et IgG sont détectées dans les séra de toutes les souris étudiées. Les pourcentages des différentes sous-classes d'IgG sont comparables à ceux trouvés dans un sérum humain normal. La production d'IgA est également détectée dans 80% des cas, alors que celle d'IgE ne l'est que dans 37% des cas [Carballido, 1995a].

Un autre système est couramment utilisé: la greffe conjointe de thymus et de foie fœtaux. L'idée est, comme précédemment, d'introduire dans la souris des cellules souches hématopoïétiques humaines et du thymus fœtal; de façon à permettre la différenciation des cellules T humaines de manière physiologique. Le foie fœtal est, entre la huitième et la vingt-quatrième semaine de gestation, le site majeur hématopoïétique humain contenant des progéniteurs pour toutes les lignées. Le thymus fœtal humain croît considérablement lorsqu'il est implanté sous la capsule surrénale. Histologiquement, l'implant ressemble à un thymus humain normal présentant une architecture thymique et une zone appropriée de sous-populations thymocytaires. Fonctionnellement, cet organe assure une thymopoïèse active pendant plus d'un an [Namikawa, 1990]. De telles souris produisent des taux significatifs d'IgM et d'IgG, qui sont maximum 4 mois après la greffe. Le répertoire IgG est au minimum oligoclonal, et peut même être polyclonal. Une transplantation additionnelle de rate fœtale n'augmente pas significativement les taux d'IgG [Vandekerckhove, 1993]. Les cellules humaines sont parfois détectables dans la circulation périphérique [Namikawa, 1988], mais toujours indétectables dans la rate et la moëlle osseuse de ces souris SCID-hu. Cependant, des cellules humaines CD19<sup>+</sup> (0,1 à 0,7% des cellules totales) ont pu être isolées du thymus humain implanté. Ces cellules B sont issues des cellules souches du foie fœtal. Elles produisent

spontanément des IgM et des IgG *in vitro*, et peuvent switcher vers des cellules productrices d'IgE en présence de cellules T CD4<sup>+</sup> et d'IL-4 [Vandekerckhove, 1993].

Ces caractéristiques font de la souris SCID un excellent modèle pour aborder la question de la différenciation cellulaire, dans le cas particulier de l'hématopoïèse (voir paragraphe II.3-). Elle permet également l'étude de pathologies humaines. Notamment, différentes études ont montré que ce modèle SCID-hu se révélait être permissif, pertinent et reproductible pour une infection par le VIH [Namikawa, 1988] (voir paragraphe 4.2- pour le détail).

#### **2.2.2.2- Greffe d'organes lymphoïdes périphériques: cas particulier de la peau**

La greffe de peau humaine à des souris SCID est un succès dans plus de 90% des cas, comme le montre l'absence de signes histologiques visibles d'inflammation, de rupture ou de contraction de la peau, jusqu'à plus de 8 semaines après la greffe. Les structures du derme et de l'épiderme sont préservées, et les mastocytes, les cellules de Langerhans et les mélanocytes persistent. De plus, la peau transplantée maintient sa vasculature humaine comme le démontre un marquage immunohistochimique spécifique des cellules endothéliales humaines. Elle est également capable de répondre à l'injection intradermale de TNF- $\alpha$  en augmentant de façon réversible l'expression des molécules d'adhérence suivantes: la E-sélectine, le VCAM-1 et l'ICAM-1. Des leucocytes murins migrent alors vers les zones où la cytokine a été injectée [Yan, 1993]. Cette réaction inflammatoire active est dépendante de la E-sélectine humaine [Yan, 1994], ainsi que du PECAM-1 humain [Vaporciyan, 1993]. Par conséquent, le modèle de souris SCID greffées avec des peaux humaines peut fournir un système *in vivo* très utile pour étudier l'endothélium humain durant les processus d'inflammation.

Ce modèle peut être perfectionné pour étudier les interactions des cellules T humaines avec l'endothélium humain. Pour cela, les modèles SCID-hu et hu-SCID sont utilisés conjointement. Quinze jours après une greffe de peau,  $100 \times 10^6$  cellules T sont injectées aux souris SCID par voie intrapéritonéale (modalités développées au paragraphe 2.2.2-). L'injection intradermique de toxine tétanique induit un afflux cellulaire au point d'injection dans les 48 heures, uniquement si les cellules étaient issues de donneurs sensibles à cet antigène [Petzelbauer, 1996].

Ce modèle a donc une importance considérable pour appréhender les interactions entre cellules T et endothélium et les phénomènes d'inflammation.

## **2.2.2- Greffe de cellules lymphoïdes humaines**

Le modèle hu-SCID est, techniquement et pratiquement, plus facile à réaliser puisqu'il s'agit de greffer aux souris des cellules du sang périphérique humain, ou plus exactement, les cellules mononucléées (CMN). Deux voies d'injection ont été envisagées: en intraveineux ou en intrapéritonéal.

### **2.2.2.1- Par injection intraveineuse**

L'injection intraveineuse de  $10-90 \times 10^6$  CMN n'induit aucune production d'immunoglobulines durant au moins 6 mois, sans stimulation [Mosier, 1988]. De plus, lorsque les souris subissent une injection par voie intraveineuse de  $3 \times 10^7$  CMN humaines, les cellules humaines quittent le sang périphérique en 1 heure. Des sections tissulaires de ces animaux mettent en évidence de nombreuses cellules humaines au niveau du parenchyme pulmonaire 30 minutes après l'injection. A l'inverse, aucune cellule humaine n'a pu être détectée dans le sang périphérique, les poumons et la rate, 4 à 5 semaines après le transfert. L'hypothèse la plus probable est que les cellules humaines injectées par voie intraveineuse quittent rapidement la circulation pour se retrouver dans les poumons, où elles seraient éliminées [Martino, 1993].

### **2.2.2.2- Par injection intrapéritonéale**

#### **\* Etendue de la reconstitution**

A l'inverse du transfert de cellules lymphoïdes humaines par voie intraveineuse, de nombreuses études ont montré que des CMN humaines injectées par voie intrapéritonéale (i.p) pouvaient survivre chez la souris SCID pendant plusieurs mois. Ainsi, l'injection de  $15-40 \times 10^6$  CMN induit une production d'IgM et IgG humaines jusqu'au moins 13 semaines après le transfert [Martino, 1993]. Peu d'auteurs ont démontré la présence d'IgE humaines, cependant l'injection de  $30-100 \times 10^6$  CMN est suivie, 2 semaines plus tard, d'une production d'IgE de 3-1000 ng/ml pour 80 à 90% des animaux. Cette production, retrouvée quel que soit le donneur, n'est possible qu'après injection d'au moins  $30 \times 10^6$  CMN, et est partiellement dépendante de l'IL-4 [Kilchherr, 1993].

De plus, il est possible de retrouver des cellules humaines au niveau du péritoine et du sang (jusqu'à 57%) alors que de très rares cellules ont pu être détectées dans la rate, les

poumons et le foie, et aucune dans la moëlle osseuse et les plaques de Peyer. Il semble donc que les immunoglobulines soient produites dans la cavité péritonéale [Martino, 1993]. D'autres auteurs ont montré que l'injection de CMN humains par voie i.p induisait une persistance des lymphocytes T et B chez la souris pendant des mois dans le péritoine et les organes lymphoïdes périphériques [Mosier, 1988]. Le péritoine semble donc être la localisation privilégiée des cellules humaines.  $100 \times 10^6$  CMN injectées par voie i.p se retrouvent en majorité dans la cavité péritonéale: des cellules T humaines  $CD3^+$ , majoritairement  $CD8^+$  et d'apparence lymphoblastoïde, prédominant, alors que les cellules B humaines  $Ig^+$  sont rares. La majorité des cellules lymphoïdes sont activées ( $HLA-DR^+$ ) et en prolifération ( $Ki67^+$ ). A partir de 4 semaines après le transfert, de larges foyers à l'apparence de granulome apparaissent. La couche de cellules les enveloppant est constituée de cellules histiocytiques et épithélioïdes  $HLA-DR^+$ ,  $CD11c^+$  et  $ICAM^+$ . Dans la zone centrale, les lymphocytes humains  $CD8^+$  sont majoritaires. Dans ces foyers se trouvent également des cellules histio-monocytiques  $IL-1^+$  et  $IL-6^+$ . Chez les souris SCID présentant un chimérisme sanguin de cellules T humaines supérieur à 10%, plus de 90% des cellules du lavage péritonéal sont des cellules humaines  $CD3^+$  et  $HLA-DR^+$  [Hoffmannfezer, 1992]. Pendant les 20 premiers jours suivant l'injection intrapéritonéale de  $10 \times 10^6$  CMN humains, les cellules humaines sont détectées exclusivement dans la cavité péritonéale. Initialement, le nombre de cellules humaines décroît considérablement: il passe de  $10 \times 10^6$  cellules injectées à moins de  $0,01 \times 10^6$  isolées du péritoine. Puis les cellules humaines prolifèrent dans les chimères: 18% des cellules  $CD3^+$  issues des souris SCID sont en processus de réplication de leur ADN. Dans certaines études, des cellules humaines peuvent être détectées dans d'autres organes 30 jours après l'injection: en particulier, plus de 96% des cellules humaines isolées des chimères sont retrouvées dans les poumons, le foie et la rate. Les cellules ainsi détectées sont majoritairement des cellules  $TCR \alpha\beta^+$ , mémoires ( $CD45RO^+$ ,  $CD45RA^-$ ) et récemment activées ( $HLA-DR^+$ ,  $Leu 8^-$ ) [Tary Lehmann, 1992].

#### **\* Fonctions des cellules T injectées**

Les fonctions cellulaires T ont été analysées dans le modèle hu-PBL-SCID. Certains ont démontré que les lymphocytes T humains isolées à partir des souris SCID étaient anergiques [Tary Lehmann, 1994; Tary Lehmann, 1992]. En effet, des cellules T humaines isolées à partir des chimères ne prolifèrent pas [Tary Lehmann, 1992], ne produisent pas de cytokines ( $IL-2$ ,  $IFN-\gamma$  et  $GM-CSF$ ) et ne mobilisent pas le calcium [Tary Lehmann, 1994] en réponse à une stimulation par un anticorps anti- $CD3$ , en présence ou en absence de cellules présentatrices



d'antigène syngéniques humaines. Elles prolifèrent néanmoins en présence d'IL-2 exogène. Des lignées T générées à partir des chimères prolifèrent au bout de 2 mois de culture, via leur CD3; cet état fonctionnel reste stable durant les 6 mois suivants. L'anergie observée pourrait être la conséquence de la spécificité des cellules T humaines isolées à des antigènes xénoréactifs. En effet, la majorité des lignées T établies à partir des chimères et rendues sensibles à une stimulation via leur CD3, présentent une xénoréactivité vis-à-vis des antigènes murins, c'est à dire qu'elles prolifèrent spécifiquement lorsqu'elles sont en présence de cellules stimulatrices de rate de souris SCID [Tary Lehmann, 1992]. Cependant, les lignées T dérivées des chimères ne présentent pas de réactivité vis-à-vis d'un antigène de rappel [Tary Lehmann, 1994]. Les auteurs en ont donc conclu que la force conductrice de la recolonisation des souris SCID par les cellules humaines non stimulées était la réactivité du greffon contre l'hôte (voir paragraphe: *limites du système*).

Cependant, des cellules T humaines au repos ou activées par l'anticorps anti-CD3 peuvent médier des effets anti-tumoraux lorsqu'elles sont administrées à des souris SCID développant un carcinome humain du colon [Murphy, 1993a; Murphy, 1993b]. De plus des allogreffes de peau humaines à des souris hu-PBL-SCID sont rejetées, indiquant que des cellules T humaines sont capables de médier une réponse primaire à des allo-antigènes de la peau [Shiroki, 1994].

Ainsi, l'anergie observée par Tary-Lehman *et al* est probablement transitoire et incomplète dans ces souris, ou dépend du moment où les cellules T humaines sont récupérées.

#### **\* Fonction des cellules B injectées**

Les études initiales de la fonction immune dans le modèle hu-SCID se sont focalisées sur l'analyse de la fonction des cellules B. En effet, des immunoglobulines (Ig) humaines peuvent être détectées dans les souris, suggérant la présence de cellules B humaines fonctionnelles.

La production d'Ig humaines a été, à l'origine, décrite comme étant pauci-clonale; les cellules B humaines présentant un répertoire limité (rapport  $\kappa/\lambda$  anormal, très différents du rapport normal = 0,5), et principalement xénoréactif [Saxon, 1991; Williams, 1992d]. Cependant, de récents articles ont suggéré que la production d'Ig humaines était initialement polyclonale pendant au moins 3 semaines après le transfert de cellules humaines [Tissot, 1996]. La production d'IgG humaines est augmentée lorsque les cellules humaines sont déplétées en cellules NK et en monocytes avant leur injection dans les souris SCID. Le rôle des cellules NK

semble prépondérant sur la production d'immunoglobulines, et apparaît également important dans l'établissement de rapports  $\kappa/\lambda$  anormaux chez les souris hu-PBL-SCID; puisque la déplétion en cellules NK humaines induit des taux de chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$  similaires à ceux observés chez le donneur [Carlsson, 1992].

Ces souris chimériques sont également capables de développer des réponses à des antigènes de rappel comme la toxine tétanique [Carlsson, 1992; Duchosal, 1992a; Martensson, 1994; Mosier, 1988]. Mais la génération d'une réponse primaire est variable et difficile à obtenir. Le premier cas d'immunisation primaire fonctionnelle a été mis en évidence chez des souris SCID, greffées par injection intrapéritonéale de  $5-10 \times 10^6$  CMN de donneurs sains, et immunisées 3 semaines plus tard avec un antigène parasitaire recombinant, la Sm-28-GST. Neuf jours après, 40% des souris développent une réponse IgG anti-Sm-28-GST [Mazingue, 1991]. Des souris SCID injectées avec  $25-40 \times 10^6$  CMN de donneurs vaccinés contre la toxine tétanique (TT), produisent des anticorps spécifiques anti-DNP après immunisation avec du DNP couplé à la TT. Un résultat semblable a pu être obtenu avec de l'albumine canine (Calb) couplé à la TT. Aucun anticorps anti-Calb n'est produit si les souris sont immunisées avec la Calb seule, la TT seule ou avec le PBS, ou si les CMN proviennent de donneurs naïfs vis-à-vis de TT. Ceci suggère que l'absence d'interaction entre des cellules T mémoires (anti-TT) et de cellules B naïves (anti-Calb) réduit la probabilité d'une réponse immune primaire effective [Bombil, 1996]. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'une plus grande proportion des cellules T est de phénotype mémoire, i.e  $CD45RO^+$ , ce qui favoriserait la réponse à un antigène primaire couplé à un antigène de rappel. En effet, des souris SCID ayant subi une injection de  $6,5 \times 10^6$  cellules B et  $15 \times 10^6$  cellules T  $CD4^+ CD45RO^+$ , et immunisées avec la TT développent une forte réponse anticorps IgG spécifiques; alors qu'aucune production d'IgG ou d'IgM spécifique n'est détectée si les souris reçoivent des lymphocytes  $CD4^+ CD45RA^+$ . Cependant, lorsque les cellules  $CD45RA^+$  se sont différenciées *in vivo* dans la souris SCID, et qu'une seconde greffe de cellules B autologues est effectuée, une production d'IgG spécifiques, similaire à celle obtenue chez des souris SCID injectées avec des cellules  $CD45RO^+$ , est détectée [Martensson, 1994]. Un autre système hu-PBL-SCID a permis de développer une réponse primaire: des souris prétraitées par irradiation et injection d'anticorps anti-asialo GM1 afin d'abolir totalement les défenses de l'hôte (voir paragraphe développé ultérieurement), puis injectées avec  $30-50 \times 10^6$  CMN humains développent des anticorps anti-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) après immunisation avec l'antigène en présence d'adjuvant complet ou incomplet de Freund. D'autres antigènes, parasitaires ou synthétiques,

ont été testés: ils induisent également une réponse IgM et IgG spécifique 14 à 16 jours après la vaccination [Sandhu, 1994]. Ces productions d'anticorps soulèvent la question de la présentation antigénique aux cellules B. Or une différenciation des cellules T CD45RA<sup>+</sup> a lieu chez les souris hu-SCID uniquement si les cellules B autologues sont présentes. Comme cette différenciation nécessite la présence de cellules présentatrices d'antigène humaines, ceci suggère que les cellules présentatrices murines ne peuvent pas présenter d'antigène aux cellules humaines T CD45RA<sup>+</sup> de manière fonctionnelle [Martensson, 1994].

#### *\* Optimisation de la reconstitution*

L'un des problèmes du modèle hu-SCID est la très grande variabilité dans l'étendue de la reconstitution de la souris avec des cellules humaines, qui peut varier d'un donneur à l'autre, et même d'une souris à une autre en ayant utilisé le même donneur. Ces variabilités limitent couramment les tentatives de standardisation entre les différents utilisateurs; de ce fait les laboratoires ont employé différentes méthodes pour optimiser et s'assurer de l'étendue de la reconstitution. Elles consistent soit à diminuer la résistance de l'hôte, soit à augmenter la capacité des cellules humaines à coloniser l'animal.

La variabilité de l'étendue de la reconstitution implique l'existence d'une certaine résistance innée de la souris SCID à une greffe de CMN humaines. Certaines études ont montré que les souris SCID pouvaient résister aux cellules humaines via leur cellules Natural Killer (NK) [Murphy, 1992a]. Il est possible de supprimer ces cellules NK par l'administration d'anticorps dirigés contre l'asialo GM1 (ASGM1), une glycoprotéine présente essentiellement sur les cellules NK. Ce traitement augmente nettement l'étendue de la reconstitution et diminue la variabilité d'une souris à l'autre. L'étendue de la reconstitution a été appréhendée grâce au pourcentage de cellules humaines CD3<sup>+</sup> au niveau de la rate. Une injection unique d'anticorps ASGM1 la veille de l'injection des cellules humaines, augmente la prise de la greffe de 1,9 à 9% [Murphy, 1992a]. Une autre technique consiste à irradier les souris SCID pour réduire les résistances de l'hôte vis-à-vis de la greffe. Ainsi, une irradiation de 2 Gray, 1 jour avant l'injection intrapéritonéale de 20x10<sup>6</sup> CMN, permet d'observer, chez les souris SCID, une corrélation entre la production d'IgE et les taux d'IgE du donneur [Nonoyama, 1993]. Il est également possible d'utiliser conjointement les 2 techniques [Sandhu, 1994; Shpitz, 1994]. Ainsi, le prétraitement des souris SCID avec une irradiation de 3 Gray, en combinaison avec l'injection d'anticorps ASGM1, induit une prise de greffe, au niveau de la rate, de 25% de

cellules CD3<sup>+</sup> dans 80% des cas, 12-14 jours après l'injection de 35-50x10<sup>6</sup> CMN. Les cellules CD3<sup>+</sup> sont également présentes au niveau du péritoine, du foie, du poumon et du sang périphérique [Shpitz, 1994]. Malheureusement, les souris SCID sont très sensibles aux irradiations (voir paragraphe II.1.2-) et développent des lymphomes T murins après plusieurs mois, ce qui pourrait sérieusement compliquer l'interprétation de résultats d'études à long terme [Murphy, 1994]. De plus, le traitement par irradiation plus injection avec l'anticorps ASGM1, induit une réaction xénogénique de greffon contre hôte (voir paragraphe développé ultérieurement) dans 75% des souris dans les 3-5 semaines [Shpitz, 1994]. Enfin, une étude particulière a montré que la déplétion en cellules phagocytaires par injection intraveineuse de liposomes contenant du dichlorométhylène diphosphonate, résulte en la capacité accrue des cellules humaines (injectée par voie intraveineuse, à raison de 5,6x10<sup>6</sup> CMN par souris) à circuler et à survivre pendant des temps plus longs au niveau du sang périphérique, de la rate et de la moelle osseuse [Fraser, 1995a].

Mais la variabilité de l'étendue de la reconstitution peut aussi être liée à la présence de neutrophiles murins. Il a en effet été démontré qu'ils infiltraient le péritoine des souris SCID en réponse à l'injection de CMN humains. Il est donc possible que ces cellules contribuent également à la résistance innée de la souris SCID à une greffe de hu-PBL [Santini, 1995].

D'un autre côté, certaines études ont montré que l'activation de cellules humaines avant leur injection favorisait la reconstitution et la circulation dans l'hôte murin. L'activation des lymphocytes entraînerait l'induction et l'activation de molécules d'adhérence à leur surface permettant leur circulation dans les organes lymphoïdes murins. Des lymphocytes humains activés par le biais d'anticorps anti-CD3 ou de l'hormone de croissance sont capables de se lier à de nombreux ligands murins *in vitro* [Taub, 1994]. Cependant, peu de choses sont actuellement connues sur le rôle des "homing" récepteurs dans cette recirculation. L'activation cellulaire pourrait également augmenter la capacité de réponse des cellules transférées et ainsi promouvoir leur prolifération et la reconstitution. Différents moyens d'activation, comme le traitement avec des anticorps anti-CD3 [Murphy, 1993b], de l'IL-4 recombinante humaine [Bombil, 1996], des chimiokines comme le RANTES ou le MIP-1β [Murphy, 1996], des superantigènes [Martensson, 1994], et des hormones neuroendocrines comme l'hormone de croissance (rhGH) [Murphy, 1992b; Taub, 1994] ont été employés pour augmenter la reconstitution, l'activation et la circulation des cellules humaines vers les organes lymphoïdes périphériques des souris SCID.

***\*Les limites du système***

Parmi les limites du système hu-SCID, M. Tary-Lehman citait: l'incapacité des cellules souches humaines à s'établir dans la souris, le déclin des cellules T naïves et mémoires qui ne rencontrent pas d'antigène dans les premières semaines du chimérisme, l'absence de cellules humaines accessoires dans les organes lymphoïdes de la chimère et l'induction d'une réponse anti-hôte [Tarylehmann, 1995]. A cela, il faut ajouter le développement de lymphomes B humains induits par l'EBV, lorsque les CMN injectés sont issus de patients séropositifs pour EBV [Mosier, 1988; Mosier, 1991; Torbett, 1991]. C'est l'induction d'une réponse anti-hôte qui rend le système plus délicat à manipuler.

Les premiers articles publiés sur les chimères hu-SCID indiquaient qu'aucune réaction de greffon contre hôte ne se produisait [Mosier, 1988]. Cependant, une splénomégalie significative, ainsi que des lésions du foie, étaient observés dans certaines souris greffés avec des quantités importantes de cellules humaines ( $100$  à  $1000 \times 10^6$ ). L'analyse de la composition de la rate indiquait que la majorité des cellules étaient des cellules hématopoïétiques murines. Le mécanisme de cette dramatique augmentation de l'hémopoïèse murine après exposition à des cellules T humaines n'est pas clair actuellement. Il est possible que les cellules humaines reconnaissent les xénoantigènes murins et produisent alors en réponse des cytokines qui stimuleraient les cellules hématopoïétiques dérivées de l'hôte. Cette hypothèse est en partie supportée par le fait que des lymphocytes périphériques de sujets normaux sont capables de proliférer *in vitro* en réponse à des xénoantigènes murins, en présence d'IL-1, d'IL-2 ou de facteurs de croissance pour les cellules T humaines [Alter, 1990]. Il apparaît donc que les cellules T humaines sont responsables d'une réaction xénogénique de greffon contre hôte (XGVHD) différente d'autres formes de réaction de greffon contre hôte, qui se produisent lorsque des cellules allogéniques sont transférées dans une même espèce [Huppés, 1992; Murphy, 1992a]. Hoffmann *et al* ont montré qu'environ 15-20 % des souris hu-SCID (reconstituées avec  $100 \times 10^6$  CMN) présentaient un chimérisme de plus de 10% de cellules humaines dans le sang périphérique dans les 8 semaines suivant le transfert, c'est à dire que 10% des cellules provenant du sang d'une telle chimère étaient humaines. Ces souris montrent des signes immunohistologiques de XGVHD. Au stade précoce de cette XGVHD (c'est à dire 3 semaines après le transfert des cellules humaines), les différentes sous-populations T humaines sont préférentiellement localisées dans la rate murine. Au niveau de la pulpe rouge, les cellules CD8+ prédominent; alors que dans la pulpe blanche, la majorité des cellules humaines sont des

cellules faiblement positives pour le marqueur CD4. En phase tardive (c'est à dire 8 semaines après la reconstitution), des cellules humaines, en majorité CD8<sup>+</sup>, sont présentes dans le thymus et les ganglions lymphatiques. Ces changements sont associés avec une condition moribonde des souris, démarrant 5 semaines après l'injection des cellules humaines [Hoffmann Fezer, 1993]. D'un côté, la XGVHD apparaît liée aux lymphocytes CD8<sup>+</sup> puisque leur nombre augmente parallèlement à une diminution de la courbe de survie des souris greffées avec 10<sup>9</sup> CMN [Hupples, 1994]. D'un autre côté, le développement d'une XGVHD apparaît lié aux lymphocytes CD4<sup>+</sup> et aux cellules B. En effet, si l'injection de 30-50x10<sup>6</sup> CMN à des souris traitées par irradiation et injection de l'anticorps ASGM1, et immunisées avec un antigène en présence d'adjuvant (adjuvant complet ou incomplet de Freund) induit une XGVHD et une mort des souris dans les 28 jours; la déplétion en cellules CD4<sup>+</sup> prolonge leur survie jusqu'à 80-90 jours, et la déplétion en cellules B la prolonge jusqu'à 70 jours [Sandhu, 1994].

*En dépit de ces obstacles, le modèle hu-PBL-SCID possède toutes les qualités pour servir de modèle d'analyse in vivo des cellules lymphoïdes humaines et a été utilement appliqué à l'étude de diverses pathologies humaines.*

### **3- SOURIS SCID ET ETUDE DE LA DIFFERENTIATION DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES**

Le modèle SCID-hu permet d'analyser la différenciation et la fonction des cellules hématopoïétiques humaines dans un contexte hématolymphoïde humain. De nombreux travaux se sont ainsi attachés à définir phénotypiquement les cellules souches hématopoïétiques humaines et d'évaluer l'effet de perturbations endogènes et exogènes sur leurs fonctions.

Ainsi, différentes études ont permis l'identification et la caractérisation des cellules progéniteurs hématopoïétiques humaines. Par exemple, les cellules CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> Thy-1<sup>+</sup>, isolées à partir de la moelle osseuse humaine après déplétion en cellules exprimant des marqueurs de cellules matures, ont été identifiées comme ayant une activité de cellules progéniteur de lignées multiples dans des souris SCID transplantées avec du thymus fœtal humain [Baum, 1992]. Ces cellules donnent naissance aux cellules T, B, myéloïdes, érythroïdes et mégacaryocytaires, *in vitro* et *in vivo* dans le cadre de la souris SCID-hu. Elles sont à durée de vie longue et ont la capacité de repeupler les fragments d'os fœtal d'autres

groupes de souris SCID-hu, avec le maintien d'un potentiel de lignées multiples [Chen, 1994b]. La population  $CD34^+ Lin^- Thy-1^+$  apparaît donc contenir des cellules souches hématopoïétiques, à vie longue et probablement à autorenouvellement. La souris SCID-hu a permis de montrer que les population  $Thy-1^+$  et  $Thy-1^-$  peuvent recoloniser le thymus. Les 2 populations donnent naissance à des thymocytes  $CD4^+ CD8^+$  et  $CD3^+ CD1^+$ , comme dans un thymus humain normal. cependant, le potentiel de génération des cellules T est égal entre les  $Thy-1^-$  et les  $Thy-1^{+lo}$  (i.e à faible expression en  $Thy-1$ ), mais est quasiment inexistant chez les cellules  $Thy-1^{+hi}$  [Murray, 1995]. Enfin, des cellules  $CD34^+ Lin^- CD45RA^+ CD10^+$  ont été montrées donnant naissance à des populations T, B, NK et à des cellules dendritiques *in vitro* et dans les thymus des souris SCID-hu [Galy, 1995].

Le modèle SCID-hu présente en outre une grande utilité dans l'évaluation de facteurs ayant un rôle dans l'hématopoïèse humaine *in vivo* [Fraser, 1995a].

Un phénomène important peut également être analysé grâce à la chimère SCID-hu: les sélections positives et négatives qui se produisent au niveau du thymus. Pour étudier le rôle de l'éducation thymique dans le développement du répertoire T humain, Vandekerckhove *et al* ont greffé des souris SCID avec du thymus et du foie fœtaux issus du même donneur, ou de 2 donneurs différents. Dans ces animaux, la génération de la diversité du récepteur T (TCR) au stade  $CD4^+ CD8^+$  est déterminé par le génotype des cellules souches du foie fœtal; simultanément, les déterminants polymorphiques exprimés par l'épithélium thymique influencent le répertoire  $V\beta$  des cellules T matures  $CD4^+$  ou  $CD8^+$  [Vandekerckhove, 1992]. De plus, les cellules hématopoïétiques humaines et les cellules de l'épithélium thymique ont été démontrées induisant la tolérance par 2 mécanismes différents: les cellules hématopoïétiques dans le thymus (les cellules dendritiques, les macrophages, et les cellules B ayant pour origine le donneur du foie fœtal) induisent la tolérance au "soi" par délétion clonale; alors que les cellules épithéliales thymiques l'induisent par anergie clonale [Vandekerckhove, 1992]. Cette anergie est liée à l'incapacité des cellules à produire des taux suffisants d'IL-2, et peut être supprimée par apport exogène d'IL-2 [Schols, 1994]. Ces évènements récapitulent ceux précédemment démontrés dans le thymus murin, et indique que l'organe thymus-foie des souris SCID-hu est un modèle convenable pour évaluer le développement et la maturation intrathymique, ainsi que l'effets de différents agents sur la sélection intrathymique des cellules T.

*La souris SCID fournit donc un modèle d'étude du développement et de la maturation des cellules immunocompétentes. Outre cet aspect fondamental, la souris SCID est aussi un modèle d'étude de nombreuses pathologies.*

## **4- SOURIS SCID ET ETUDE DE PATHOLOGIES HUMAINES**

### **4.1- Etude des maladies autoimmunes**

L'utilisation de la souris SCID dans l'étude des maladies autoimmunes s'est largement répandue puisque le modèle hu-SCID mice a fourni la première opportunité pour étudier la production d'auto-anticorps humain hors du patient.

En effet, suite à l'injection de cellules mononucléées du sang périphérique ou de tissu cible contenant des lymphocytes autoréactifs, des auto-anticorps sont produits pendant des semaines, voire des mois. Par exemple, l'injection de  $15 \times 10^6$  CMN de patients présentant un lupus erythémateux disséminé, à des souris SCID résulte en une production continue d'anticorps anti-nucléaires, accompagnée dans certains cas, d'un dépôt de C3 murin dans les glomérules [Duchosal, 1992b]. Cependant, en dépit de cette production d'auto-anticorps, les souris SCID sont incapables de développer des manifestations cliniques de la maladie. Différentes hypothèses expliquant l'absence de pathologie dans la souris ont été soulevées: (1) les lymphocytes T humains sont restreints par le complexe majeur d'histocompatibilité humain, (2) la quantité d'auto-anticorps produit est faible (environ 10% des taux trouvés chez le donneur), (3) il peut exister des différences entre les épitopes humains et les épitopes murins, (4) les auto-anticorps humains doivent posséder une capacité variable d'activation du complément murin et d'autres voies effectrices, enfin (5) les cellules humaines étant injectées seules, il est probable qu'il existe peu d'antigène susceptible de stimuler la réponse anticorps [Elkon, 1994]. Il faudrait de plus pouvoir appréhender la durée de survie des lymphocytes T et B humains. Ce modèle ne fait pas l'unanimité à cause de l'incapacité à développer la maladie. Pourtant, la production continue d'auto-anticorps permet une investigation détaillée des facteurs cellulaires et environnementaux nécessaires à leur synthèse.

Un autre modèle SCID a permis le développement d'un processus inflammatoire similaire à celui observé chez l'homme dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi, des cellules mononucléées issues de liquide synovial de patients atteint de polyarthrite rhumatoïde,



injectées de façon intra-articulaire, induisent, au bout de 4-8 semaines, chez certaines souris SCID, une hyperplasie synoviale qui reproduit les changements histopathologiques observés chez les patients, à des stades précoces de la maladie [Mima, 1995]. De plus, des cellules T issues du fluide synovial, et activées par un anticorps anti-CD3, induisent, 6 semaines après le transfert, une arthrite sévèrement destructrice lorsqu'elles sont injectées simultanément dans l'articulation du genou et dans la cavité péritonéale. Cette arthrite implique une prolifération des cellules synoviales agressives, une érosion du cartilage et de l'os par infiltration de fibroblastes fortement prolifératifs, et une sérieuse altération de l'articulation. La seule différence avec la pathologie humaine, réside dans le fait que le transfert de lymphocytes synoviaux n'arrive pas à induire la formation de follicules lymphoïdes, probablement à cause de l'absence de lymphocytes B, et donc de complexes immuns, séquestrés par les cellules dendritiques et nécessaires à la formation de follicules lymphoïdes [Sakata, 1996]. Dans un système plus autologue, du cartilage humain normal a été co-implanté avec des fibroblastes synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. A bout de 60 jours, tous les implants présentaient une croissance intensive et invasive dans le cartilage. De plus, des enzymes dégradant le cartilage (cathepsines B, D et L) ont été détectées dans les implants, dans une zone environnant le site d'invasion [Muller Ladner, 1996]. Un tel modèle de souris SCID développant certaines caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde, peut alors permettre d'analyser l'importance de certaines molécules comme cible thérapeutique. Par exemple, il a été montré que l'ICAM-1 était impliquée dans la rétention des cellules mononucléées au niveau de la synovie rhumatoïde, dans un modèle de souris SCID greffées en sous-cutané avec du tissu synovial de patients atteints d'une polyarthrite rhumatoïde, puis injectées par voie intrapéritonéale avec des cellules mononucléées de donneurs sains [Jorgensen, 1996].

## **4.2- Etude des cancers humains**

La souris SCID humanisée par injection de cellules ou greffe de tissus humains est un modèle largement utilisé pour étudier le développement de cancers, et envisager de nouvelles thérapeutiques. Seuls quelques exemples seront développés dans le paragraphe ci-dessous.

La souris SCID permet par exemple d'étudier la biologie des leucémies humaines et d'explorer la faisabilité et l'efficacité de nouvelles thérapies. Ainsi, plusieurs études ont montré que des cellules provenant de patients atteints de leucémie lymphoblastique aigüe (ALL), peuvent, après leur transfert chez les souris SCID, proliférer dans les tissus hématopoïétiques,

envahir de nombreux organes et provoquer la mort de la souris [Kamel Reid, 1991; Kamel Reid, 1989]. Plus précisément, des cellules provenant de patients ALL récemment diagnostiqués sont détectées en faible nombre, ou sont indétectables chez les souris SCID. A l'inverse, des cellules provenant de patients ayant rechuté dans les 13 mois après le diagnostic, prolifèrent rapidement dans la moelle osseuse murine, la rate et le thymus, envahissent les organes péritonéaux, et causent la mort de la souris dans les 4-16 semaines [Kamel Reid, 1991]. Il est donc possible de prédire la réponse à un traitement pour des ALL de lignée B à haut risque, ce qui permet une ségrégation des patients en fonction de sous-groupes distincts de pronostic [Uckun, 1995a]. Les informations tirées de l'utilisation du modèle de ALL chez la souris SCID, peuvent aussi être très utiles pour planifier l'intensification et la maintenance d'une chimiothérapie. Le modèle permet également d'évaluer et de comparer les caractéristiques pharmacodynamiques, la toxicité et l'efficacité de nouvelles drogues, ainsi que la toxicité et l'efficacité de nouveaux programmes thérapeutiques combinés utilisant plusieurs drogues. Par exemple, Uckun *et al* ont récemment comparé l'activité antileucémique de 15 substances dans un modèle SCID de ALL humaine [Uckun, 1995b]. Les résultats de cette étude ont fourni des preuves expérimentales sans précédent du potentiel thérapeutique d'inhibiteurs spécifiques des tyrosine kinases associées aux récepteurs CD19, agissant donc au niveau des cellules leucémiques précurseurs des cellules B.

La souris SCID permet également d'envisager des protocoles thérapeutiques utilisant des anticorps monoclonaux humains puisqu'il est possible de produire des anticorps humains réactifs vis-à-vis de certaines lignées cancéreuses. Ainsi, la greffe de tumeurs pulmonaires humaines, associée à une injection intrapéritonéale de cellules mononucléées provenant des ganglions proximaux des mêmes patients permet la production d'IgG par les souris SCID. Les sera de ces souris SCID sont réactifs vis-à-vis d'une lignée d'adénocarcinome pulmonaire. La production et la sélection de lignées provenant de cellules de rate et de thymus des souris SCID-hu a permis d'obtenir, après formation d'hybridomes, 4 anticorps monoclonaux humains réactifs vis-à-vis de nombreuses lignées [Satoh, 1995].

### **4.3- Etude de la pathologie induite par le VIH**

Des études utilisant le modèle hu-SCID ont démontré que les cellules T humaines peuvent être infectées avec le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) *in vivo* dans l'hôte murin. Le site le plus fréquent de localisation du virus est le péritoine, suivi de la rate, du sang

périphérique et des ganglions lymphatiques périphériques. L'infection par le VIH affecte la concentration d'immunoglobulines humaines et le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la souris [Mosier, 1991]. De plus, lorsque les souris SCID sont injectées avec des cellules provenant de patients infectés par le VIH, une déplétion des lymphocytes CD4<sup>+</sup> est observée 18 à 25 jours après, alors que la pathologie restait stable chez les patients. Le virus est quant à lui détectable dans la rate, le lavage péritonéal et le sang. Des traitements anti-rétroviraux (comme l'analogue de nucléoside: le FddA) bloquent la production du virus et la perte de cellules T CD4<sup>+</sup> dans les souris [Boyle, 1995]. Cependant, l'incapacité à greffer des monocytes humains dans la souris SCID limite l'utilisation de ce modèle dans l'analyse des effets du VIH sur les cellules humaines.

Le modèle SCID-hu est plus largement répandu pour étudier la pathologie du SIDA. Du thymus et du foie fœtaux sont greffés sous la capsule surrénale et fusionnent, formant un organe unique appelé implant thymus/foie (thy/liv). L'implant thy/liv peut être infecté avec le VIH par injection directe du virus dans l'implant [Aldrovandi, 1993]. Des résultats similaires ont pu être obtenus en greffant les souris SCID avec du thymus fœtal et des ganglions lymphatiques [Namikawa, 1988]. La déplétion en cellules CD4<sup>+</sup> est observée 3 à 9 semaines après l'infection, et est visible histologiquement par l'hypocellularité, la perte des jonctions corticomédullaires, et l'involution thymique. Phénotypiquement, les thymocytes immatures CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> disparaissent les premiers, suivis par les cellules matures CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>. La déplétion en cellules CD4<sup>+</sup> corrèle avec la charge virale [Aldrovandi, 1993]. Une pathologie similaire a été observée dans le thymus de patients infectés. La variation de séquence du VIH-1 est faible dans le modèle SCID tout comme dans l'infection aiguë chez l'homme. Les souris SCID-hu thy/liv apparaissent donc être un modèle d'étude de la phase aiguë de l'infection par le VIH-1, plutôt que de la phase chronique où la variation de séquence du virus est considérable [Jamieson, 1995]. La souris SCID-hu semble donc utile pour modéliser les événements précoces de la pathogénèse induite par le VIH et évaluer des stratégies thérapeutiques pour intervenir précocement.

#### **4.4- Etude des maladies parasitaires**

L'utilisation de la souris SCID dans l'étude des maladies parasitaires est basée sur trois caractéristiques importantes: (1) la souris SCID peut être vulnérable vis-à-vis de parasites qui n'infecteraient pas des souris immunocompétentes, fournissant ainsi un modèle murin de

l'infection; (2) la souris chimérique SCID-hu offre un système permettant l'étude de parasites spécifiques de l'homme chez la souris; et (3) la reconstitution sélective de souris SCID stimulées par le parasite avec des anticorps et/ou des lymphocytes compétents est un outil puissant pour isoler et identifier le rôle de différentes composantes du système immunitaire dans la réponse de l'hôte au parasite.

Ainsi, par exemple, des souris SCID infectées par *Schistosoma* ne forment pas de granulome autour des œufs et présentent une réduction de la ponte des œufs par les vers adultes. Comme les macrophages sont normaux chez la souris SCID, ces observations suggèrent que les lymphocytes doivent être nécessaires pour la formation de granulome, probablement par l'intermédiaire d'une sécrétion de cytokines [Amiri, 1992].

De plus, lorsque des hépatocytes (hep) humains sont greffés sous les capsules rénales de souris SCID et que ces souris SCID-hu-hep ainsi créées sont stimulées par injection intraveineuse de *Plasmodium falciparum*, des parasites sont retrouvés dans les hépatocytes humains. L'infection d'hépatocytes humains transplantés et la poursuite du cycle du parasite dans l'hôte peut ainsi permettre d'évaluer l'efficacité de vaccins potentiels [Sacci, 1992].

Enfin, une infection par *Plasmodium chabaudi* de souris SCID non reconstituées est létale au bout de 20-30 jours. L'injection de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> normaux et compétents provoque la survie de 70% des animaux. L'injection conjointe de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et B induit une production d'IgG spécifiques anti-malaria, et une clairance de la parasitémie dans les 20 jours. Ces souris ont alors un comportement clinique similaire à celui de souris contrôles Balb/c [Meding, 1991].

Tous ces facteurs réunis fournissent donc un système des plus valables pour étudier les parasites humains dans un modèle de petit animal.

#### **4.5- Etude des maladies allergiques**

L'utilisation de la souris SCID comme modèle d'étude des réactions allergiques a essentiellement concerné la régulation de la réponse humorale, c'est-à-dire, de la réponse IgE. Le mode de reconstitution le plus courant est l'injection de cellules du sang périphérique, mais il est également possible d'utiliser dans certains cas des souris SCID greffées avec des organes fœtaux.

Ainsi, une étude a montré que des souris SCID greffées, en sous-cutané, conjointement avec du thymus fœtal et de la moelle osseuse produisaient spontanément des niveaux

considérables d'IgM, d'IgG et dans certains cas des IgE et des IgA. L'injection d'IL-4 potentialise la maturation des précurseurs B humains *in vivo* et augmente spécifiquement la production d'IgE, alors que l'injection sous-cutanée continue d'un antagoniste des récepteurs de l'IL-4 et de l'IL-13 inhibe spécifiquement la production d'IgE [Carballido, 1995b; Carballido, 1995a].

De manière plus générale, des souris SCID reconstituées par injection intrapéritonéale avec  $40\text{-}50 \times 10^6$  CMN de patients atteints de dermatite atopique (et présentant des taux d'IgE variant de 3700 à 20300 UI/ml) développent au bout de 2 semaines une production significative d'IgE humaine. Cette production atteint un maximum entre la troisième et la cinquième semaine après le transfert, alors que la concentration d'IgG humaine (pour les 4 classes d'immunoglobulines) augmente progressivement jusqu'à former un plateau au bout de 2 mois, et persiste au moins 3 mois après le transfert [Ito, 1992; Spiegelberg, 1994]. Aucune production d'IgE humaine n'est détectée si seulement  $10 \times 10^6$  CMN de patients atopiques ou  $50 \times 10^6$  CMN de patients non atopiques sont injectées. La production d'anticorps humains est totalement supprimée lorsque les cellules sont déplétées en CD2<sup>+</sup> ou en CD4<sup>+</sup> [Ito, 1992], ou partiellement, lorsque les cellules sont déplétées en CD14<sup>+</sup> [Herz, 1997]. A l'inverse la déplétion en cellules CD8<sup>+</sup> induit une réponse IgE persistente [Ito, 1992]. L'injection de CMN préincubées avec de l'IL-4 humaine, accompagnée ou non d'une injection d'IL-4 à des souris hu-SCID augmente d'une centaine de fois la production d'IgE qui atteint son maximum 6 semaines après la reconstitution. La production d'IgG est également amplifiée. Le même protocole utilisé cette fois avec de l'IFN- $\gamma$  ne modifie pas les productions d'immunoglobulines. A l'inverse, l'injection simultanée des cellules et d'un anticorps anti-récepteur de l'IL-4, inhibe la production d'IgE [Spiegelberg, 1994]. Enfin, en dépit d'une bonne production d'IgE humaine chez les souris SCID reconstituées avec les cellules de donneurs atopiques, et d'une détection d'anticorps IgG spécifiques (anti-poussière de maison), aucun IgE spécifique n'a été mis en évidence. De plus, aucune réponse anticorps secondaire n'a été observée après injection sous-cutanée de l'allergène en présence d'adjuvant [Ito, 1992].

Un autre modèle a cependant permis de mettre en évidence des IgE spécifiques vis-à-vis de l'acarien Dpt, et fonctionnels, dans toutes les souris SCID reconstituées avec  $10 \times 10^6$  CMN et immunisées par voie intrapéritonéale avec l'allergène en présence d'adjuvant. A l'inverse, aucune production n'est détectée si les souris sont reconstituées avec les CMN de donneurs non allergiques, ou si les souris reconstituées avec les CMN de sujets allergiques ne sont pas stimulées par l'allergène correspondant [Pestel, 1994]. Des souris SCID reconstituées avec 25-

$60 \times 10^6$  CMN de patients sensibles au pollen de bouleau produisent des IgE totales, dont les taux sont corrélés avec ceux des donneurs. Ces IgE ont une demi-vie plus courte que chez l'homme: 24 heures chez la souris hu-PBL-SCID contre 2-3 jours chez l'homme. Chez certaines souris, des IgE spécifiques ont pu être détectées, mais la stimulation par l'antigène n'induit aucune augmentation de ces taux [Steinsvik, 1997]. Les différences observées dans ces 2 systèmes peuvent être expliquées premièrement, en ce qui concerne la production spontanée, par l'augmentation du nombre de cellules injectées dans le second cas, et deuxièmement, en ce qui concerne l'immunisation, par le fait que les CMN ont été prélevés chez les patients allergiques au pollen de bouleau pendant la saison pollinique, c'est-à-dire que les cellules ont été préalablement stimulées *in vivo*.

*Les utilisations de la souris SCID sont donc multiples. En particulier, sa capacité à tolérer des cellules humaines, fait d'elle un modèle intéressant pour étudier la régulation de la réaction immunitaire humaine, ainsi que divers désordres immunologiques.*

# **CADRE et OBJECTIFS**

Connue depuis l'antiquité, l'asthme est la maladie chronique actuelle la plus commune dans les pays industrialisés. Des études épidémiologiques suggèrent que sa prévalence, sa sévérité et mortalité sont en augmentation constante. Deux éléments majeurs interviennent dans son développement: une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux comme l'exposition aux allergènes (comme les acariens de la poussière de maison) ou à des polluants atmosphériques. D'un point de vue clinique, l'asthme se définit comme une maladie caractérisée par une dyspnée paroxystique secondaire à une hypersensibilité des voies aériennes à des stimuli divers et se manifestant par un trouble ventilatoire obstructif variable (American Thoracic Society, 1975). L'asthme allergique est caractérisé par trois composantes majeures: (1) une production anormale d'immunoglobulines de type E, (2) une inflammation chronique des voies aériennes avec infiltration de lymphocytes, d'éosinophiles et de mastocytes, liée à une desquamation de l'épithélium, un épaissement et une désorganisation des tissus de la barrière bronchique, et (3) une hyperréactivité des voies aériennes se définissant comme une anormalité des voies aériennes conduisant à un rétrécissement excessif en réponse à un agent bronchoconstricteur [Barnes, 1997].

L'étude des mécanismes impliqués dans le développement d'un asthme chez l'homme est limitée, pour des raisons éthiques évidentes, à des analyses *ex vivo* de prélèvements. De plus, les études réalisées *in vitro* avec des cellules d'origine humaine n'autorisent qu'une vision des mécanismes, réduite aux cellules en présence. Enfin, l'utilisation de modèles animaux ne permet pas toujours une extrapolation des résultats à l'homme. Par conséquent, disposer d'un modèle plaçant des cellules humaines dans un environnement plus physiologique et manipulable aussi aisément qu'un modèle animal classique, peut s'avérer déterminant pour une meilleure compréhension des mécanismes de la réaction allergique conduisant aux manifestations cliniques observées dans l'asthme et une meilleure évaluation de molécules à visée thérapeutique.

La souris SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency) ne possède pas de lymphocytes T et B matures fonctionnels [Bosma, 1983] et autorise donc la greffe de cellules allo- et xénogéniques. Dans notre laboratoire J. Pestel *et al* ont développé un modèle d'étude de la régulation de la synthèse d'IgE humaines chez cette souris. Ils ont montré que l'injection intrapéritonéale de cellules provenant du sang périphérique de patients sensibles à l'acarien *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (Dpt), suivie d'une immunisation par voie intrapéritonéale



avec du Dpt en présence d'adjuvant (alun), induisait une production d'IgE humaines fonctionnelles et spécifiques vis-à-vis de l'allergène. Aucune production d'IgE n'était détectée lorsque les souris SCID étaient reconstituées avec les cellules de donneurs non sensibles à Dpt [Pestel, 1994].

Néanmoins, cette voie d'administration de l'allergène ne correspond pas au mode de sensibilisation naturelle des patients. Nous avons donc voulu appréhender l'effet que pouvait entraîner l'inhalation de l'allergène Dpt chez des souris SCID reconstituées avec des cellules de patients asthmatiques allergiques à Dpt.

La première partie de ce travail concerne donc l'analyse de la production d'IgE humaines chez les souris SCID humanisées. Dans un deuxième temps, nous avons analysé la migration des cellules humaines, en particulier au niveau des poumons murins. Enfin, nous avons évalué l'hyperréactivité bronchique au carbachol, de souris SCID ainsi traitées.

# **RESULTATS**

# **RESULTATS 1**

***LA REPONSE IgE CHEZ LES SOURIS SCID***

Nous avons dans un premier temps analysé la réponse IgE humaine chez les souris SCID reconstituées avec les cellules de patients allergiques à Dpt, comparativement à celle des souris SCID reconstituées avec les cellules de patients allergiques à un autre aéroallergène ou non allergiques, et sensibilisées ou non par un aérosol de Dpt. L'étude a été menée de manière cinétique jusqu'à une date maximale de 60 jours après l'inhalation.

### **1- Obtention d'une réponse IgE humaine chez des souris SCID humanisées**

Les souris SCID ont été reconstituées avec  $15 \times 10^6$  CMN de patients sensibles (souris SCID "allergiques") ou non sensibles (souris SCID non "allergiques") à Dpt, puis ont inhalé l'allergène 15 jours plus tard, à raison d'une inhalation de 100 IR de Dpt (IR: Index de Réactivité, 100 IR correspondent à environ 200  $\mu$ g de protéines), une fois par jour pendant 4 jours (protocole 1).

Dans un premier temps, nous avons montré sur un nombre restreint de lots de souris, que seules les souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt produisaient des IgE humaines (jusqu'à 118 UI/ml) (figure 1A). En effet, en absence d'exposition à l'allergène, de très faibles taux d'IgE (0 à 2,2 UI/ml) étaient détectés dans le sérum des souris SCID reconstituées avec les CMN des mêmes patients, quel que soit le moment de l'analyse (figure 1B). Chez des souris SCID non "allergiques", le taux d'IgE reste inférieur à 6 UI/ml, que les souris aient ou non inhalé l'allergène (figure 1C). L'analyse de quelques sérums de souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt a permis de mettre en évidence des IgE spécifiques vis-à-vis de l'allergène (figure 2).

En poursuivant les expériences, nous avons remarqué que beaucoup de lots de souris SCID "allergiques" ne répondaient pas à la stimulation par l'allergène (taux d'IgE inférieurs à 5 UI/ml quel que soit le jour après l'inhalation), soit 11 lots sur 21, plus 4 lots où plus de la moitié des souris n'avaient pas répondu. En se basant sur l'absence de production d'IgE, nous avons émis l'hypothèse d'une absence de prise de greffe chez de telles souris SCID. Certains auteurs avaient déjà décrit la variation du taux de réussite de la reconstitution selon le donneur [Hoffmann Fezer, 1993]. Nous n'avons pas trouvé de relation entre ces échecs de reconstitution et le statut allergique du patient, comme par exemple le taux d'IgE sériques totales, le RAST (Radio-Allergo Sorbent Test qui mesure les IgE spécifiques) vis-à-vis de Dpt ou la polysensibilisation, et l'analyse des quantités respectives de cellules injectées (lymphocytes T CD4<sup>+</sup>: 34 à 50%, CD8<sup>+</sup>: 16 à 22%, lymphocytes B CD19<sup>+</sup>: 5 à 10% et

monocytes CD14<sup>+</sup>: 19 à 22%) n'a rien révélé non plus. Néanmoins, d'une manière générale, la réussite de la reconstitution est favorisée lorsque les taux d'IgE du patient asthmatique sont supérieurs à 1000 UI/ml et qu'il présente des taux d'IgE spécifiques supérieurs à 50 unités RAST. Les lots de souris à reconstitution non effective ont été éliminés des analyses ultérieures.

Dans un souci d'amélioration de cette reconstitution, l'effet de différentes quantités de Dpt nébulisé a été évalué, soit 4, 9 ou 20 inhalations de 100 IR de Dpt chacune, sur 4 lots de souris SCID reconstituées avec les CMN de patients sensibles à Dpt. Aucune différence significative n'a été mise en évidence par le test statistique de Kruskal-Wallis entre les taux d'IgE humaines obtenus après exposition à ces quantités variables d'allergène, quel que soit le moment d'analyse. Toutes les souris SCID ont donc été réunies au sein d'un même groupe appelé: " souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt ".

Nous avons alors pu appréhender l'effet des aérosols de Dpt sur la production d'IgE en comparant la réponse IgE chez les souris SCID "allergiques" ayant ou non inhalé l'allergène (figure 3). Ainsi, seule l'exposition des voies aériennes des souris SCID "allergiques" au Dpt induit une production d'IgE humaines sériques: les médianes sont respectivement pour les souris exposées ou non au Dpt à J15: 18,6 contre 1,85; à J21: 18,8 contre 3,01; à J30: 15,5 contre 1,26; à J60: 25,05 contre 0,35 UI/ml. Les taux d'IgE sont significativement différents à J15 et J30 ( $p < 0,005$ ).

## **2- Amélioration de la reconstitution**

Compte tenu du nombre important de souris dites "allergiques" ne produisant pas d'IgE suite à une reconstitution défectueuse, une amélioration du système a été envisagée. L'idée était d'augmenter la stimulation des cellules humaines et/ou de diminuer la résistance de l'hôte.

Premièrement, il a été montré que le nombre de cellules humaines décroît dans les 15 premiers jours après la reconstitution, pour augmenter par la suite. Les cellules humaines mémoires et/ou réactives vis-à-vis de l'hôte sont alors sélectionnées [Tary Lehmann, 1992]. Deuxièmement, certaines études ont montré que les souris SCID pouvaient résister aux cellules humaines via leur cellules Natural Killer (NK) [Murphy, 1992b]. Il est possible de supprimer ces cellules NK par l'administration d'anticorps dirigés contre l'asialo GM1 (ASGM1), une glycoprotéine présente sur les cellules NK et quelques autres types cellulaires. Ce traitement augmente nettement l'étendue de la reconstitution et diminue la variabilité de réponse d'une

souris à l'autre. L'étendue de la reconstitution avait été appréhendée grâce au pourcentage de cellules humaines CD3+ au niveau de la rate. Une injection unique d'anticorps ASGM1 la veille de l'injection des cellules humaines, augmentait la prise de la greffe de 1,9 à 9% [Murphy, 1992a].

Nous avons donc d'une part injecté du Dpt par voie i.p au moment de la reconstitution (protocole 2), d'autre part combiné ce protocole avec l'injection d'un Ac ASGM1 avant la reconstitution (protocole 3).

La comparaison qualitative des protocoles 1, 2 et 3 met en avant l'efficacité de l'injection de l'Ac anti-ASGM1. En effet, avec le protocole 1, seuls 6 lots sur 25 avait présenté une production significative d'IgE (soit 24%). Le protocole 2 permet d'augmenter ce rendement à 4 lots sur 12 (soit 34%), alors qu'avec le protocole 3 aucun échec n'a été observé (7 lots sur 7 étaient efficacement reconstitués). Ces observations ont pu être confirmées avec différents lots de souris SCID reconstitués avec les cellules d'un même patient asthmatique allergique à Dpt, et soumis aux 3 protocoles.

En revanche, la comparaison quantitative des 3 protocoles, i.e la comparaison des taux d'IgE, entre des lots effectivement reconstitués n'est pas en faveur d'un des 3 traitements. En effet, des différences significatives ne sont observées qu'à J15 et J30, mais elles ne vont pas dans le même sens (figure 4). Par conséquent, le traitement avec l'Ac ASGM1 améliore l'efficacité de la reconstitution (évaluée par des taux sériques d'IgE humaines supérieurs à 5 UI/ml), mais ne permet pas d'homogénéiser les résultats d'IgE obtenus avec le même donneur (les déviations standard restent élevées).

Cependant, les différences de production d'IgE humaines restent significatives ( $p < 0,02$ ) entre les souris SCID "allergiques" et non "allergiques" exposées au Dpt et prétraitées avec l'Ac ASGM1 (figure 5).

### **3- Cinétique de production des IgE humaines chez les souris SCID "allergiques"**

La production d'IgE a été analysée de manière cinétique chez des souris SCID "allergiques" sensibilisées selon le protocole 3 (figure 6).

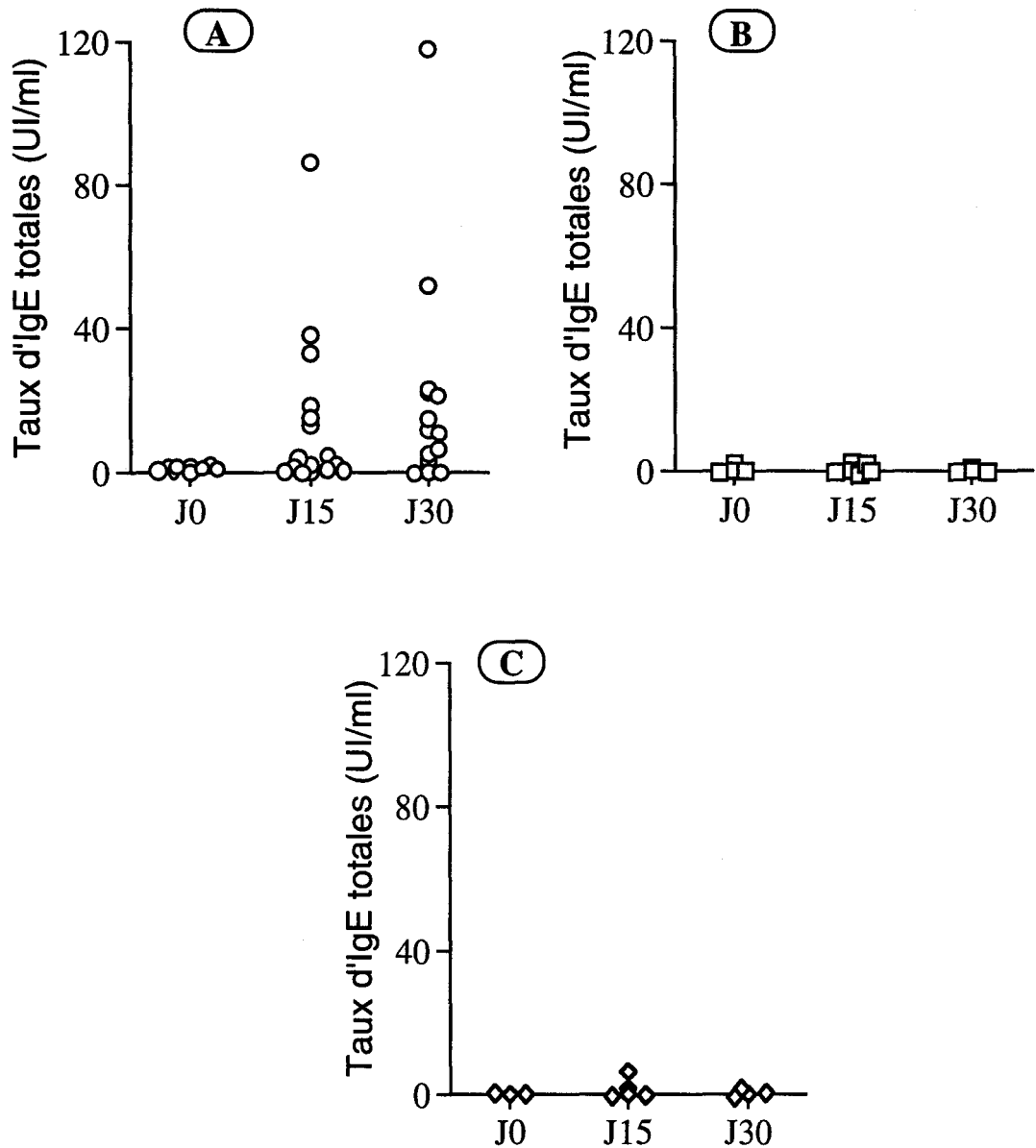
L'étude a été réalisée sur 22 souris reconstituées avec les CMN de 3 donneurs différents (taux d'IgE des patients de 400 à 3000 UI/ml). La production d'IgE croît dès le septième jour après l'inhalation (J7), soit le 12ème jour après la reconstitution où une injection i.p. de Dpt est

réalisée (médiane (M) = 14,95; écart interquartile (EQ) = 24,32 UI/ml). Elle est maximale entre J15 et J21, avec des valeurs respectivement égales à M = 28,5 (EQ = 49,9) et 22,45 (EQ = 28,4) UI/ml, et diminue à J30 (M = 19,55; EQ = 14,9 UI/ml). Les différences sont significatives entre les différents temps ( $p < 0,05$ ), sauf entre J15 et J21.

#### **4- Etude de la modulation de la production d'IgE: Rôle des cellules CD8<sup>+</sup>**

La production d'IgE humaines chez les souris SCID "allergiques" exposées au Dpt était donc transitoire, tout comme la production d'IgE chez souris Balb/c sensibilisées à l'OVA. Dans ces modèles, la diminution tardive de la production d'IgE était dépendante d'une population de cellules CD8<sup>+</sup> suppressives [MacAry, 1997]. Afin d'évaluer l'incidence de la population lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> sur la production d'IgE chez les souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ont été éliminés des CMN totales avant l'injection aux souris (déplétion en cellules T CD8<sup>+</sup>).

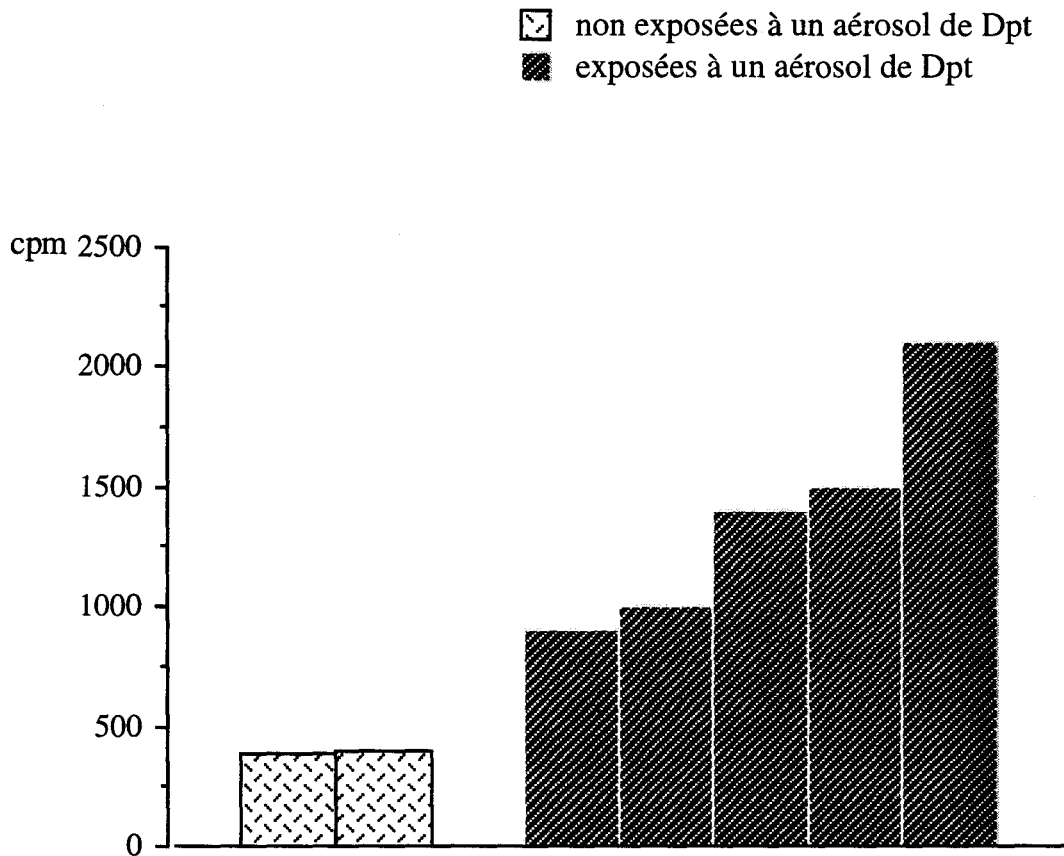
La déplétion en cellules T CD8<sup>+</sup> augmente significativement la production d'IgE à J45 (figure 7). Les souris SCID reconstituées avec les CMN totales ou avec les CMN déplétées en cellules T CD8<sup>+</sup> développent une réponse IgE respectivement de M = 8,06 (EQ = 15,59) et 51,6 (EQ = 46,4) UI/ml ( $p = 0,05$ ). Ces résultats suggèrent donc que les cellules T CD8<sup>+</sup> pourraient intervenir dans la régulation tardive de la production d'IgE induite par l'allergène Dpt.



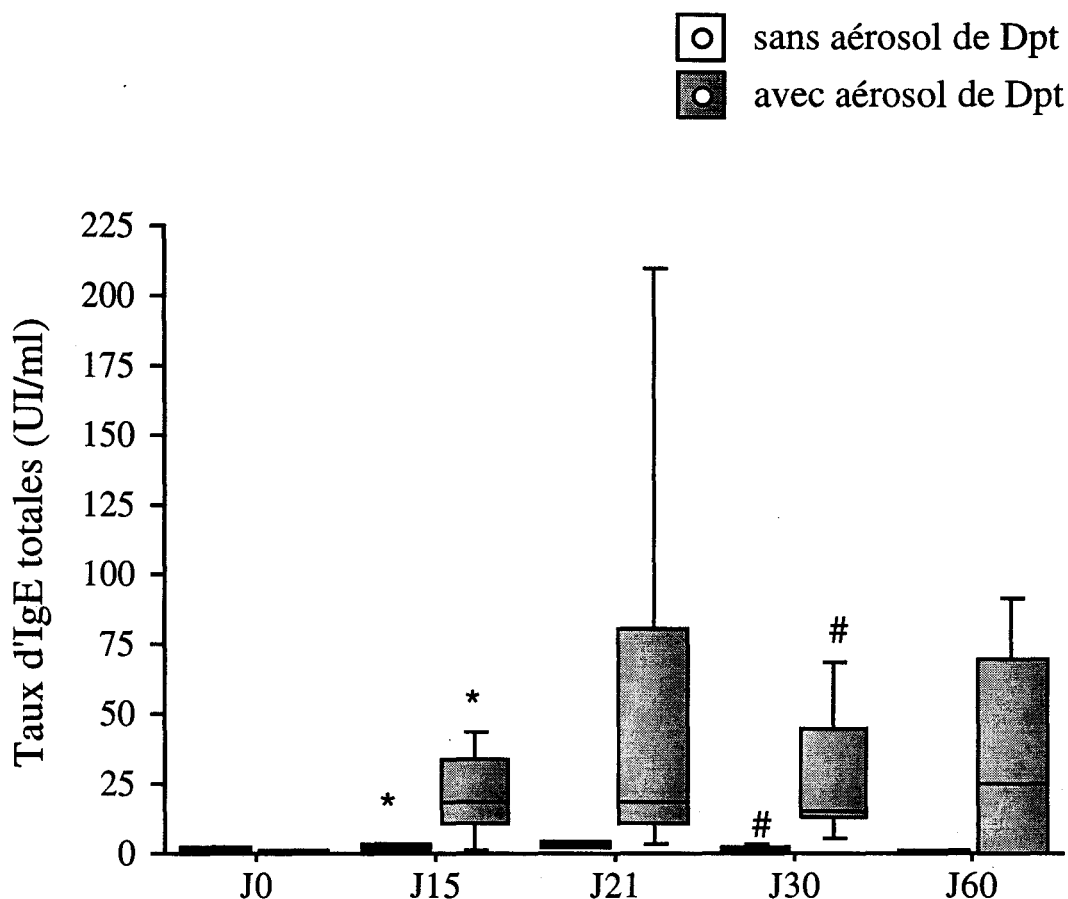
**Figure 1: Production d'IgE humaines chez les souris SCID humanisées.**

Les taux d'IgE humaines ont été évalués chez des souris SCID reconstituées avec les cellules de patients allergiques et exposées (A, n = 17), ou non (B, n = 6) à un aérosol de Dpt, et chez des souris reconstituées avec les cellules de donneurs non allergiques et exposées à un aérosol de Dpt (C, n = 5). Les cellules de patients allergiques à Dpt provenaient de 3 donneurs différents, dont les taux d'IgE sériques étaient de 400, 1064 et 1614 UI/ml.



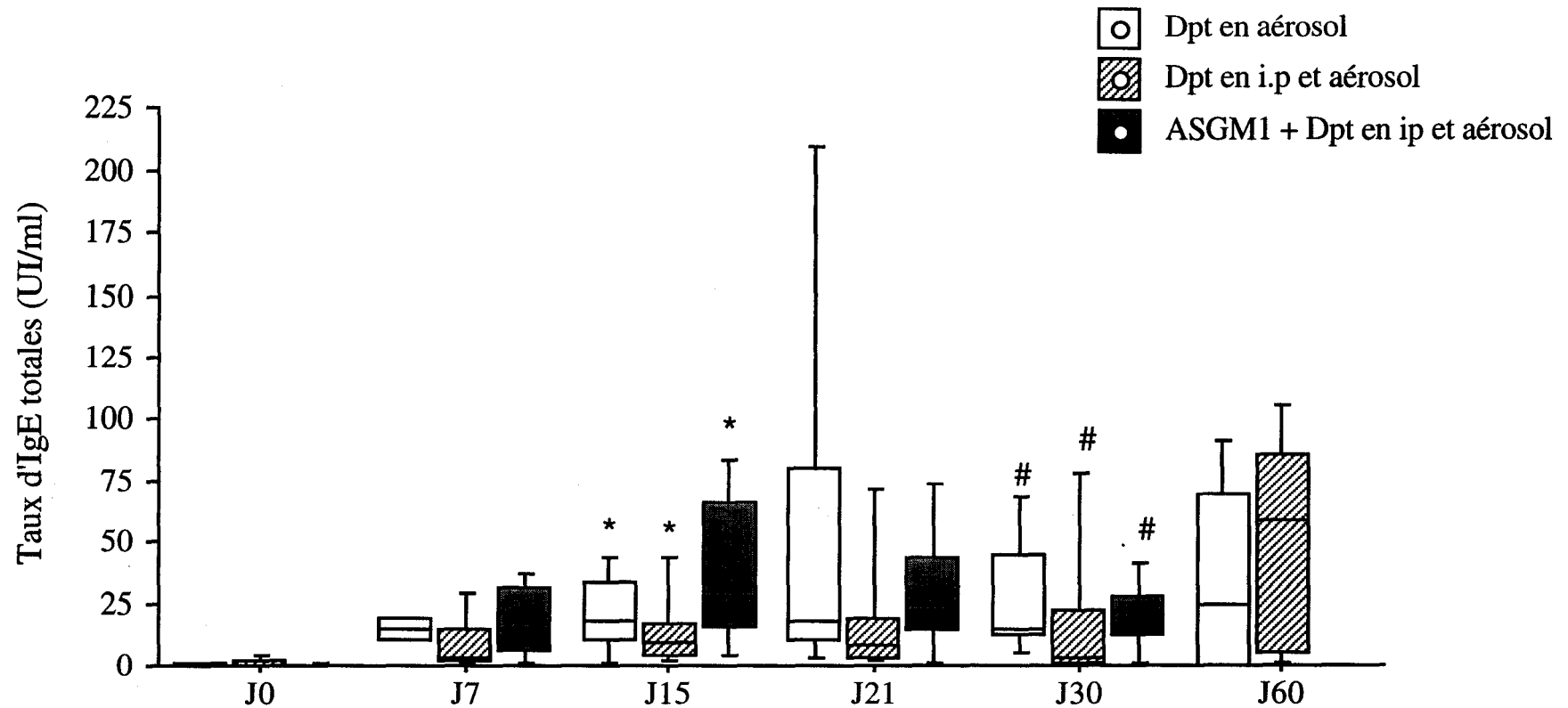


**Figure 2: Présence d'IgE humaines spécifiques vis-à-vis de Dpt chez les souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.**  
 La présence d'IgE humaines spécifiques vis-à-vis de Dpt a été vérifiée dans les sérums de souris SCID reconstituées avec les cellules d'un même patient sensible à Dpt, et exposées (hachures noires) ou non (pointillés) à un aérosol de Dpt. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm), déduction faite du bruit de fond égal au nombre de cpm obtenu dans les puits recouverts de BSA (albumine sérique bovine).



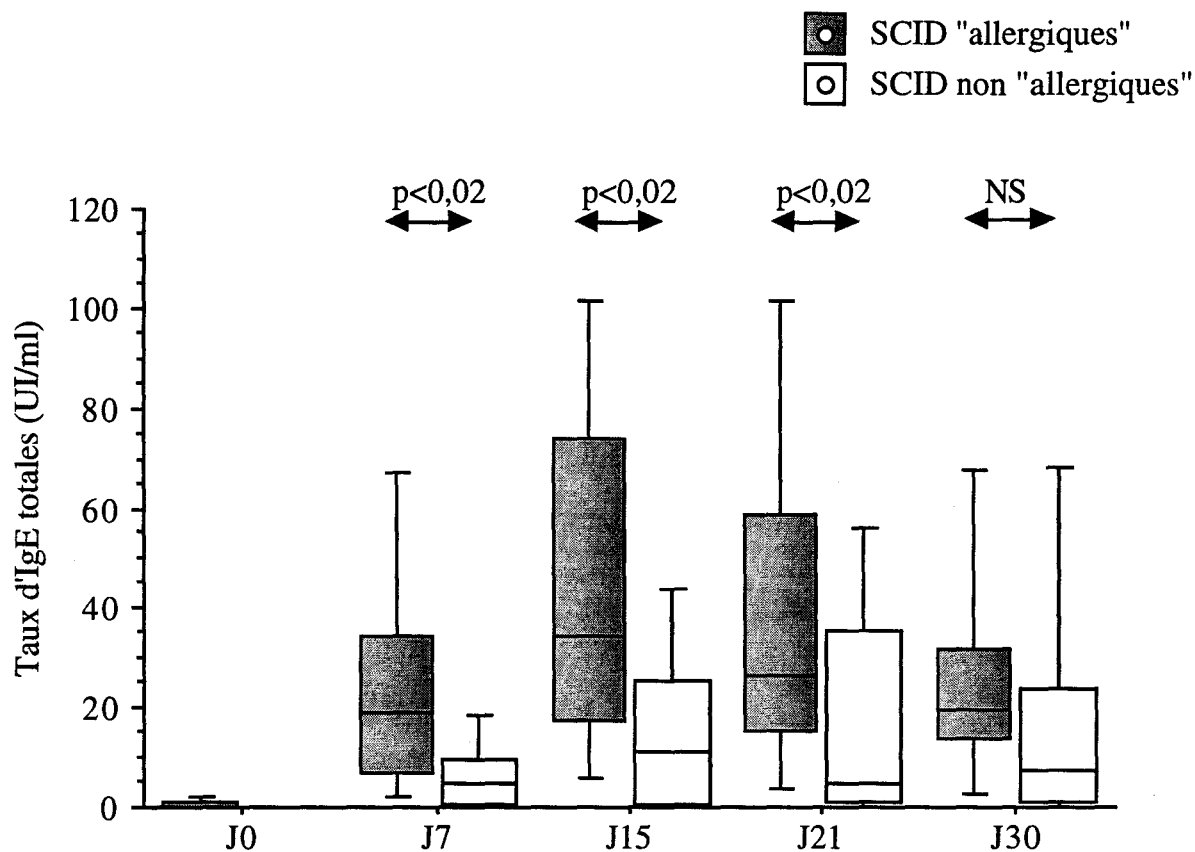
**Figure 3: Production d'IgE humaines chez des souris SCID "allergiques" exposées ou non à un aérosol de Dpt.**

Les taux d'IgE humaines ont été évalués dans 2 groupes de souris SCID reconstituées avec les CMN de patients asthmatiques sensibles à Dpt: avec (rectangles gris, n = 30), ou sans (rectangles blancs, n = 15) inhalation de l'allergène. Les résultats sont exprimés en médiane (taux d'IgE pour lequel 50% des valeurs sont inférieures) et écart interquartile (médiane  $\pm$  25% des valeurs). Les taux d'IgE sont significativement différents selon le test de Mann-Whitney, à J15 (\*) et J30 (#) ( $p < 0,005$ ).

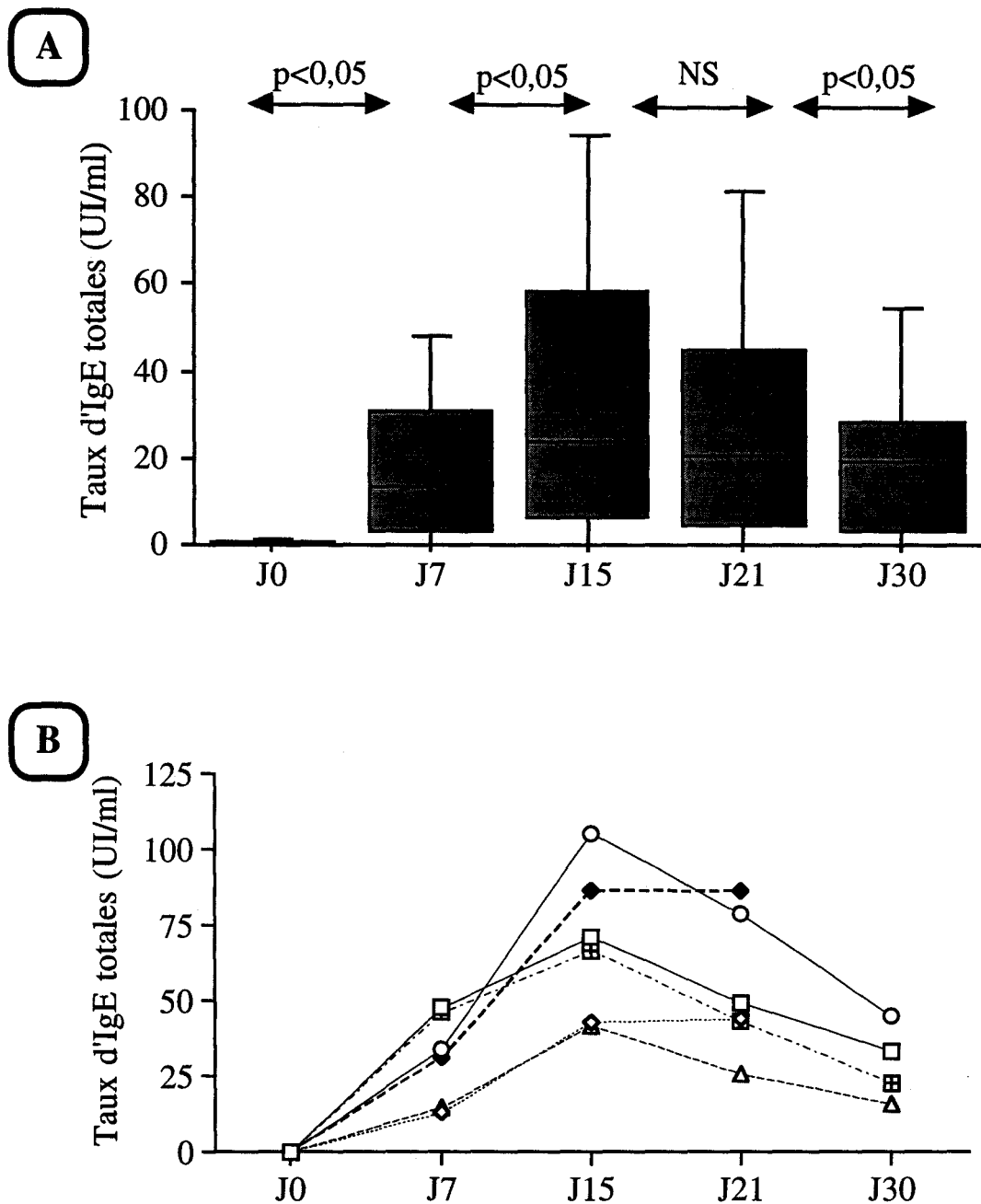


**Figure 4: Effet de différents traitements visant à améliorer la production d'IgE humaines chez les souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.**

Les taux d'IgE humaines ont été évalués dans 3 groupes de souris SCID reconstituées avec les CMN de patients sensibles à Dpt et exposées au Dpt: en absence de traitement (rectangles blancs, n = 25), avec injection de Dpt en i.p au moment de la reconstitution (rectangles hachurés, n = 24), ou avec prétraitement des souris avec l'Ac ASGM-1 et injection de Dpt en i.p au moment de la reconstitution (rectangles gris, n = 22). Les résultats sont exprimés en médiane (taux d'IgE pour lequel 50 % des valeurs sont inférieures) et écart interquartile (médiane  $\pm$  25 % des valeurs). Les taux d'IgE sont significativement différents selon le test de Kruskal-Wallis, à J15 (\*) et J30 (#) ( $p < 0,003$ ).



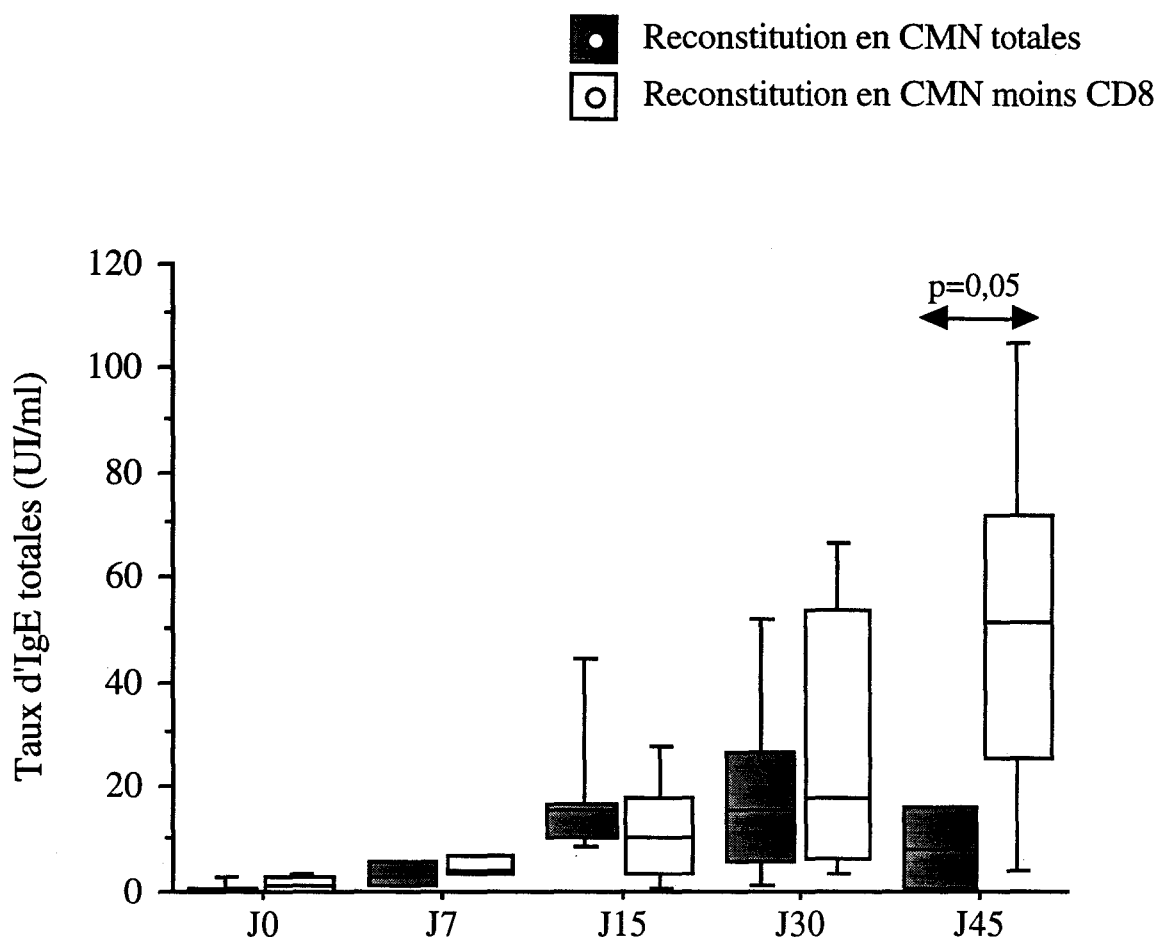
**Figure 5: Production d'IgE humaines chez des souris SCID "allergiques" ou non "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.**  
 Les taux d'IgE humaines ont été évalués dans 2 groupes de souris SCID reconstituées avec les CMN de patients asthmatiques sensibles à Dpt (rectangles gris, n = 29), ou de patients non sensibles à Dpt (rectangles blancs, n = 21) après inhalation de l'allergène. Les résultats sont exprimés en médiane (taux d'IgE pour lequel 50% des valeurs sont inférieures) et écart interquartile (médiane  $\pm$  25% des valeurs). Les taux d'IgE sont significativement différents à J7, J15 et J21 selon le test de Mann-Whitney ( $p < 0,02$ ).



**Figure 6: Cinétique de production d'IgE humaines chez des souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.**

**A:** Les taux d'IgE humaines ont été évalués, après inhalation de l'allergène, chez des souris SCID prétraitées avec l'Ac ASGM1, puis reconstituées avec les CMN de patients asthmatiques sensibles à Dpt administrées en même temps qu'une injection i.p de Dpt (rectangles gris, n = 29). Les résultats sont exprimés en médiane (taux d'IgE pour lequel 50% des valeurs sont inférieures) et écart interquartile (médiane  $\pm$  25% des valeurs). Les taux d'IgE sont significativement différents entre les différents temps d'analyse ( $p < 0,05$ ), excepté entre J15 et J21, selon le test de Wilcoxon.

**B:** Exemple de cinétique de production d'IgE humaines dans un lot de souris SCID reconstituées avec les CMN d'un même patient allergique, et exposées à un aérosol de Dpt (chaque symbole représente une souris).



**Figure 7: Régulation tardive, par des cellules CD8+, de la production d'IgE humaines chez des souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.**

Les taux d'IgE humaines ont été évalués dans 2 groupes de souris SCID reconstituées soit avec des CMN totales (rectangles gris, n = 7), soit avec des CMN déplétées en cellules CD8+ (rectangle blancs, n = 8) provenant de patients sensibles à Dpt, et exposées à un aérosol d'allergène. Une injection de Dpt était réalisée au moment de la reconstitution. Les résultats sont exprimés en médianes (taux d'IgE pour lequel 50 % des valeurs sont inférieures) et écart interquartile (médiane  $\pm$  25 % des valeurs). Les taux d'IgE sont significativement différents à J45 entre les 2 groupes ( $p = 0,005$ ), selon le test de Mann-Whitney.

## **RESULTATS 2**

***LA REACTION INFLAMMATOIRE***

***CHEZ LES SOURIS SCID***

Outre une production d'IgE spécifiques de l'aéroallergène vis-à-vis duquel ils sont sensibles, les patients asthmatiques présentent une réaction inflammatoire au niveau des voies aériennes, principalement caractérisée par un infiltrat d'éosinophiles et de lymphocytes T CD4+ activés, de type Th2 (production d'IL-4 et IL-5). Nous avons donc voulu savoir si suite à l'inhalation de Dpt, les souris SCID "allergiques" présentaient une réaction similaire.

Ainsi, dans un deuxième temps, l'étude a porté sur l'analyse des poumons de souris SCID humanisées et sensibilisées par des aérosols de Dpt.

### **1- Mise en évidence d'une réaction pulmonaire de type inflammatoire chez les souris SCID "allergiques" après inhalation de l'aéroallergène**

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue dans Eur. J. Immunol. (1996, 26: 1088) et insérée ci-après.

Bien que quelques cellules humaines CD45<sup>+</sup> puissent être détectées dans les poumons de souris SCID "allergiques" 30 jours après l'inhalation de Dpt (J30), selon le protocole 1, un infiltrat significatif a été mis en évidence à J60. Les cellules humaines ont une localisation périvasculaire, péribronchique et parenchymateuse (Article Eur. J. Immunol., figure 2C et D). Ces résultats immunohistochimiques ont été confirmés grâce à une méthode d'hybridation *in situ* fluorescente détectant tous les centromères humains (Article Eur. J. Immunol., figure 2A et B). Très peu de cellules humaines CD45<sup>+</sup> ont été détectées dans les poumons des souris SCID "allergiques" n'ayant pas inhalé le Dpt, et des souris SCID reconstituées avec les CMN de sujets non sensibles à Dpt.

De plus, des cellules inflammatoires de type éosinophilique ont été mises en évidence dans l'infiltrat cellulaire localisé au niveau des zones péribronchiques des souris SCID "allergiques", 60 jours après l'inhalation (Article Eur. J. Immunol., figure 2E). Aucun éosinophile n'a été détecté dans les poumons des souris SCID "allergiques" n'ayant pas inhalé le Dpt, et dans les poumons des souris SCID contrôles. La présence d'éosinophiles est fortement dépendante de la présence d'un infiltrat de cellules humaines CD45<sup>+</sup> (Article Eur. J. Immunol., tableau 1). Finalement, l'expression d'ARNm codant pour l'IL-5 humaine a été observée dans de tels poumons (Article Eur. J. Immunol., figure 2F et tableau 1).





La poursuite de l'analyse de l'expression des cytokines de type Th2 a permis de mettre en évidence l'expression d'ARNm codant pour l'IL-4 humaine, parmi les ARN extraits de poumons de souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt (figure 8).

Ces résultats suggèrent que des cellules humaines produisant des cytokines de type Th2: l'IL-4 et l'IL-5 pourraient participer au développement de l'infiltrat pulmonaire observé chez les souris SCID "allergiques" après inhalation de Dpt.

Catherine Duez<sup>1</sup>,  
 Anne Tscopoulos<sup>1</sup>,  
 Anne Janin<sup>2</sup>,  
 Isabelle Tillie-Leblond<sup>1,3</sup>,  
 Georges Thyphronitis<sup>4</sup>,  
 Philippe Marquillies<sup>1</sup>,  
 Qutayba Hamid<sup>5</sup>,  
 Benoît Wallaert<sup>1,3</sup>,  
 André-Bernard Tonnel<sup>1,3</sup> and  
 Joël Pestel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM U416, Institut Pasteur, Lille, France

<sup>2</sup> Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France

<sup>3</sup> Département de Pneumologie, Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France

<sup>4</sup> INSERM U167, Institut Pasteur, Lille, France

<sup>5</sup> Meakins Christie Laboratories, McGill University, Montréal, Canada

## An *in vivo* model of allergic inflammation: pulmonary human cell infiltrate in allergen-challenged allergic Hu-SCID mice

CB.17 severe combined immunodeficient (SCID) mice were used to establish a model of allergic pulmonary inflammation. SCID mice were intraperitoneally reconstituted with  $10^7$  peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients sensitive to *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dpt*) and 2 weeks later were exposed to *Dpt* aerosols. After *Dpt* nebulization, SCID mice engrafted with PBMC from *Dpt*-sensitive patients developed a specific human IgE response as well as an intense pulmonary infiltrate of human cells. In contrast, SCID mice reconstituted with PBMC from patients allergic to grass pollen or from non-allergic donors failed to produce IgE or to exhibit a similar inflammatory response. The level of the IgE production was dependent on the IgE level of the allergic donor. In the lungs of the same allergic SCID mice, 2 months after *Dpt* inhalation, the cell infiltrate contained CD45<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> human cells. They were located in perivascular and peribronchial areas and disseminated in the mouse lung parenchyma. Moreover, mRNA IL-5<sup>+</sup> cells and eosinophils were found in peribronchial infiltrates. The observations indicate that humanized allergic SCID mice may develop, after nebulization with the relevant allergen, immune reactions similar to those observed in man and suggest that SCID mice may represent a useful model to analyze the regulatory mechanisms of IgE-associated allergic diseases.

### 1 Introduction

Many studies have been devoted to investigating the mechanisms of the human allergic reaction. Upon exposure to allergens, a fraction of the population develops a specific immune response characterized by IgE production and a local inflammatory reaction. In humans, the majority of data are derived from studies *in vitro* or *ex vivo* or are extrapolated from experimental animal models (reviewed by Holt [1]).

In humans, T cells obtained from the site of an allergic reaction preferentially express mRNA encoding Th2 cytokines (*i.e.* IL-4 and IL-5) [2, 3] and spontaneously produce these cytokines. The development of the inflammatory cellular infiltrate in asthma has been studied by bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies [4, 5]. The results of many studies suggest that the Th2 cell population plays a pivotal role in asthma pathogenesis. However, for practical and ethical reasons, studies in humans *in vivo* are limited and some questions related to the behavior of immune cells in lungs are difficult to address.

CB.17 SCID mice were demonstrated to be a useful model to analyze human pathogenic mechanisms. Due to an

[I 14986]

Received October 13, 1995; in revised form February 5, 1996; accepted February 19, 1996.

Correspondence: Joël Pestel, INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, BP 245, F-59019 Lille, France (Fax: +33-20 87 78 88)

Abbreviations: SCID: Severe combined immunodeficiency; *Dpt*: *Dermatophagoides pteronyssinus*; i.p.: Intraperitoneal; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization

Key words: Allergy / Inhalation / SCID mouse / Inflammation

immune defect, SCID mice are unable to reject allogeneic or xenogeneic transplants [6, 7]. Mature human lymphocytes isolated from peripheral blood survive for extended periods of time in SCID mice and spontaneously produce human Ig, mainly of the IgG isotype [8], although some IgM, IgA and IgD can be detected [9, 10]. When peripheral blood cells from vaccinated donors are used, the immunized Hu-SCID mice develop an Ag-specific IgG antibody response [11, 12].

Recently, SCID mice reconstituted i.p. with  $5 \times 10^7$  PBMC from atopic patients were shown spontaneously to produce human IgE [13, 14]. In our laboratory, Ag-specific IgE production has been demonstrated in SCID mice reconstituted i.p. with  $10^7$  PBMC from *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dpt*)-sensitive patients and immunized i.p. with a low dose of allergen in the presence of aluminium hydroxide. SCID mice reconstituted with PBMC from non-allergic donors failed to produce human IgE [15].

Since for allergic asthmatic patients, inhalation represents the main route for airway sensitization, the aim of this study was to analyze, in the absence of adjuvant, the effect of allergen aerosols on humanized SCID mice reconstituted with PBMC from *Dpt*-sensitive patients. The results indicate that after inhalation of the relevant allergen, allergic SCID mice develop a specific IgE Ab response as well as an inflammatory reaction.

### 2 Materials and methods

#### 2.1 Mice

CB.17 SCID mice (6–8 weeks old) were maintained in sterilized isolators (La Calhène, France) with sterilized bedding at the Pasteur Institute of Lille. The SCID colony was regularly checked for the absence of serum Ig.

## 2.2 Isolation of human PBMC

PBMC were prepared by density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Pharmacia, France) from blood of donors sensitive ( $n = 6$ ) or not sensitive ( $n = 3$ ) to house dust mite. Mononuclear cells harvested at the interface were washed three times in sterile RPMI 1640 before transfer. Allergic patients had positive skin-prick tests towards *Dpt* allergen, positive RAST and serum IgE levels ranging from 400–2173 IU/ml. Healthy donors not sensitive to *Dpt* (absence of allergic diseases, negative cutaneous tests, negative *Dpt*-specific IgE) were used as negative controls.

## 2.3 Cell transfer and inhalation protocol

Human cells ( $10^7$ /mouse) were injected i.p. in 200–300  $\mu$ l medium into 6–8-week-old SCID mice with a 23-gauge needle. After 2 weeks, SCID mice were exposed to *Dpt* aerosols each day during 4 days (day 0 to day 4). SCID mice ( $n = 54$ ) reconstituted with PBMC from patients sensitive or not to *Dpt* were placed in a sterilized air flow-controlled chamber connected to a nebulizer (VarioSonic Peters, Aubervilliers, France) generating 4–6- $\mu$ m droplets and were exposed to a solution containing 80 IR *Dpt* [100 IR (index of reactivity) is equivalent to about 200  $\mu$ g protein].

## 2.4 Human IgE measurements

After reconstitution, mice were periodically bled from the retro-orbital sinus under ether anesthesia. Total human serum IgE was detected by a fluorometric method (CAP system, Pharmacia, Sweden) using two different mouse mAb specific for the  $\epsilon$  chain. The sensitivity of the method was 0.1 IU/ml (0.24 ng/ml). Specific IgE Ab against *Dpt* allergen were quantified as described [15].

## 2.5 Immunohistochemistry and cell identification in the lungs of SCID mice

At various periods after allergen nebulization, lungs were excised, fixed in 4% buffered paraformaldehyde and processed for paraffin embedding. After deparaffinization, rehydration and treatment in a microwave oven for Ag retrieval [16], the 6- $\mu$ m-thick paraffin tissue sections were saturated with 20% normal mouse serum diluted in Tris-buffered saline (TBS) and incubated at 4°C overnight with mAb to human CD45 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) CD45RO, CD20, HLA-DR or control Ig (Dako SA, Trappes, France). mAb staining was demonstrated by an APAAP (alkaline phosphatase-anti-alkaline phosphatase) technique [17], repeated once to increase the sensitivity of the reaction. For eosinophil identification, a following paraffin section of each lung was stained with May-Grünwald-Giemsa. Cells were counted on three different fields at a magnification of  $\times 400$ .

## 2.6 Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

Human cells in tissues of reconstituted SCID mice were ascertained using *in situ* hybridization with a biotinylated

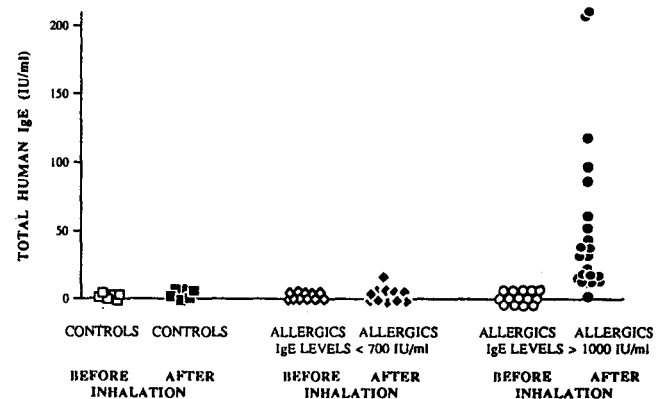
DNA probe directed to all human centromeres according to the manufacturer's protocol (Oncor, Gaithersburg, MD) [18]. In tissue sections, positive human cells were observed by fluorescence microscopy (excitation wavelength 450–490 nm).

## 2.7 Detection of mRNA encoding human IL-5 in the lungs of SCID mice

*In situ* hybridization was performed as described [19, 20]. Briefly, paraformaldehyde-fixed cryostat tissue sections were incubated overnight at 50°C with  $^{35}$ S-labeled riboprobes ( $2 \times 10^6$  cpm/section) in hybridization buffer containing 50 mM DTT and washed under high stringency conditions (45°C,  $0.1 \times$  SSC). As positive control for IL-5 mRNA, we used the KU 812 cell line stimulated by PMA and calcium ionophore [21]. For the negative control, sections were incubated with the sense probe for human IL-5. Cells were identified as dense, discrete, well-circumscribed areas of silver grains. Results are expressed as the number of cells expressing mRNA for IL-5 per field at a magnification of  $\times 400$ .

## 2.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Statview F4.11 software (Apple Computer, Cupertino, CA). The Wilcoxon and the Mann-Whitney tests were applied to the quantitative IgE data.



**Figure 1.** Human IgE in the serum of allergic Hu-SCID mice exposed to *Dpt* aerosol. IgE production was evaluated in three groups of SCID mice: 1) reconstituted with PBMC from non-*Dpt*-sensitive patients ( $n = 6$ ) before ( $\square$ ) and after ( $\blacksquare$ ) inhalation, 2) reconstituted with PBMC from *Dpt*-sensitive patients ( $n = 11$ ) whose serum IgE levels were below 700 IU/ml, before ( $\diamond$ ) and after ( $\blacklozenge$ ) inhalation, and 3) reconstituted with PBMC from *Dpt*-sensitive patients whose serum IgE levels were above 1000 IU/ml, before ( $n = 14$ ) ( $\circ$ ) and after ( $n = 21$ ) ( $\bullet$ ) inhalation. The difference between IgE levels in the groups of highly allergic (patients IgE levels >1000 IU/ml) and non-allergic Hu-SCID mice after inhalation is significant according to the Mann-Whitney test ( $p < 0.01$ ), and the difference between IgE levels detected in the group of highly allergic Hu-SCID mice before and after sensitization with nebulized *Dpt* is significant according to the Wilcoxon test ( $p = 0.0002$ ).

### 3 Results

#### 3.1 Effect of allergen inhalation on the human IgE production in SCID mice engrafted with PBMC from allergic patients

SCID mice reconstituted with  $10^7$  enriched PBMC from patients sensitive to *Dpt* and exposed to *Dpt* aeroallergen produced significant amounts of human IgE (Fig. 1). This human IgE response appeared dependent on the IgE level of the donors. A group of highly allergic SCID mice (patients with IgE levels >1000 IU/ml) exhibited a significant human IgE response (from 12 to 210 IU/ml) only after *Dpt* inhalations. In contrast, a group of low allergic SCID mice (patients with IgE levels <700 IU/ml) produced low levels of IgE (0 to 5 IU/ml). No human IgE was detected in the control group (*i.e.* SCID mice reconstituted with PBMC from non-allergic donors or pollen-sensitive patients). Statistical analysis indicated that differences in human IgE levels were significant between the groups of highly allergic, low allergic and control SCID mice after allergen exposure. By radioimmunoassay, *Dpt*-specific human IgE Ab were only detected in allergic Hu-SCID sera after *Dpt* inhalation.

These results suggest that *Dpt* administered to allergic SCID mice as an aerosol was effective in the restimulation of immunocompetent human cells leading to *Dpt*-specific IgE Ab production, which was the result of an active process of synthesis and not solely a passive release of preformed IgE.

#### 3.2 Detection of human cells in the lungs of aerosolized allergic SCID mice

Using immunohistochemistry with mAb directed against human CD45, some human cells were initially detected at day 30 in the lungs of allergic SCID mice challenged with *Dpt* aerosols. However, when lungs of highly allergic SCID mice (reconstituted with PBMC from four different patients) were studied by the FISH method (Fig. 2A) and immunostained with anti-human CD45 (Fig. 2C, D), a significant human cell infiltrate was observed at day 60 after *Dpt* inhalation. Human cells were confined around blood vessels, located under the epithelial membrane of some bronchi and scattered in lung parenchyma. Further

immunostaining analyses demonstrated the presence of CD45RO T cells, CD20<sup>+</sup> B cells and activated HLA-DR<sup>+</sup> cells (data not shown) within the pulmonary human cell infiltrate. Very few human cells were found in mouse lungs if allergic SCID mice had not inhaled the allergen. No human cells could be detected in lungs of control Hu-SCID mice.

#### 3.3 Presence of eosinophils and IL-5 mRNA-expressing cells in the pulmonary cellular infiltrate of allergic SCID mice

As this pulmonary cellular infiltrate appeared to be similar to the airway inflammation associated with asthma in humans, the presence of inflammatory cells was investigated. After May-Grünwald-Giemsa staining, several eosinophils were observed in the cellular infiltrate localized in peribronchial areas of highly allergic Hu-SCID mouse lungs at day 60 after *Dpt* inhalation (Fig. 2E). In contrast, no eosinophils were detected in lungs of allergic Hu-SCID mice not exposed to *Dpt* aerosol or in control SCID mice. Indeed, the presence of eosinophils is highly dependent on the development of the human cell infiltrate and particularly on the presence of CD45<sup>+</sup> cells (Table 1).

As IL-5 promotes the growth, differentiation, survival and activation of eosinophils, human IL-5 mRNA expression was investigated by *in situ* hybridization using a specific antisense probe (Fig. 2F). Human IL-5 mRNA expression was observed only in lungs of allergic Hu-SCID mice exposed to *Dpt* aerosols (Table 1). No signal was observed using a sense probe for human IL-5 mRNA.

These results suggest that IL-5-producing cells may participate in the development of the pulmonary human cellular infiltrate and that allergic SCID mice, only after exposition to *Dpt* aerosols, express a Th2 response similar to that observed in allergic humans.

### 4 Discussion

Various animal models have been developed to examine the mechanisms of the allergic reaction leading to the clinical manifestations observed in asthma. We demonstrate here for the first time that after *Dpt* allergen inhalation,

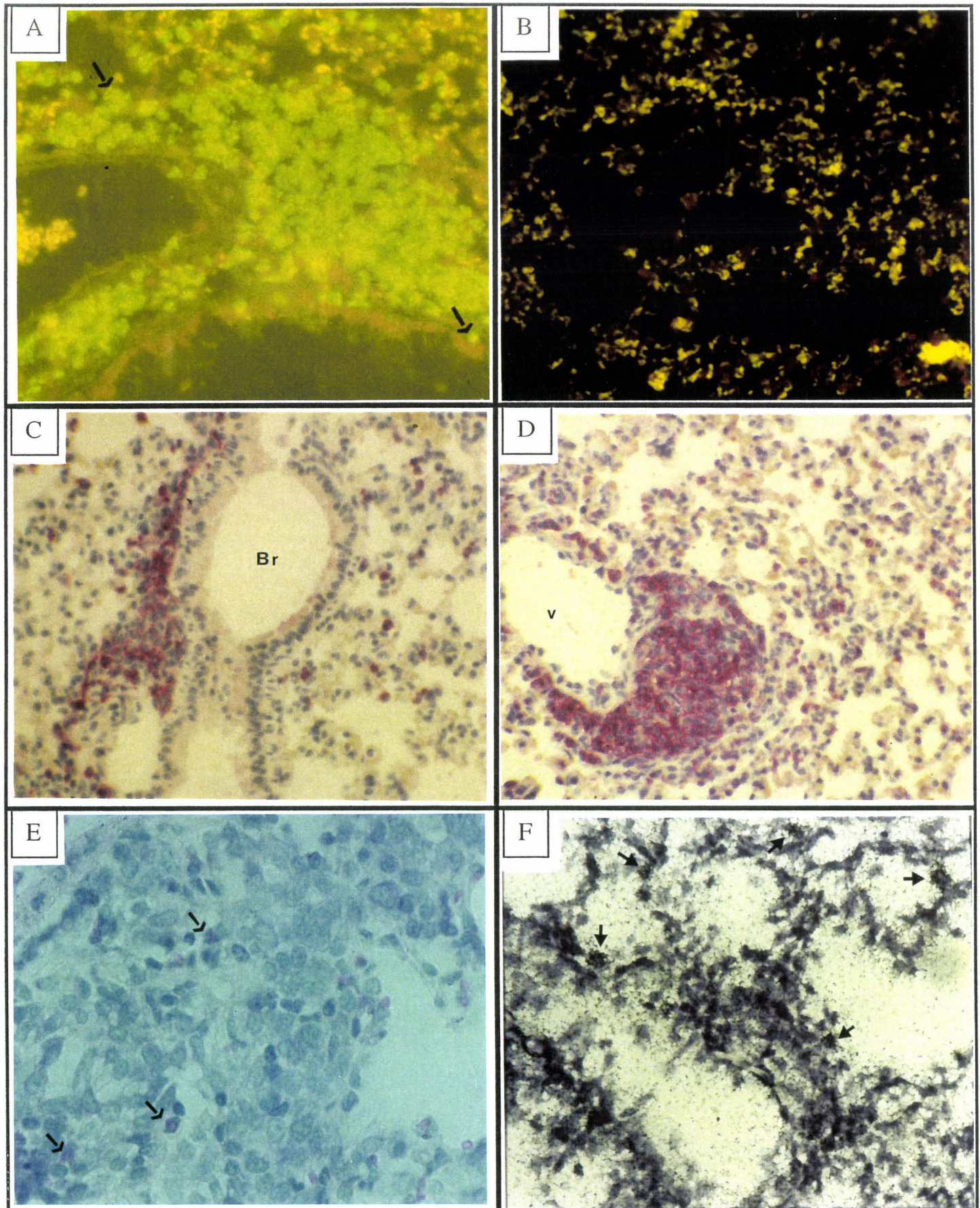
**Table 1.** Analysis of the cell populations in the lung infiltrate of allergic humanized SCID mice<sup>a)</sup>

Mice	Sensitivity of donors	<i>Dpt</i> aerosol sensitization	Number of CD45 <sup>+</sup> cells <sup>b)</sup>	Number of eosinophils*	Number of IL-5 mRNA <sup>+</sup> cells*
1	<i>Dpt</i>	+	311	16	ND <sup>c)</sup>
2	<i>Dpt</i>	+	376	1	ND
3	<i>Dpt</i>	+	304	11	12
4	<i>Dpt</i>	+	118	1	2
5	<i>Dpt</i>	+	148	4	3
6	<i>Dpt</i>	+	86	6	2
7	Non-allergic	+	0	0	ND
8	Non-allergic	+	0	0	ND
9	<i>Dpt</i>	-	0	0	0
10	<i>Dpt</i>	-	0	0	0

a) Human CD45<sup>+</sup> cells, hu-IL-5 mRNA<sup>+</sup> cells and eosinophils were demonstrated in the peribronchial infiltrates of allergic SCID mice sensitized with *Dpt* aerosol.

b) Mean of the number of cells detected in three different fields at magnification × 400.

c) ND = not done.



**Fig.2. Detection of a pulmonary infiltrate containing human cells, eosinophils and IL-5 mRNA expressing cells in allergic Hu-SCID mice.** Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) on a lung section of an allergic Hu-SCID-mouse at D60 after inhalation (A) and on a lung section of non reconstituted SCID mouse (B). Human cells are evidenced by fluorescent green points in nucleus (some are shown with arrows) and cells nucleus labeled with propidium iodide appear in red. Immunohistochemistry with anti-CD45 mAb on lung sections counterstained with haematoxylin of others allergic Hu-SCID mice at D60 after inhalation (C, D). Human cells appearing stained in red are localized in peribronchial and perivascular areas as well as in parenchyma. (Original magnification x 400). A May-Grunwald-Giemsa coloration on a representative lung section of an allergic Hu-SCID-mouse at D60 after inhalation evidences eosinophils in the cellular infiltrate as shown with arrows (E). PFA-fixed cryostat tissue section from allergic Hu-SCID mice at D60 after exposition to Dpt aerosol. Positive cells expressing human IL-5mRNA identified as dense, discrete, well-circumscribed areas of silver grains were detected after hybridization with antisense 35S-labeled riboprobe (see arrows) (F).

only SCID mice humanized with cells from allergic patients produce a specific IgE response and exhibit an intense human CD45<sup>+</sup> cell infiltrate in the lungs. As these features are characteristic of allergic asthma, SCID mice represent a useful model for elucidating the pathogenesis of some aspects of this disease.

Humanized SCID mice can produce a specific human IgG response against recall or naive antigens [8, 11, 12, 18] and human IgE in the absence [13, 14] or in the presence of relevant allergen [15]. However, in these latter studies, the protocol used to induce the IgE response was not similar to the natural route of allergen sensitization in humans. In conventional rats and mice, repeated allergen exposure induced a transient IgE production [22–25]. Pulmonary inflammation was observed in i.p. OVA-sensitized Brown Norway rats after repeated OVA exposures over an 8-week period [26].

The present model of humanized SCID mice partially reproduces the allergen airway challenge response observed in human respiratory allergic diseases. The production of IgE against *Dpt* allergen is the result of the stimulation of allergen-specific memory T and B cells. It is known that human Ig production is only observed when SCID mice are transplanted with human B cells in the presence of T helper cells expressing the CD45RO<sup>+</sup> memory phenotype [12], and that monocytes are not absolutely necessary [11, 12]. In the presence of CD45RA<sup>+</sup> T cells, activated and blast-transformed human B cells are in a state of anergy [12] because of the absence of adequate triggering signals. In the SCID system, Ag-specific human CD4<sup>+</sup> T memory cells can activate human B cells in an antigen-restricted manner and B cells can be considered as Ag-presenting cells [7, 8]. After injection of human cells into the peritoneal cavity of SCID mice, the number of T and B cells decreases and the majority of the remaining cell population which can recirculate or colonize mouse tissues express memory phenotypes [27]. In our conditions, human IgE production was only observed after inhalation of the relevant allergen, and only in the group of SCID mice reconstituted with PBMC from patients allergic to *Dpt*; thus IgE was not passively secreted. The site of the IgE synthesis is not known. However, in rats or mice following inhalation of allergen, the induction of IgE synthesis was shown to begin in the regional lymph nodes draining the respiratory tract and to continue in the spleen. In allergic humanized SCID mice, it is reasonable to assume that *Dpt* allergen can be trapped in lymph nodes draining the upper airways and participate in the development and the persistence of the specific IgE synthesis.

The other main observation is that a human cellular infiltrate was detected only in allergic Hu-SCID mice after *Dpt* nebulization. This suggests that the migration of human cells into mouse lungs could be due to the chemoattractant activity of cytokines released by allergen-activated human immune cells, the expression of adhesion molecules, or both. Indeed, human cells injected into SCID mice can reside in the peritoneal cavity [8] or, after passage in the blood or lymph circulation, mainly reconstitute the cortex and paracortex of lymph nodes and spleen [28] where germinal centers may develop. The remaining memory T (or B) cells which can express adhesion molecules may interact with their counterpart molecules present on the surface

of vascular endothelial cells and invade the lung parenchyma. Recently, human cells have been demonstrated to bind mouse intracellular matrix proteins [29]. The results of analyses of lung sections of allergic Hu-SCID mice 2 months after aerosol exposures support this hypothesis. Although CD20<sup>+</sup> cells were present, the majority of human CD45<sup>+</sup> cells detected in and around pulmonary vessels, in the parenchyma and in the vicinity of the bronchial epithelium was CD45RO. Moreover, since HLA-DR<sup>+</sup> cells were present in the infiltrate, it is likely that after specific activation of these human cells by entrapped residual *Dpt* allergen, cytokines (*i.e.* IL-4 and IL-5) are released and may amplify the migration of the human cells into the mouse lungs. Other factors could, however, be implicated: recently human RANTES has been described to induce human leukocyte migration in the skin of i.p. humanized SCID mice [30]. Site-specific attraction proliferation *in situ* after exposure to *Dpt* and/or could explain why a larger infiltrate is observed at day 60 than at day 30.

Finally, eosinophils were detected in the peribronchial human cellular infiltrate in *Dpt*-sensitized Hu-SCID mice. Since purified human mononuclear cells deprived of polymorphonuclear cells were injected into the SCID mice, it could be assumed that mouse eosinophils were attracted into the lungs, either directly by released human IL-5, or indirectly by mouse cells activated by infiltrated human CD45<sup>+</sup> cells. The first hypothesis is supported by the fact that human IL-5 can stimulate mouse eosinophils [31].

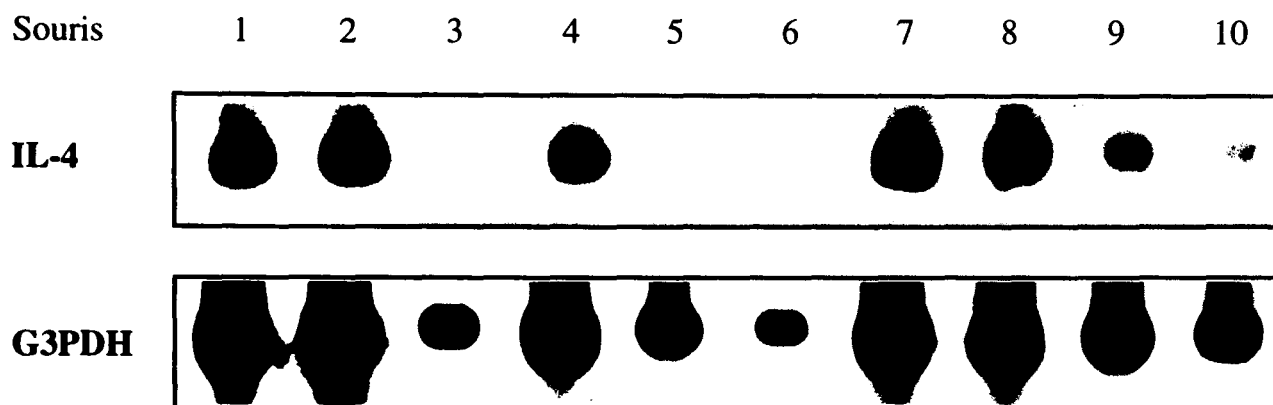
Since IgE synthesis increased before the development of the cell infiltrate, IgE may play a determining role in this phenomenon. Analysis of the mRNA preparations of spleens and lungs indicated increased expression of mRNA encoding for pCε and IL-4 in allergic Hu-SCID mice. Indeed, neither IgE production nor cell infiltrate were observed in SCID mice reconstituted with cells from one patient reactive to tetanus toxoid and exposed to aerosols of tetanus toxoid. IgE could favor the capacity of B cells to present *Dpt* allergen to Th2 lymphocytes and enhance proliferation and activation of T cells.

Since human cell infiltration was only observed in allergic Hu-SCID mice exposed to *Dpt* aerosol, these animals may be used as an *in vivo* model of allergic inflammation and may permit the analysis of the different phases of human IgE-dependent allergic reactions.

*The authors wish to thank C. André and A. Didierlaurent (Laboratoires des Stallergènes) for providing allergen extracts; Dr. A. Carlier (Département de Biologie Spécialisée, Institut Pasteur de Lille) for facilities for quantification of total IgE, Dr. J.-Y. Cesbron for providing SCID mice and E. Fleurbaix and J. P. Decavel for assistance in the maintenance of SCID mice. We are also grateful to C. Bisiau (Service d'Anatomopathologie, Hôpital Calmette) for anatomopathological analysis and to P. Gosset for helpful advice during this work. The authors wish to thank James N. Baraniuk and T. Cupps (Georgetown University Medical Center, Washington, DC) for critical reading of the manuscript. This study was supported by INSERM (U416), Electricité-Santé and Stallergènes (contrat no. 92016). C. Duez is a recipient of a grant from the Conseil Régional Nord-Pas de Calais and Institut Pasteur de Lille.*

## 5 References

- 1 Holt, P. G., *Immunol. Today* 1994. 15: 484.
- 2 Hamid, Q., Azzawi, M., Ying, S., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., Corrigan, C. J., Bradley, B., Durham, S. R., Collins, J. V., Jeffery, P. K., Quint, D. J. and Kay, A. B., *Clin. Invest.* 1991. 87: 1541.
- 3 Kay, A. B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S. R., Moqbel, R., Wardlaw, A. J. and Hamid, Q., *J. Exp. Med.* 1991. 173: 775.
- 4 Bradley, B. L., Azzawi, M., Jacobson, M., Assoufi, B., Collins, J. V., Irani, A. A., Schwartz, L. B., Durham, S. R., Jeffery, P. K. and Kay, A. B., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991. 88: 661.
- 5 Djukanovic, R., Lai, C. K. W., Wilson, J. W., Britten, K. M., Wilson, S. J., Roche, W. R., Howarth, P. H. and Holgate, S. T., *Eur. Respir. J.* 1992. 5: 538.
- 6 Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. and Wilson, D. B., *Nature* 1988. 335: 256.
- 7 Mc Cune, J. M., *Curr. Opin. Immunol.* 1991. 3: 224.
- 8 Duchosal, M. A., Eming, S. A., Fischer, P., Leturcq, D., Barbas, C. D., McConahey, P. J., Caothien, R. H., Thornton, G. B., Dixon, F. J. and Burton, D. R., *Nature* 1992. 355: 258.
- 9 Saxon, A., Macy, E., Denis, K., Tary, L. M., Witte, O. and Braun, J., *J. Clin. Invest.* 1991. 87: 658.
- 10 Vandekerckhove, B. A. E., Jones, D., Punnonen, J., Schols, D., Lin, H. C., Duncan, B., Bacchetta, R., Devries, J. E. and Roncarolo, M. G., *J. Immunol.* 1993. 151: 128.
- 11 Walker, W. and Gallagher, G., *Immunology* 1994. 83: 163.
- 12 Martensson, C., Kristensson, K., Kalliomaki, S., Borrebaeck, C. A. K. and Carlsson, R., *Immunology* 1994. 83: 171.
- 13 Ito, M., Matsuzaki, G., Uno, S., Katakai, Y., Suko, M., Endo, S. and Okudaira, H., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992. 99: 373.
- 14 Spiegelberg, H. L., Beck, L., Kocher, H. P., Fanslow, W. C. and Lucas, A. H., *J. Clin. Invest.* 1994. 93: 711.
- 15 Pestel, J., Jeannin, P., Delneste, Y., Dessaint, J. P., Cesbron, J. Y., Capron, A., Tsicopoulos, A. and Tonnel, A. B., *J. Immunol.* 1994. 153: 3804.
- 16 Shi, S. R., Key, M. E. and Kalra, K. L., *J. Histochem. Cytochem.* 1991. 39: 741.
- 17 Frew, A. J. and Kay, A. B., *J. Immunol.* 1988. 41: 4158.
- 18 Martino, G., Anastasi, J., Feng, J. J., Mcshan, C., Degroot, L., Quintans, J. and Grimaldi, L. M. E., *Eur. J. Immunol.* 1993. 23: 1023.
- 19 Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B., *N. Engl. J. Med.* 1992. 326: 298.
- 20 Hamid, Q., Wharton, J., Terenghi, G., Hassall, C., Aimi, J., Taylor, K., Nakazato, H., Dixon, J., Burnstock, G. and Polack, J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987. 84: 6760.
- 21 Gauchat, J. F., Henchoz, S., Mazzei, G., J. P., A., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores-Romo, L., Thompson, J., Kishi, K., Butterfield, J., Dahinden, C. and Bonnefoy, J.-Y., *Nature* 1993. 365: 340.
- 22 Sedgwick, J. D. and Holt, P. G., *Immunology* 1983. 50: 625.
- 23 Sedgwick, J. D. and Holt, P. G., *Cell Immunol.* 1985. 94: 182.
- 24 Renz, H., Smith, H. R., Henson, J. E., Ray, B. S., Irvin, C. G. and Gelfand, E. W., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1992. 89: 1027.
- 25 Renz, H., Lack, G., Saloga, J., Schinzer, R., Bradley, K., Loader, J., Kupfer, A., Larsen, G. L. and Gelfand, E. W., *J. Immunol.* 1994. 152: 351.
- 26 Haczk, A., Moqbel, R., Elwood, W., Sun, J., Kay, A. B., Barnes, P. J. and Chung, K. F., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1994. 150: 23.
- 27 Tary-Lehmann, M. and Saxon, A., *J. Exp. Med.* 1992. 175: 503.
- 28 Armstrong, N., Cigel, F., Borchering, W., Hong, R. and Malkovska, V., *Clin. Exp. Immunol.* 1992. 90: 476.
- 29 Taub, D. D., Tsarfaty, G., Lloyd, A. R., Durum, S. K., Longo, D. L. and Murphy, W. J., *J. Clin. Invest.* 1994. 94: 293.
- 30 Murphy, W. J., Taub, D. D., Anver, M., Conlon, K., Oppenheim, J. J., Kelvin, D. J. and Longo, D. L., *Eur. J. Immunol.* 1994. 24: 1823.
- 31 Fattah, D., Quint, D. J., Proudfoot, A., O'Malley, R., Zanders, E. D. and Champion, B. R., *Cytokine* 1990. 2: 112.



**Figure 8: Expression d'ARNm humains codant pour l'IL-4 dans les poumons de souris SCID "allergiques" après exposition à un aérosol de Dpt.**

L'ARNm extrait de poumons de 10 souris SCID "allergiques" a été rétrotranscrit, et l'ADNc a été amplifié par PCR en présence de nucléotides marqués à la digoxygénine. Après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% - Bromure d'éthidium (taille du fragment IL-4 = 224 pb), les produits amplifiés ont été transférés sur membrane de nylon et révélés au moyen d'un Ac anti-digoxygénine marqué à la phosphatase alcaline catalysant une réaction de chimioluminescence. En parallèle, la G3PDH spécifique des cellules humaines a été analysée (taille du fragment = 470 pb).



## **2- Analyse de la migration des cellules humaines chez les souris SCID "allergiques" après inhalation de l'aéroallergène**

Ce travail a fait l'objet d'une publication acceptée dans *Scand. J. Immunol.* (in press) et insérée ci-après.

L'infiltrat pulmonaire obtenu chez des souris SCID humanisées et traitées selon le protocole 1 (i.e reconstituées avec des cellules de patients asthmatiques sensibles à Dpt et exposées à des aérosols de *cet allergène*) a été analysé et comparé aux résultats décrits dans la littérature concernant l'analyse de biopsies bronchiques de patients allergiques en état d'asthme stable. Ainsi, le processus inflammatoire chez l'homme est caractérisé par un afflux d'éosinophiles et de lymphocytes dans la muqueuse bronchique, accompagné d'une augmentation du nombre de mastocytes, d'éosinophiles et de cellules épithéliales dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA). La plupart des lymphocytes détectés dans les biopsies bronchiques et les LBA sont des cellules T activées, caractérisées phénotypiquement par les marqueurs CD25, HLA-DR et VLA-1 [Bradley, 1991; Walker, 1991]. Au niveau de la zone bronchique subépithéliale, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont prédominants et le rapport CD4<sup>+</sup>: CD8<sup>+</sup> est augmenté chez les patients asthmatiques allergiques comparativement aux sujets sains [Azzawi, 1990].

Comme un infiltrat significatif de cellules humaines avait été mis en évidence dans les poumons, 2 mois après l'inhalation de Dpt par les souris SCID "allergiques", le profil phénotypique des cellules humaines a été déterminé .

De plus, comme la rate et le thymus sont deux organes lymphoïdes impliqués dans la recirculation des cellules immunocompétentes, la colonisation de ces organes par les CMN humaines a été évaluée et comparée à l'infiltrat pulmonaire.

Premièrement, nous avons montré que l'afflux des cellules humaines CD45<sup>+</sup> dans les poumons, la rate et le thymus était lié à l'inhalation d'allergène. Ainsi, les analyses immunohistochimiques ont mis en évidence une quantité significative de cellules humaines CD45<sup>+</sup> dans les sections d'organes obtenus 2 mois après l'inhalation de Dpt. A l'inverse, des souris SCID reconstituées avec les cellules des mêmes donneurs mais non exposées à des aérosols de Dpt ont un nombre significativement inférieur ( $p < 0,05$ ) de cellules humaines dans les 3 organes étudiés (figure 1, article *Scand. J. Immunol.*).

Deuxièmement, le profil phénotypique des cellules humaines a été analysé dans les 3 organes. Dans les poumons, les cellules humaines infiltrantes étaient préférentiellement des cellules T CD4<sup>+</sup> activées (HLA-DR<sup>+</sup>) et mémoires (CD45RO<sup>+</sup>). A l'inverse, dans la rate et le thymus, ont été retrouvées à la fois des cellules T et des cellules B. Le nombre de cellules B CD20<sup>+</sup> était corrélé avec le nombre de cellules IgE<sup>+</sup>, ces cellules étant soit des cellules produisant de l'IgE soit des cellules portant l'IgE à leur surface. Enfin, dans les sections de rate et de thymus où des cellules humaines IgE<sup>+</sup> avaient été détectées, des récepteurs de type II pour les IgE ou CD23 ont été mis en évidence à la surface des cellules humaines (figure 2, article Scand. J. Immunol.).

Troisièmement, comme les cellules humaines introduites au niveau du péritoine des souris SCID étaient capables de migrer vers les poumons, la rate et le thymus, l'expression de molécules d'adhérence humaines (intégrines et ICAM-1) a été évaluée dans les 3 organes. Quel que soit l'organe étudié, l'expression du CD11a (chaîne  $\alpha$  du LFA-1), du CD49d (VLA-4) et du CD54 (ICAM-1) a été mise en évidence. Cependant, seul le CD11a dans le poumon était préférentiellement exprimé comparativement à celles du CD49d et du CD54 ( $p = 0,01$ ) (figure 3, article Scand. J. Immunol.), suggérant que les cellules humaines CD11a<sup>+</sup> pourraient migrer préférentiellement vers les poumons après l'inhalation de Dpt.

**ALLERGEN - INDUCED MIGRATION  
OF HUMAN CELLS IN ALLERGIC SCID MICE**

Catherine DUEZ<sup>1</sup>, Hikmat AKOUM<sup>1</sup>,  
Philippe MARQUILLIES<sup>1</sup>, André-Bernard TONNEL<sup>1,2</sup> and Joël PESTEL<sup>1</sup>

INSERM U 416<sup>1</sup>  
Institut Pasteur, BP 245, 59019- Lille, France.  
Département de Pneumologie<sup>2</sup>,  
Hôpital Calmette, CHRU, Lille, France.

ABBREVIATIONS : SCID, Severe Combined Immuno Deficiency ; PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells ; *Dpt*, *Dermatophagoides pteronyssinus* ; *i.p.*, intraperitoneally.

## ABSTRACT

Recently, we have shown that SCID mice i.p reconstituted with PBMC from *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dpt*)-sensitive patients produced human IgE and developed a pulmonary inflammatory-type reaction after exposure to allergen aerosol [1]. In order to understand the potential mechanisms involved in the human cell migration in SCID mice, we have analyzed their phenotypic profile in the lungs, spleen, and thymus, 2 months after *Dpt* inhalation. The human cell recruitment in these organs was allergen-dependent since CD45<sup>+</sup> human cells were only detected in hu-SCID mice after *Dpt* exposure. The characteristics of the pulmonary human T cell infiltrate (preferentially memory (CD45 RO), activated (HLA-DR) and CD4<sup>+</sup> cells) was similar to that described in asthmatic patients. However CD20<sup>+</sup> B cells were predominately recruited in the spleen and thymus and may be IgE producing cells in the spleen. In the lungs, the percentage of human leukocytes expressing the  $\alpha$ -chain of the LFA-1 (CD11a) was higher than those of CD49d<sup>+</sup> or CD54<sup>+</sup> cells, contrary to the spleen and thymus, suggesting a potential role of LFA-1 in the human cell migration towards SCID mice lung. In conclusion, this model could be useful to study the factors implicated in the cellular migration towards the lymphoid organs during an allergic reaction.

Joël PESTEL, INSERM U 416, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 59019 LILLE, FRANCE. (Tel : (33) 3 20 87 78 80; Fax : (33) 3 20 87 73 45).

## INTRODUCTION

Airway inflammation, one feature of allergic asthma, is currently studied in humans by analysis of airway tissue obtained by bronchial biopsies, and by analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) (review in [2]). The inflammatory process is characterized by an influx of eosinophils and lymphocytes in the bronchial mucosa, accompanied by an increase of the number of mast cells, eosinophils and epithelial cells in the BAL. Most of the lymphocytes detected in bronchial biopsies and BAL are activated T cells, phenotypically characterized by the markers CD25, HLA-DR, VLA-1 [3-5]. In the subepithelial zone of the bronchi, CD4+ T lymphocytes are predominant and the CD4+: CD8+ ratio is increased in patients with allergic asthma compared to control subjects [6]. In mild asthma, even though CD4+ and CD8+ T cells express activation markers, only the number of CD4+ T cells is correlated with the number of eosinophils and the severity of the disease [5]. An increased number of cells purified from BAL of asthmatic patients express IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF mRNA, but not IFN- $\gamma$  mRNA, which characterizes a Th2-type cytokine profile [7]. Lung extravasation of leukocytes is due in part to new adhesion properties of the adjacent endothelium involving molecules which regulate leukocyte migration to the site of inflammation. The expression of endothelial adhesion molecules like ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 is increased in bronchial biopsies from patients with allergic asthma [8, 9].

However, regulatory mechanisms of the cellular migration responsible for the inflammatory reaction are difficult to assess in humans. Animal models have therefore been developed. Among them the SCID mouse is of particular interest because of the absence of mature and functional T and B lymphocytes [10]. Due to a defect in the recombinase system, linked to a nonsense mutation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit [11], SCID mice cannot successfully rearrange their immune receptor genes and consequently have no mature T or B cell [12]. This allows graft with human cells and particularly by intraperitoneal injection of mononuclear cells [13].

In a previous study, we have shown that SCID mice reconstituted with  $10 \times 10^6$  mononuclear cells from asthmatic patients sensitive to *Dermatophagoides pteronyssinus*, and exposed to allergen aerosol developed a specific human IgE response and a pulmonary inflammatory-type infiltrate. The cell infiltrate was constituted of human CD45+ cells localized in perivascular and peribronchial areas and disseminated in the lung parenchyma. The development

of this allergen-dependent infiltrate was associated with the expression of IL-5 mRNA, restricted to few cells, and was correlated with the presence of eosinophils [1].

The purpose of this work was first to analyze the pulmonary infiltrate of the allergic SCID mice in order to evaluate the similarity with airways inflammation developed in asthmatic patients, particularly in a stable situation. Thus the phenotypic profile of the human cells infiltrating the murine lung was defined 2 months after *Dpt* inhalation. In a second step, as spleen and thymus are involved in the immunocompetent cell recirculation, the colonisation of these two lymphoid organs by human PBMC injected i.p was evaluated after allergen inhalation.

## MATERIALS AND METHODS

### *Reconstitution of SCID mice*

6-8 weeks old C.B 17 SCID mice were maintained in sterilized isolators (La Calhène, France) with sterilized bedding at the Pasteur Institute of Lille. The SCID colony was regularly checked for absence of serum Ig.

Human PBMC were prepared by density centrifugation on Ficoll-Paque (Pharmacia, France) from blood of donors sensitive to house dust mite (positive skin prick-tests towards *Dpt* allergen, positive RAST and serum IgE levels ranging from 400 to 2173 IU/ml). Mononuclear cells harvested at the interface were washed three times in sterile RPMI medium before transfer: cells ( $10 \times 10^6$ /mouse) were injected i.p in 200-300  $\mu$ l RPMI into SCID mice via a 23-gauge needle.

### *Inhalation protocol*

Two weeks after human cell transfer, SCID mice were exposed to *Dpt* aerosols daily during 4 days (D0 to D4). Reconstituted Hu-SCID mice were placed in a sterilized air flow-controlled chamber connected to a nebulizer (VarioSonic Peters, Aubervilliers, France) generating 4-6  $\mu$ m size droplets and were exposed to a solution containing 80 IR units *Dpt* (100 Index Reactivity units are equivalent to about 200  $\mu$ g of protein contained in the *Dpt* extract).

### *Immunohistochemistry and antibodies used for staining*

Two months after allergen nebulization, lungs, spleen and thymus from 16 mice were excised, fixed in 4% buffered paraformaldehyde and dehydrated before freezing. We purchased the following primary antibodies which are specific for human markers: CD45RO, CD20, CD8, CD23, IgE, HLA-DR from Dako (Dako SA, Trappes, France); CD45, CD4, CD54 from Becton Dickinson (Mountain View, Ca, USA); and CD11a, CD49d from Immunotech (Marseille, France). All these antibodies exhibited specificity to human molecules and were negative when tested on mouse tissues. Mouse isotype controls (IgG1, IgG2a), rabbit anti-mouse immunoglobulins and Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP) were obtained from Dako.

Cryostat tissue sections were permeabilized for 30 min in Tris buffered saline (TBS) - Triton 0.3%, except for the detection of CD45+, CD45RO+ or HLADR+ human cells. After saturation

with 20% normal human serum diluted in TBS, sections were incubated at 4°C overnight with primary monoclonal antibody. After saturation with 10% normal human serum diluted in TBS, sections were stained using an APAAP technique [14] once repeated in order to increase the sensitivity of the reaction, except for the detection of CD45<sup>+</sup> human cells. Cells were counted, at least, in three different fields at magnification 400.

### *Statistical analysis*

The statistical analysis was performed using the Statview F4.11 Software (Apple Company, Copertino, Calif., USA). The Wilcoxon and the Mann-Whitney tests were respectively applied to the quantitative data of the CD45<sup>+</sup> cell number, and to the data of the different phenotypes ( $p < 0.05$  is considered as statistically significant).



## RESULTS

### **1- *Dpt* inhalation-induced CD45<sup>+</sup> human cell infiltration into the lungs, spleen and thymus of allergic hu-SCID mice**

Two months after *Dpt* inhalation, immunohistochemical analysis of allergic-reconstituted SCID mice evidenced a significant number of infiltrated human CD45<sup>+</sup> cells in tissue sections from lungs and two lymphoid organs: the spleen and the thymus (lungs: from 1 to 170, spleen: from 5 to 263, thymus: from 0 to 217 CD45<sup>+</sup> cells per field). In contrast, hu-SCID mice which were reconstituted with PBMC from the same donors but without *Dpt* inhalation, had no or a very limited number of human CD45<sup>+</sup> cells detectable in the 3 organs studied (0 in the lungs, spleen: from 0 to 9, thymus: from 0 to 1 CD45<sup>+</sup> cells per field). The differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ) (fig 1). In parallel to the organs studied, the analysis of gut sections of both inhaled and control allergic hu-SCID mice did not show any human leukocyte infiltrate (data not shown).

Thus human cells only migrate in the lungs, spleen and thymus of allergic SCID mice challenged by inhalation.

### **2- Phenotype profile of the human infiltrating cells into the lungs, spleen and thymus of allergic hu-SCID mice**

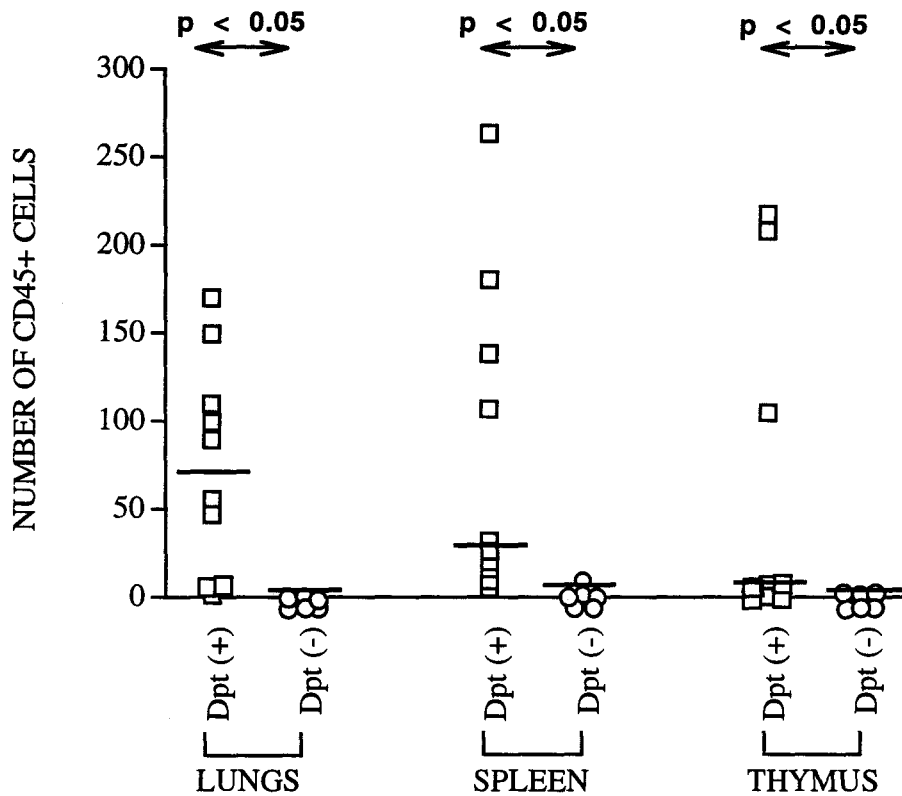
In the three organs, the human infiltrating cells were a majority of HLA-DR<sup>+</sup> cells. However, the expression of the CD45RO marker was different according to the organ studied: the highest expression was found in the lungs and the lowest in the thymus ( $p = 0.02$ ). In the lungs and the spleen, the percentage of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was significantly higher than that of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (respectively:  $44.7 \pm 6.8$  % CD4<sup>+</sup> and  $21 \pm 5.3$  % CD8<sup>+</sup>, and  $43.4 \pm 8.9$  % CD4<sup>+</sup> and  $28.4 \pm 8.9$  % CD8<sup>+</sup>). There were few CD20<sup>+</sup> B cells in the lungs ( $2 \pm 1.5$  %), in comparison with spleen and thymus (respectively:  $27.7 \pm 11$  % and  $23.1 \pm 12.1$  %). The presence of human macrophages was examined in murine lungs using an anti-CD68 antibody, but no positive cells could be detected (data not shown).

These results suggest that the human infiltrating cells in the lungs are preferentially memory and activated CD4<sup>+</sup> T cells. In contrast, in the spleen and thymus, infiltrating cells are a combination of T and B cells. The number of CD20<sup>+</sup> B cells was correlated with IgE<sup>+</sup> cells, which could be

IgE secreting cells or IgE bearing cells. In sections of spleen and thymus where human IgE positive cells were detected, the IgE receptor type II or CD23 could be evidenced on the human cell surface ( $2.01 \pm 1.24$  and  $14.62 \pm 10.02$  % of the hu-CD45<sup>+</sup> cells respectively).

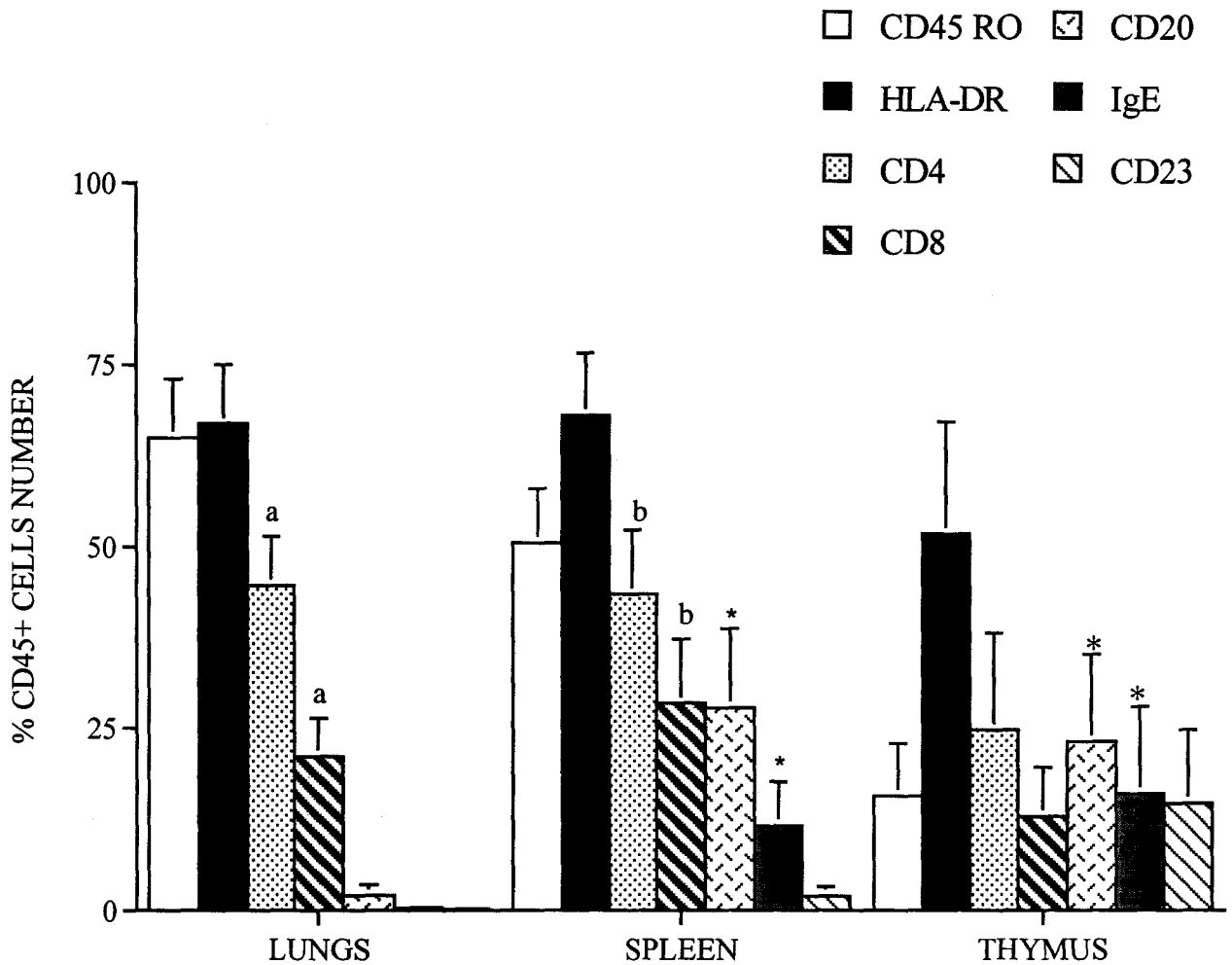
### **3- Expression of integrins and ICAM-1 on human infiltrating cells in the lungs, spleen and thymus of allergic SCID mice**

As human cells, injected intraperitoneally in the SCID mice, were able to migrate into the lungs, the spleen and thymus, we then examined the presence of adhesion molecules on human cells that had migrated towards these organs. In the three organs, the expression of CD11a (the  $\alpha$  chain of the LFA-1 integrin), CD49d (VLA-4) and CD54 (ICAM-1) was evidenced (fig 3). In the spleen and the thymus, there was no significant difference between the percentage of human cells expressing the three adhesion molecules (respectively: CD11a=  $9.7 \pm 5.9\%$  and  $20.4 \pm 10.2\%$ , CD49d=  $18.3 \pm 9.1\%$  and  $22 \pm 11.7\%$ , CD54=  $4.2 \pm 4.1\%$  and  $13.6 \pm 7.3\%$  of hu-CD45<sup>+</sup> cells). In contrast, in the lungs CD11a was preferentially expressed comparatively with CD49d and CD54 (respectively:  $53.2 \pm 10\%$ ,  $10 \pm 5.5\%$  and  $2.7 \pm 1.1\%$  of hu-CD45<sup>+</sup> cells). These results suggest that CD11a<sup>+</sup> human cells preferentially migrate towards the lungs after *Dpt* inhalation.



**Figure 1: Number of CD45+ human cells in the lungs, spleen and thymus of reconstituted SCID mice, after Dpt inhalation.**

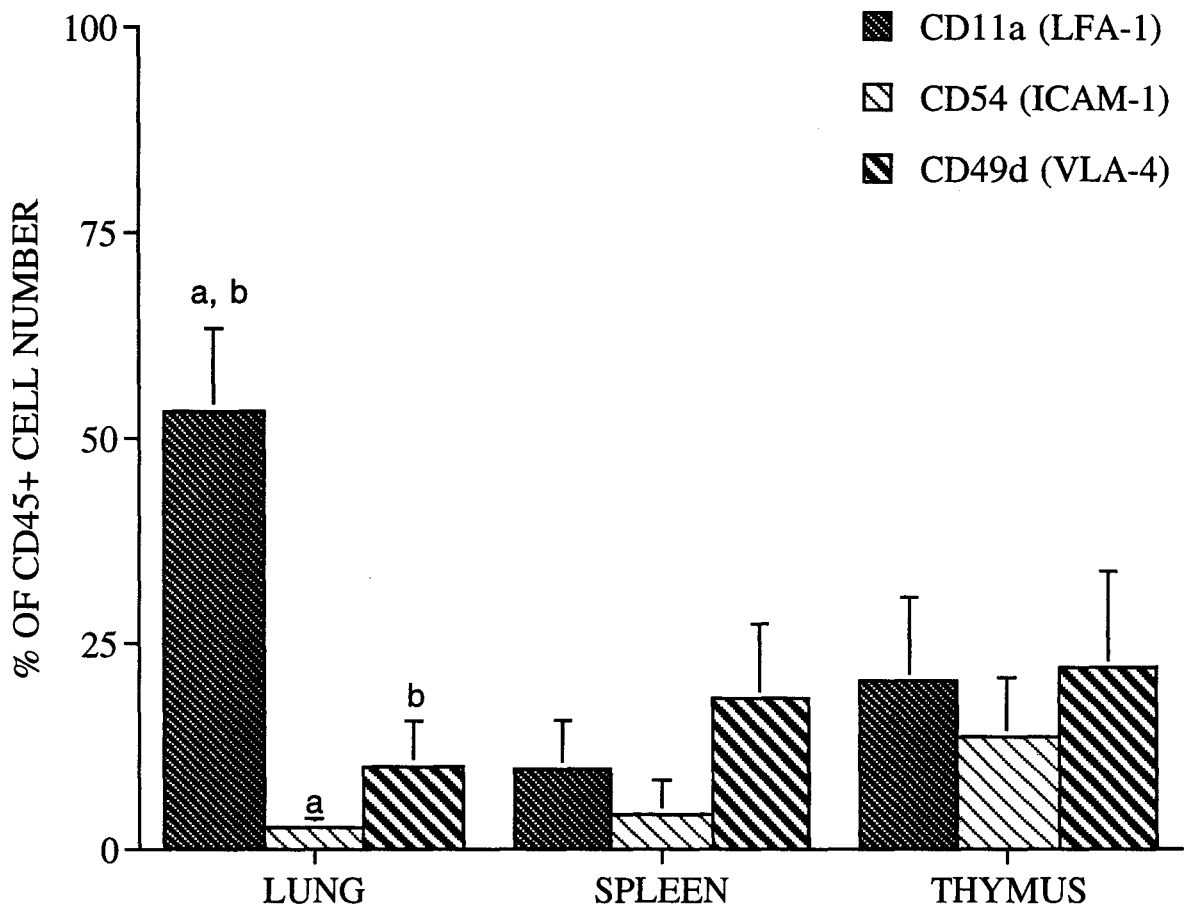
Hu-CD45+ cells were evidenced by immunohistochemistry on sections of these 3 organs in allergic hu-SCID mice which had inhaled Dpt (Dpt +), or not (Dpt -). Horizontal bars show the mean number of CD45+ cells in the organs of 10 Dpt + hu-SCID mice and 6 Dpt - hu-SCID mice. The differences between the Dpt + and Dpt - groups are statistically significant according to the Mann Whitney test (for the lung,  $p = 0.001$ , for the spleen  $p = 0.002$ , and for the thymus  $0.008$ ).



**Figure 2: Phenotypical characteristics of human cells detected in the lung, spleen and thymus of hu-SCID mice, after Dpt inhalation.**

Immunohistochemistry (the antibodies used were directed against CD45RO, HLA-DR, CD4, CD8, CD20, IgE and CD23) was performed on sections of the 3 organs for all Inh+ hu-SCID mice. Results are expressed as the mean of the % of hu-CD45+ cells  $\pm$  standard error of the mean and the percentages were calculated according to the following formula: (number of positive cells / number of CD45+ cells)  $\times$  100.

Minus letters (a, b) designate the existence of significant differences according to the Wilcoxon test (a:  $p=0.007$ , b:  $p=0.01$ ) between 2 markers. The symbol \* shows the presence of a correlation between the expression of 2 markers (in the spleen:  $r = 0.8$ ,  $p = 0.02$ , in the thymus:  $r = 0.8$ ,  $p = 0.05$  according to the Spearman test).



**Figure 3: Expression of human adhesion molecules in the lung, spleen and thymus of hu-SCID mice, after Dpt inhalation.**

Sections of lung, spleen and thymus were analysed by immunohistochemistry (the antibodies used were directed against CD11a, CD49d and CD54), for all Inh+ hu-SCID mice. Results are expressed as the mean of the % of hu-CD45+ cells  $\pm$  standard error of the mean and the percentages were calculated according to the following formula: (number of positive cells / number of CD45+ cells) x 100.

Minus letters (a, b) represent the existence of significant differences ( $p = 0.01$ ) according to the Wilcoxon test.

## DISCUSSION

In this study we have shown that memory and activated CD4<sup>+</sup> T cells are the major human cell type in the pulmonary infiltrates of allergic hu-SCID mice exposed to allergen aerosols. The lung tissue infiltration appears to be closely related to the exposure of allergen and the allergic state of the patient because the unchallenged allergic hu-SCID mice, and the non allergic hu-SCID mice exposed to *Dpt* did not show any CD45<sup>+</sup> human cell infiltrate in their lung tissue. Moreover, as no inflammatory-type reaction was detected in SCID mice reconstituted with PBMC from patient sensitive to pollen, and exposed to Dpt aerosol, unspecific pulmonary irritation on cells from atopic donors can not explain the pulmonary infiltrate [1]. It is unlikely that this human cell infiltrate was due to xenogeneic graft versus host disease (XGVHD). Three arguments can be developed against the hypothesis of a XGVHD. First, the number of human cells used to induce a XGVHD is very high ( $10^8$  -  $10^9$  hu-PBMC) [15, 16] compared to the  $10^7$  hu-PBMC transferred here in SCID mice. Second, the XGVHD appears linked to an increase of the mortality and an increased number of CD8<sup>+</sup> human cells in the spleen [16]; while, in this work, the number of CD8<sup>+</sup> human lymphocytes was always lower than that of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the spleen of allergic SCID mice. Third, the predominant manifestation of XGVHD involves splenomegaly resulting from an expansion of murine hematopoietic cells in the spleen of these xenogeneic chimeras [15], but none of the mice included in this study presented this characteristic. Consequently, the human cell phenotypes in the lung (activated and memory lymphocytes, and predominantly CD4<sup>+</sup>) appear strictly allergen-dependent, and indicate that, after allergen inhalation, the allergic hu-SCID mice exhibited human T cell infiltration in the lung tissue similar to that observed in asthmatic patients [3, 4, 6, 8].

In addition, human cell infiltrate was demonstrated in the spleen and thymus of the SCID mice developing a pulmonary human cell infiltration. On the contrary, few or no human cells were detected in murine organs of hu-SCID mice which had not inhaled the allergen. This absence of human cells is in agreement with other studies. Particularly, by using similar method as ourselves, Martino et al have detected very few human cells (from 0 to 11 human cells per field according either to the number of transferred cells, or the EBV status of the donor or the time when the mice were sacrificed) on sections of murine organs like spleen and thymus of SCID mice, 10 weeks after reconstitution with  $20 \times 10^6$  PBMC from normal donors [17]. Splenic and

thymic infiltrates were phenotypically different from those of the lungs, particularly for the expression of markers like CD45RO and CD11a (higher in the lungs) and CD20 (lower in the lungs). In the thymus of allergic SCID mice, human cells were T (CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup>) and B (CD20<sup>+</sup>) lymphocytes, mostly activated (HLA-DR<sup>+</sup>). Some works have demonstrated that thymic engraftment could occur when human cells were previously activated. Six to 8 weeks after the transfer of human growth hormone- or anti-CD3-activated human PBL, human CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> cells were usually detected in the thymus [18, 19]. This is probably in relation with the induction of specific adhesion molecule expression on the human cell surface. In the spleen of allergic hu-SCID mice, like in the thymus, human B cells were detected and approximately half of them were IgE<sup>+</sup>. The human IgE production was previously demonstrated in allergic hu-SCID mice [1, 20], but the IgE production site was not precised. Here, few human B cells infiltrating the spleen were positive for CD23, a binding structure for IgE which is not expressed by plasmocytes [21]. It is therefore possible that the human IgE<sup>+</sup> cells might be IgE producing cells. Moreover, as IgE productive transcripts were detected by RT-PCR in the spleen of allergic hu-SCID mice (data not shown), the spleen might be one of the IgE production sites. On the other side, in the thymus, the number of B lymphocytes was correlated with those of IgE positive cells. Moreover, as the number of CD23 positive cells was similar to those of IgE positive cells, we can hypothesize that IgE may be fixed on CD23. This suggests that B lymphocytes might bear IgE by their corresponding receptors. The role of such IgE<sup>+</sup> B cells in the thymus is not clear although they might act as antigen presentating cells.

Two main factors could explain the human cell migration in the allergic SCID mice: the intervention of cell adhesion molecules (CAM), and the role of chemotactic factors. In this study we exclusively focused our attention on CAM expression and have detected the expression of LFA-1, ICAM-1 and VLA-4 on the human leukocytes infiltrating the murine tissues, particularly in the lungs. As the  $\alpha$ -chain expression of LFA-1 was more expressed at the level of human cells infiltrating the lungs of SCID mice compared to ICAM-1 and VLA-4, we can hypothesize that human LFA-1 may play a preferential role in the pulmonary influx, and more precisely by interacting with its murine counter-receptor: ICAM-1. Indeed there is sufficient homology between human and murine adhesion molecules to allow productive xenogeneic interactions. Human T cells have been shown to bind to immobilized mouse ICAM-1, VCAM-1, collagen type IV and fibronectin [22, 23]. Thus the lung infiltrate in allergic SCID mice might be explained, in

part, by leukocyte emigration through the vasculature mediated by ICAM-1. The respective role of the different CAM in the establishment of allergic pulmonary infiltration is still debated. Previous studies in asthmatic patients using bronchial biopsies with or without segmental antigen challenge have provided evidence that ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 were upregulated in the bronchial microvasculature in allergic asthma. In addition, although there was no correlation with the expression of endothelial adhesion molecules, increased numbers of LFA-1-, Mac-1- and VLA-4-expressing leukocytes were also detected in the bronchial submucosa [8, 9, 24]. The use of different animal models does not allow definitive conclusions about the importance of LFA-1/ICAM-1 interaction in lymphocytic infiltration in asthma. In a monkey model of asthma, it has already been demonstrated that *in vivo* ICAM-1 neutralization only attenuated the eosinophil infiltration and the induction of airway hyperresponsiveness [25]. In contrast, in a murine model of airway inflammation, treatment with anti-ICAM-1 antibody did not affect eosinophil infiltration in mouse airway but reduced antigen-induced CD4+ and CD8+ lymphocyte infiltration. But, 24 hours after allergen challenge, ICAM-1 expression on the endothelium was not significantly increased [26] contrary to what occurred in humans. Finally, ICAM-1 antibody inhibits airway hyperresponsiveness in sensitized Brown-Norway rats without suppressing the accompanying inflammatory process, e.g. without reducing neutrophils and lymphocytes counts [27]. Here the chimeric human-SCID mouse model that we have developed may allow a better approach of lymphocyte behaviour in asthma. Further studies are required to test our hypothesis on the intervention of murine ICAM-1/human LFA-1 interaction in allergen-induced human T cell infiltrate in the lung of allergic SCID mice.

In conclusion, SCID mice can be used to study human allergic asthma and particularly the development of the pulmonary inflammation. The processes inducing the allergen-dependent migration of lymphocytes into tissues should be in the future dynamically analysed.



## REFERENCES

1. Duez C, Tsicopoulos A, Janin A et al. An in vivo model of allergic inflammation: pulmonary human cell infiltrate in allergen-challenged allergic Hu-SCID mice. *Eur. J. Immunol.* 1996;26:1088-93.
2. Bochner BS, Udem BJ, Lichtenstein LM. Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol* 1994;12:295-335.
3. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M et al. Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:661-74.
4. Poston RN, Chanez P, Lacoste JY, Litchfield T, Lee TH, Bousquet J. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltration in asthmatic bronchi. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:918-21.
5. Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:935-42.
6. Azzawi M, Bradley BL, Jeffery PK. Identification of activated T-lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am. rev. Respir. Dis.* 1990;142:1407-13.
7. Robinson DS, Hamid Q, Ying S et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* 1992;326:298-304.
8. Pilewski JM, Abelda SM. Cell adhesion molecules in asthma: homing, activation, and airway remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995;12:1-3.
9. Gosset P, Tillie Leblond I, Janin A et al. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1995;106:69-77.
10. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-30.
11. Blunt T, Gell D, Fox M et al. Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:10285-90.
12. Schuler W, Weiler IJ, Schuler A et al. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 1986;46:963-72.
13. Mosier DE. Immunodeficient mice xenografted with human lymphoid cells: new models for in vivo studies of human immunobiology and infectious diseases. *J Clin Immunol* 1990;10:185-91.
14. Frew AJ, Kay AB. The relationship between infiltrating CD4+ lymphocytes activated eosinophils, and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction in man. *J. Immunol.* 1988;41:4158-64.
15. Murphy WJ, Bennett M, Anver MR, Baseler M, Longo DL. Human-mouse lymphoid chimeras: host-vs.-graft and graft-vs.-host reactions. *Eur J Immunol* 1992;22:1421-7.
16. Hupples W, Fickenscher H, Thart BA, Fleckenstein B. Cytokine dependence of human to mouse graft-versus-host disease. *Scand J Immunol* 1994;40:26-36.
17. Martino G, Anastasi J, Feng JJ et al. The Fate of Human Peripheral Blood Lymphocytes After Transplantation into SCID Mice. *Eur J Immunol* 1993;23:1023-8.
18. Murphy WJ, Durum SK, Longo DL. Human growth hormone promotes engraftment of murine or human T cells in severe combined immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4481-5.

19. Murphy WJ, Conlon KC, Sayers TJ et al. Engraftment and activity of Anti-CD3-Activated human peripheral blood lymphocytes transferred into mice with severe combined immune deficiency. *J Immunol* 1993;150:3634-42.
20. Pestel J, Jeannin P, Delneste Y et al. Human IgE in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from dermatophagoides pteronyssinus-sensitive patients. *J Immunol* 1994;153:3804-10.
21. Banchereau J, Rousset F. Human B lymphocytes: phenotype, proliferation and differentiation. *Adv. Immunol.* 1992;52:125-262.
22. Taub DD, Tsarfaty G, Lloyd AR, Durum SK, Longo DL, Murphy WJ. Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogeneic engraftment. *J Clin Invest* 1994;94:293-300.
23. Renz ME, Chiu HH, Jones S et al. Structural requirements for soluble recombinant murine vascular cell adhesion molecule-1 to  $\alpha 4\beta 1$ . *J. Cell Biol.* 1994;125:1395-406.
24. Ohkawara O, Yamauchi K, Maruyama N et al. *In situ* expression of the cell adhesion molecules in bronchial tissues from asthmatics with airflow limitation: *in vivo* evidence of VCAM-1/VLA-4 interaction in selective eosinophil infiltration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995;12:4-12.
25. Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 1990;247:456-9.
26. Nakajima H, Sano H, Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I. Role of Vascular Cell Adhesion Molecule 1/Very Late Activation Antigen 4 and Intercellular Adhesion Molecule 1/Lymphocyte Function-associated Antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J. Exp. Med.* 1994;179:1145-54.
27. Sun J, Elwood W, Haczku A, Barnes PJ, Hellewell PG, Chung KF. Contribution of Intercellular-Adhesion Molecule-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in sensitised Brown-Norway rats. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1994;104:291-5.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank J-Y. Cesbron for providing SCID mice, E. Fleurbaix and J-P. Decavel for assistance in the maintenance of SCID mice; and B. Wallaert, I. Tillie-Leblond, A. Tsicopoulos and the personnel of the Calmette Hospital (Service et consultations d'Immunoallergologie) for the selection of patients and the blood collection involved in this study. C. Duez is a recipient of a grant from the Conseil Régional Nord-Pas de Calais and the Institut Pasteur de Lille.

### **3- Effet d'un Ac anti-ICAM-1 murin sur la migration de cellules humaines vers les poumons de souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt**

Suite à l'observation que les cellules humaines migrant vers les poumons des souris SCID étaient majoritairement CD11a<sup>+</sup>, nous avons émis l'hypothèse que le couple ICAM-1/LFA-1 pourrait être responsable de la migration lymphocytaire pulmonaire. Dans notre système mixte, nous devons donc considérer que cette interaction mettrait en jeu l'ICAM-1 murin et le LFA-1 humain.

Il existe des homologies entre molécules d'adhérence humaines et murines permettant des interactions xénogéniques efficaces. Ainsi des cellules T humaines sont capables de se lier à de l'ICAM-1, du VCAM-1, de la fibronectine et du collagène de type IV murins immobilisés [Renz, 1994b; Taub, 1994]. Nous avons donc voulu explorer la possibilité que l'infiltrat pulmonaire soit en partie la conséquence de la migration transendothéliale des leucocytes humains par l'intermédiaire de l'ICAM-1 murin.

Afin de mieux appréhender l'effet d'un Ac anti-ICAM-1 sur l'afflux des cellules humaines dans le poumon entier, une suspension cellulaire a été réalisée à partir de l'organe et a été analysée par cytométrie de flux. Les pourcentages de cellules CD45<sup>+</sup> sont évalués sur l'ensemble des populations cellulaires pulmonaires (macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales et lymphocytes). Une étude préliminaire avait révélé qu'il était possible de détecter dès J30 après l'inhalation de Dpt des cellules humaines dans le poumon de souris SCID "allergiques" traitées selon le protocole 2. Ainsi, dans les poumons de 2 souris SCID "allergiques", les pourcentages de cellules CD45<sup>+</sup>, analysées par cytométrie de flux, et le nombre de cellules CD45<sup>+</sup> par champ (au grossissement x500), analysées par immunohistochimie, étaient respectivement de 1,08% (105 cellules par champ en localisation périvasculaire, péribronchique et parenchymateuse), et 0,53% (7 cellules par champ en localisation parenchymateuse).

Les poumons de souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols d'allergène selon le protocole 2, et traitées par des Ac anti-ICAM-1 préparés à partir de culture de la lignée YN1/1.7.4, et administrés par un système de pompe osmotique, ont donc été analysés à J30. Le traitement avec l'Ac semble avoir plutôt un effet nul voire éventuellement positif sur l'infiltrat des cellules humaines dans les poumons murins. En effet aucune des 3 souris témoins (traitées avec l'Ac témoin: IgG de rat) ne présentait d'infiltrat, cette absence de cellules

humaines étant à mettre en liaison avec une reconstitution inefficace, évaluée par une absence de production d'IgE humaines. A l'inverse, toutes les souris traitées par l'Ac de rat anti-ICAM-1 murin produisaient des IgE et présentaient des cellules humaines dans le poumon (tableau 1).

**Tableau 1:** Effet d'un Ac anti-ICAM-1 murin sur l'infiltrat de cellules humaines dans le poumon des souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules CD45+ sur l'ensemble du poumon et les valeurs minimales ou maximales des taux d'IgE humaines sériques correspondantes sont indiquées. L'analyse a été réalisée en cytométrie de flux, 30 jours après l'inhalation de Dpt.

	Traitement	% de cellules CD45 <sup>+</sup>	Réponse IgE
souris n°1	IgG contrôle	0 %	< 0,35 UI/ml
souris n°2	IgG contrôle	0 %	< 3,36 UI/ml
souris n°3	IgG contrôle	0 %	< 0,35 UI/ml
souris n°4	Ac anti-ICAM-1	0,55 %	< 6,61 UI/ml
souris n°5	Ac anti-ICAM-1	0,75 %	< 5,31 UI/ml
souris n°6	Ac anti-ICAM-1	1,6 %	> 11,3 UI/ml
souris n°7	Ac anti-ICAM-1	0,16 %	< 8,09 UI/ml

En utilisant le protocole 3 (prétraitement avec l'ASGM1, injection i.p et inhalation de Dpt), l'efficacité de la reconstitution évaluée par le taux d'IgE sériques ayant été vérifiée, l'analyse des poumons de souris SCID "allergiques" a révélé que l'utilisation de l'Ac anti-ICAM-1 murin semblait augmenter de plus de 2 fois le pourcentage de cellules humaines détectées dans les poumons 30 jours après l'inhalation de Dpt (tableau 2). Cependant, le petit nombre de souris obtenues selon ce protocole ne permet pas d'effectuer d'étude statistique, et donc de conclure sur l'action de l'Ac anti-ICAM-1 murin.

**Tableau 2:** Effet d'un Ac anti-ICAM-1 murin sur l'infiltrat de cellules humaines dans le poumon des souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt, prétraitées avec un Ac anti-cellules NK (ASGM1). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules CD45+ sur l'ensemble du poumon et les valeurs minimales des taux d'IgE humaines sériques correspondantes sont indiquées. L'analyse a été réalisée en cytométrie de flux, 30 jours après l'inhalation de Dpt.

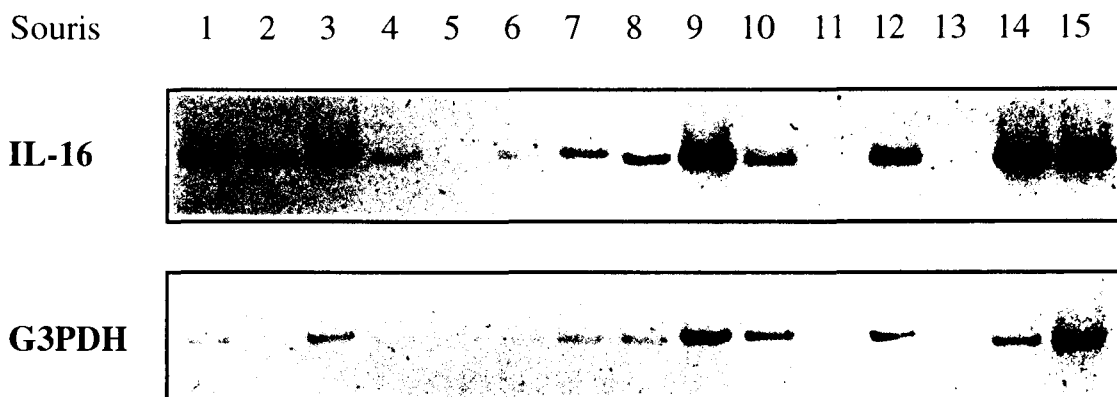
	Traitement	% de cellules CD45 <sup>+</sup>	Réponse IgE
souris n°1	Pas de traitement	0,2 %	> 7,1 UI/ml
souris n°2	Pas de traitement	0,8 %	> 20,8 UI/ml
souris n°3	IgG contrôle	0,3 %	> 35,5 UI/ml
souris n°4	IgG contrôle	0 %	> 31,6 UI/ml
souris n°5	IgG contrôle	0,4 %	> 23,2 UI/ml
souris n°6	Ac anti-ICAM-1	2,1 %	> 16 UI/ml
souris n°7	Ac anti-ICAM-1	3,2 %	> 23,1 UI/ml
souris n°8	Ac anti-ICAM-1	39,8 %	> 105 UI/ml

#### 4- Etude de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-16 humaine dans les poumons des souris SCID "allergiques" après inhalation de l'aéroallergène

La migration cellulaire étant le résultat cumulé de l'intervention de molécules d'adhérence et de molécules chimioattractantes, nous avons voulu évaluer la présence de telles molécules dans les poumons des souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt et développant un infiltrat de type inflammatoire. Nous avons plus précisément analysé l'expression d'ARNm codant pour l'IL-16 humaine.

Grâce à une technique de RT-PCR, la présence d'ARNm codant pour l'IL-16 a été mise en évidence, en parallèle de celle d'ARNm codant pour la G3PDH ("housekeeping gene" servant de référence, exprimé constitutivement dans toutes les cellules humaines, et dont l'expression n'est pas modulable) (figure 8).

Par conséquent, certaines cellules humaines présentes dans les infiltrats pulmonaires expriment l'ARNm codant l'IL-16, molécule chimioattractante pour les lymphocytes T humains CD4<sup>+</sup>, population cellulaire affluant majoritairement vers les poumons de souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.



**Figure 9: Expression d'ARNm humains codant pour l'IL-16 dans les poumons de souris SCID "allergiques" 37 jours après exposition au Dpt.** L'ARNm extrait de poumons de 13 souris SCID "allergiques" traitées selon le protocole 3, a été rétrotranscrit, et l'ADNc a été amplifié par PCR. Les fragments amplifiés ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de SYBR-Green (taille du fragment IL-16 = 226 pb). En parallèle, la G3PDH spécifique des cellules humaines a été analysée (taille du fragment = 470 pb).



## **RESULTATS 3**

***L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE***

***CHEZ LES SOURIS SCID***

La troisième caractéristique majeure de l'asthme allergique est l'existence d'une hyperréactivité des voies aériennes. De nombreux facteurs ont été impliqués dans le développement d'une HRB comme l'existence d'anomalies neurogéniques [Barnes, 1989] et d'une inflammation des voies aériennes [Djukanovic, 1990] caractérisée par un infiltrat d'éosinophiles [Bousquet, 1995] et la libération de médiateurs et de cytokines inflammatoires [Robinson, 1992]. De nombreux modèles animaux ont été développés afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement d'une HRB, et d'évaluer l'action de différents agents dans la prévention de l'HRB.

Dans notre modèle de souris SCID humanisées, nous avons mis en évidence une production d'IgE humaines dans le sérum et le développement d'un infiltrat pulmonaire de type inflammatoire, après inhalation de Dpt à des souris SCID reconstituées avec les cellules de patients allergiques vis-à-vis de cet aéroallergène. Nous avons donc voulu savoir si ces manifestations de type allergique s'accompagnaient d'une HRB.

### **1- Analyse de la réactivité bronchique des souris SCID**

Afin d'évaluer la réactivité bronchique de base, propre aux souris SCID de souche CB.17, nous avons analysé le pourcentage d'augmentation de la résistance des voies aériennes, à différentes doses de carbachol chez des souris SCID non reconstituées.

De façon à appréhender un éventuel effet non spécifique du Dpt sur les voies aériennes murines, l'augmentation de la résistance des voies aériennes a été mesurée pour 3 groupes de souris SCID témoin non reconstituées: des souris non exposées au Dpt (groupe 1) , ou soumises au même protocole de sensibilisation à l'allergène que les souris SCID humanisées, et analysées à J30 (groupe 2) ou J60 (groupe 3). L'objectif étant de se placer dans des conditions de stimulation proches de celles auxquelles sont soumis les patients, les souris des groupes 2 et 3 ont été de nouveau exposées au Dpt (100 IR) 24 heures avant l'étude de l'HRB. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les 3 groupes: les moyennes de PC50 (dose de carbachol pour laquelle le pourcentage d'augmentation de la résistance des voies aériennes est égal à 50) étaient de  $7,8 \pm 2$  (groupe 1),  $8,6 \pm 4,8$  (groupe 2) et  $4,7 \pm 0,6$  (groupe 3) (figure 9).

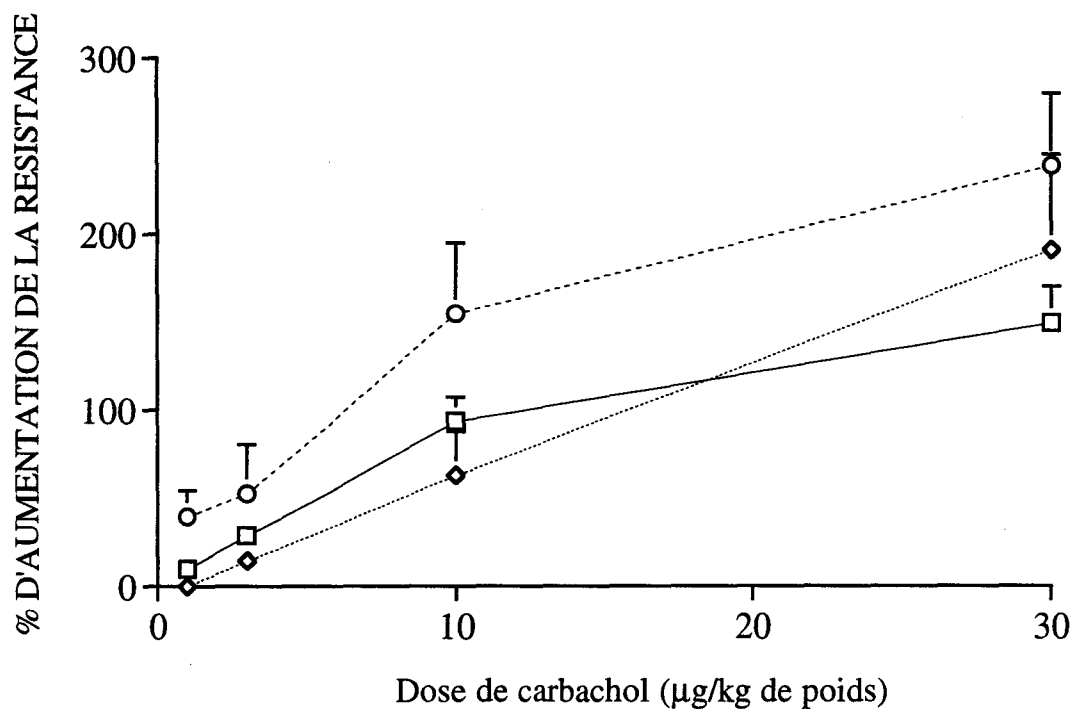
Par conséquent, l'inhalation de l'allergène n'a pas d'effet sur la réactivité des voies aériennes des souris SCID. Les 3 groupes ont donc été réunis en un seul: les souris SCID non reconstituées.

## **2- Développement d'une hyperréactivité bronchique chez les souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt**

Dans un deuxième temps, le pourcentage d'augmentation de la résistance des voies aériennes à différentes doses de carbachol, chez des souris SCID "allergiques" a été évalué comparativement à celui des souris SCID non "allergiques", et des souris non reconstituées.

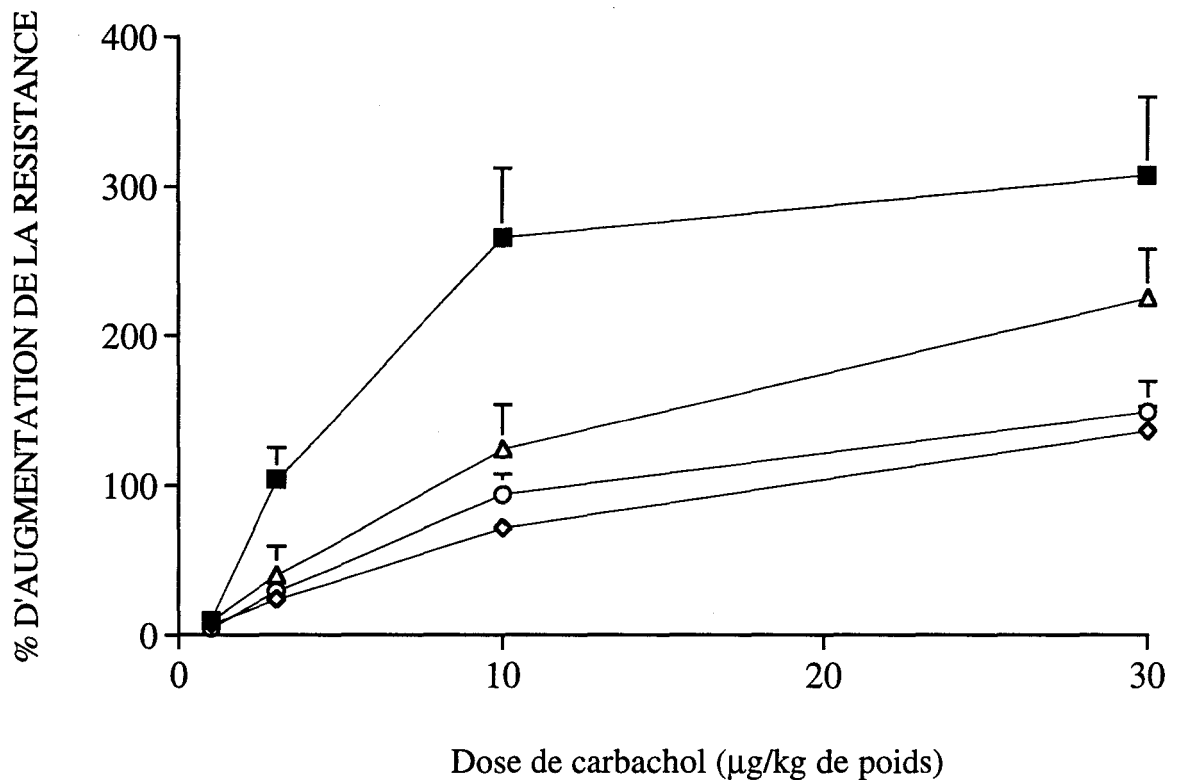
Chez les souris SCID "allergiques" exposées au Dpt, la réactivité vis-à-vis du carbachol était significativement augmentée par rapport aux 2 types de témoins (figure 10): les pourcentages d'augmentation de la résistance des voies aériennes sont statistiquement différents, aux doses de carbachol de 3, 10, 30  $\mu\text{g/g}$  de poids de souris ( $p < 0,01$ ). De plus, la PC50 moyenne des souris SCID "allergiques" est diminuée par rapport à celle des souris SCID non "allergiques" et celles des souris SCID non reconstituées, soit respectivement de  $2,13 \pm 0,36$ ,  $6,83 \pm 0,99$  et  $7,44 \pm 1,14$ .

Par conséquent, les souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt développent une HRB par rapport aux souris SCID témoins, i.e des souris SCID non "allergiques" exposées au Dpt et des souris SCID non reconstituées.



**Figure 10: Réactivité bronchique des souris SCID non reconstituées.**

La réactivité des voies aériennes au carbachol a été évaluée chez des souris SCID non reconstituées et non exposées au Dpt (carrés, n = 13), ou exposées et analysées 30 jours (losanges, n = 4), ou 60 jours (ronds, n = 8) après l'inhalation. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance des voies aériennes (moyenne  $\pm$  SEM). Les différences de réactivité entre les 3 groupes ne sont pas significatives, selon le test de Kruskal-Wallis.



**Figure 11: Hyperréactivité bronchique des souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt.**

La réactivité des voies aériennes au carbachol a été évaluée chez des souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt (carrés, n = 10) comparativement à celle de souris SCID non "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt (losanges, n = 11), de souris SCID non reconstituées et exposées (triangles, n = 12) ou non (ronds, n = 13) au Dpt. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance des voies aériennes (moyenne  $\pm$  SEM). La réactivité des souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt est significativement supérieure à celle des souris appartenant aux 3 autres groupes, selon le test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,007$ ).

**DISCUSSION**

**\*\*\***

**CONCLUSIONS**

L'analyse des différentes composantes de la réaction allergique chez l'homme est encore limitée. Disposer d'un modèle d'étude peut s'avérer déterminant pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et une meilleure évaluation de molécules à visée thérapeutique. Dans cet esprit, de nombreux modèles animaux ont été développés afin d'examiner les mécanismes de la réaction allergique conduisant aux manifestations cliniques observées dans l'asthme. Dans ce travail, nous avons démontré pour la première fois, qu'après inhalation de l'allergène, seules les souris SCID humanisées avec les cellules de patients allergiques produisaient une réponse IgE spécifique, développaient un intense infiltrat de cellules humaines CD45<sup>+</sup> dans les poumons et une HRB par rapport aux souris SCID témoin.

### **1- Production d'IgE humaine chez des souris SCID après inhalation d'allergène**

Dans un premier temps, nous avons démontré que des souris SCID reconstituées avec des cellules de patients asthmatiques allergiques à Dpt, et exposées 15 jours plus tard à un aérosol de l'allergène (protocole 1), produisent des IgE humaines spécifiques.

Une production spontanée d'immunoglobulines humaines a déjà pu être mise en évidence chez des souris SCID humanisées. Les cellules B humaines de donneurs non allergiques peuvent persister et proliférer après injection i.p. à des souris SCID [Carlsson, 1992; Duchosal, 1992a; Saxon, 1991]. Après reconstitution une production spontanée d'IgG, ainsi que d'IgM, IgA et IgD, a été observée. La production d'IgG peut persister jusqu'à 2 ans après l'injection des cellules, alors que la demi-vie de cet isotype n'est que de 12 jours lorsqu'il est injecté à des souris SCID [Duchosal, 1992b]. A l'inverse, un très faible nombre de souris SCID reconstituées avec des CMN de sujets sains produisent des IgE détectables [Saxon, 1991]. Cependant, des souris SCID reconstituées avec les CMN de patients atteints de dermatite atopique (taux d'IgE élevés: 3700 à 20300 UI/ml) produisent spontanément des IgE humaines [Ito, 1992; Spiegelberg, 1994], ainsi que des souris SCID reconstituées avec les CMN de patients sensibles à l'allergène du bouleau [Steinsvik, 1997]. La durée de vie de l'IgE dans la souris étant très courte (demi-vie = 24 heures), les taux d'IgE sériques détectés témoignent d'une réelle production. Une réponse Ac a également été appréhendée chez la souris SCID humanisée: une réponse IgG humaine spécifique contre des antigènes de rappel ou des antigènes naïfs [Duchosal, 1992a; Martensson, 1994; Walker, 1994], et une réponse IgE en présence de l'allergène spécifique [Pestel, 1994] ont été détectées. Ainsi dans le laboratoire, J.

Pestel *et al* ont montré que des souris SCID reconstituées avec  $10^7$  CMN de patients sensibles à Dpt et immunisées par voie i.p. avec l'allergène en présence d'adjuvant produisent des IgE humaines spécifiques et fonctionnelles. Au cours de la thèse, d'un autre côté, nous avons montré qu'une réponse similaire peut être déclenchée en administrant l'allergène sous forme d'aérosol et sans adjuvant, protocole qui se rapproche fortement des conditions de sensibilisation auxquelles sont soumis les patients.

Il est connu que les patients présentant une atopie sévère possèdent un plus grand nombre de cellules B à un stade plasmocytaire, capables de sécréter spontanément de l'IgE *in vitro* [Ricci, 1992]. Par conséquent, Ito *et al*, et Spiegelberg *et al*, en utilisant un nombre élevé de CMN ( $40$  à  $50 \times 10^6$ ) de sujets atopiques présentant des taux d'IgE sériques très élevés (de  $3700$  à  $20300$  UI/ml), ont pu transférer chez la souris SCID suffisamment de cellules B différenciées et de lymphocytes B matures capables de se différencier et de produire une réponse IgE de l'ordre de  $80$  UI/ml, dans les 15 jours qui suivent la reconstitution. A l'inverse, lorsque  $10^7$  cellules sont injectées, aucune production d'IgE n'est détectée [Ito, 1992]. En utilisant un nombre élevé de cellules ( $25$  à  $60 \times 10^6$ ), Steinsvik *et al* ont mis en évidence une réponse IgE chez des souris SCID reconstituées avec les CMN de patients allergiques au pollen de bouleau et ayant des taux d'IgE inférieurs à  $350$  UI/ml. Cependant, les CMN étaient isolées au moment de la saison pollinique, c'est-à-dire quand les populations cellulaires B activées étaient en quantité suffisamment importantes pour produire des IgE humaines chez les souris SCID [Steinsvik, 1997].

Dans notre cas, non seulement les caractéristiques immunologiques des donneurs sont différentes de celles d'Ito *et al*, et Spiegelberg *et al* (taux d'IgE totales sériques inférieurs), mais encore, en injectant moins de cellules lors de la reconstitution, le nombre de cellules B matures (voire différenciées) transférées est beaucoup plus faible. En effet, la production spontanée d'IgE chez toutes les souris SCID reconstituées avec des CMN patients allergiques est faible (inférieure à  $2,2$  UI/ml), en particulier 2 semaines après la reconstitution. Le taux d'IgE augmentant après la nébulisation, nous pouvons supposer que celle-ci participe à l'induction de la différenciation de cellules B matures, et vraisemblablement à leur multiplication.

Dans nos conditions expérimentales, la production d'IgE apparaît spécifique de l'allergène. Premièrement, une production d'IgE significative n'est observée que chez les souris SCID ayant inhalé du Dpt après reconstitution avec les CMN de patients sensibles à *cet* allergène. Deuxièmement, bien qu'ayant pu être analysée sur un nombre limité de souris SCID "allergiques", la présence d'IgE spécifiques a été mise en évidence (CMN provenant de 2



patients allergiques). A l'inverse, il a été montré que des souris SCID reconstituées avec les cellules de patients allergiques au pollen de bouleau produisent des IgE humaines, mais que cette réponse n'est pas modifiée par une immunisation i.p. avec l'allergène et que très peu de souris produisent des IgE spécifiques [Steinsvik, 1997]. Le nombre de cellules humaines injectées était supérieur au nôtre ( $25-60 \times 10^6$ ), mais les doses d'allergène utilisées étaient peut être trop faibles pour stimuler la synthèse d'IgE. Enfin, il n'est pas exclu que le mode d'administration sous forme d'aérosol soit plus efficace que l'injection i.p.

*Par conséquent, une stimulation antigénique des voies respiratoires des souris SCID humanisées induit une production d'IgE par des cellules humaines préalablement activées chez le patient. Ces cellules, après transfert, sont donc susceptibles de proliférer et de se différencier sous l'effet de l'antigène et de signaux (comme l'IL-4) délivrés par les lymphocytes T helper, dont certains sont spécifiques de l'allergène.*

Différentes populations cellulaires peuvent être mises en cause dans la production d'IgE humaines chez la souris SCID humanisée après exposition allergénique. La production d'IgE spécifiques vis-à-vis de Dpt est le résultat de la stimulation de cellules T et B mémoires spécifiques de l'allergène. Il a été montré que la production d'IgE humaines est observée uniquement lorsque les souris SCID sont transplantées avec des cellules B humaines en présence de lymphocytes T helper exprimant le phénotype mémoire [Martensson, 1994], et que les monocytes ne sont pas absolument nécessaires [Martensson, 1994; Walker, 1994]. En présence de cellules T CD45RA+, des cellules B humaines activées et de type lymphoblaste sont dans un état d'anergie suite à l'absence de signaux costimulateurs adéquats [Martensson, 1994]. Dans le système SCID, des cellules T CD4+ mémoires humaines spécifiques de l'allergène peuvent activer des cellules B humaines de manière spécifique de l'antigène, et les cellules B peuvent être considérées comme des cellules présentatrices d'antigène [Duchosal, 1992b; McCune, 1991]. Après l'injection de cellules humaines dans la cavité péritonéale de la souris SCID, le nombre de cellules T et B décroît et la majorité des populations cellulaires restantes, pouvant recirculer ou coloniser les tissus murins expriment le phénotype mémoire [Tary Lehmann, 1992]. Dans nos conditions, la production d'IgE humaine a été uniquement observée après inhalation de Dpt, et seulement chez les souris SCID reconstituées avec les cellules de patients sensibles à Dpt; ainsi les IgE n'étaient pas passivement sécrétées. Le site de

production des IgE humaines chez la souris SCID est inconnu actuellement, mais un parallèle peut être fait avec des modèles animaux pour lesquels le site d'induction de la production d'IgE après inhalation d'antigène a été analysé. Il a été démontré que l'induction de la synthèse d'IgE commençait dans les ganglions régionaux drainant le tractus respiratoire et continuait dans la rate chez les rats et les souris [Gerbrandy, 1976; Sedgwick, 1983; Sedgwick, 1985b]. Ainsi, après inhalation d'OVA par des rats, les cellules productrices d'IgE sont détectées pour 50% au niveau du BALT (tissu lymphoïde associé aux bronches) et 25% au niveau du GALT (tissu lymphoïde associé à l'intestin), 5 semaines après le début des inhalations [Renz, 1994b; Sedgwick, 1983; Sedgwick, 1985b]. Cependant, la souris SCID ne possédant pas de telles structures lymphoïdes, il faut envisager une migration des cellules humaines du péritoine vers les poumons et/ou les intestins, et ensuite la formation de structures lymphoïdes chimères. Cependant, Martino *et al* considèrent que la production d'Ig par la souris SCID s'effectue au niveau de la cavité péritonéale [Martino, 1993]. Néanmoins, dans notre modèle, bien que les cellules soient injectées par voie i.p., l'allergène est inhalé et même ingéré mais le devenir et la localisation précise au niveau des structures lymphoïdes reste encore à déterminer. Cependant, comme la production d'IgE n'a lieu de façon significative que si cette nébulisation est effectuée, on peut penser qu'un contact a lieu entre l'allergène et les cellules humaines. Le site de rencontre de l'antigène et des cellules humaines reste à préciser. Une des pistes à explorer concerne la migration d'éventuelles cellules dendritiques humaines vers les poumons et organes lymphoïdes. En effet, le maintien à long terme d'une réponse IgG chez le rat après exposition à un aérosol d'antigène est induite au niveau de ganglions drainant le site d'immunisation contenant des CPA, en particulier des cellules dendritiques, capables d'une rétention de l'antigène [Bice, 1991]. La présence de CPA humaines a été examinée dans les poumons murins avec le marqueur CD68, exprimé par les macrophages et les monocytes, mais aucune cellule positive n'avait été détectée (données non présentées).

La production d'IgE peut se poursuivre dans la rate. En effet, un infiltrat de cellules humaines a été détecté dans la rate et le thymus de souris SCID développant un infiltrat pulmonaire de cellules humaines. A l'inverse, pas ou peu de cellules humaines ont été détectées dans les organes murins des souris SCID humanisées n'ayant pas inhalé l'allergène. Dans ce cas, l'absence de cellules humaines est en accord avec d'autres études. En particulier, en utilisant des méthodes de détection similaire aux nôtres, Martino *et al* ont détecté très peu de cellules humaines sur des sections d'organes murins tels que la rate et le thymus, 10 semaines après reconstitution avec  $20 \times 10^6$  CMN de donneurs normaux. Zero à 11 cellules humaines par

champ ont été détectées selon le nombre de cellules transférées, le statut d'infection par EBV du donneur ou le moment auquel les souris SCID ont été sacrifiées [Martino, 1993]. Dans notre étude, les profils phénotypiques des infiltrats spléniques et thymiques sont différents de ceux du poumon, en particulier pour l'expression de marqueurs tels que le CD45RO et le CD11a (plus élevé dans les poumons) et le CD20 (plus faible dans les poumons). Dans le thymus des souris SCID allergiques sensibilisées à Dpt, les cellules humaines sont des cellules T (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) et B (CD20<sup>+</sup>), principalement activés (HLA-DR). Certaines études ont démontré qu'une reconstitution du thymus pouvait avoir lieu lorsque les cellules humaines étaient préalablement activées. Six à 8 semaines après le transfert de CMN humaines activées par l'hormone de croissance humaine ou un Ac anti-CD3, des cellules humaines CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> et HLA-DR<sup>+</sup> sont détectées dans le thymus [Murphy, 1992b]. La présence de cellules B CD19<sup>+</sup> a également été observée dans des thymus fœtaux humains co-transplantés avec du foie fœtal dans la souris SCID [Vandekerckhove, 1993]. Ces migrations sont probablement à mettre en relation avec l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules humaines. Dans la rate des souris SCID allergiques, tout comme dans le thymus, des cellules B humaines ont été détectées et environ la moitié d'entre elles étaient IgE<sup>+</sup>. Peu de cellules B humaines infiltrant la rate étant positives pour le CD23, structure liant l'IgE, qui n'est pas exprimée sur les plasmocytes [Banchereau, 1992], il est donc possible que les cellules IgE<sup>+</sup> humaines soient des cellules produisant l'IgE. De plus, comme des transcrits productifs pour l'IgE ont été détectés par RT-PCR dans les rates des souris SCID allergiques (données non présentées), la rate pourrait être un des sites de production des IgE. D'un autre côté, dans le thymus le nombre de lymphocytes B était corrélé avec celui de cellules IgE<sup>+</sup>. De plus comme le nombre de cellules CD23<sup>+</sup> était similaire à celui des cellules IgE<sup>+</sup>, nous pouvons supposer que les IgE soient fixés au CD23. Ceci suggère que les lymphocytes B pourraient porter les IgE par leurs récepteurs correspondants. Le rôle de telles cellules B IgE<sup>+</sup> dans le thymus n'est pas clair, bien qu'elles puissent fonctionner en tant que cellules présentatrice d'antigène.

*Par conséquent, bien que le site de rencontre de l'antigène et des cellules spécifiques reste à découvrir, la rate apparaît être un site potentiel de production de l'IgE chez la souris SCID allergique. Néanmoins, il est fort probable que cet organe lymphoïde ne soit pas le site d'initiation de la synthèse d'IgE, ni même l'endroit de rétention du Dpt.*

Certains paramètres conditionnant la production d'IgE humaines chez la souris SCID ont été évalués. Nous avons montré que suivant le protocole 1 (4 inhalations 15 jours après la reconstitution) 11 lots sur 21 présentaient une très faible production spontanée et inductible, alors que les autres lots ne présentaient aucune réponse IgE. Nous avons émis l'hypothèse que cette faible reproductibilité était liée à une efficacité de reconstitution variable d'une souris à l'autre et d'un donneur à l'autre. Néanmoins, la mise en évidence d'une absence complète de production d'IgG aurait été un argument plus convaincant. Aucune des variables dépendantes du patient (taux d'IgE totales et spécifiques, polysensibilisation, antécédant d'eczéma ou pourcentages de cellules lymphocytaires T, B ou monocytaires injectées) n'ont pu être corrélées au succès de la greffe des cellules humaines dans la souris SCID. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir évaluer le nombre de cellules mémoires, et en particulier le nombre de cellules mémoires spécifiques de Dpt. De plus, la variation de la reconstitution peut être liée à la résistance de l'hôte murin à la greffe de cellules humaines. Deux méthodes ont été envisagées pour surmonter ce problème: premièrement une injection i.p. de Dpt au moment de la reconstitution, deuxièmement une injection d'Ac ASGM1 anti-cellules Natural Killer murines (Ac dirigés contre l'asialo GM1, marqueur membranaire des cellules NK) avant la reconstitution.

M. Tary-lehman a décrit une diminution du nombre de cellules humaines au niveau du péritoine dans les 2 semaines après injection. Durant cette période, les cellules mémoires et les cellules réactives vis-à-vis de l'hôte murin sont sélectionnées [Tary Lehmann, 1992]. L'idée était donc de stimuler spécifiquement les cellules humaines dès leur injection pour éviter cette destruction cellulaire et surtout pour accroître le nombre de cellules humaines spécifiques vis-à-vis de Dpt. De plus il a été montré qu'une stimulation *in vitro* des cellules humaines avant leur injection augmente l'efficacité de la reconstitution (par exemple, stimulation par un anti-CD3 [Murphy, 1993b], de l'IL-4 recombinante humaine [Bombil, 1996] et des chimiokines comme le RANTES ou le MIP-1 $\beta$  [Murphy, 1996]). Dans notre cas, nous avons préféré stimuler les cellules *in vivo*, par injection i.p. de Dpt au moment de la reconstitution, mais nous n'avons observé qu'une faible augmentation du taux de reconstitution. Ces résultats peuvent s'expliquer par le faible nombre de cellules spécifiques de l'antigène qui vont pouvoir être stimulées. De plus ces cellules sont dans un milieu qui peut leur être hostile à cause de la présence de cellules NK et même de macrophages et de neutrophiles murins [Fraser, 1995b; Murphy, 1992a; Santini, 1995]. Par conséquent, le temps que les cellules humaines produisent suffisamment de

cytokines pour proliférer et activer d'autres cellules, beaucoup de cellules peuvent être éliminées.

Nous nous sommes donc consacrés à l'autre versant du problème, i.e nous avons cherché à diminuer les capacités de l'hôte à détruire les cellules humaines. Certaines études ont montré que les souris SCID pouvaient résister aux cellules humaines grâce à leurs cellules NK [Murphy, 1992a]. Il est possible de supprimer ces cellules NK par l'administration d'ASGM1. Une injection unique d'anticorps ASGM1 la veille de l'injection des cellules humaines, augmente la prise de la greffe, en faisant passer le pourcentage de cellules CD3<sup>+</sup> de 1,9 à 9% dans la rate [Murphy, 1992a]. Nous avons également observé une nette amélioration de la prise de greffe des cellules humaines dans l'hôte murin, puisqu'à ce jour, tous les lots de souris SCID "allergiques" produisent des IgE spontanément, ainsi qu'après exposition à un aérosol de Dpt. Cependant avec le traitement par l'ASGM1, les souris SCID reconstituées avec les cellules de patients non allergiques (taux d'IgE des patients de 14, 39 et 80 UI/ml) produisent des quantités non négligeables d'IgE humaines (taux d'IgE totales pouvant atteindre 79 UI/ml). Nous pouvons émettre l'hypothèse suivante: l'ASGM1 en éliminant les cellules NK de l'hôte, augmente la reconstitution par les cellules humaines quelles qu'elles soient, donc accroît leur possibilité de prolifération. De plus, même chez des sujets témoins, il existe des cellules spécifiques de Dpt capables de produire des IgG spécifiques après stimulation avec l'allergène. On peut donc imaginer que de telles cellules puissent être stimulées, d'autant que l'on favorise cette stimulation en injectant du Dpt en i.p. au moment de la reconstitution et que l'on peut détecter des IgG spécifiques chez toutes les souris SCID humanisées (données non présentées). Ces cellules pourraient stimuler de manière non spécifique des cellules B $\epsilon$ . De plus, S. Nonoyama *et al* suggéraient qu'après transfert dans la souris SCID irradiée (i.e une souris sans aucune défense immunitaire), les cellules B mémoires issues du donneur pourraient être spontanément polyclonalement activées et pourraient se différencier de manière continue en cellules produisant des Ac [Nonoyama, 1993]. Il est donc capital de vérifier la spécificité des IgE produites chez les souris SCID non "allergiques".

Cependant, alors que le traitement par l'ASGM-1 augmente la production d'IgE totales par les souris SCID non "allergiques", il n'augmente pas le niveau de production par les souris SCID "allergiques". L'ASGM-1 n'intervient donc pas directement sur la synthèse d'IgE. De plus il est possible que la production d'IgE chez les souris SCID "allergiques" ait atteint sa limite supérieure, c'est-à-dire que toutes les cellules susceptibles de produire des Ac sont déjà en activité. Il serait donc intéressant de voir si dans notre modèle, les cellules humaines

produisant des IgE ont déjà commuté, ou si l'inhalation de Dpt peut induire un switch des cellules B $\mu$  ou B $\gamma$  vers les cellules B $\epsilon$ .

Enfin, malgré l'augmentation de l'efficacité de reconstitution, une hétérogénéité de réponse intra-groupe persiste. Cette hétérogénéité est liée à 2 paramètres biologiques: la réactivité propre de chaque souris, même si elles sont issues d'un même lot initial, et l'introduction de cellules humaines. L'hétérogénéité de réponse chez la souris SCID humanisée a déjà été montrée dans de nombreuses publications et notamment en ce qui concerne la réponse IgE [Kilchherr, 1993; Nonoyama, 1993; Steinsvik, 1997].

*Par conséquent, en absence de traitement préalable le pourcentage d'efficacité de production d'IgE par les souris SCID reconstituées avec les cellules de patients allergiques à Dpt et exposées à un aérosol de cet allergène, est faible (inférieur à 50%). Des 2 solutions envisagées (traitement par l'ASGM1 avec ou sans injection i.p. de Dpt), seul le traitement par l'Ac anti-cellules NK plus l'injection de Dpt s'est révélé efficace. Néanmoins, même avec un prétraitement des souris, les productions d'IgE humaines restent hétérogènes au sein d'un lot de souris SCID reconstituées avec les cellules d'un même donneur.*

Nous avons également étudié la cinétique de production des IgE totales humaines chez les souris SCID "allergiques". La réponse est maximale entre J15 et J21 selon les donneurs, puis décroît jusque J45. Une variation dans la cinétique de production en fonction des donneurs a également été montrée dans la littérature [Steinsvik, 1997]. Dès J30, la production d'IgE totales diminue. Cette diminution semble dépendante de l'existence de cellules CD8<sup>+</sup> régulatrices, puisque la déplétion des cellules CD8<sup>+</sup> avant l'injection des cellules humaines dans les souris SCID maintient la production d'IgE qui reste élevée à J45 contrairement à la production d'IgE chez des souris SCID reconstituées avec les CMN totales. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont montré que la déplétion en cellules CD4<sup>+</sup> ou CD2<sup>+</sup> de cellules provenant de donneurs atopiques inhibait la production d'IgE, mais que la déplétion en cellules CD8<sup>+</sup> augmentait la production spontanée d'IgE humaines chez les souris SCID. En absence de CD8<sup>+</sup>, la synthèse d'IgE passe donc d'un état transitoire à un état persistant, mais la production d'IgG (augmentée progressivement jusqu'à 5 semaines) n'est pas modifiée [Ito, 1992]. Chez le rat, il a été montré que l'inhalation répétée de faibles doses d'antigène induisait un état de tolérance spécifique. La production d'IgE est alors transitoire et de faible amplitude, et semble

liée à l'apparition de cellules CD8<sup>+</sup> suppressives [Sedgwick, 1985a]. Dans de nombreux modèles de rongeurs (rat, souris), la déplétion *in vivo* en cellules CD8<sup>+</sup> après la période d'immunisation induit une réponse IgE persistante [Holmes, 1997; MacAry, 1997], et l'injection de cellules CD8<sup>+</sup> provenant de souris sensibilisées diminue la réponse IgE [Renz, 1994a]. Cette activité régulatrice de la production d'IgE n'apparaît pas liée au potentiel cytolytique des cellules CD8<sup>+</sup>, ni à leur capacité à synthétiser de l'IFN- $\gamma$  *in vitro* [MacAry, 1997]. En fait, l'action des cellules CD8<sup>+</sup> sur la production d'IgE dans de tels modèles est bimodale. Après immunisation i.p. de rats avec l'OVA, les réponses cellulaires T spécifiques de l'OVA sont premièrement détectées dans les ganglions drainants, puis dans la rate. La déplétion *in vitro* des cellules CD8<sup>+</sup> des ganglions lymphatiques réduit la réponse spécifique de l'OVA des cellules T CD4<sup>+</sup> des ganglions, alors que la déplétion *in vitro* des cellules CD8<sup>+</sup> de la rate augmente la réponse spécifique de l'OVA des cellules T CD4<sup>+</sup> de la rate, suggérant une fonction helper précoce et une fonction suppressive tardive [Holmes, 1997]. En parallèle, la déplétion *in vivo* des cellules CD8<sup>+</sup> avant immunisation, diminue la production d'IgE, alors que la déplétion *in vivo* au moins 12 jours après immunisation augmente la production d'IgE, suggérant l'existence de populations distinctes de cellules CD8<sup>+</sup> immunorégulatrices [Holmes, 1997; Kemeny, 1995]. Dans notre système, la déplétion des cellules CD8<sup>+</sup> avant l'injection équivaut à une déplétion avant immunisation dans les modèles précédemment décrits. Cependant, les cellules proviennent de patients allergiques et sont donc déjà sensibilisés, et la déplétion est en fait à rapporter à une déplétion post-immunisation, c'est-à-dire, à l'élimination de la population CD8<sup>+</sup> régulant tardivement la production d'IgE. Nos résultats sont donc concordants avec ceux décrits dans la littérature.

*Par conséquent, la stimulation des souris SCID allergiques par le Dpt provoque une réponse IgE transitoire, régulée notamment par des cellules CD8<sup>+</sup> potentiellement suppressives. Les mécanismes de cette régulation restent à préciser et permettraient de mieux comprendre le rôle des populations de cellules CD8<sup>+</sup> pouvant avoir une fonction helper ou suppressive sur la production d'IgE, notamment par la synthèse de cytokines de type 1 et 2.*

## **2- Induction d'infiltrat de type inflammatoire chez des souris SCID après inhalation d'allergène**

La deuxième observation principale de notre travail est qu'un infiltrat pulmonaire de cellules humaines a été détecté uniquement chez les souris SCID allergique après nébulisation de Dpt.

Nous avons montré que les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires et activées représente le type cellulaire humain majeur dans les infiltrats pulmonaires des souris SCID allergiques exposées à un aérosol de Dpt. L'infiltrat cellulaire pulmonaire apparaît être étroitement lié à l'exposition à l'allergène et au statut allergique du patient puisque des souris SCID allergiques non sensibilisées par des aérosols, et des souris SCID non allergiques exposées au Dpt ne présentent pas d'infiltrat pulmonaire de cellules humaines CD45<sup>+</sup>. De plus, puisqu'aucune réaction de type inflammatoire n'est détectée chez les souris SCID reconstituées avec les cellules de patients sensibles à un autre aéroallergène que Dpt, comme le pollen, et exposées à des aérosols de Dpt, une stimulation non spécifique des cellules de donneur atopique ne peut pas expliquer l'infiltrat pulmonaire (données non présentées).

Il est peu probable que cet infiltrat de cellules humaines soit dû à une réaction xénogénique de greffon contre hôte (XGVHD). Trois arguments peuvent être développés contre une telle hypothèse de XGVHD. (1) le nombre de cellules humaines utilisé pour induire une réaction de greffon contre hôte est très élevé ( $10^8$  -  $10^9$  CMN) [Huppés, 1992; Murphy, 1992a] comparativement aux  $10^7$  CMN humaines transférées ici dans les souris SCID. (2) la XGVHD apparaît être liée à une augmentation de la mortalité et un nombre accru de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> humains dans la rate [Huppés, 1994]. A l'inverse dans ce travail, le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> était toujours inférieur à celui des CD4<sup>+</sup> dans la rate des souris SCID allergiques exposées au Dpt. (3) une manifestation prédominante de la XGVHD implique une splénomégalie, résultat de l'expansion de cellules murines hématopoïétiques dans la rate de ces chimères xénogéniques; mais aucune des souris incluses dans cette étude ne présentait cette caractéristique.

Des éosinophiles ont été détectés dans les infiltrats cellulaires humains péribronchiques chez les souris SCID allergiques exposées au Dpt. Puisque les cellules humaines injectées étaient des CMN humaines purifiées dépourvues de cellules polynucléaires, et qu'une analyse immunohistochimique avec un Ac anti-MBP spécifique humain s'est révélée négative, les éosinophiles sont probablement d'origine murine. Il est alors possible de penser que les



éosinophiles murins pourraient être attirés soit directement par de l'IL-5 ou du RANTES humains, ou indirectement par des cellules murines activées par les cellules humaines CD45+ infiltrantes. La première hypothèse est supportée par le fait que l'IL-5 humaine peut stimuler des éosinophiles murins [Fattah, 1990].

*Par conséquent, l'infiltrat de cellules humaines dans le poumon apparaît strictement dépendant de l'allergène, et indique qu'après inhalation de l'allergène, les souris SCID allergiques présentent un recrutement de cellules T humaines dont le phénotype (lymphocytes T activés et mémoires préférentiellement CD4<sup>+</sup>) est similaire à celui observé chez les patients asthmatiques [Azzawi, 1990; Bradley, 1991; Pilewski, 1995].*

Deux facteurs principaux pourraient expliquer la migration des cellules humaines dans la souris SCID allergique: l'intervention des molécules d'adhérence, et le rôle de facteurs chimioattractants.

L'expression des molécules d'adhérence LFA-1, ICAM-1 et VLA-4 a pu être détectée à la surface des leucocytes humains infiltrant les organes des souris SCID allergiques, en particulier dans les poumons. Comme la chaîne  $\alpha$  du LFA-1 était plus exprimée à la surface des cellules humaines infiltrant les poumons, comparativement au VLA-4 et à l'ICAM-1, nous pouvons supposer que le LFA-1 humain pourrait jouer un rôle préférentiel dans l'afflux pulmonaire, et plus précisément en interagissant avec son ligand murin, l'ICAM-1. En effet, les cellules T humaines peuvent se lier à l'ICAM-1, au VCAM-1, à la fibronectine et au collagène de type IV murins immobilisés [Renz, 1994b; Taub, 1994]. Ainsi l'infiltrat pulmonaire chez la souris SCID pourrait en partie être expliqué par la migration des leucocytes humains à travers la barrière endothéliale murine, par l'intermédiaire de l'ICAM-1.

Les rôles respectifs des différentes molécules d'adhérence dans l'établissement de l'infiltrat pulmonaire allergique est encore controversé. Des études réalisées chez l'homme à partir de biopsies bronchiques après stimulation antigénique segmentaire ou non, ont montré que l'expression de l'ICAM-1, la E-sélectine et le VCAM-1 est augmentée dans la microvasculature bronchique dans l'asthme allergique. De plus, bien qu'aucune corrélation n'ait été mise en évidence avec l'expression de molécules d'adhérence endothéliales, un nombre accru de leucocytes exprimant le LFA-1, Mac-1 et VLA-4 a également été détecté dans la sous-muqueuse bronchique [Gosset, 1995; Ohkawara, 1995; Pilewski, 1995]. L'utilisation de

différents modèles animaux ne permet pas d'établir de conclusions définitives sur l'importance de l'interaction LFA-1/ICAM-1 dans l'infiltration lymphocytaire dans l'asthme. Dans un modèle d'asthme chez le singe, la neutralisation *in vivo* de l'ICAM-1 atténue seulement l'infiltrat d'éosinophiles et le développement d'une HRB [Wegner, 1990]. A l'inverse, dans un modèle murin d'inflammation des voies aériennes, le traitement avec un Ac anti-ICAM-1 n'affecte pas l'infiltrat d'éosinophiles dans les voies aériennes de la souris mais réduit l'infiltrat des lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> induit par l'antigène. Cependant, l'expression de l'ICAM-1 sur l'endothélium n'était pas significativement augmentée, 24 heures après un challenge allergénique [Nakajima, 1994], contrairement à ce qui se passe chez l'homme. Finalement un Ac anti-ICAM-1 inhibe l'HRB de rats Brown-Norway sensibilisés sans supprimer le processus inflammatoire associé, i.e sans réduire le nombre de lymphocytes et de neutrophiles [Sun, 1994].

Ici, le modèle chimère homme-souris SCID que nous avons développé, pouvant permettre une meilleure approche du comportement des lymphocytes humains dans l'asthme, nous avons évalué l'effet d'un Ac anti-ICAM-1 murine sur la migration des cellules vers les poumons. Nous avons montré au cours de 2 expériences, réalisées respectivement sur 7 et 8 souris, que le traitement par l'Ac tendait à augmenter l'infiltrat pulmonaire de cellules humaines. Toute une série de questions et d'hypothèses peuvent être avancées.

Compte tenu de toutes les expériences précédemment citées mettant en avant le rôle de l'interaction LFA-1/ICAM-1, les résultats attendus étaient les suivants: soit l'ICAM-1 jouait un rôle et l'infiltrat était réduit, soit il n'intervenait pas dans la migration et aucune modulation n'était visible. La première remarque est d'ordre technique. En effet, nous pouvons tout d'abord nous demander si l'Ac a bien atteint sa cible et s'il a été fourni en quantité suffisante. L'Ac a été administré au moyen de pompes microosmotiques permettant une diffusion de la molécule, et il est fort probable qu'une injection par voie intraveineuse, bien que techniquement plus difficile, aurait été plus efficace. D'un autre côté, l'absence d'effet de l'Ac peut s'expliquer par une intervention faible ou nulle de l'ICAM-1 murine. Ainsi, ni l'injection d'Ac anti-ICAM-1 seul, ni celle d'un Ac anti-LFA-1 seul, n'inhibe l'apparition de lésions inflammatoires dans un modèle de syndrome de Sjögren chez la souris SCID, alors que l'injection conjointe des 2 Ac prévient le transfert adoptif de la pathologie [Hayashi, 1995]. Ainsi plusieurs hypothèses peuvent expliquer une non-réduction du nombre de cellules humaines infiltrant le poumon.

Cependant, cela n'explique pas pourquoi le nombre de cellules humaines est accru dans les poumons des souris SCID "allergiques" traitées par l'Ac anti-ICAM-1. Une première hypothèse est liée à la présence d'ICAM-1 à la surface de certaines cellules NK [Perez Villar, 1996], macrophages [Goebeler, 1993] et neutrophiles [Kuijpers, 1991]. Comme ces cellules sont susceptibles d'intervenir dans un processus de rejet des cellules humaines [Fraser, 1995b; Murphy, 1992a; Santini, 1995], il n'est pas exclu que l'Ac ait pu améliorer la reconstitution des souris SCID, d'autant que lors de la première expérience, l'Ac avait été administré avant la reconstitution et qu'aucune production d'IgE n'avait été mise en évidence dans les souris traitées avec l'Ac contrôle. Deuxièmement, il est possible que cet afflux des cellules humaines dans les poumons des souris SCID "allergiques" traitées par l'Ac anti-ICAM-1 murine soit non spécifique. Il pourrait être lié soit à une activation cellulaire permettant la libération de divers médiateurs, soit à l'intervention d'autres molécules d'adhérence dont l'expression pourrait être accrue consécutivement à l'administration de l'Ac. Afin de vérifier l'hypothèse de la non-spécificité, il faudrait analyser d'une part d'autres organes murins pour évaluer la présence de cellules humaines, et d'autre part les poumons pour la présence de cellules murines dans l'infiltrat.

*Par conséquent, suite à l'observation que la chaîne  $\alpha$  du LFA-1 était plus fortement exprimée que le VLA-4 et l'ICAM-1, et ceci uniquement dans les poumons, nous avons émis l'hypothèse que l'interaction entre le LFA-1 des leucocytes humains et l'ICAM-1 des cellules endothéliales murines pourrait être un des facteurs déterminant de la migration des cellules humaines vers les poumons des souris SCID "allergiques" après l'inhalation de Dpt. Nous n'avons pas, à ce jour, réussi à confirmer ou infirmer cette hypothèse.*

D'un autre côté, le couple LFA-1/ICAM-1 n'est pas simplement impliqué dans l'adhésion cellulaire, mais joue également un rôle dans l'activation cellulaire en tant que molécule accessoire. A la surface des CPA, sont présentes les molécules accessoires B-7, ICAM-1, LFA-3 et VCAM-1. La réponse proliférative induite par des chimères Ig-ICAM-1 ou Ig-VCAM-1 immobilisées est plus forte que celle induite par des chimères Ig-B-7 ou Ig-LFA-3 immobilisées, et les cellules T CD4<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> sont plus sensibles à cet effet costimulateur [Damle, 1992]. Pour les cellules T le signal médié par le LFA-1, et en particulier sa chaîne  $\alpha$ , contribue à une phase très précoce de transduction de signal au cours de l'activation médiée par le CD2. De plus, un Ac anti-chaîne  $\alpha$  du LFA-1 potentialise l'activation des cellules T induite

par le CD3 [Yamada, 1992]. Enfin, l'injection d'Ac anti-LFA-1 à des souris sensibilisées par injection i.p. d'OVA, inhibe les réponses IgE primaire et secondaire. A l'inverse, un Ac anti-ICAM-1 seul n'inhibe pas la production d'IgE. Ce résultat peut s'expliquer par l'existence d'autres ligands du LFA-1: l'ICAM-2 et -3 [Tanaka, 1995]. Chez les souris SCID "allergiques", nous avons détecté des cellules humaines portant le LFA-1 et/ou l'ICAM-1 dans les 3 organes. La costimulation consécutive à l'interaction LFA-1/ICAM-1 pourrait participer, chez les souris SCID "allergiques", à une activation efficace des cellules T humaines. De plus, les lymphocytes T mémoires expriment fortement le LFA-1, ce qui est le reflet d'une activation récente [Hviid, 1993]. Dans les poumons des souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt, les pourcentages de cellules mémoires CD45RO<sup>+</sup> sont similaires à ceux des cellules CD11a<sup>+</sup>, permettant d'avancer l'hypothèse que la plupart des cellules humaines détectées dans les poumons 2 mois après l'inhalation du Dpt pourraient avoir été récemment stimulées. Dans ce cas, une rétention de l'antigène dans les poumons peut être suspectée. Il serait de plus pertinent d'évaluer l'expression de l'ICAM-2 et -3, autres ligands du LFA-1 pouvant être exprimés à la surface des lymphocytes, et impliqués dans la costimulation des lymphocytes T [Bossy, 1994; Simmons, 1995], et d'effectuer une étude cinétique de l'expression des différentes molécules d'adhérence humaines chez la souris SCID "allergique".

La participation de ces molécules costimulatrices pourrait être importante pour la production d'IgE (discutée dans le paragraphe 1). En effet, les cellules T fonctionnelles pourraient produire des cytokines intervenant dans la production d'IgE et la migration d'autres leucocytes.

Les IgE pourraient en retour jouer un rôle dans le développement de l'infiltrat cellulaire. En effet, l'augmentation de la synthèse d'IgE précède l'afflux des cellules humaines dans les poumons de souris SCID "allergiques", et aucune production d'IgE ni d'infiltrat pulmonaire n'a été observée chez des souris SCID reconstituées avec les CMN de sujet immunisé vis-à-vis de la toxine tétanique (TT) et exposées à des aérosols de TT (données non présentées). L'IgE pourrait favoriser, par le biais du CD23, la capacité des cellules B à présenter l'allergène aux lymphocytes Th2 et ainsi augmenter la prolifération et l'activation des cellules T. *In vitro*, des cellules B en présence de complexes Derp 2-IgE spécifiques de Derp 2, sont capables de présenter l'antigène à des clones T CD4<sup>+</sup> spécifiques. Cette présentation d'antigène est inhibée par un Ac anti-CD23 [van der Heijden, 1993]. L'intervention des IgE dans la migration des cellules T vers les poumons des souris SCID "allergiques" pourraient être appréhendée par la

déplétion des CMN en cellules B avant l'injection aux souris SCID et l'évaluation de la migration des cellules humaines introduites. Ces expériences devraient permettre d'analyser la migration des cellules T indépendamment de la production d'IgE.

*Par conséquent, il est possible qu'une réactivation des cellules T humaines ait lieu dans les poumons des souris SCID "allergiques" et contribue à une production de cytokines intervenant dans le recrutement d'autres cellules.*

Outre l'intervention des molécules d'adhérence, les cellules humaines pourraient infiltrer spécifiquement le poumon consécutivement à l'action de molécules chimioattractantes. Une première piste a été suivie: nous avons détecté de l'ARNm codant pour l'IL-16 humaine dans les poumons de souris SCID "allergiques", 30 jours après exposition à un aérosol de Dpt. *In vitro*, l'IL-16 est un facteur chimioattractant des lymphocytes CD4<sup>+</sup>, il est produit notamment par les cellules T CD8<sup>+</sup> [Laberge, 1996a], les éosinophiles [Lim, 1996] et les cellules épithéliales bronchiques [Bellini, 1993]. Sa synthèse est augmentée par l'histamine [Bellini, 1993] et la sérotonine [Laberge, 1996a]. L'IL-16 est présente en quantité accrue dans les poumons des patients asthmatiques [Cruikshank, 1994]. Ainsi, la détection de l'IL-16 humaine est à rapprocher de la mise en évidence d'un infiltrat de cellules CD4<sup>+</sup> prédominantes, dans les poumons murins 2 mois après l'inhalation de Dpt. L'activité chimioattractante de l'IL-16 humaine n'a pas encore été démontrée *in vivo*. Ce point devra être analysé avant d'évaluer l'effet d'un Ac anti-IL-16 sur la migration des cellules humaines vers les poumons des souris SCID "allergiques" après inhalation de Dpt.

De plus des expériences préliminaires ont montré qu'il était possible de détecter d'autres cytokines chimioattractantes dans les poumons des souris SCID "allergiques" après inhalation de Dpt. Ainsi, nous avons détecté dans certains poumons de l'ARNm codant pour l'IL-8 et le RANTES humains (données non présentées), chimiokines pluripotentes attirant notamment des lymphocytes (IL-8 et RANTES) et les éosinophiles (RANTES).

*Par conséquent, la migration des cellules humaines vers les poumons de souris SCID "allergiques" après inhalation de Dpt pourrait s'expliquer par une activation des cellules au site de rencontre avec l'allergène entraînant d'une part l'expression de molécules d'adhérence, et d'autre part la production de molécules chimioattractantes spécifiques humaines.*

### **3- Développement d'une hyperréactivité bronchique chez des souris SCID après inhalation d'allergène**

Finalement, en analysant la résistance des voies aériennes au carbacol, nous avons montré que les souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol de Dpt selon le protocole 3 présentent une HRB par rapport à des souris SCID non "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt, et par rapport à des souris SCID non reconstituées exposées ou non à des aérosols de Dpt.

L'allergène majeur de Dpt, Der p1, est doté d'une activité enzymatique thiol-protéase [Chua, 1988] et a été montré augmenter la perméabilité de l'épithélium bronchique *in vitro* [Herbert, 1995]. De plus l'extrait allergénique utilisé pour les inhalations est susceptible de contenir des endotoxines. Cependant, comme la différence de résistance des voies aériennes aux différentes doses de bronchoconstricteur n'est pas significative entre les souris SCID non reconstituées et non exposées à l'allergène, et les souris non reconstituées mais exposées à l'allergène dans les mêmes conditions que les souris reconstituées, nous pouvons conclure que l'HRB mise en évidence chez les souris SCID "allergiques" n'est pas le fait de l'inhalation en elle-même, ni du contact des voies aériennes murines avec le Dpt. Par conséquent, l'HBR n'est pas due à l'activation directe des cellules pulmonaires musculaires murines par l'antigène inhalé, confirmant ainsi que les cellules T et B (absentes chez la souris SCID) participent à l'élaboration de l'HRB [Corry, 1996].

De plus, la différence de résistance des voies aériennes n'est pas significative non plus entre les souris SCID non "allergiques" et exposées au Dpt, et les souris SCID non reconstituées et exposées à l'allergène. Les souris SCID non "allergiques" produisent néanmoins des IgE totales en quantités non négligeable (jusqu'à 79 UI/ml). Donc, la présence et l'activation non spécifique de cellules humaines dans la souris SCID ne suffit pas pour induire une HRB. La seule production d'IgE sérique n'est pas non plus suffisante pour obtenir une HRB. Néanmoins, il n'est pas exclu que l'HRB soit plutôt dépendante d'une réponse IgE spécifique. Dans un modèle de souris sensibilisées à l'OVA, il a été montré que les IgE étaient nécessaires à l'établissement d'une HRB. En effet, des souris déficientes en cellules B sensibilisées à l'OVA ne produisent pas d'IgE spécifiques et ne développent pas d'HRB, contrairement aux souris de type sauvage. L'HRB est rétablie dans la souche déficientes en cellules B lorsqu'une sensibilisation passive avec des IgE murines anti-OVA est réalisée lors du challenge antigénique [Hamelmann, 1997]. De plus, l'injection d'Ac anti-IgE à des souris

sensibilisées à l'OVA inhibe l'infiltrat d'éosinophiles et l'HRB [Heusser, 1997]. Par conséquent, il semble que les immunoglobulines d'isotype E soient nécessaires mais non suffisantes à l'établissement d'une HRB.

A l'inverse les différences de résistance des voies aériennes aux différentes doses de bronchoconstricteur sont significatives entre les souris SCID "allergiques" et non "allergiques" exposées toutes deux à un aérosol de Dpt, et entre les souris SCID "allergiques" et les souris SCID non reconstituées. Nous avons précédemment montré que, 2 mois après l'inhalation de l'allergène, les souris SCID "allergiques" développaient un infiltrat pulmonaire de cellules humaines, contrairement aux souris SCID non "allergiques". L'HRB semble donc dépendante du développement d'un infiltrat de cellules humaines provenant de patients allergiques, consécutif à l'exposition à un aérosol de Dpt. Ceci suggère que le développement de l'HRB pourrait être lié à l'activation de cellules humaines spécifiques de l'allergène présentes au niveau des voies aériennes de la souris. Il est possible que la présence de l'infiltrat pulmonaire de type inflammatoire, et la production de certaines cytokines soient responsables du développement de l'HRB, comme l'ont suggéré divers modèles animaux [Haczku, 1997b; Hessel, 1997a; Kips, 1992a]. Cependant, l'intervention de ces différentes composantes est très controversé. Par exemple, des souris déficientes pour l'IL-4 ne développent pas d'HRB après sensibilisation à l'OVA, contrairement aux souris de type sauvage [Brusselle, 1995]. De plus, la neutralisation *in vivo* de l'IL-4 pendant la période d'immunisation systémique inhibe l'HRB [Corry, 1996]. A l'inverse, l'injection d'Ac anti-IL-4 au moment du challenge allergénique (effectué 4 semaines après l'injection parentérale d'OVA) ne modifie pas l'HRB des souris [Hessel, 1997a]. Une analyse plus précise de l'infiltrat, des cytokines produites et de leur relation avec l'HRB des souris SCID "allergiques" doit donc être également réalisée dans notre modèle.

*En conclusion, nous avons démontré pour la première fois que seule l'exposition, à un aérosol de Dpt, de souris SCID humanisées par injection de cellules de patients sensibles à cet allergène, provoquait une hyperréactivité bronchique. Par conséquent, notre modèle de souris SCID "allergiques" développe, après inhalation de l'allergène spécifique, trois caractéristiques majeures de l'asthme allergique: une **production d'IgE spécifiques**, un **infiltrat pulmonaire de cellules humaines** et une **hyperréactivité bronchique**. Ces animaux pourraient donc être utilisés comme un modèle d'étude in vivo des mécanismes impliqués dans le développement de l'asthme allergique.*



# **PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ouvrent plusieurs perspectives. Nous envisageons d'une part d'utiliser le modèle de la souris SCID humanisée pour évaluer le potentiel thérapeutique de peptides et lipopeptides de Derp 1, et appréhender les facteurs impliqués dans la régulation de la réaction allergique. Les analyses porteront sur les trois paramètres majeurs développés par les souris SCID "allergiques", c'est à dire sur la production d'IgE spécifique de Dpt, sur la réaction de type inflammatoire et sur l'HRB. D'autre part, nous essaierons d'élucider une question qui reste en suspens: comment s'effectue l'initiation de la réponse IgE chez les souris SCID "allergiques" exposées à un aérosol d'allergène? Ceci nous permettra d'appréhender les mécanismes de la présentation de l'antigène.

### **1- Utilisation du modèle de souris SCID "allergique": potentiel thérapeutique des peptides et lipopeptides de Derp 1**

Les lipopeptides sont des peptides sur lesquels est greffée une partie lipidique rendant la molécule liposoluble et permettant son passage dans le cytoplasme cellulaire. Les lipopeptides sont donc susceptibles d'être présentés par le CMH de classe I, et d'induire une réponse T cytotoxique [BenMohamed, 1997].

Nous avons récemment montré que des souris SCID prétraitées par l'Ac ASGM1 (favorisant la colonisation de la souris SCID), et reconstituées avec des CMN issues de patients sensibles à Dpt présentaient une réponse IgE humaine totale après injection de Dpt ou d'un peptide de Derp 1 (démonstré étant immunogène dans une étude préalable [Jeannin, 1993b]) en présence d'alun. L'injection du lipopeptide correspondant au peptide Derp 1 utilisé, réduit sensiblement la production d'IgE. Néanmoins, dans cette expérience préliminaire, le nombre de souris par groupe étant restreint à 4, il n'a pas été possible de conclure. Cependant, la restimulation i.p. avec le Dpt sans adjuvant, 15 jours après, ne permet toujours pas d'atteindre un niveau de production similaire à celui obtenu avec le peptide de Derp 1.

D'autres expériences sont donc nécessaires pour conforter ces résultats. Elles seront réalisées selon le même protocole, mais en absence d'alun, adjuvant favorisant la réponse IgE.

De plus, dans ce modèle, une tolérisation des cellules CD4<sup>+</sup> sera envisagé en administrant le peptide par voie intra-trachéale. En effet, il a été montré que des souris C57BL/6J exposées à de faibles doses de peptide de Der p 1 administré en intra-nasal ne répondent plus à une stimulation immunogénique avec l'antigène intact. L'induction de la

tolérance conduit à une diminution de la production de cytokines *in vitro* par les cellules T isolées, mais la production d'IgE ne semble pas affectée [Hoyne, 1997; Hoyne, 1993].

## **2- Facteurs impliqués dans la régulation de la réaction allergique**

### **2.1- Rôle des populations CD8+ dans la réaction allergique**

Les patients atopiques possèdent un pourcentage de cellules T CD8<sup>+</sup> dans le sang périphérique, inférieur à celui des sujets normaux [Walker, 1992]. Après immunothérapie spécifique, ce pourcentage augmente et pourrait être lié à une augmentation du taux d'IFN- $\gamma$  [Canonica, 1979; Lack, 1997]. De plus, des études dans des modèles de rongeurs ont mis en évidence une production d'IgE transitoire consécutive à une sensibilisation à l'OVA, régulée par des cellules CD8<sup>+</sup> provenant d'animaux sains [Holmes, 1997; MacAry, 1997].

Au cours de la thèse, nous avons mis en évidence une production transitoire d'IgE chez les souris SCID "allergiques" après exposition à un aérosol de Dpt, avec un maximum entre J15 et J21 après l'inhalation. Cependant, cette production persiste après élimination des cellules CD8<sup>+</sup> avant la reconstitution. Afin d'évaluer le rôle d'une cytokine produite par les cellules CD8<sup>+</sup> (l'IFN- $\gamma$ ) dans cette régulation, nous analyserons l'effet d'injections parentérales ou d'inhalations d'IFN- $\gamma$  dès J15 après l'exposition au Dpt de souris SCID reconstituées avec des CMN déplétées en cellules CD8<sup>+</sup>, sur la production d'IgE.

L'effet de la déplétion des cellules CD8<sup>+</sup> sur l'infiltrat de cellules humaines sera également appréhendé. Dans une étude préliminaire, nous avons analysé le pourcentage de cellules humaines dans les poumons de souris SCID ainsi traitées. Les résultats étaient contradictoires: la déplétion en cellules CD8<sup>+</sup> inhibait ou non l'infiltrat selon les souris. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire induite par l'OVA chez la souris, il a été montré qu'une déplétion en cellules CD8<sup>+</sup> augmentait l'infiltrat de cellules inflammatoire [Laberge, 1996b]. Néanmoins, chez le rongeur, il a été suggéré l'existence d'au moins 2 populations de cellules CD8<sup>+</sup>: des cellules induisant une production d'IgE et des cellules inhibant la production d'IgE. D'autres observations sont en faveur d'un rôle potentialisateur des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sur la production d'IgE ou l'inflammation. En effet des cellules CD8<sup>+</sup> activées en présence d'IL-4 acquièrent le phénotype CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>, produisent des cytokines de type 2 et aident les cellules B à

la production d'Ac [Erard, 1993]. De plus, des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques de virus activées en présence d'IL-4 produisent de l'IL-5 et induisent une éosinophilie pulmonaire [Coyle, 1995].

En fonction des résultats de la déplétion en cellules CD8<sup>+</sup> obtenus sur la réaction de type inflammatoire, l'HRB sera également évaluée chez la souris SCID allergique exposée à un aérosol de Dpt.

Outre la polarisation de type 1 ou 2, les cellules CD8<sup>+</sup> sont également capables de produire des molécules chimioattractantes. Par exemple, les lymphocytes CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> ont été montré produire des quantités plus importantes de MIP-1 $\alpha$  et de RANTES, que des lymphocytes CD4<sup>+</sup> qu'ils soient mémoires ou activés [Conlon, 1995], mais les cellules CD8<sup>+</sup> produisent également l'IL-16, molécules chimioattractante spécifique pour les cellules CD4<sup>+</sup> [Laberge, 1996a].

## 2.2- Rôle de l'IL-16 dans la réaction allergique

Décrite à l'origine comme un facteur chimiotactique pour les lymphocytes (le LCF), l'IL-16 a été plus récemment clonée [Cruikshank, 1994]. Son action est suspectée dans l'asthme où elle est exprimée en quantité accrue dans l'épithélium bronchique [Cruikshank, 1995]. De plus, chez des souris sensibilisées par voie i.p. puis intra-trachéale avec l'antigène des globules rouges de mouton, des déplétions *in vivo* ont permis de montrer que le recrutement des leucocytes, sauf des lymphocytes CD8<sup>+</sup>, dépendait largement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Une suppression similaire de la réponse immune est observée après injection de fragments F(ab')<sub>2</sub> spécifiques du CD4 [Curtis, 1991], qui bloquent l'accès de l'IL-16 à son récepteur: le CD4 [Center, 1996]. Comme l'IL-16 est produite par les cellules CD8<sup>+</sup> après stimulation par de l'histamine ou de la sérotonine [Laberge, 1996a], le rôle des cellules CD8<sup>+</sup> peut être suspecté également par sa capacité à produire cette molécule chimioattractante spécifiques des cellules CD4<sup>+</sup>.

Dans un premier temps, nous analyserons *in vivo* l'activité chimiotactique de l'IL-16 humaine chez des souris SCID reconstituées par 10<sup>8</sup> CMN issues de donneurs normaux. Deux voies d'administration seront testées: la voie intra-dermique (site proche du péritoine où sont

injectées les cellules) et la voie intra-trachéale. La présence de cellules humaines au site d'injection sera évaluée par immunohistochimie ou cytométrie de flux.

Dans un deuxième temps, nous envisageons de bloquer spécifiquement l'IL-16 par un Ac injecté dans les voies aériennes, ou à l'aide d'un oligonucléotide anti-sens (ODN). Nous utiliserons un ODN de type phosphorothioate bloquant spécifiquement l'ARNm de l'IL-16 [Lefebvre d'Hellencourt, 1995]. Une fois l'efficacité de l'ODN-anti-IL-16 vérifiée *in vitro*, les cellules CD8<sup>+</sup> de patients allergiques seront isolées et l'ODN-anti-IL-16 y sera introduit par électroporation. Les souris, pré-traitées avec l'ASGM1, seront reconstituées avec les CMN, déplétées en cellules CD8<sup>+</sup>, plus les cellules CD8<sup>+</sup> contenant l'ODN-anti-IL-16, puis seront exposées à un aérosol de Dpt. La réaction de type allergique, c'est-à-dire la production d'IgE humaines, la réaction de type inflammatoire et l'HRB, sera alors analysée.

### **3- Initiation de la réponse IgE chez la souris SCID "allergique"**

#### **3.1- Commutation isotypique des cellules humaines dans la souris SCID**

Afin d'évaluer si la production d'IgE humaines chez la souris SCID humanisée est le résultat d'une simple restimulation de cellules mémoires, ou si des cellules B naïves subissent une commutation isotypique après présentation de l'allergène, une étude cinétique de l'apparition des transcrits stérile et productif de l'IgE sera réalisée grâce à une méthode de RT-PCR sur des ARNm provenant de rate, de poumons, de thymus et éventuellement de ganglions. L'étude portera sur les 21 premiers jours suivant l'administration de l'allergène et permettra également de préciser le moment et le lieu de la production d'IgE chez la souris SCID humanisée exposée à des aérosols de Dpt.

L'évaluation de la commutation vers l'IgE passera par l'analyse de la présence de cercle délétore. Des études *in vitro* ont montré que deux signaux étaient nécessaires et suffisants pour induire la commutation isotypique de l'IgE: l'IL-4 fournit un signal aux cellules B pour induire la transcription du g $\epsilon$ , et l'engagement simultané du CD40 avec le CD40-L induit la recombinaison S $\mu$ -S $\epsilon$ , qui aboutit à la formation d'une boucle d'ADN, qui est éliminée et permet la formation du transcrite productif [Zhang, 1994a]. Les études préliminaires réalisées à ce jour sur la souris SCID humanisée n'ont pas permis de détecter ces cercles d'ADN excisés au moment de la commutation, sur les échantillons d'organes prélevés à des temps tardifs.

Néanmoins, la technique est très délicate, et le moment de l'analyse était probablement trop éloigné de la sensibilisation au Dpt.

### **3.2- Présentation de l'allergène pour la production d'IgE**

L'exposition au Dpt des souris SCID "allergiques" aboutit à une production d'IgE spécifique de Dpt. Néanmoins, la manière dont s'effectue la présentation de l'antigène aux lymphocytes T spécifiques reste un point à élucider.

Comme les cellules dendritiques (CPA professionnelles) représentent moins de 0,5% des CMN du sang périphérique et les cellules B plus de 5% (évaluées en nombre de cellules CD19+ avant l'injection des CMN aux souris), il est fort probable que la présentation de l'antigène soit le fait des cellules B dans notre modèle de souris SCID.

En effet, les cellules B sensibilisées par l'antigène sont de puissantes CPA, en partie grâce à la capacité des récepteurs Ig à favoriser une capture rapide et spécifique de l'antigène. De plus, elles possèdent des molécules costimulatrices nécessaires à l'activation complète des cellules T, et qui sont absentes de la surface des cellules B naïves. L'engagement des Ig à la surface de cellules B murines induit rapidement une expression du CD86, ligand du CD28. Ainsi, l'efficacité de fonction CPA par des cellules B spécifiques d'antigène dépend à la fois de la capture de l'antigène, médiée par le récepteur des cellules B, et l'augmentation immédiate de l'expression d'une molécule costimulatrice puissante [Lenschow, 1993]. D'un autre côté, chez l'homme, l'interaction CD28/CD80 fournit un second signal précoce pour l'activation de cellules T CD4+ par des lymphoblastes B [Koulova, 1991].

Nous appréhenderons l'intervention des cellules B dans la présentation de l'antigène en 2 étapes: d'une part en évaluant l'expression de molécules costimulatrices dans les différents organes, et d'autre part, en analysant l'effet d'une déplétion en cellules B.

La première étape consistera à analyser par immunohistochimie, la présence de cellules exprimant le CD80 et le CD86 dans les poumons, les ganglions pulmonaires lorsqu'ils existent, les ganglions péritonéaux, la rate et également le thymus où nous avons détecté un grand nombre de cellules B et de cellules CD23<sup>+</sup> potentiellement présentatrices d'antigène. Un double marquage avec un anticorps anti-CD20 (le CD19 pouvant être présent à la surface des cellules dendritiques) permettra d'évaluer l'expression de ces 2 marqueurs par les cellules B. L'analyse sera effectuée de manière cinétique à J7, J15 et J30.

La deuxième étape consistera à éliminer spécifiquement les cellules B humaines des CMN de patients asthmatiques allergiques, au moyen de billes magnétiques (billes coatées avec le CD20). Nous analyserons la possibilité de stimulation des cellules T par d'autres cellules que les cellules B, en évaluant la production d'IL-2 et d'IL-4 (par RT-PCR sur les cellules du lavage péritonéal et sur les différents organes: poumons, rate, thymus et ganglions), et leur capacité migratoire.

Néanmoins, la capacité de cellules B activées à stimuler des cellules T naïves reste inférieure à celle des cellules dendritiques [Cassell, 1994]. Nous évaluerons donc, chez la souris SCID humanisée, le rôle des cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques sont présentes dans le poumon normal. Chez l'homme, des cellules de Langerhans CD1a<sup>+</sup> sont retrouvées de manière prédominante dans l'épithélium bronchique, et des cellules dendritiques CD1c<sup>+</sup> sont principalement détectées dans la sous-muqueuse bronchique et le parenchyme alvéolaire [Soler, 1989]. L'accumulation de cellules dendritiques dans l'épithélium bronchique pourraient être lié à la production de GM-CSF, cytokine importante pour la survie et la fonction des cellules dendritiques *in vitro* [Tazi, 1993]. Le nombre de cellules dendritiques CD1a<sup>+</sup> ou L25<sup>+</sup> (marqueur des cellules B et des cellules dendritiques), ainsi que l'expression de l'HLA-DR sont accrus dans la muqueuse bronchique des patients asthmatiques comparés aux sujets contrôles [Moller, 1996]. Enfin, des cellules dendritiques de patients asthmatiques sensibles à Dpt, isolées à partir d'épithélium bronchique, activent des cellules T CD4<sup>+</sup> qui peuvent produire de l'IL-4 et de l'IL-5 [Mattoli, 1992].

La migration des cellules dendritiques consécutive à une inhalation d'allergène a pu être appréhendée grâce à des modèles animaux. Dans un modèle de rat, les cellules dendritiques sont recrutées dans la muqueuse du tractus respiratoire après une stimulation locale avec des antigènes protéiques bactériens, viraux ou soluble comme l'OVA [McWilliam, 1996]. En fait, durant la réponse inflammatoire aigüe, les précurseurs de cellules dendritiques restent dans l'épithélium, où elles se différencient et développent une morphologie dendriforme typique des cellules dendritiques résidentes trouvées dans l'épithélium normal. Au cours des 48 heures suivant l'inhalation, ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques régionaux. Aucune réponse des cellules dendritiques n'est observée lors d'une stimulation intrapéritonéale ou sous-cutanée [McWilliam, 1994].

Nous évaluerons donc dans notre modèle SCID la production d'Ac lorsque les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigène. Les cellules dendritiques obtenues à partir de monocytes de sang périphérique, seront cultivées pendant 14 jours en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Les cellules dendritiques dérivées des monocytes CD14<sup>+</sup> néo-expriment le CD1a, le CD1b, le CD1c, le CD80 et le CD5, augmentent massivement leur expression de HLA-DR, CD4, CD11b, CD11c, CD43, CD45, CD45RO, CD54, CD58 et CD59 [Pickl, 1996], et sont capables de présenter un antigène soluble [Triozi, 1997].

Dans un premier temps, nous évaluerons la migration de cellules dendritiques ainsi produites (à partir de sang de sujets sains), après injection par différentes voies: i.p, sous-cutanée ou intra-trachéale. En ce qui concerne la voie sous-cutanée, Barratt-Boyes *et al* ont démontré que des cellules dendritiques de chimpanzé obtenues après stimulation de monocytes du sang périphérique par de l'IL-4 et du GM-CSF, sont capable de migrer *in vivo*, particulièrement vers les zones T des tissus lymphoïdes. En effet, des cellules dendritiques ainsi obtenues injectées par voie sous-cutanée migrent spontanément et rapidement vers les ganglions drainant, où elles résident pendant au moins 5 jours. Elles présentent une morphologie de cellules interdigitées et un phénotype de puissante CPA (CD86+, CD40+ et HLA-DR+) [Barratt Boyes, 1997]. Il semble intéressant d'évaluer également la migration des cellules dendritiques injectées en intra-trachéal, puisque les poumons sont un des lieux de résidence des cellules dendritiques dont les dendrites sont susceptibles de fournir un meilleur ancrage au niveau de l'épithélium et de favoriser la pénétration des cellules dendritiques dans les voies aériennes. Ces modes d'administration des cellules dendritiques seront couplés à une exposition des souris à un aérosol de Dpt, permettant ainsi d'évaluer la migration de cellules dendritiques (issues de sujets sains ou allergiques à Dpt) chargées en antigène. La cinétique de migration des cellules dendritiques sera suivi dans l'animal au moyen d'un colorant fluorescent des cellules, le PKH26 [Johnsson, 1997].

Dans un second temps, le rôle d'un ajout de cellules dendritiques sera évalué sur la production d'IgE et l'infiltrat pulmonaire de souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt.

*Ces résultats devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la réaction allergique, tant au niveau de la production d'IgE, qu'à celui du développement de la réaction inflammatoire et de l'HRB.*



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Achatz, G., Oberkofler, H., Lechenauer, E., Simon, B., Unger, A., Kandler, D., Ebner, C., Prillinger, H., Kraft, D. and Breitenbach, M. Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. 1995. *Mol Immunol* 32:213.
- Airas, L., Salmi, M. and Jalkanen, S. Lymphocyte-vascular adhesion protein-2 is a novel 70-kDa molecule involved in lymphocyte adhesion to vascular endothelium. 1993. *J Immunol* 151:4228.
- Akoum, H., Tsiopoulos, 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., York, J., Boyars, M., Stafford, S., Grant, J. A., Lee, J., Forsythe, P., Sim, T. and Ida, N. Increased MCP-1, RANTES, and MIP-1alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. 1996. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1398.
- Aldrovandi, G. M., Feuer, G., Gao, L., Jamieson, B., Kristeva, M., Chen, I. S. and Zack, J. A. The SCID-hu mouse as a model for HIV-1 infection. 1993. *Nature* 363:732.
- Alter, B. J. and Bach, F. H. Cellular basis of the proliferative response of human T cells to mouse xenoantigens. 1990. *J exp Med* 171:333.
- Amiri, P., Locksley, R. M., Parslow, T. G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D. and McKerrow, J. H. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice [see comments]. 1992. *Nature* 356:604.
- 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+ T cells are associated with IFN-gamma production. 1996. *Faseb J* 10:769.
- Arlan, L. G., Bernstein, I. L., Vyszynski Moher, D. L. and Gallagher, J. S. Investigations of culture medium-free house dust mites. IV. Cross antigenicity and allergenicity between the house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus*. 1987. *J Allergy Clin Immunol* 79:467.
- Armerding, D., Hren, A., Callard, R. E., Fu, S. M. and Mudde, G. C. Induction of cognate and non-cognate T-cell help for B-cell IgE production in relation to CD40 ligand expression. 1996. *Int Arch Allergy Immunol* 111:376.
- 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.
- Asakura, K., Saito, H. and Kataura, A. In vivo effect of monoclonal antibody against ICAM-1 and LFA-1 on antigen-induced nasal symptoms and eosinophilia in sensitized rats. 1996. *Int Arch Allergy Immunol* 111:156.
- 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.
- Aversa, G., Punnonen, J., Cocks, B. G., de Waal Malefyt, R., Vega, F. J., 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. L. and Jeffery, P. K. Identification of activated T-lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. 1990. *Am. rev. Respir. Dis.* 142:1407.
- Backer, V. and Ulrik, C. S. Bronchial responsiveness to exercise in a random sample of 494 children and adolescents from Copenhagen. 1992. *Clin Exp Allergy* 22:741.
- Baggiolini, M. and Dahinden, C. A. CC chemokines in allergic inflammation. 1994. *Immunol Today* 15:127.

- Bai, T. R. and Bramley, A. M.** Effect of an inhibitor of nitric oxide synthase on neural relaxation of human bronchi. 1993. *Am J Physiol* 264:L425.
- Balbo, B. A.** Structural features of allergen large and small with emphasis on recombinant allergen. 1991. *Curr Opin Immunol* 3:841.
- 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.
- Barnes, P., Grunstein, M., Leff, A. and Woolcock, A.** 1997. *Asthma* 1-Chapitre 1:3.
- Barnes, P. J.** Asthma as an axon reflex. 1986a. *Lancet* 1:242.
- Barnes, P. J.** Neural control of human airways in health and disease. 1986b. *Am Rev Respir Dis* 134:1289.
- Barnes, P. J.** Endogenous catecholamines and asthma. 1986c. *J Allergy Clin Immunol* 77:791.
- Barnes, P. J.** Neuropeptides in the lung: localization, function, and pathophysiologic implications. 1987. *J Allergy Clin Immunol* 79:285.
- Barnes, P. J.** New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. 1989. *J Allergy Clin Immunol* 83:1013.
- Barnes, P. J.** Biochemistry of asthma [see comments]. 1991. *Trends Biochem Sci* 16:365.
- Barnes, P. J. and Dixon, C. M.** The effect of inhaled vasoactive intestinal peptide on bronchial reactivity to histamine in humans. 1984. *Am Rev Respir Dis* 130:162.
- Barratt Boyes, S. M., Watkins, S. C. and Finn, O. J.** In vivo migration of dendritic cells differentiated in vitro: a chimpanzee model. 1997. *J Immunol* 158:4543.
- Batista, F. D., Efremov, D. G. and Burrone, O. R.** Characterization and expression of alternatively spliced IgE heavy chain transcripts produced by peripheral blood lymphocytes. 1995. *J Immunol* 154:209.
- Batley, J., Max, E. E., McBride, W. O., Swan, D. and Leder, P.** A processed human immunoglobulin epsilon gene has moved to chromosome 9. 1982. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:5956.
- Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M. and Peault, B.** Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. 1992. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2804.
- Beasley, R., Roche, W. R., Roberts, J. A. and Holgate, S. T.** Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. 1989. *Am Rev Respir Dis* 139:806.
- Bellini, A., Yoshimura, H., Vittori, E., Marini, M. and Mattoli, S.** Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. 1993. *J Allergy Clin Immunol* 92:412.
- BenMohamed, L., Gras-Masse, H., Tartar, A., Daubersies, P., Brahimi, K., Bossus, M., Thomas, A. and Druilhe, P.** Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. 1997. *Eur J Immunol* 27:1242.
- Bentley, A. M., Durham, S. R., Robinson, D. S., Menz, G., Storz, C., Cromwell, O., Kay, A. B. and Wardlaw, A. J.** Expression of endothelial and leukocyte adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, E-selectin, and vascular cell adhesion molecule-1 in the bronchial mucosa in steady-state and allergen-induced asthma. 1993. *J Allergy Clin Immunol* 92:857.

- Benveniste, J., Chignard, M., Le Couedic, J. P. and Vargaftig, B. B.** Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-ACETHER). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-ACETHER and lyso-PAF-ACETHER from rabbit platelets. 1982. *Thromb Res* 25:375.
- Bergren, D. R., Agrawal, D. K. and Towley, R. G.** Platelet-activating factor (PAF) antagonizes isoproterenol during metacholine induced bronchoconstriction. 1987. *Am Rev Respir Dis* 135:A162.
- Bettler, B., Maier, R., Ruegg, D. and Hofstetter, H.** Binding site for IgE of the human lymphocyte low-affinity Fc epsilon receptor (Fc epsilon RII/CD23) is confined to the domain homologous with animal lectins. 1989. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7118.
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R. and al, e.** Selectins: a family of adhesion receptors. 1991. *Cell* 67:233.
- Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr. and Seed, B.** Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. 1989. *Science* 243:1160.
- Bice, D. E., Weissman, D. N. and Muggenburg, B. A.** Long-term maintenance of localized antibody responses in the lung. 1991. *Immunology* 74:215.
- 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). 1992. *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.
- Biedermann, K. A., Sun, J. R., Giaccia, A. J., Tosto, L. M. and Brown, J. M.** SCID mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. 1991. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1394.
- Billaud, M., Busson, P., Huang, D., Mueller Lantzsch, N., Rousselet, G., Pavlish, O., Wakasugi, H., Seigneurin, J. M., Tursz, T. and Lenoir, G. M.** Epstein-Barr virus (EBV)-containing nasopharyngeal carcinoma cells express the B-cell activation antigen blast2/CD23 and low levels of the EBV receptor CR2. 1989. *J Virol* 63:4121.
- Black, J. L., Johnson, P. R. and Armour, C. L.** Potentiation of the contractile effects of neuropeptides in human bronchus by an enkephalinase inhibitor. 1988. *Pulm Pharmacol* 1:21.
- Bleecker, E. R., Amelung, P. J., Levitt, R. C., Postma, D. S. and Meyers, D. A.** Evidence for linkage of total serum IgE and bronchial hyperresponsiveness to chromosome 5q: a major regulatory locus important in asthma. 1995. *Clin Exp Allergy* 2:84.
- Blunt, T., Finnie, N. J., Taccioli, G. E., Smith, G. C., Demengeot, J., Gottlieb, T. M., Mizuta, R., Varghese, A. J., Alt, F. W., Jeggo, P. A. and et al.** Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. 1995. *Cell* 80:813.
- Blunt, T., Gell, D., Fox, M., Taccioli, G. E., Lehmann, A. R., Jackson, S. P. and Jeggo, P. A.** Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10285.
- Bombil, F., Kints, J. P., Scheiff, J. M., Bazin, H. and Latinne, D.** A promising model of primary human immunization in human-scid mouse. 1996. *Immunobiology* 195:360.
- Bonnefoy, J. Y., Shields, J. and Mermod, J. J.** Inhibition of human interleukin 4-induced synthesis by a subset of anti-CD23/Fc epsilon RII monoclonal antibodies. 1990. *Eur J Immunol* 20:139.

- Borish, L., Aarons, A., Rumblyrt, J., Cvietusa, P., Negri, J. and Wenzel, S.** Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 97:1288.
- Bosma, G. C., Custer, R. P. and Bosma, M. J.** A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. 1983. *Nature* 301:527.
- Bosma, G. C., Davison, M. T., Ruetsch, N. R., Sweet, H. O., Shultz, L. D. and Bosma, M. J.** The mouse mutation severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16 [published erratum appears in *Immunogenetics* 1989;29(3):224]. 1989. *Immunogenetics* 29:54.
- Bosma, G. C., Fried, M., Custer, R. P., Carroll, A., Gibson, D. M. and Bosma, M. J.** Evidence of functional lymphocytes in some (leaky) scid mice. 1988. *J Exp Med* 167:1016.
- Bossy, D., Mattei, M. G. and Simmons, D. L.** The human intercellular adhesion molecule 3 (ICAM3) gene is located in the 19p13.2-p13.3 region, close to the ICAM1 gene. 1994. *Genomics* 23:712.
- Bousquet, J., Chanez, P., Campbell, A. M., Vignola, A. M. and Godard, P.** Cellular inflammation in asthma. 1995. *Clin Exp Allergy* 2:39.
- Boyle, M. J., Connors, M., Flanigan, M. E., Geiger, S. P., Ford, H., Jr., Baseler, M., Adelsberger, J., Davey, R. T., Jr. and Lane, H. C.** The human HIV/peripheral blood lymphocyte (PBL)-SCID mouse. A modified human PBL-SCID model for the study of HIV pathogenesis and therapy. 1995. *J Immunol* 154:6612.
- 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.
- Bradley, B. L., Azzawi, M., Jacobson, M., Assoufi, B., Collins, J. V., Irani, A. M., Schwartz, L. B., Durham, S. R., Jeffery, P. K. and Kay, A. B.** Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. 1991. *J Allergy Clin Immunol* 88:661.
- Brindley, L. L., Sweet, J. M. and Goetzl, E. J.** Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. 1983. *J Clin Invest* 72:1218.
- Brusselle, G., Kips, J., Joos, G., Bluethmann, H. and Pauwels, R.** Allergen-induced airway inflammation and bronchial responsiveness in wild-type and interleukin-4-deficient mice. 1995. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:254.
- Bullard, D. C., Qin, L., Lorenzo, I., Quinlin, W. M., Doyle, N. A., Bosse, R., Vestweber, D., Doerschuk, C. M. and Beaudet, A. L.** P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli [see comments]  
Comment in: *J Clin Invest* 1995 Apr;95(4):1425. 1995. *J Clin Invest* 95:1782.
- 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.
- Burrows, B., Sears, M. R., Flannery, E. M., Herbison, G. P. and Holdaway, M. D.** Relationships of bronchial responsiveness assessed by methacholine to serum IgE, lung function, symptoms, and diagnoses in 11-year-old New Zealand children. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 90:376.
- Camp, R. L., Scheynius, A., Johansson, C. and Pure, E.** CD44 is necessary for optimal contact allergic responses but is not required for normal leukocyte extravasation. 1993. *J Exp Med* 178:497.
- Campbell, A. M., Chanez, P., Vignola, A. M., Bousquet, J., Couret, I., Michel, F. B. and Godard, P.** Functional characteristics of bronchial epithelium obtained by brushing from asthmatic and normal subjects. 1993. *Am Rev Respir Dis* 147:529.
- Campbell, A. M., Vignola, A. M., Chanez, P., Godard, P. and Bousquet, J.** Low-affinity receptor for IgE on human bronchial epithelial cells in asthma. 1994. *Immunology* 82:506.

- Canonica, G. W., Mingari, M. C., Melioli, G., Colombatti, M. and Moretta, L.** Imbalances of T cell subpopulations in patients with atopic diseases and effect of specific immunotherapy. 1979. *J Immunol* 123:2669.
- 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.
- Carballido, J. M., Aversa, G., Schols, D., Punnonen, J. and de Vries, J. E.** Inhibition of human IgE synthesis in vitro and in SCID-hu mice by an interleukin-4 receptor antagonist. 1995b. *Int Arch Allergy Immunol* 107:304.
- Carballido, J. M., Schols, D., Namikawa, R., Zurawski, S., Zurawski, G., Roncarolo, M. G. and de Vries, J. E.** IL-4 induces human B cell maturation and IgE synthesis in SCID-hu mice. Inhibition of ongoing IgE production by in vivo treatment with an IL-4/IL-13 receptor antagonist. 1995a. *J Immunol* 155:4162.
- Cardot, E., Pestel, J., Callebaut, I., Lassalle, P., Tsicopoulos, A., Gras Masse, H., Capron, A. and Joseph, M.** Specific activation of platelets from patients allergic to Dermatophagoides pteronyssinus by synthetic peptides derived from the allergen Der p I. 1992. *Int Arch Allergy Immunol* 98:127.
- Carlsson, R., Martensson, C., Kalliomaki, S., Ohlin, M. and Borrebaeck, C. A.** Human peripheral blood lymphocytes transplanted into SCID mice constitute an in vivo culture system exhibiting several parameters found in a normal humoral immune response and are a source of immunocytes for the production of human monoclonal antibodies. 1992. *J Immunol* 148:1065.
- Carroll, A. M., Hardy, R. R. and Bosma, M. J.** Occurrence of mature B (IgM+, B220+) and T (CD3+) lymphocytes in SCID mice. 1989. *J Immunol* 143:1087.
- Cassell, D. J. and Schwartz, R. H.** A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. 1994. *J Exp Med* 180:1829.
- Cavaillon, J.** Cytokines et Allergie. 1996. *Les cytokines-2ème édition* chapitre 33:523.
- Center, D. M. and Cruikshank, W.** Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. 1982. *J Immunol* 128:2563.
- Center, D. M., Kornfeld, H. and Cruikshank, W. W.** Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. 1996. *Immunol Today* 17:476.
- Cerrina, J., Le Roy Ladurie, M., Labat, C., Raffestin, B., Bayol, A. and Brink, C.** Comparison of human bronchial muscle responses to histamine in vivo with histamine and isoproterenol agonists in vitro. 1986. *Am Rev Respir Dis* 134:57.
- Chapman, M. D. and Platts Mills, T. A.** Purification and characterization of the major allergen from Dermatophagoides pteronyssinus-antigen P1. 1980. *J Immunol* 125:587.
- Chapman, M. D., Sutherland, W. M. and Platts Mills, T. A.** Recognition of two Dermatophagoides pteronyssinus-specific epitopes on antigen P1 by using monoclonal antibodies: binding to each epitope can be inhibited by serum from dust mite-allergic patients. 1984. *J Immunol* 133:2488.
- Chen, B. P., Galy, A., Kyoizumi, S., Namikawa, R., Scarborough, J., Webb, S., Ford, B., Cen, D. Z. and Chen, S. C.** Engraftment of human hematopoietic precursor cells with secondary transfer potential in SCID-hu mice. 1994b. *Blood* 84:2497.
- Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. and Weiner, H. L.** Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. 1994a. *Science* 265:1237.

- Chua, K. Y., Kehal, P. K., Thomas, W. R., Vaughan, P. R. and Macreadie, I. G.** High-frequency binding of IgE to the Der p allergen expressed in yeast. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 89:95.
- Chua, K. Y., Stewart, G. A., Thomas, W. R., Simpson, R. J., Dilworth, R. J., Plozza, T. M. and Turner, K. J.** Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. 1988. *J Exp Med* 167:175.
- 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.
- Cockcroft, D. W.** Modulation of airway hyperresponsiveness. 1988. *Ann Allergy* 60:465.
- 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.
- 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.
- Conlon, K., Lloyd, A., Chattopadhyay, U., Lukacs, N., Kunkel, S., Schall, T., Taub, D., Morimoto, C., Osborne, J., Oppenheim, J. and et al.** CD8+ and CD45RA+ human peripheral blood lymphocytes are potent sources of macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin-8 and RANTES. 1995. *Eur J Immunol* 25:751.
- Corrigan, C. J. and Kay, A. B.** Asthma. Role of T-lymphocytes and lymphokines. 1992. *Br Med Bull* 48:72.
- Corry, D. B., Folkesson, H. G., Warnock, M. L., Erle, D. J., Matthay, M. A., Wiener Kronish, J. P. and Locksley, R. M.** Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity [see comments]  
Comment in: *J Exp Med* 1996 Jan 1;183(1):1-5. 1996. *J Exp Med* 183:109.
- 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.
- Cruikshank, W. W., Center, D. M., Nisar, N., Wu, M., Natke, B., Theodore, A. C. and Kornfeld, H.** Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5109.
- Cruikshank, W. W., Long, A., Tarpy, R. E., Kornfeld, H., Carroll, M. P., Teran, L., Holgate, S. T. and Center, D. M.** Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. 1995. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:738.
- Curtis, J. L., Byrd, P. K., Warnock, M. L. and Kaltreider, H. B.** Requirement of CD4-positive T cells for cellular recruitment to the lungs of mice in response to a particulate intratracheal antigen. 1991. *J Clin Invest* 88:1244.
- Cuss, F. M., Dixon, C. M. and Barnes, P. J.** Effects of inhaled platelet activating factor on pulmonary function and bronchial responsiveness in man. 1986. *Lancet* 2:189.
- Custer, R. P., Bosma, G. C. and Bosma, M. J.** Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. 1985. *Am J Pathol* 120:464.

- Czitrom, A. A., Edwards, S., Phillips, R. A., Bosma, M. J., Marrack, P. and Kappler, J. W. The function of antigen-presenting cells in mice with severe combined immunodeficiency. 1985. *J Immunol* 134:2276.
- Damle, N. K., Klussman, K., Linsley, P. S. and Aruffo, A. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4+ T lymphocytes. 1992. *J Immunol* 148:1985.
- Dandeu, J. P., Le Mao, J., Lux, M., Rabillon, J. and David, B. Antigens and allergens in Dermatophagoides farinae mite. II. Purification of AG f1, a major allergen in Dermatophagoides farinae. 1982. *Immunology* 46:679.
- Davis, M. M., Kim, S. K. and Hood, L. E. DNA sequences mediating class switching in alpha-immunoglobulins. 1980. *Science* 209:1360.
- de Fougerolles, A. R., Qin, X. and Springer, T. A. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. 1994. *J Exp Med* 179:619.
- De Lisser, H. M., Newman, P. J. and Abelda, S. M. Platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31). 1993. *Curr Topics Microbiol Immunol* 184:37.
- De Monchy, J. G., Kauffman, H. F., Venge, P., Koeter, G. H., Jansen, H. M., Sluiter, H. J. and De Vries, K. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. 1985. *Am Rev Respir Dis* 131:373.
- 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 Pozo, M. A., Cabanas, C., Montoya, M. C., Ager, A., Sanchez Mateos, P. and Sanchez Madrid, F. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. 1997. *J Cell Biol* 137:493.
- del Pozo, M. A., Sanchez Mateos, P., Nieto, M. and Sanchez Madrid, F. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. 1995. *J Cell Biol* 131:495.
- del Pozo, M. A., Sanchez Mateos, P. and Sanchez Madrid, F. Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment? 1996. *Immunol Today* 17:127.
- Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Daniel, C. K., D'Elios, M. M., Zancuoghi, G., Vinante, F., Pizzolo, G. and Romagnani, S. Preferential expression of CD30 by human CD4+ T cells producing Th2 cytokines. 1995. *FASEB J* 9:81.
- Delespesse, G., Demeure, C. E., Yang, L. P., Ohshima, Y., Byun, D. G. and Shu, U. In vitro maturation of naive human CD4+ T lymphocytes into Th1, Th2 effectors. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:157.
- Deryckx, S., de Waal Malefyt, R., Gauchat, J. F., Vivier, E., Thomas, Y. and de Vries, J. E. Immunoregulatory functions of paf-acether. VIII. Inhibition of IL-4-induced human IgE synthesis in vitro. 1992. *J Immunol* 148:1465.
- Dessaint, J. P. and Labalette, M. [Regulation of the production of IgE in man] Regulation de la production des IgE chez l'homme. 1994. *Allerg Immunol Paris* 26:238.
- Detmers, P. A., Powell, D. E., Walz, A., Clark Lewis, I., Baggiolini, M. and Cohn, Z. A. Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. 1991. *J Immunol* 147:4211.
- Devalia, J. L., Campbell, A. M., Safford, R. J., Rusznak, C., Quint, D., Godard, P., Bousquet, J. and Davies, R. J. Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro. 1993. *Am J respir cell Mol Biol* 1993:271.



- 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.
- Didierlaurent, A. and Garcelon, M.** Measurement of IgE specific to a major allergen of house dust mite: Der p I. **1991.** *J Immunol Methods* 145:33.
- Dierks, S. E., Bartlett, W. C., Edmeades, R. L., Gould, H. J., Rao, M. and Conrad, D. H.** The oligomeric nature of the murine Fc epsilon RII/CD23. Implications for function. **1993.** *J Immunol* 150:2372.
- Dilworth, R. J., Chua, K. Y. and Thomas, W. R.** Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der f I. **1991.** *Clin Exp Allergy* 21:25.
- Djukanovic, R., Roche, W. R., Wilson, J. W., Beasley, C. R., Twentymann, O. P., Howarth, R. H. and Holgate, S. T.** Mucosal inflammation in asthma. **1990.** *Am Rev Respir Dis* 142:434.
- Dorshkind, K., Pollack, S. B., Bosma, M. J. and Phillips, R. A.** Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). **1985.** *J Immunol* 134:3798.
- Dransfield, I., Cabanas, C., Craig, A. and Hogg, N.** Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. **1992.** *J Cell Biol* 116:219.
- Duchosal, M. A., Eming, S. A., Fischer, P., Leturcq, D., Barbas, C. F. d., McConahey, P. J., Caothien, R. H., Thornton, G. B., Dixon, F. J. and Burton, D. R.** Immunization of hu-PBL-SCID mice and the rescue of human monoclonal Fab fragments through combinatorial libraries. **1992a.** *Nature* 355:258.
- Duchosal, M. A., Eming, S. A., McConahey, P. J. and Dixon, F. J.** The hu-PBL-SCID mouse model. Long-term human serologic evolution associated with the xenogeneic transfer of human peripheral blood leukocytes into SCID mice. **1992b.** *Cell Immunol* 139:468.
- 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.
- Elkon, K. B. and Ashany, D.** Autoimmunity versus allo- and xeno-reactivity in SCID mice. **1994.** *Int Rev Immunol* 11:283.
- Erard, F., Wild, M. T., Garcia Sanz, J. A. and Le Gros, G.** Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. **1993.** *Science* 260:1802.
- Erbe, D. V., Watson, S. R., Presta, L. G., Wolitzky, B. A., Foxall, C., Brandley, B. K. and Lasky, L. A.** P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. **1993.** *J Cell Biol* 120:1227.
- Eum, S. Y., Haile, S., Lefort, J., Huerre, M. and Vargaftig, B. B.** Eosinophil recruitment into the respiratory epithelium following antigenic challenge in hyper-IgE mice is accompanied by interleukin 5-dependent bronchial hyperresponsiveness. **1995.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:12290.
- 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.
- Fattah, D., Quint, D. J., Proudfoot, A., O'Malley, R., Zanders, E. D. and Champion, E. D.** In vitro and in vivo studies of purified recombinant human interleukin-5. **1990.** *Cytokine* 2:112.
- Ferrero, E., Ferrero, M. E., Pardi, R. and Zocchi, M. R.** The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. **1995.** *FEBS lett* 374:313.
- 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.

- Fingeroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A. and Fearon, D. T.** Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. **1984.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4510.
- Flotte, T. J., Springer, T. A. and Thorbecke, G. J.** Dendritic cell and macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. **1983.** *Am J Pathol* 111:112.
- Fraser, C. C., Chen, B. P., Webb, S., van Rooijen, N. and Kraal, G.** Circulation of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice after Cl2MDP-liposome-mediated macrophage depletion. **1995b.** *Blood* 86:183.
- Fraser, C. C., Kaneshima, H., Hansteen, G., Kilpatrick, M., Hoffman, R. and Chen, B. P.** Human allogeneic stem cell maintenance and differentiation in a long-term multilineage SCID-hu graft. **1995a.** *Blood* 86:1680.
- Freedman, A. S., Munro, J. M., Rice, G. E., Bevilacqua, M. P., Moromoto, C., McIntyre, B. W., Rhyhart, K., Poher, J. S. and Nadler, L. M.** Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-1. **1990.** *Science* 249:1030.
- Frigas, E. and Gleich, G. J.** The eosinophil and the pathophysiology of asthma. **1986.** *J Allergy Clin Immunol* 77:527.
- 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.
- Fukuda, T., Fukushima, Y., Numao, T., Ando, N., Arima, M., Nakajima, H., Sagara, H., Adachi, T., Motojima, S. and Makino, S.** Role of interleukin-4 and vascular cell adhesion molecule-1 in selective eosinophil migration into the airways in allergic asthma. **1996.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:84.
- 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.
- Fulop, G. M. and Phillips, R. A.** The SCID mutation in mice causes a general defect in DNA repair. **1990.** *Nature* 347:479.
- Gagro, A. and Rabatic, S.** Allergen-induced CD23 on CD4+ T lymphocytes and CD21 on B lymphocytes in patients with allergic asthma: evidence and regulation. **1994.** *Eur J Immunol* 24:1109.
- Gagro, A., Rabatic, S., Lokar Kolbas, R., Medar Lasic, M. and Zimic, L.** Effect of an asthmatic attack on CD23 and CD21 expression on lymphocytes from allergic children during the allergen season [see comments]  
Comment in: *Clin Exp Allergy* 1995 Aug;25(8):678-9. **1995.** *Clin Exp Allergy* 25:690.
- Galli, S. J., Gordon, J. R. and Wershil, B. K.** Cytokine production by mast cells and basophils. **1991.** *Curr Opin Immunol* 3:865.
- Gallin, J. I.** Inflammation. **1993.** *Fundamental Immunology, 3rd edition* 1032.
- Galy, A., Travis, M., Cen, D. and Chen, B.** Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. **1995.** *Immunity* 3:459.
- Garcia-Zepeda, E. A., Combadiere, C., Rothenberg, M. E., Sarafi, M. N., Lavigne, F., Hamid, Q., Murphy, P. M. and Luster, A. D.** Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and non allergic inflammation that signal through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and-3. **1996.** *J Immunol* 157:5613.
- Garlisi, C. G., Falcone, A., Kung, T. T., Stelts, D., Pennline, K. J., Beavis, A. J., Smith, S. R., Egan, R. W. and Umland, S. P.** T cells are necessary for Th2 cytokine production and

eosinophil accumulation in airways of antigen-challenged allergic mice. 1995. *Clin Immunol Immunopathol* 75:75.

**Garrone, P., Djossou, O., Galizzi, J. P. and Banchereau, J.** A recombinant extracellular domain of the human interleukin 4 receptor inhibits the biological effects of interleukin 4 on T and B lymphocytes. 1991. *Eur J Immunol* 21:1365.

**Gascan, H., Gauchat, J. F., Aversa, G., Van Vlasselaer, P. and de Vries, J. E.** Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. 1991. *J Immunol* 147:8.

**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. 1992b. *Int Immunol* 4:397.

**Gauchat, J. F., Gascan, H., de Waal Malefyt, R. and de Vries, J. E.** Regulation of germ-line epsilon transcription and induction of epsilon switching in cloned EBV-transformed and malignant human B cell lines by cytokines and CD4+ T cells. 1992a. *J Immunol* 148:2291.

**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.

**Gavett, S. H., O'Hearn, D. J., Karp, C. L., Patel, E. A., Schofield, B. H., Finkelman, F. D. and Will-Karp, M.** Interleukin-4 receptor blockade prevents airway responses induced by antigen challenge in mice. 1997. *Am J Physiol* 272:L253.

**Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M. U., Clark-lewis, I. and Baggiolini, M.** The interleukin-8-related cytokines GRO alpha, GRO beta, and GRO gamma activate human neutrophil and basophil leukocytes. 1993. *J Biol Chem* 268:15419.

**Georas, S. N., Liu, M. C., Newman, W., Beall, L. D., Stealey, B. A. and Bochner, B. S.** Altered adhesion molecule expression and endothelial cell activation accompany the recruitment of human granulocytes to the lung after segmental antigen challenge. 1992. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:261.

**Gerard, N. P., Bao, L., Xiao Ping, H., Eddy, R. L., Jr., Shows, T. B. and Gerard, C.** Human chemotaxis receptor genes cluster at 19q13.3-13.4. Characterization of the human C5a receptor gene. 1993. *Biochemistry* 32:1243.

**Gerbrandy, J. L. and Bienenstock, J.** Kinetics and localization of IgE tetanus antibody response in mice immunized by the intratracheal, intraperitoneal and subcutaneous routes. 1976. *Immunology* 31:913.

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

**Godfrey, S., Springer, C., Noviski, N., Maayan, C. and Avital, A.** Exercise but not methacholine differentiates asthma from chronic lung disease in children. 1991. *Thorax* 46:488.

**Goebeler, M., Roth, J., Kunz, M. and Sorg, C.** Expression of intercellular adhesion molecule-1 by murine macrophages is up-regulated during differentiation and inflammatory activation. 1993. *Immunobiology* 188:159.

**Goetzl, E. J., Xia, M., Ingram, D. A., Kishiyama, J. L., Kaltreider, H. B., Byrd, P. K., Ichikawa, S. and Sreedharan, S. P.** Neuropeptide signaling of lymphocytes in immunological responses. 1995. *Int Arch Allergy Immunol* 107:202.

- Gosset, P., Tillie Leblond, I., Janin, A., Marquette, C. H., Copin, M. C., Wallaert, B. and Tonnel, A. B. Expression of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on bronchial biopsies from allergic and non-allergic asthmatic patients. 1995. *Int Arch Allergy Immunol* 106:69.
- Gosset, P., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Vannimendus, C., Joseph, M., Tonnel, A. B. and Capron, A. Increased secretion of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. 1991. *J Allergy Clin Immunol* 88:561.
- Gounni, A. S., Lamkhioued, 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.
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M. and et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. 1994. *Science* 264:965.
- Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C. and Kroczeck, R. A. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. 1995. *Eur J Immunol* 25:1749.
- Grammer, A. C., Bergman, M. C., Miura, Y., Fujita, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. The CD40 ligand expressed by human B cells costimulates B cell responses. 1995. *J Immunol* 154:4996.
- 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.
- Graves, B. J., Crowther, R. L., Chandran, C., Rumberger, J. M., Li, S., Huang, K. S., Presky, D. H., Familletti, P. C., Wolitzky, B. A. and Burns, D. K. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EGF domains. 1994. *Nature* 367:532.
- Greene, W. K., Cyster, J. G., Chua, K. Y., O'Brien, R. M. and Thomas, W. R. IgE and IgG binding of peptides expressed from fragments of cDNA encoding the major house dust mite allergen Der p I. 1991. *J Immunol* 147:3768.
- Greene, W. K. and Thomas, W. R. IgE binding structures of the major house dust mite allergen Der p I. 1992. *Mol Immunol* 29:257.
- Griffiths Johnson, D. A., Collins, P. D., Rossi, A. G., Jose, P. J. and Williams, T. J. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro and causes their accumulation into the lung in vivo. 1993. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1167.
- Gunthert, U. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. 1993. *Curr Top Microbiol Immunol* 184:47.
- Haczku, A., Chung, K. F., Sun, J., Barnes, P. J., Kay, A. B. and Moqbel, R. Airway hyperresponsiveness, elevation of serum-specific IgE and activation of T cells following allergen exposure in sensitized Brown-Norway rats. 1995. *Immunology* 85:598.
- Haczku, A., Hamelmann, E., Takeda, K., Loader, J., Oshiba, A., Larsen, G., Kikutani, H., Conrad, D. and Gelfand, E. W. Differential effects of gene targeting and antibody treatment against CD23 in allergic airway hyperresponsiveness. 1997a. *J Allergy Clin Immunol* 99:S265.
- Haczku, A., Macary, P., Huang, T. J., Tsukagoshi, H., Barnes, P. J., Kay, A. B., Kemeny, D. M., Chung, K. F. and Moqbel, R. Adoptive transfer of allergen specific CD4+ T cells induces airway inflammation and hyperresponsiveness in Brown-Norway rats. 1997b. *Immunol* 91:176.
- Hamelmann, E., Oshiba, A., Paluh, J., Bradley, K., Loader, J., Potter, T. A., Larsen, G. L. and Gelfand, E. W. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a marine model of airway sensitization. 1996. *J Exp Med* 183:1719.

- Hamelmann, E., Vella, A. T., Oshiba, A., Kappler, J. W., Marrack, P. and Gelfand, E. W.** Allergic airway sensitization induces T cell activation but not airway hyperresponsiveness in B cell-deficient mice. **1997.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1350.
- Hamid, Q., Azzawi, M., Ying, S., Moqbel, R., Wardlaw, A. J., Corrigan, C. J., Bradley, B., Durham, S. R., Collins, J. V., Jeffery, P. K. and et al.** Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. **1991.** *J Clin Invest* 87:1541.
- Haskill, S., Peace, A., Morris, J., Sporn, S. A., Anisowicz, A., Lee, S. W., Smith, T., Martin, G., Ralph, P. and Sager, R.** Identification of three related human GRO genes encoding cytokine functions. **1990.** *Proc Natl Acad Sci* 87:7732.
- Hayashi, Y., Haneji, N., Yanagi, K., Higashiyama, H., Yagita, H. and Hamano, H.** Prevention of adoptive transfer of murine Sjogren's syndrome into severe combined immunodeficient (SCID) mice by antibodies against intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). **1995.** *Clin Exp Immunol* 102:360.
- Heike, Y., Ohira, T., Takahashi, M. and Saijo, N.** Long-term human hematopoiesis in SCID-hu mice bearing transplanted fragments of adult bone and bone marrow cells. **1995.** *Blood* 86:524.
- Henchoz, S., Gauchat, J. F., Aubry, J. P., Graber, P., Pochon, S. and Bonnefoy, J. Y.** Stimulation of human IgE production by a subset of anti-CD21 monoclonal antibodies: requirement of a co-signal to modulate epsilon transcripts. **1994.** *Immunology* 81:285.
- Herbert, C. A., King, C. M., Ring, P. C., Holgate, S. T., Stewart, G. A., Thompson, P. J. and Robinson, C.** Augmentation of permeability in the bronchial epithelium by the house dust mite allergen Der p1 [see comments]  
Comment in: *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995 Apr;12(4):367-8. **1995.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:369.
- Herz, U., Daser, A. and Renz, H.** The humanized (Hu-PBMC) SCID mouse as an in vivo model for human IgE production and allergic inflammation of the skin. **1997.** *Int Arch Allergy Immunol* 113:150.
- Hessel, E. M., Cruikshank, W. W., Van Ark, I., De Bie, J. J., Van Ersch, B., Hofman, G., Nijkamp, F. P., Center, D. M. and Van Oosterhout, A. J. M.** IL-16 is important for IgE synthesis and airway hyperreactivity in a mouse model for allergic asthma. **1997b.** *J Allergy Clin Immunol* 99:S265.
- Hessel, E. M., Van Oosterhout, A. J., Van-Ark, I., Van Esch, B., Hofman, G., Van Loveren, H., Savelkoul, H. F. and Nijkamp, F. P.** Development of airway hyperresponsiveness is dependent on interferon-gamma and independent of eosinophil infiltration. **1997a.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:325.
- Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Schiffer, S. B., Goff, D., Moy, P., Chi Rosso, G., Luhowskyj, S., Lobb, R. and Osborn, L.** Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM1). **1991.** *J Biol Chem* 266:6682.
- Heusser, C. H., Wagner, K., Bews, J. P., Coyle, A., Bertrand, C., Einsle, K., Kips, J., Eum, S. Y., Lefort, J. and Vargaftig, B. B.** Demonstration of the therapeutic potential of non-anaphylactogenic anti-IgE antibodies in murine models of skin reaction, lung function and inflammation. **1997.** *Int Arch Allergy Immunol* 113:231.
- Hewitt, C. R., Brown, A. P., Hart, B. J. and Pritchard, D. I.** A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. **1995.** *J Exp Med* 182:1537.
- Heymann, P. W., Chapman, M. D., Aalberse, R. C., Fox, J. W. and Platts Mills, T. A.** Antigenic and structural analysis of group II allergens (Der f II and Der p II) from house dust mites (*Dermatophagoides* spp). **1989.** *J Allergy Clin Immunol* 83:1055.
- Hoffmann Fezer, G., Gall, C., Zengerle, U., Kranz, B. and Thierfelder, S.** Immunohistology and immunocytology of human T-cell chimerism and graft-versus-host disease in SCID mice. **1993.** *Blood* 81:3440.

- Hoffmannfezer, G., Kranz, B., Gall, C. and Thierfelder, S.** peritoneal sanctuary for human lymphopoiesis in SCID mice injected with human peripheral blood lymphocytes from Epstein-Barr virus-negative donors. 1992. *Eur J Immunol* 22:3161.
- 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.
- Hollenbaugh, D., Mischel Petty, N., Edwards, C. P., Simon, J. C., Denfeld, R. W., Kiener, P. A. and Aruffo, A.** Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. 1995. *J Exp Med* 182:33.
- Holmes, B. J., MacAry, P. A. and Kemeny, D. M.** Depletion of CD8+ T cells following primary immunization with ovalbumin results in a high and persistent IgE response. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:160.
- Holzmann, B. and Weissman, I. L.** Integrin molecules involved in lymphocyte homing to Peyer's patches. 1989. *Immunol Rev* 108:45.
- 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.
- Horst, E., Meijer, C. J., Duijverstijn, A. M., Hartwig, N., Van der Harten, H. J. and Pals, S. T.** The ontogeny of human lymphocyte recirculation: high endothelial cell antigen (HECA-452) and CD44 homing receptor expression in the development of the immune system. 1990. *Eur J Immunol* 20:1483.
- Hosselet, J., Stefano, A., Saetta, M., Maestrelli, P., Bignon, J., Mapp, C. and Fabbri, L.** Increased tumor necrosis factor-alpha positive cells in bronchial biopsies of mild allergic asthmatics. 1994. *Am J Respir Crit Care Med* 149:A958.
- 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.
- Hoyne, G. F., Jarnicki, A. G., Thomas, W. R. and Lamb, J. R.** Characterisation of the specificity and duration of T cell tolerance to intranasally administered peptides in mice: a role for intramolecular epitope suppression. 1997. *Int Immunol* 9:1165.
- Hoyne, G. F., O'Hehir, R. E., Wraith, D. C., Thomas, W. R. and Lamb, J. R.** Inhibition of T cell and antibody responses to house dust mite allergen by inhalation of the dominant T cell epitope in naive and sensitized mice. 1993. *J Exp Med* 178:1783.
- Hsu, D. K., Zuberi, R. I. and Liu, F. T.** Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. 1992. *J Biol Chem* 267:14167.
- Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F. d. and Weiss, S. J.** Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8 [published errata appear in Science 1991 Nov 1;254(5032):631 and 1991 Dec 6;254(5037):1435]. 1991. *Science* 254:99.
- Humbert, M., Grant, J. A., Taborda Barata, L., Durham, S. R., Pfister, R., Menz, G., Barkans, J., Ying, S. and Kay, A. B.** High-affinity IgE receptor (FcepsilonRI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. 1996. *Am J Respir Crit Care Med* 153:1931.
- 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 gene encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and non atopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)-5 GM-CSF and IL-3. 1997. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:1.
- Huppes, W., De Geus, B., Zurcher, C. and Van Bekkum, D. W.** Acute human vs. mouse graft vs. host disease in normal and immunodeficient mice. 1992. *Eur J Immunol* 22:197.

Hupples, W., Fickenscher, H., tHart, B. A. and Fleckenstein, B. Cytokine dependence of human to mouse graft-versus-host disease. 1994. *Scand J Immunol* 40:26.

Hviid, L., Felsing, A. and Theander, T. G. Kinetics of human T-cell expression of LFA-1, IL-2 receptor, and ICAM-1 following antigenic stimulation in vitro. 1993. *J Clin Lab Immunol* 40:163.

Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. 1992. *Cell* 69:11.

Imhof, B. A. and Dunon, D. Leukocyte migration and adhesion. 1995. *Adv Immunol* 58:345.

Ipsen, H. and Lowenstein, H. Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). 1983. *J Allergy Clin Immunol* 72:150.

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.

Ito, M., Matsuzaki, G., Uno, S., Katakai, Y., Suko, M., Endo, S. and Okudaira, H. Regulation of human IgE production by peripheral blood mononuclear cells from atopic patients in mice with severe combined immunodeficiency. 1992. *Int Arch Allergy Immunol* 99:373.

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. 1990. *J Exp Med* 172:1861.

Jalkanen, S. and Jalkanen, M. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. 1992. *J Cell Biol* 116:817.

James, A. L., Pare, P. D. and Hogg, J. C. The mechanics of airway narrowing in asthma. 1989. *A m Rev Respir Dis* 139:242.

Jamieson, B. D., Pang, S., Aldrovandi, G. M., Zha, J. and Zack, J. A. In vivo pathogenic properties of two clonal human immunodeficiency virus type 1 isolates. 1995. *J Virol* 69:6259.

Jarolim, E., Rumpold, H., Endler, A. T., Ebner, H., Breitenbach, M., Scheiner, O. and Kraft, D. IgE and IgG antibodies of patients with allergy to birch pollen as tools to define the allergen profile of *Betula verrucosa*. 1989. *Allergy* 44:385.

Jeannin, P., Delneste, Y., Buisine, E., Le Mao, J., Didierlaurent, A., Stewart, G. A., Tartar, A., Tonnel, A. B. and Pestel, J. Immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides derived from the mite allergen Der p I. 1993b. *Mol Immunol* 30:1511.

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.

Jeannin, P., Didierlaurent, A., Gras Masse, H., Ellass, A. A., Delneste, Y., Cardot, E., Joseph, M., Tartar, A., Vergoten, G. and Pestel, J. Specific histamine release capacity of peptides selected from the modelized Der p I protein, a major allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*. 1992. *Mol Immunol* 29:739.

Jeannin, P., Pestel, J., Bossus, M., Lassalle, P., Tartar, A. and Tonnel, A. B. Comparative analysis of biological activities of Der p I-derived peptides on Fc epsilon receptor-bearing cells from *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitive patients. 1993a. *Clin Exp Immunol* 92:133.

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.

Johnsson, C., Festin, R., Tufveson, G. and Totterman, T. H. Ex vivo PKH26-labelling of lymphocytes for studies of cell migration in vivo. 1997. *Scand J Immunol* 45:511.

**Johnston, G. I., Cook, R. G. and McEver, R. P.** Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. 1989. *Cell* 56:1033.

**Johnston, J. A., Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Oppenheim, J. J. and Kevlin, D. J.** Human T lymphocyte chemotaxis and adhesion induced by vasoactive intestinal peptide. 1994. *J Immunol* 153:1762.

**Jonuleit, H., Wiedemann, K., Muller, G., Degwert, J., Hoppe, U., Knop, J. and Enk, A. H.** Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. 1997. *J Immunol* 158:2610.

**Joost Van Neerven, R. J., Van de Pol, M. M., Van Milligen, F. J., Jansen, H. M., Aalberse, R. C. and Kapsenberg, M. L.** Characterisation of cat dander-specific T lymphocytes from atopic patients. 1994. *J Immunol* 152:4203.

**Jorgensen, C., Couret, I., Canovas, F., Bologna, C., Brochier, J., Reme, T., Lipsky, P. and Sany, J.** Mononuclear cell retention in rheumatoid synovial tissue engrafted in severe combined immunodeficient (SCID) mice is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and mediated through intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). 1996. *Clin Exp Immunol* 106:20.

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

**Joseph, M., Soussi Gouni, A., Kusnierz, J., Vorng, H., Sarfati, M., Kinet, J., Tonnel, A.-B., 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.

**Josephs, L. K., Greeg, I., Mullee, M. A. and Holgate, S. T.** Nonspecific bronchial reactivity and its relationship to the clin expression of asthma. A longitudinal study. 1989. *Am Rev Respir Dis* 140:350.

**June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. and Thompson, C. B.** The B7 and CD28 receptor families. 1994. *Immunol Today* 15:321.

**Jung, S., Siebenkotten, G. and Radbruch, A.** Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other classes. 1994. *J Exp Med* 179:2023.

**Kamel Reid, S., Letarte, M., Doedens, M., Greaves, A., Murdoch, B., Grunberger, T., Lapidot, T., Thorner, P., Freedman, M. H., Phillips, R. A. and et al.** Bone marrow from children in relapse with pre-B acute lymphoblastic leukemia proliferates and disseminates rapidly in scid mice. 1991. *Blood* 78:2973.

**Kamel Reid, S., Letarte, M., Sirard, C., Doedens, M., Grunberger, T., Fulop, G., Freedman, M. H., Phillips, R. A. and Dick, J. E.** A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice. 1989. *Science* 246:1597.

**Karlsson Borga, A., Jonsson, P. and Rolfsen, W.** Specific IgE antibodies to 16 widespread mold genera in patients with suspected mold allergy. 1989. *Ann Allergy* 63:521.

**Katada, Y., Tanaka, T., Ochi, H., Aitani, M., Yokota, A., Kikutani, H., Suemura, M. and Kishimoto, T.** B cell-B cell interaction through intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte functional antigen-1 regulates immunoglobulin E synthesis by B cells stimulated with interleukin-4 and anti-CD40 antibody. 1996. *Eur J Immunol* 26:192.

**Kay, A. B.** Inflammatory cells in bronchial asthma [see comments]  
Comment in: *J Asthma* 1989;26(6):331-3. 1989. *J Asthma* 26:335.

**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.
- 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.
- Kikutani, H., Inui, S., Sato, R., Barsumian, E. L., Owaki, H., Yamasaki, K., Kaisho, T., Uchibayashi, N., Hardy, R. R., Hirano, T. and et al. Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. 1986a. *Cell* 47:657.
- Kikutani, H., Suemura, M., Owaki, H., Nakamura, H., Sato, R., Yamasaki, K., Barsumian, E. L., Hardy, R. R. and Kishimoto, T. Fc epsilon receptor, a specific differentiation marker transiently expressed on mature B cells before isotype switching. 1986b. *J Exp Med* 164:1455.
- Kilchherr, E., Mandak, V., Wagner, K. and Heusser, C. H. Regulation of human IgE response in hu-PBL-SCID mice. 1993. *Cell Immunol* 151:241.
- Kim, M. G., Schuler, W., Bosma, M. J. and Marcu, K. B. Abnormal recombination of Igh D and J gene segments in transformed pre-B cells of scid mice. 1988. *J Immunol* 141:1341.
- Kimata, H. and Fujimoto, M. Growth hormone and insulin-like growth factor I induce immunoglobulin (Ig)E and IgG4 production by human B cells. 1994. *J Exp Med* 180:727.
- Kimata, H. and Saxon, A. Subset of natural killer cells is induced by immune complexes to display Fc receptors for IgE and IgA and demonstrates isotype regulatory function. 1988. *J Clin Invest* 82:160.
- 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.
- Kips, J. C., Brusselle, G. G., Joos, G. F., Peleman, R. A., Devos, R. R., Tavernier, J. H. and Pauwels, R. A. Importance of interleukin-4 and interleukin-12 in allergen-induced airway changes in mice. 1995a. *Int Arch Allergy Immunol* 107:115.
- Kips, J. C., Brusselle, G. J., Joos, G. F., Peleman, R. A., Tavernier, J. H., Devos, R. R. and Pauwels, R. A. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. 1996. *Am J Respir Crit Care Med* 153:535.
- Kips, J. C., Lefebvre, R. A., Peleman, R. A., Joos, G. F. and Pauwels, R. A. The effect of a nitric oxide synthase inhibitor on the modulation of airway responsiveness in rats. 1995b. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1165.
- Kips, J. C., Tavernier, J. and Pauwels, R. A. Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. 1992a. *Am Rev Respir Dis* 145:332.
- Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A., Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A. and Brown, J. M. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. 1995. *Science* 267:1178.
- 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.
- Konig, B., Fischer, A. and Konig, W. Modulation of cell-bound and soluble CD23, spontaneous and ongoing IgE synthesis of human peripheral blood mononuclear cells by soluble IL-4 receptors and the partial antagonistic IL-4 mutant protein IL-4 (Y124D). 1995. *Immunology* 85:604.

- Kornfeld, H., Berman, J. S., Beer, D. J. and Center, D. M.** Induction of human T lymphocyte motility by interleukin 2. 1985. *J Immunol* 134:3887.
- 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.
- Krillis, S., Baldo, B. A., Sutton, R. and Basten, A.** Antigens and allergens from the common house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Part I. Demonstration of multiple allergens by immunochemical and biologic analyses. 1984. *J Allergy Clin Immunol* 74:132.
- Krinzman, S. J., De Sanctis, G. T., Cernadas, M., Mark, D., Wang, Y., Listman, J., Kobzik, L., Donovan, C., Nassr, K., Katona, I., Christiani, D. C., Perkins, D. L. and Finn, P. W.** Inhibition of T cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in a murine model. 1996. *J Clin Invest* 98:2693.
- Krishnaswamy, G., Liu, M. C., Su, S. N., Kumai, M., Xiao, H. Q., Marsh, D. G. and Huang, S. K.** Analysis of cytokines transcripts in the bronchoalveolar lavage cells of patients with asthma. 1993. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:279.
- Kuhn, R., Rajewsky, K. and Muller, W.** Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. 1991. *Science* 254:707.
- Kuijpers, T. W., Tool, A. T., van der Schoot, C. E., Ginsel, L. A., Onderwater, J. J., Roos, D. and Verhoeven, A. J.** Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. 1991. *Blood* 78:1105.
- Kuo, H. P., Liu, S. and Barnes, P. J.** The effect of endogenous nitric oxide on neurogenic plasma exudation in guinea-pig airways. 1992. *Eur J Pharmacol* 221:385.
- Laberge, S., Cruikshank, W. W., Beer, D. J. and Center, D. M.** Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. 1996a. *J Immunol* 156:310.
- Laberge, S., Ernst, P., Ghaffar, O., Song, Y. L., Cruikshank, W. W., Center, D. M. and Hamid, Q.** Increase in Interleukin-16 (IL-16) expression in baseline asthma. 1994. *J Allergy Clin Immunol* 97:313.
- Laberge, S., Rabb, H., Issekutz, T. B. and Martin, J. G.** Role of VLA-4 and LFA-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the rat. 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 151:822.
- Laberge, S., Wu, L., Olivenstein, R., Xu, L. J., Renzi, P. M. and Martin, J. G.** Depletion of CD8+ T cells enhances pulmonary inflammation but not airway responsiveness after antigen challenge in rats. 1996b. *J Allergy Clin Immunol* 98:617.
- 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.
- Lack, G., Renz, H., Saloga, J., Bradley, K. L., Loader, J., Leung, D. Y., Larsen, G. and Gelfand, E. W.** Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. 1994. *J Immunol* 152:2546.
- Lake, F. R., Ward, L. D., Simpson, R. J., Thompson, P. J. and Stewart, G. A.** House dust mite-derived amylase: allergenicity and physicochemical characterization. 1991. *J Allergy Clin Immunol* 87:1035.
- Lammers, J.-W. J., Minette, P., McCusker, M., Chung, K. F. and Barnes, P. J.** Nonadrenergic, noncholinergic bronchodilatation stimulated by capsaicin inhalation in normal and asthmatic subjects. 1988. *Am Rev Respir Dis* 134:240.
- Lasky, L. A., Singer, M. S., Yednock, T. A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S. and Rosen, S. D.** Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. 1989. *Cell* 56:1045.

- Le Mao, J., Dandeu, J. P., Rabillon, J., Lux, M. and David, B. Comparison of antigenic and allergenic composition of two partially purified extracts from *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* mite cultures. 1983. *J Allergy Clin Immunol* 71:588.
- Lee, J., Horuk, R., Rice, G. C., Bennett, G. L., Camerato, T. and Wood, W. I. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. 1992. *J Biol Chem* 267:16283.
- Lee, J. J., McGarry, M. P., Farmer, S. C., Denzler, K. L., Larson, K. A., Carrigan, P. E., Brenneise, I. E., Horton, M. A., Haczku, A., Gelfand, E. W., Leikauf, G. D. and Lee, N. A. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. 1997. *J Exp Med* 185:2143.
- Lefebvre d'Hellencourt, C., Diaw, L. and Guenounou, M. Immunomodulation by cytokine antisens oligonucleotides. 1995. *Eur Cytokine Netw* 6:7.
- 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.
- Lenter, M. and Vestweber, D. The integrin chains beta 1 and alpha 6 associate with the chaperone calnexin prior to integrin assembly. 1994. *J Biol Chem* 269:12263.
- 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.
- Letellier, M., Sarfati, M. and Delespesse, G. Mechanisms of formation of IgE-binding factors (soluble CD23)--I. Fc epsilon R II bearing B cells generate IgE-binding factors of different molecular weights. 1989. *Mol Immunol* 26:1105.
- Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P. and Farber, J. M. Human mig chemokine: biochemical and functional characterization. 1995. *J Exp Med* 182:1301.
- Lieber, M. R., Hesse, J. E., Lewis, S., Bosma, G. C., Rosenberg, N., Mizuuchi, K., Bosma, M. J. and Gellert, M. The defect in murine severe combined immune deficiency: joining of signal sequences but not coding segments in V(D)J recombination. 1988. *Cell* 55:7.
- 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.
- Life, P., Gauchat, J. F., Schnuriger, V., Estoppey, S., Mazzei, G., Durandy, A., Fischer, A. and Bonnefoy, J. Y. T cell clones from an X-linked hyper-immunoglobulin (IgM) patient induce IgE synthesis in vitro despite expression of nonfunctional CD40 ligand. 1994. *J Exp Med* 180:1775.
- 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.
- Lind, P. and Lowenstein, H. Identification of allergens in *Dermatophagoides pteronyssinus* mite body extract by crossed radioimmuno-electrophoresis with two different rabbit antibody pools. 1983. *Scand J Immunol* 17:263.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Tan, P., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., Anasetti, C. and Damle, N. K. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. 1992. *J Exp Med* 176:1595.
- Liu, F. T. S-type mammalian lectins in allergic inflammation. 1993. *Immunol Today* 14:486.
- Lorenz, M., Jung, S. and Radbruch, A. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. 1995. *Science* 267:1825.

- Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Chensue, S. W., Widmer, M. and Kunkel, S. L. TNF-alpha mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. 1995. *J Immunol* 154:5411.
- Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Warmington, K., Lincoln, P., Chensue, S. W. and Kunkel, S. L. Differential recruitment of leukocyte populations and alteration of airway hyperreactivity by C-C family chemokines in allergic airway inflammation. 1997. *J Immunol* 158:4398.
- 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.
- Luo, H. Y., Hofstetter, H., Banchereau, J. and Delespesse, G. Cross-linking of CD23 antigen by its natural ligand (IgE) or by anti-CD23 antibody prevents B lymphocyte proliferation and differentiation. 1991. *J Immunol* 146:2122.
- MacAry, P. A., Holmes, B. J. and Kemeny, D. M. Generation of rat MHC class-I-restricted ovalbumin-specific IgE inhibitory CD8+ T cell clones. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:279.
- Macek, V., Sorli, J., Kopriva, S. and Marin, J. Persistent adenoviral infection and chronic airway obstruction in children [see comments]  
Comment in: *Am J Respir Crit Care Med* 1994 Jul;150(1):2-3. 1994. *Am J Respir Crit Care Med* 150:7.
- Mackay, C. R. and Imhof, B. A. Cell adhesion in the immune system. 1993. *Immunol Today* 14:99.
- Malynn, B. A., Blackwell, T. K., Fulop, G. M., Rathbun, G. A., Furley, A. J., Ferrier, P., Heinke, L. B., Phillips, R. A., Yancopoulos, G. D. and Alt, F. W. The scid defect affects the final step of the immunoglobulin VDJ recombinase mechanism. 1988. *Cell* 54:453.
- 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.
- Martensson, C., Kristensson, K., Kalliomaki, S., Borrebaeck, C. A. K. and Carlsson, R. Antigen-specific human immunoglobulin production in SCID mice transplanted with human peripheral lymphocytes is dependent on CD4(+) CD45RO(+) t cells. 1994. *Immunology* 83:171.
- Martin, T. R., Altman, L. C., Albert, R. K. and Henderson, W. R. Leukotriene B4 production by the human alveolar macrophage: a potential mechanism for amplifying inflammation in the lung. 1984. *Am Rev Respir Dis* 129:106.
- Martino, G., Anastasi, J., Feng, J., Mc Shan, C., DeGroot, L., Quintans, J. and Grimaldi, L. M. The fate of human peripheral blood lymphocytes after transplantation into SCID mice. 1993. *Eur J Immunol* 23:1023.
- Masinovski, B., Urdal, D. and Gallatin, W. M. IL-4 acts synergistically with IL-1 beta to promote lymphocyte adhesion to microvascular endothelium by induction of vascular cell adhesion molecule 1. 1990. *J Immunol* 145:2886.
- Masumoto, A. and Hemler, M. E. Mutation of putative divalent cation sites in the alpha 4 subunit of the integrin VLA-4: distinct effects on adhesion to CS1/fibronectin, VCAM-1, and invasin. 1993. *J Cell Biol* 123:245.
- Mattoli, S., Vittori, E. and Marini, M. Bronchial epithelium of atopic asthmatics contains increased number of dendritic cells which induce the selective activation of Th2-like T lymphocytes in vitro. 1992. *Am Rev Respir Dis* 145:A19.
- Maurer, D., Ebner, C., Reininger, B., Fiebiger, E., Kraft, D., Kinet, J. P. and Stingl, G. The high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) mediates IgE-dependent allergen presentation. 1995. *J Immunol* 154:6285.

- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolff Winiski, B., Jouvin, M. H., Kilgus, O., Kinet, J. P. and Stingl, G. Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. 1994. *J Exp Med* 179:745.
- 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.
- Mazingue, C., Cottrez, F., Auriault, C., Cesbron, J. Y. and Capron, A. Obtention of a human primary humoral response against schistosome protective antigens in severe combined immunodeficiency mice after the transfer of human peripheral blood mononuclear cells. 1991. *Eur J Immunol* 21:1763.
- McCune, J. M. SCID mice as immune system models. 1991. *Curr Opin Immunol* 3:224.
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M. and Weissman, I. L. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. 1988. *Science* 241:1632.
- McInnes, I. B., Leung, B. P., Sturrock, R. D., Field, M. and Liew, F. Y. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. 1997. *Nature Med* 3:189.
- 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.
- McWilliam, A. S., Napoli, S., Marsh, A. M., Pemper, F. L., Nelson, D., Pimm, C. L., Stumbles, P. A., Wells, T. N. C. and Holt, P. G. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. 1996. *J Exp Med* 184:2429.
- McWilliam, A. S., Nelson, D., Thomas, J. A. and Holt, P. G. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. 1994. *J Exp Med* 179:1331.
- Meding, S. J. and Langhorne, J. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. 1991. *Eur J Immunol* 21:1433.
- Melewicz, F. M., Kline, L. E., Cohen, A. B. and Spiegelberg, H. L. Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. 1982. *Clin Exp Immunol* 49:364.
- Melewicz, F. M. and Spiegelberg, H. L. Fc receptors for IgE on a subpopulation of human peripheral blood monocytes. 1980. *J Immunol* 125:1026.
- Melewicz, F. M., Zeiger, R. S., Mellon, M. H., O'Connor, R. D. and Spiegelberg, H. L. Increased peripheral blood monocytes with Fc receptors for IgE in patients with severe allergic disorders. 1981. *J Immunol* 126:1592.
- Mengelers, H. J., Maikoe, T., Brinkman, L., Hooibrink, B., Lammers, J. W. and Koenderman, L. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. 1994. *Am J Respir Crit Care Med* 149:345.
- Menz, G., Schmitz Schumann, M., Bottiger, J. and Virchow, C. Lack of PAF release in extrinsic asthma. 1987. *Agents Actions Suppl* 21:139.
- Mills, F. C., Mitchell, M. P., Harindranath, N. and Max, E. E. Human Ig S gamma regions and their participation in sequential switching to IgE. 1995. *J Immunol* 155:3021.
- Mills, F. C., Thyphronitis, G., Finkelman, F. D. and Max, E. E. Ig mu-epsilon isotype switch in IL-4-treated human B lymphoblastoid cells. Evidence for a sequential switch. 1992. *J Immunol* 149:1075.
- Mima, T., Saeki, Y., Ohshima, S., Nishimoto, N., Matsushita, M., Shimizu, M., Kobayashi, Y., Nomura, T. and Kishimoto, T. Transfer of rheumatoid arthritis into severe combined

immunodeficient mice. The pathogenetic implications of T cell populations oligoclonally expanding in the rheumatoid joints. 1995. *J Clin Invest* 96:1746.

**Minette, P., Lammers, J., Dixon, C., McCusker, M. and Barnes, P.** A muscarinic agonist inhibits reflex bronchoconstriction in normal but not in asthmatic subjects. 1989. *J Appl Physiol* 67:2461.

**Minette, P. A. and Barnes, P. J.** Prejunctional inhibitory muscarinic receptors on cholinergic nerves in human and guinea pig airways. 1988. *J Appl Physiol* 64:2532.

**Mingari, M. C., Maggi, E., Cambiaggi, A., Annunziato, F., Schiavetti, F., Manetti, R., Moretta, L. and Romagnani, S.** Development in vitro of human CD4+ thymocytes into functionally mature Th2 cells. Exogenous interleukin-12 is required for priming thymocytes to produce both Th1 cytokines and interleukin-10. 1996. *Eur J Immunol* 26:1083.

**Miyake, K., Medina, K. L., Hayashi, S., Ono, S., Hamaoka, T. and Kincade, P. W.** Monoclonal antibodies to PgP-1/CD44 block lymphohemopoiesis in long-term bone marrow culture. 1990. *J exp Med* 171:477.

**Miyake, K., Weissman, I. L., Greenberger, J. S. and Kincade, P. W.** Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. 1991. *J Exp Med* 173:599.

**Moller, G. M., Overbeek, S. E., Van Helden Meeuwse, C. G., Van Haarst, J. M., Prens, E. P., Mulder, P. G., Postma, D. S. and Hoogsteden, H. C.** Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:517.

**Montefort, S., Gratziou, C., Goulding, D., Polosa, R., Haskard, D. O., Howarth, P. H., Holgate, S. T. and Carroll, M. P.** Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. 1994. *J Clin Invest* 93:1411.

**Montefort, S., Roche, W. R., Howarth, P. H., Djukanovic, R., Gratziou, C., Carroll, M., Smith, L., Britten, K. M., Haskard, D., Lee, T. H. and et al.** Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) expression in the bronchial mucosa of normal and asthmatic subjects. 1992. *Eur Respir J* 5:815.

**Moreno, R. H., Hogg, J. C. and Pare, P. D.** Mechanics of airway narrowing. 1986. *Am Rev Respir Dis* 133:1171.

**Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. and Wilson, D. B.** Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. 1988. *Nature* 335:256.

**Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., Wilson, D. B., Spector, D. H. and Spector, S. A.** Human immunodeficiency virus infection of human-PBL-SCID mice. 1991. *Science* 251:791.

**Muller Ladner, U., Kriegsmann, J., Franklin, B. N., Matsumoto, S., Geiler, T., Gay, R. E. and Gay, S.** Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. 1996. *Am J Pathol* 149:1607.

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

**Murphy, W. J., Back, T. C., Conlon, K. C., Komschlies, K. L., Ortaldo, J. R., Sayers, T. J., Wiltrout, R. H. and Longo, D. L.** Antitumor effects of interleukin-7 and adoptive immunotherapy on human colon carcinoma xenografts. 1993a. *J Clin Invest* 92:1918.

**Murphy, W. J., Bennett, M., Anver, M. R., Baseler, M. and Longo, D. L.** Human-mouse lymphoid chimeras: host-vs.-graft and graft-vs.-host reactions. 1992a. *Eur J Immunol* 22:1421.

**Murphy, W. J., Conlon, K. C., Sayers, T. J., Wiltrout, R. H., Back, T. C., Ortaldo, J. R. and Longo, D. L.** Engraftment and activity of anti-CD3-activated human peripheral blood lymphocytes transferred into mice with severe combined immune deficiency. 1993b. *J Immunol* 150:3634.

- Murphy, W. J., Durum, S. K., Anver, M. R., Ferris, D. K., McVicar, D. W., O'Shea, J. J., Ruscetti, S. K., Smith, M. R., Young, H. A. and Longo, D. L. Induction of T cell differentiation and lymphomagenesis in the thymus of mice with severe combined immune deficiency (SCID). 1994. *J Immunol* 153:1004.
- Murphy, W. J., Durum, S. K. and Longo, D. L. Human growth hormone promotes engraftment of murine or human T cells in severe combined immunodeficient mice. 1992b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4481.
- Murphy, W. J., Tian, Z. G., Asai, O., Funakoshi, S., Rotter, P., Henry, M., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Longo, D. L. and Taub, D. D. Chemokines and T lymphocyte activation: II. Facilitation of human T cell trafficking in severe combined immunodeficiency mice. 1996. *J Immunol* 156:2104.
- Murray, L., Chen, B., Galy, A., Chen, S., Tushinski, R., Uchida, N., Negrin, R., Tricot, G., Jagannath, S., Vesole, D. and et al. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. 1995. *Blood* 85:368.
- Nagai, H., Yamaguchi, S., Maeda, Y. and Tanaka, H. Role of mast cells, eosinophils and IL-5 in the development of airway hyperresponsiveness in sensitized mice [see comments]  
Comment in: *Clin Exp Allergy* 1996 Jun;26(6):618-20. 1996. *Clin Exp Allergy* 26:642.
- Nakajima, H., Sano, H., Nishimura, T., Yoshida, S. and Iwamoto, I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. 1994. *J Exp Med* 179:1145.
- Nakamura, T., Morita, Y., Kuriyama, M., Ishihara, K., Ito, K. and Miyamoto, T. Platelet-activating factor in late asthmatic response. 1987. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 82:57.
- Namikawa, R., Kaneshima, H., Lieberman, M., Weissman, I. L. and McCune, J. M. Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. 1988. *Science* 242:1684.
- Namikawa, R., Weillbaecher, K. N., Kaneshima, H., Yee, E. J. and McCune, J. M. Long-term human hematopoiesis in the SCID-hu mouse. 1990. *J Exp Med* 172:1055.
- Newman, P. J., Berndt, M. C., Gorski, J., White, G. C., Lyman, S., Paddock, C. and Muller, W. A. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. 1990. *Science* 247:1219.
- Nieto, M., Frade, J. M., Mellado, M. and Martinez-A, C. S. M., F. Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. 1997. *J Exp Med* 186:153.
- NIH. International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. 1992. *Eur Respir J* 5:601.
- Nonoyama, S., Smith, F. O. and Ochs, H. D. Specific antibody production to a recall or a neoantigen by SCID mice reconstituted with human peripheral blood lymphocytes. 1993. *J Immunol* 151:3894.
- Nortamo, P., Li, R., Renkonen, R., Timonen, T., Prieto, J., Patarroyo, M. and Gahmberg, C. G. The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. 1991. *Eur J Immunol* 21:2629.
- O'Brien, R. M., Thomas, W. R. and Wootton, A. M. T cell responses to the purified major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. 1992. *J Allergy Clin Immunol* 89:1021.
- O'Byrne, P. M. Allergen-induced airway hyperresponsiveness. 1988. *J Allergy Clin Immunol* 81:119.
- 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.
- Oettinger, M. A. Cutting apart V(D)J recombination. 1996. *Curr Opin Genet Dev* 6:141.

**Ohashi, Y., Motojima, S., Fukuda, T. and Makino, S.** Airway hyperresponsiveness, increased intracellular spaces of bronchial epithelium, and increased infiltration of eosinophils and lymphocytes in bronchial mucosa in asthma [see comments]. 1992. *Am Rev Respir Dis* 145:1469.

**Ohkawara, Y., Yamauchi, K., Maruyama, N., Hoshi, H., Ohno, I., Honma, M., Tanno, Y., Tamura, G., Shirato, K. and Ohtani, H.** In situ expression of the cell adhesion molecules in bronchial tissues from asthmatics with air flow limitation: in vivo evidence of VCAM-1/VLA-4 interaction in selective eosinophil infiltration. 1995. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:4.

**Ohman, J. L., Jr., Lorusso, J. R. and Lewis, S.** Cat allergen content of commercial house dust extracts: comparison with dust extracts from cat-containing environment. 1987. *J Allergy Clin Immunol* 79:955.

**Osborn, L., Vassallo, C. and Benjamin, C. D.** Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. 1992. *J Exp Med* 176:99.

**Palmer, J. B., Cuss, F. M. and Barnes, P. J.** VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways. 1986. *J Appl Physiol* 61:1322.

**Patel, H. R., Oshiba, A., Jeppson, J. D. and Gelfand, E. W.** Differential expression of CD40 ligand on T cell subsets. Implications for different roles of CD45RA+ and CD45RO+ cells in IgE production. 1996. *J Immunol* 156:1781.

**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. 1988. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6880.

**Perez, M., Ishioka, G. Y., Walker, L. E. and Chesnut, R. W.** cDNA cloning and immunological characterization of the rye grass allergen Lol p I. 1990. *J Biol Chem* 265:16210.

**Perez Villar, J. J., Melero, I., Gismondi, A., Santoni, A. and Lopez Botet, M.** Functional analysis of alpha 1 beta 1 integrin in human natural killer cells. 1996. *Eur J Immunol* 26:2023.

**Peroni, D. G., Djukanovic, R., Bradding, P., Feather, I. H., Montefort, S., Howarth, P. H., Jones, D. B. and Holgate, S. T.** Expression of CD44 and integrins in bronchial mucosa of normal and mildly subjects. 1996. *Eur Respir J* 9:2236.

**Pesci, A., Foresi, A., Bertorelli, G., Chetta, A., Olivieri, D. and Oliveri, D.** Histochemical characteristics and degranulation of mast cells in epithelium and lamina propria of bronchial biopsies from asthmatic and normal subjects [published erratum appears in *Am Rev Respir Dis* 1993 Jul;148(1):following 264]. 1993. *Am Rev Respir Dis* 147:684.

**Pestel, J., Jeannin, P., Delneste, Y., Dessaint, J. P., Cesbron, J. Y., Capron, A., Tsicopoulos, A. and Tonnel, A. B.** Human IgE in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from Dermatophagoides pteronyssinus-sensitive patients. 1994. *J Immunol* 153:3804.

**Pestel, P., Duez, C., Jeannin, P., André, C. and Tonnel, A.-B.** Les allergènes recombinants d'acariens, un exemple: Der p 1. 1995. *Rev Fr Allergol* 35:278.

**Peterson, L. H. and Conrad, D. H.** Fine specificity, structure, and proteolytic susceptibility of the human lymphocyte receptor for IgE. 1985. *J Immunol* 135:2654.

**Petzelbauer, P., Groger, M., Kuntzfeld, R., Petzelbauer, E. and Wolff, K.** Human delayed-type hypersensitivity reaction in a SCID mouse engrafted with human T cells and autologous skin. 1996. *J Invest Dermatol* 107:576.

**Piali, L., Albelda, S. M., Baldwin, H. S., Hammel, P., Gisler, R. H. and Imhof, B. A.** Murine platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)/CD31 modulates beta 2 integrins on lymphokine-activated killer cells. 1993. *Eur J Immunol* 23:2464.



- Piccinni, M.-P., Beloni, L., Giannarini, L., Livi, C., Scarselli, G., Romagnani, S. and Maggi, E.** Abnormal production of T helper 2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 by T cells from newborns with atopic parents. **1996.** *Eur J Immunol* 26:2293.
- Pickl, W. F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello Fernandez, C. and Knapp, W.** Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. **1996.** *J Immunol* 157:3850.
- Pilewski, J. M. and Albelda, S. M.** Cell adhesion molecules in asthma: homing, activation, and airway remodeling. **1995.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:1.
- Platts Mills, T. A.** Atopic allergy: asthma and atopic dermatitis. **1991.** *Curr Opin Immunol* 3:873.
- Pollart, S. M., Mullins, D. E., Vailes, L. D., Hayden, M. L., Platts Mills, T. A., Sutherland, W. M. and Chapman, M. D.** Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. **1991.** *J Allergy Clin Immunol* 87:511.
- 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.
- Postma, D. S., Bleecker, E. R., Amelung, P. J., Holroyd, K. J., Xu, J., Panhuysen, C. I., Meyers, D. A. and Levitt, R. C.** Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. **1995.** *N Engl J Med* 333:894.
- Pretolani, M., Ruffie, C., Lapa e Silva, J. R., Joseph, D., Lobb, R. R. and Vargaftig, B. B.** Antibody to very late activation antigen 4 prevents antigen-induced bronchial hyperreactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. **1994.** *J Exp Med* 180:795.
- Proost, P., De Wolf-Peeters, C., Conings, R., Opdenakker, G., Billiau, A. and Van Damma, J.** Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. **1993.** *J Immunol* 150:1000.
- 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., Cocks, B. G. and de Vries, J. E.** IL-4 induces germ-line IgE heavy chain gene transcription in human fetal pre-B cells. Evidence for differential expression of functional IL-4 and IL-13 receptors during B cell ontogeny. **1995.** *J Immunol* 155:4248.
- Rand, T. H., Silberstein, D. S., Kornfeld, H. and Weller, P. F.** Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors. **1991.** *J Clin Invest* 88:825.
- 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.
- Rawle, F. C., Mitchell, E. B. and Platts Mills, T. A.** T cell responses to the major allergen from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, Antigen P1: comparison of patients with asthma, atopic dermatitis, and perennial rhinitis. **1984.** *J Immunol* 133:195.
- Reimann, J., Rudolphi, A. and Claesson, M. H.** Selective reconstitution of T lymphocyte subsets in scid mice. **1991.** *Immunol Rev* 124:75.
- Renz, H., Lack, G., Saloga, J., Schwitzer, R., Bradley, K., Loader, J., Kupfer, A., Larsen, G. L. and Gelfand, E. W.** Inhibition of IgE production and normalization of airways responsiveness by sensitized CD8 T cells in a mouse model of allergen-induced sensitization. **1994a.** *J Immunol* 152:351.
- Renz, M. E., Chiu, H. H., Jones, S., Fox, J., Kim, K. J., Presta, L. G. and Fong, S.** Structural requirements for adhesion of soluble recombinant murine vascular cell adhesion molecule-1 to alpha 4 beta 1. **1994b.** *J Cell Biol* 125:1395.

- Ricci, M. T cells, cytokines, IgE and allergic inflammation. 1992. *Int Arch Allergy Immunol* 99:165.
- Richards, I. M., Kolbasa, K. P., Hatfield, C. A., Winterrowd, G. E., Vonderfecht, S. L., Fidler, S. F., Griffin, R. L., Brashler, J. R., Krzesicki, R. F., Sly, L. M., Ready, K. A., Staite, N. D. and Chin, J. E. Role of very late activation antigen-4 in the antigen-induced accumulation of eosinophils and lymphocytes in the lungs and airway lumen of sensitized brown Norway rats. 1996. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:172.
- Robertson, D. N., Coyle, A. J., Rhoden, K. J., Grandordy, B., Page, C. P. and Barnes, P. J. The effect of platelet-activating factor on histamine and muscarinic receptor function in guinea pig airways. 1988. *Am Rev Respir Dis* 137:1317.
- Robertson, M. W. Phage and Escherichia coli expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alpha-subunit ectodomain. Domain localization of the IgE-binding site. 1993. *J Biol Chem* 268:12736.
- 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.
- Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. 1994. *Annu Rev Immunol* 12:227.
- Romagnani, S. Biology of human TH1 and TH2 cells. 1995. *J Clin Immunol* 15:121.
- Romagnani, S., Parronchi, P., D'Elis, M. M., Romagnani, P., Annunziato, F., Piccinni, M. P., Manetti, R., Sampognaro, S., Mavilia, C., De Carli, M., Maggi, E. and Del Prete, G. F. An update on human Th1 and Th2 cells. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:153.
- Roper, R. L. and Phipps, R. P. Prostaglandin E2 and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. 1992. *J Immunol* 149:2984.
- Rot, A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. 1993. *Eur J Immunol* 23:303.
- Roth, D. B., Menetski, J. P., Nakajima, P. B., Bosma, M. J. and Gellert, M. V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. 1992. *Cell* 70:983.
- Rothenberg, M. E., Luster, A. D. and Leder, P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. 1995b. *Proc Natl Acad Sci* 92:8960.
- Rothenberg, M. E., Luster, A. D., Lilly, C. M., Drazen, J. M. and Leder, P. Constitutive and allergen-induced expression of eotaxin mRNA in the guinea pig lung. 1995a. *J Exp Med* 181:1211.
- Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, N. M., Marlin, S. D., Mainolfi, E. and Merluzzi, V. J. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by proinflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. 1988. *J Immunol* 141:1665.
- Rumsaeng, V., Cruikshank, W. W., Foster, B., Prussin, C., Kirshenbaum, A. S., Davis, T. A., Kornfeld, H., Center, D. M. and Metcalfe, D. D. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. 1997. *J Immunol* 159:2904.
- Sacci, J. B., Jr., Schriefer, M. E., Resau, J. H., Wirtz, R. A., Detolla, L. J., Jr., Markham, R. B. and Azad, A. F. Mouse model for exoerythrocytic stages of Plasmodium falciparum malaria parasite. 1992. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3701.
- 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.

- Sakata, A., Sakata, K., Ping, H., Ohmura, T., Tsukano, M. and Kakimoto, K.** Successful induction of severe destructive arthritis by the transfer of in vitro-activated synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis (RA) in severe combined immunodeficient (SCID) mice. 1996. *Clin Exp Immunol* 104:247.
- Salmi, M. and Jalkanen, S.** A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. 1992. *Science* 257:1407.
- Salmi, M., Kalimo, K. and Jalkanen, S.** Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. 1993. *J Exp Med* 178:2255.
- Sandhu, J., Shpitz, B., Gallinger, S. and Hozumi, N.** Human primary immune response in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes. 1994. *J Immunol* 152:3806.
- Santini, S. M., Rizza, P., Logozzi, M. A., Sestili, P., Gherardi, G., Lande, R., Lapenta, C., Belardelli, F. and Fais, S.** The SCID mouse reaction to human peripheral blood mononuclear leukocyte engraftment. Neutrophil recruitment induced expression of a wide spectrum of murine cytokines and mouse leukopoiesis, including thymic differentiation. 1995. *Transplantation* 60:1306.
- Sastry, S. K. and Horwitz, A. F.** Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. 1993. *Curr Opin Cell Biol* 5:819.
- Satoh, N., Kudo, T., Saeki, H., Saijo, S., Hasumi, T., Yoshida, H., Kobayashi, S. and Fujimura, S.** A new and efficient method to generate human IgG monoclonal antibodies reactive to cancer cells using SCID-hu mice. 1995. *Immunol Lett* 47:113.
- 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.
- Saxon, A., Macy, E., Denis, K., Tary Lehmann, M., Witte, O. and Braun, J.** Limited B cell repertoire in severe combined immunodeficient mice engrafted with peripheral blood mononuclear cells derived from immunodeficient or normal humans. 1991. *J Clin Invest* 87:658.
- Schols, D., Vandekerckhove, B., Jones, D. and Roncarolo, M. G.** IL-2 reverses human T cell unresponsiveness induced by thymic epithelium in SCID-hu mice. 1994. *J Immunol* 152:2198.
- Schuler, W., Weiler, I. J., Schuler, A., Phillips, R. A., Rosenberg, N., Mak, T. W., Kearney, J. F., Perry, R. P. and Bosma, M. J.** Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. 1986. *Cell* 46:963.
- Seder, R. A., Boulay, J. L., Finkelman, F., Barbier, S., Ben Sasson, S. Z., Le Gros, G. and Paul, W. E.** CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. 1992. *J Immunol* 148:1652.
- Seder, R. A. and Paul, W. E.** Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. 1994. *Annu Rev Immunol* 12:635.
- Sedgwick, J. D. and Holt, P. G.** Induction of IgE-isotype specific tolerance by passive antigenic stimulation of the respiratory mucosa. 1983. *Immunology* 50:625.
- Sedgwick, J. D. and Holt, P. G.** Down-regulation of immune responses to inhaled antigen: studies on the mechanism of induced suppression. 1985a. *Immunology* 56:635.
- Sedgwick, J. D. and Holt, P. G.** Induction of IgE-secreting cells and IgE isotype-specific suppressor T cells in the respiratory lymph nodes of rats in response to antigen inhalation. 1985b. *Cell Immunol* 94:182.
- Shi, H., Qin, S., Huang, G., Chen, Y., Xiao, C., Xu, H., Liang, G., Xie, Z., Qin, X., Wu, J., Li, G. and Zhang, C.** Infiltration of eosinophils into the asthmatic airways caused by interleukin 5. 1997. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:220.
- Shiroki, R., Poindexter, N. J., Woodle, E. S., Hussain, M. S., Mohanakumar, T. and Scharp, D. W.** Human peripheral blood lymphocyte reconstituted severe combined immunodeficient (hu-PBL-SCID) mice. A model for human islet allograft rejection. 1994. *Transplantation* 57:1555.

**Shpitz, B., Chambers, C. A., Singhal, A. B., Hozumi, N., Fernandes, B. J., Roifman, C. M., Weiner, L. M., Roder, J. C. and Gallinger, S.** High level functional engraftment of severe combined immunodeficient mice with human peripheral blood lymphocytes following pretreatment with radiation and anti-asialo GM1. **1994.** *J Immunol Methods* 169:1.

**Sim, T. C., Hilsmeier, K. A., Reece, L. M., Grant, J. A. and Alam, R.** Interleukin-1 receptor antagonist protein inhibits the synthesis of IgE and proinflammatory cytokines by allergen-stimulated mononuclear cells. **1994.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:473.

**Simmons, D. L.** The role of ICAM expression in immunity and disease. **1995.** *Cancer Surv* 24:141.

**Sirinek, L. P. and O'Dorisio, M. S.** Modulation of immune function by intestinal neuropeptides. **1991.** *Acta Oncol* 30:509.

**Sligh, J. E., Jr., Ballantyne, C. M., Rich, S. S., Hawkins, H. K., Smith, C. W., Bradley, A. and Beaudet, A. L.** Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. **1993.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8529.

**Soler, P., Moreau, A., Basset, F. and Hance, A. J.** Cigarette smoking-induced changes in the number and differentiated state of pulmonary dendritic cells/Langerhans cells. **1989.** *Am Rev Respir Dis* 139:1112.

**Sonnenberg, A.** Integrins and their ligands. **1993.** *Curr Top Microbiol Immunol* 184:7.

**Sont, J. K., Booms, P., Bel, E. H., Vandenbroucke, J. P. and Sterk, P. J.** The severity of breathlessness during challenges with inhaled methacholine and hypertonic saline in atopic asthmatic subjects. The relationship with deep breath-induced bronchodilation. **1995.** *Am J Respir Crit Care Med* 152:38.

**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.

**Spiegelberg, H. L., Beck, L., Kocher, H. P., Fanslow, W. C. and Lucas, A. H.** Role of interleukin-4 in human immunoglobulin E formation in hu-PBL-SCID mice. **1994.** *J Clin Invest* 93:711.

**Spiegelberg, H. L., O'Connor, R. D., Simon, R. A. and Mathison, D. A.** Lymphocytes with immunoglobulin E Fc receptors in patients with atopic disorders. **1979.** *J Clin Invest* 64:714.

**Sprent, J., Schaefer, M., Hurd, M., Surh, C. D. and Ron, Y.** Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. **1991.** *J Exp Med* 174:717.

**Springer, T. A.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **1994.** *Cell* 76:301.

**Stampfli, M. R., Miescher, S., Aebischer, I., Zurcher, A. W. and Stadler, B. M.** Inhibition of human IgE synthesis by anti-IgE antibodies requires divalent recognition. **1994.** *Eur J Immunol* 24:2161.

**Stanley, P., Bates, P. A., Harvey, J., Bennett, R. I. and Hogg, N.** Integrin LFA-1 alpha subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V and VI. **1994.** *Embo J* 13:1790.

**Stanley, S. L. and Virgin, H. W.** SCID mice as models for parasitic infections. **1993.** *Parasitol Today* 9:406.

**Staunton, D. E., Dustin, M. L. and Springer, T. A.** Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. **1989.** *Nature* 339:61.

**Steinsvik, T. E., Aaberge, I. S., Gaardner, P. I., Bjonness, U. and Lovik, M.** Total and birch pollen-specific human IgE in mice with severe combined immunodeficiency transplanted with human peripheral blood lymphocytes: Donor dependence, seasonal variation and in vivo half-life. **1997.** *Int Arch Allergy Immunol* 112:175.

- 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.
- Sterk, P. J. and Bel, E. H.** Bronchial hyperresponsiveness: the need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing. 1989. *Eur Respir J* 2:267.
- Stewart, G. A., Simpson, R. J., Thomas, W. R. and Turner, K. J.** Physicochemical characterization of a major protein allergen, Der p I, from the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Amino acid analysis and circular dichroism studies. 1987. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 82:444.
- Stewart, G. A., Thompson, P. J. and Simpson, R. J.** Protease antigens from house dust mite [letter]. 1989. *Lancet* 2:154.
- Suemura, M., Kikutani, H., Barsumian, E. L., Hattori, Y., Kishimoto, S., Sato, R., Maeda, A., Nakamura, H., Owaki, H., Hardy, R. R. and et al.** Monoclonal anti-Fc epsilon receptor antibodies with different specificities and studies on the expression of Fc epsilon receptors on human B and T cells. 1986. *J Immunol* 137:1214.
- Sun, J., Elwood, W., Haczk, A., Barnes, P. J., Hellewell, P. G. and Chung, K. F.** Contribution of intercellular-adhesion molecule-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in sensitised brown-Norway rats. 1994. *Int Arch Allergy Immunol* 104:291.
- Sun, X. M. and Hsueh, W.** Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. 1988. *J Clin Invest* 81:1328.
- Sutton, B. J. and Gould, H. J.** The human IgE network. 1993. *Nature* 366:421.
- Swerlick, R. A., Lee, K. H., Li, L. J., Sepp, N. T., Caughmann, S. W. and Lawley, T. J.** Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. 1992. *J Immunol* 149:698.
- Tachimoto, H., Ebisawa, M., Iikura, Y., Kimata, M., Mori, K., Sakaguchi, N. and Akasawa, A.** Activated human mast cells release factors supporting eosinophil survival in vitro. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:293.
- Takeda, K., Hamelmann, E., Joetham, A., Irvin, C. G., Schultz, L. and Gelfand, E. W.** Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR) in allergen sensitized mast cell deficient mice. 1997. *J Allergy Clin Immunol* 99:S265.
- Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. and Shaw, S.** T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta [see comments]. 1993. *Nature* 361:79.
- Tanaka, Y., Albelda, S. M., Horgan, K. J., van Seventer, G. A., Shimizu, Y., Newman, W., Hallam, J., Newman, P. J., Buck, C. A. and Shaw, S.** CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. 1992. *J Exp Med* 176:245.
- Tanaka, Y., Takahashi, A., Arai, I., Inoue, T., Higuchi, S., Otomo, S., Watanabe, K., Habu, S. and Nishimura, T.** Prolonged inhibition of an antigen-specific IgE response in vivo by monoclonal antibody against lymphocyte function-associated antigen-1. 1995. *Eur J Immunol* 25:1555.
- Tary Lehmann, M., Lehmann, P. V., Schols, D., Roncarolo, M. G. and Saxon, A.** Anti-SCID mouse reactivity shapes the human CD4+ T cell repertoire in hu-PBL-SCID chimeras. 1994. *J Exp Med* 180:1817.
- Tary Lehmann, M. and Saxon, A.** Human mature T cells that are anergic in vivo prevail in SCID mice reconstituted with human peripheral blood. 1992. *J Exp Med* 175:503.
- Tarylehmann, M., Saxon, A. and Lehmann, P. V.** The human immune system in hu-PBL-SCID mice. 1995. *Immunol Today* 16:529.

- Taub, D. D., Conlon, K., Lloyd, A. R., Oppenheim, J. J. and Kelvin, D. J.** Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. 1993b. *Science* 260:355.
- Taub, D. D., Lloyd, A. R., Conlon, K., Wang, J. M., Ortaldo, J. R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D. J. and Oppenheim, J. J.** Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. 1993a. *J Exp Med* 177:1809.
- Taub, D. D., Tsarfaty, G., Lloyd, A. R., Durum, S. K., Longo, D. L. and Murphy, W. J.** Growth hormone promotes human T cell adhesion and migration to both human and murine matrix proteins in vitro and directly promotes xenogeneic engraftment. 1994. *J Clin Invest* 94:293.
- Tazi, A., Bouchonnet, F., Grandsaigne, M., Boumsell, L., Hance, A. J. and Soler, P.** Evidence that granulocyte macrophage-colony-stimulating factor regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers. 1993. *J Clin Invest* 91:566.
- Tedder, T. F., Isaacs, C. M., Ernst, T. J., Demetri, G. D., Adler, D. A. and Disteché, C. M.** Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. 1989. *J Exp Med* 170:123.
- Teran, L. M., Carroll, M., Frew, A. J., Montefort, S., Lau, L. C., Davies, D. E., Lindley, I., Howarth, P. H., Church, M. K. and Holgate, S. T.** Neutrophil influx and interleukin-8 release after segmental allergen or saline challenge in asthmatics. 1995. *Int Arch Allergy Immunol* 107:374.
- Teran, L. M. and Davies, D. E.** The chemokines: their potential role in allergic inflammation. 1996b. *Clin Exp Allergy* 26:1005.
- Teran, L. M., Noso, N., Carroll, M., Davies, D. E., Holgate, S. and Schroder, J. M.** Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. 1996a. *J Immunol* 157:1806.
- Thomas, P., Yates, D. and Barnes, P.** Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 152:76.
- Thompson, S. J. and Carswell, F.** The major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, is synthesized and secreted into its alimentary canal. 1988. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 85:312.
- 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.
- Tissot, J. D., Schneider, P., Schapira, M. and Duchosal, M. A.** Human immunoglobulins produced in hu-PBL-SCID mice are polyclonal early after xenotransplantation. 1996. *Cell Immunol* 167:241.
- Tonnel, A. B., Joseph, M., Gosset, P., Fournier, E. and Capron, A.** Stimulation of alveolar macrophages in asthmatic patients after local provocation test. 1983. *Lancet* 1:1406.
- Torbett, B. E., Picchio, G. and Mosier, D. E.** hu-PBL-SCID mice: a model for human immune function, AIDS, and lymphomagenesis. 1991. *Immunol Rev* 124:139.
- Townley, R. G., Hopp, R. J., Agrawal, D. K. and Bewtra, A. K.** Platelet-activating factor and airway reactivity [published erratum appears in *J Allergy Clin Immunol* 1990 Feb;85(2):532]. 1989. *J Allergy Clin Immunol* 83:997.
- Triozzi, P. L. and Aldrich, W.** Phenotypic and functional differences between human dendritic cells derived in vitro from hematopoietic progenitors and from monocytes/macrophages. 1997. *J Leukoc Biol* 61:600.
- 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. 1993. *J Exp Med* 177:243.

- Uckun, F. M., Evans, W. E., Forsyth, C. J., Waddick, K. G., Ahlgren, L. T., Chelstrom, L. M., Burkhardt, A., Bolen, J. and Myers, D. E. Biotherapy of B-cell precursor leukemia by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kinases. 1995b. *Science* 267:886.
- Uckun, F. M., Sather, H., Reaman, G., Shuster, J., Land, V., Trigg, M., Gunther, R., Chelstrom, L., Bleyer, A., Gaynon, P. and et al. Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia. 1995a. *Blood* 85:873.
- Underwood, S., Foster, M., Raeburn, D., Bottoms, S. and Karlsson, J. A. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea-pig and its relationship to airway hyperresponsiveness. 1995. *Eur Respir J* 8:2104.
- Vaddi, K. and Newton, R. C. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. 1994. *J Immunol* 153:4721.
- Valle, A., Aubry, J. P., Durand, I. and Banchereau, J. IL-4 and IL-2 upregulate the expression of antigen B7, the B cell counterstructure to T cell CD28: an amplification mechanism for T-B cell interactions. 1991. *Int Immunol* 3:229.
- 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 Pouw-Kran, C. T., Rensink, H. J., Rappuoli, R. and Aarden, L. A. Co-stimulation of T cells via CD28 inhibits human IgE production; reversal by pertussis toxin. 1995. *Clin Exp Immunol* 99:473.
- van Essen Zandvliet, E. E., Hughes, M. D., Waalkens, H. J., Duiverman, E. J. and Kerrebijn, K. F. Remission of childhood asthma after long-term treatment with an inhaled corticosteroid (budesonide): can it be achieved? Dutch CNSLD Study Group. 1994. *Eur Respir J* 7:63.
- 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.
- Vandekerckhove, B. A., Jones, D., Punnonen, J., Schols, D., Lin, H. C., Duncan, B., Bacchetta, R., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G. Human Ig production and isotype switching in severe combined immunodeficient-human mice. 1993. *J Immunol* 151:128.
- Vandekerckhove, B. A. E., Baccala, R., Jones, D., Kono, D. H., Theofilopoulos, A. N. and Roncarolo, M. G. Thymic selection of the human T cell receptor V beta repertoire in SCID-hu mice. 1992. *J Exp Med* 176:1619.
- Vaporciyan, A. A., DeLisser, H. M., Yan, H. C., Mendiguren, II, Thom, S. R., Jones, M. L., Ward, P. A. and Albelda, S. M. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. 1993. *Science* 262:1580.
- Venge, J., Lampinen, M., Sci, B., Hakansson, L., Rak, S. and Venge, P. Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. 1996. *J Allergy Clin Immunol* 97:1110.
- Vercelli, D. Regulation of IgE synthesis in humans. 1995. *J Biol Regul Homeost Agents* 9:1.
- 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. 1989. *Eur J Immunol* 19:1419.
- Vignola, A. M., Campbell, A. M., Chanez, P., Bousquet, J., Paul Lacoste, P., Michel, F. B. and Godard, P. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis. 1993. *Am Rev Respir Dis* 148:689.
- Waldmann, T. A. Disorders of immunoglobulin metabolism. 1969. *N Engl J Med* 281:1170.

**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., Kaegi, M. K., Braun, P. and Blaser, K.** Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. 1991. *J Allergy Clin Immunol* 88:935.

**Walker, W. and Gallagher, G.** The in vivo production of specific human antibodies by vaccination of human-PBL-SCID mice. 1994. *Immunology* 83:163.

**Wardlaw, A., Chung, K., Moqbel, R., MacDonald, A., Hartnell, A., McCusker, M., Collins, J., Barnes, P. and Kay, A.** Effects of inhaled PAF in humans on circulating and bronchoalveolar lavage fluid neutrophils. Relationship to bronchoconstriction and changes in airway responsiveness. 1990. *Am Rev Respir Dis* 141:386.

**Warner, S. J. and Libby, P.** Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. 1989. *J Immunol* 142:100.

**Watanabe, M., Kobayashi, M., Iida, K. I., Ozeki, M., Doi, S. and Hoshino, T.** Langerhans cells in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). 1996. *Arch Histol Cytol* 59:347.

**Webb, L. M., Ehrenguber, M. U., Clark Lewis, I., Baggiolini, M. and Rot, A.** Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7158.

**Wegner, C. D., Gundel, R. H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L. G. and Rothlein, R.** Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. 1990. *Science* 247:456.

**Welker, P., Grabbe, J., Zuberbier, T. and Henz, B. M.** GM-CSF downregulates expression of tryptase, Fc epsilon RI and histamine in HMC-1 mast cells. 1997. *Int Arch Allergy Immunol* 113:284.

**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.

**Wilhelm, D., Klouche, M., Gorg, S. and Kirchner, H.** Expression of sCD23 in atopic and nonatopic blood donors: correlation with age, total serum IgE, and allergic symptoms. 1994. *Allergy* 49:521.

**Wilkinson, P. C. and Liew, F. Y.** Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. 1995. *J Exp Med* 181:1255.

**Williams, S. S., Umemoto, T., Kida, H., Repasky, E. A. and Bankert, R. B.** Engraftment of human peripheral blood leukocytes into severe combined immunodeficient mice results in the long term and dynamic production of human xenoreactive antibodies. 1992d. *J Immunol* 149:2830.

**Wu, C. Y., 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.

**Yamada, A., Kaneyuki, T., Torimoto, Y., Daley, J. F., Prado, C. M. and Yokoyama, M. M.** Signaling from LFA-1 contributes signal transduction through CD2 alternative pathway in T cell activation. 1992. *Cell Immunol* 142:145.

**Yamaoka, K. A., Dugas, B., Paul Eugene, N., Mencia Huerta, J. M., Braquet, P. and Kolb, J. P.** Leukotriene B4 enhances IL-4-induced IgE production from normal human lymphocytes. 1994. *Cell Immunol* 156:124.

**Yan, H. C., Delisser, H. M., Pilewski, J. M., Barone, K. M., Szklut, P. J., Chang, X. J., Ahern, T. J., Langer Safer, P. and Albelda, S. M.** Leukocyte recruitment into human skin transplanted onto severe combined immunodeficient mice induced by TNF-alpha is dependent on E-selectin. 1994. *J Immunol* 152:3053.



**Yan, H. C., Juhasz, I., Pilewski, J., Murphy, G. F., Herlyn, M. and Albelda, S. M.** Human/severe combined immunodeficient mouse chimeras. An experimental in vivo model system to study the regulation of human endothelial cell-leukocyte adhesion molecules. **1993.** *J Clin Invest* 91:986.

**Yanagihara, Y., Kajiwara, K., Basaki, Y., Ikizawa, K. and Saito, H.** Induction of human IgE synthesis in B cells by a basophilic cell line, KU812. **1997.** *Clin Exp Immunol* 108:295.

**Yanagihara, Y., Kajiwara, K., Ikizawa, K., Koshio, T., Okumura, K. and Ra, C.** Recombinant soluble form of the human high-affinity immunoglobulin E (IgE) receptor inhibits IgE production through its specific binding to IgE-bearing B cells. **1994.** *J Clin Invest* 94:2162.

**Yanagihara, Y., Sarfati, M., Marsh, D., Nutman, T. and Delespesse, G.** Serum levels of IgE-binding factor (soluble CD23) in diseases associated with elevated IgE. **1990.** *Clin Exp Allergy* 20:395.

**Ying, S., Robinson, D. S., Varney, V., Meng, Q., Tscopoulos, A., Moqbel, R., Durham, S. R., Kay, A. B. and Hamid, Q.** TNF alpha mRNA expression in allergic inflammation. **1991.** *Clin Exp Allergy* 21:745.

**Yodoi, J. and Ishizaka, K.** Lymphocytes bearing Fc receptors for IgE. I. Presence of human and rat T lymphocytes with Fc epsilon receptors. **1979.** *J Immunol* 122:2577.

**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.

**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.

**Zeiss, C. R., Pruzansky, J. J., Patterson, R. and Roberts, M.** A solid phase radioimmunoassay for the quantitation of human reaginic antibody against ragweed antigen E. **1973.** *J Immunol* 110:414.

**Zhang, K., Max, E. E., Cheah, H. K. and Saxon, A.** Complex alternative RNA splicing of epsilon-immunoglobulin transcripts produces mRNAs encoding four potential secreted protein isoforms [published erratum appears in *J Biol Chem* 1994 Dec 9;269(49):31322]. **1994b.** *J Biol Chem* 269:456.

**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. **1994a.** *J Immunol* 152:3427.

**Zhang, K., Saxon, A. and Max, E. E.** Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons. **1992.** *J Exp Med* 176:233.

**Zheng, Y., Shopes, B., Holowka, D. and Baird, B.** Conformations of IgE bound to its receptor Fc epsilon RI and in solution. **1991.** *Biochemistry* 30:9125.

# ANNEXES

# **ANNEXE 1**

## ***MATERIELS ET METHODES***

## **1- Les souris**

Des souris CB.17 SCID élevées et maintenues dans des conditions stériles strictes (en isolateur) à l'Institut Pasteur de Lille, et n'ayant reçu aucun traitement antibiotique, ont été utilisées au cours de cette étude. Ces souris SCID dérivent d'une colonie établie par le Pr. M. Lieberman (Stanford University) et gracieusement mises à la disposition du Dr. JY. Cesbron.

## **2- Les patients**

Dans cette étude, ont été inclus :

- 36 patients allergiques à Dpt c'est à dire présentant des tests cutanés positifs à D.pt, et des taux d'IgE totales variant de 400 à 5000 UI/ml.
- 2 patients allergiques aux pollens ayant un taux d'IgE sériques totales de 300 et 1000 UI/ml, ne présentant pas de test cutané positif à Dpt. Ils ont servi de contrôle de spécificité de la réponse à l'inhalation.
- 3 sujets non allergiques, testés comme contrôle négatif.

Les patients ont été recrutés dans le service d'immunoallergologie du Pr. A.B. Tonnel (Hopital Calmette de Lille), chaque patient ayant donné son accord pour participer à cette étude.

## **3- Les cellules mononucléées de sang périphérique humain**

Le sang de sujets sensibles ou non à Dpt est prélevé sur héparinate de Calcium. Après dilution au 1/2 dans du milieu RPMI 1640, il est déposé sur gradient Ficoll-Hypaque (Pharmacia), et centrifugé à 400 g pendant 30 min à 15°C. Les cellules mononucléées, présentes à l'interface, sont recueillies et lavées 3 fois en RPMI par centrifugations successives à 800g pendant 7 min. Le culot cellulaire est resuspendu en milieu RPMI, avant injection à l'animal.

#### **4- Transfert de cellules et protocoles de nébulisation**

10 à 20x10<sup>6</sup> cellules humaines sont injectées par voie i.p aux souris SCID.

Trois protocoles ont été suivis:

\* **Protocole 1:** Deux semaines après le transfert, les souris sont exposées à un aérosol de Dpt. Le premier jour de l'inhalation est noté J0. Pendant 4 jours consécutifs, les souris SCID humanisées sont exposées à un aérosol de 100 IR/ml par jour (IR = unité biologique de réactivité, 100 IR est équivalent à 200µg de protéines). La solution de Dpt est transformée en gouttelettes de 3-5µm de diamètre à l'aide d'un nébulisateur.

\* **Protocole 2:** Au moment de la reconstitution, une injection i.p de 2 à 5 IR de Dpt est réalisée. Quatre jours après le transfert, soit J0, les souris sont exposées à un aérosol de 100 IR de Dpt par jour pendant 4 jours.

\* **Protocole 3:** Un jour avant la reconstitution, les souris SCID reçoivent 50ml d'Ac ASGM1 par voie i.p. Puis, au moment de la reconstitution, une injection i.p de 2 IR de Dpt est réalisée. Quatre jours après le transfert, les souris sont exposées à un aérosol de Dpt, tout comme dans le protocole 2.

Dans certains cas, une exposition à Dpt est réalisée 24 heures avant de sacrifier l'animal (inhalation de pré-sacrifice).

#### **5- Dosage des IgE totales et spécifiques vis à vis de Dpt**

Les souris SCID reconstituées sont saignées de manière cinétique jusqu'à J60, au niveau du sinus rétro-orbital après une anesthésie à l'éther.

##### **\* Dosage des IgE totales**

Le dosage des IgE sériques a été effectué par la méthode de CAP-system (Pharmacia) utilisée dans le service du Département de Biologie Spécialisée de l'Institut Pasteur de Lille.

Brièvement, des Ac anti-IgE, couplés à un cylindre de mousse, fixent les IgE sériques, éventuellement présentes dans le sérum de souris SCID reconstituées. Les IgE sont ensuite révélés à l'aide d'un autre Ac anti-IgE marqué à la fluorescéine. Le taux d'IgE est alors

proportionnel à la quantité de fluorescence détectée. La sensibilité du dosage est de 0,1 UI/ml, et 50µl de sérum de souris SCID humanisées sont nécessaires.

**\* Dosage des IgE spécifiques vis-à-vis de Dpt**

Les IgE spécifiques dirigées contre l'allergène Dpt sont quantifiées à l'aide d'un test radioimmunologique.

L'adsorption du Dpt sur des cupules en polyvinyl (Microtest, Falcon 3911) s'effectue en incubant 100 µl par puits d'une solution de Dpt à 80 µg/ml en tampon carbonate-bicarbonate 0.1M de pH 9.6 à 4°C pendant une nuit. Parallèlement, une solution de PBS-BSA 1% est adsorbée sur l'autre moitié de la plaque qui servira à déterminer la fixation non spécifique. Après saturation avec 200µl d'une solution de PBS-BSA 1% pendant 2h à température ambiante, les sérums des souris SCID (100 µl dilués au 1/2) sont incubés à 4°C pendant une nuit. A la suite de 4 lavages avec du PBS-Tween 0,1%, 100µl d'Ac anti-IgE radiomarquées par l'<sup>125</sup>I (5.10<sup>5</sup> cpm/100µl) sont ajoutés dans chaque puits. Après une incubation de 16 heures à 4°C, et lavage en PBS-Tween 0,1%, les cupules sont découpées, et la radioactivité liée est mesurée grâce à un compteur gamma. Les résultats sont exprimés en coups par minutes (cpm), déduction faite du bruit de fond représenté par le nombre de cpm obtenu dans les puits recouverts de BSA.

**6- Préparation de coupes d'organes de souris SCID reconstituées**

Un prélèvement des poumons, de la rate, du thymus et des ganglions lymphoïdes (lorsqu'ils existent), a été effectué dans les divers groupes de souris SCID reconstituées. Deux types de traitements ont été utilisés : l'un pour obtenir des coupes à partir d'organes congelés, l'autre pour obtenir des coupes d'organes préservés en paraffine.

Une partie des poumons, de la rate et du thymus est fixé, immédiatement après le prélèvement, avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (dans du PBS "RNase-free") pendant 2 heures. Les organes sont alors soit inclus, après déshydratation en PBS-15% de sucrose, dans une résine (OCT) qui est solidifiée par congélation dans de l'azote liquide, soit inclus dans de la paraffine, après déshydratation progressive par l'éthanol. Les coupes de 5µm d'épaisseur, respectivement obtenues à l'aide d'un cryostat et d'un microtome, sont déposées sur des lames coatées au moyen d'une solution d'aminopropyltriéthoxysilane 2%-acétone (Sigma).

## **7- Hybridation *in situ* fluorescente**

Cette technique permet de détecter des cellules humaines chez la souris SCID [Martino, 1993]. La sonde utilisée est une sonde ADN biotinyllée contenant des séquences "alpoïdes", et dirigée contre tous les centromètres humains (Oncor). Elle est révélée grâce à de l'avidine couplée à de la fluorescéine.

Avant hybridation, les coupes en paraffine subissent plusieurs traitements. Elles sont d'abord déparaffinées dans un bain de xylène (10 min), et soumises à 2 bains d'éthanol 100% de 5 minutes chacun, puis séchées à l'air. Après 25 min de digestion enzymatique à 37°C en présence d'une protéase diluée à 2,5µg/ml en 2xSSC de pH 7, les lames sont lavées 3 fois pendant 1min en 2xSSC à 25°C. Les sections sont ensuite déshydratées par des bains successifs (2min) d'éthanol 70%, 80%, 90% et 100%. Après un bain d'acétone 100% de 2min, les lames sont séchées et prêtes à subir l'hybridation.

Pour l'hybridation, la sonde est dénaturée en la plaçant 5 min dans un bain-marie à 70°C, puis rapidement dans de la glace. 20µl de sonde pure sont déposées sur chaque section préchauffée à 37°C. Après une incubation d'une nuit à 37°C, les lavages de posthybridation sont effectués à 37°C : 2 fois 15min dans une solution de pH 7 contenant 20% de 20xSSC et 50% de formamide, et 1 fois 30min dans une solution de 0,1 x SSC à pH 7. Afin d'éviter tout séchage, les lames sont placées en tampon phosphate (noté PBD) avant la phase de détection.

La sonde biotinyllée est détectée avec la fluorescéine-avidine, puis amplifiée par l'utilisation successive d'un Ac anti-avidine et de fluorescéine-avidine (20min à 25°C, à chaque étape).

Afin de bien identifier les cellules, les noyaux sont colorés par de l'iodure de propidium dilué au 1/2 dans de l'antifade. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope à fluorescence sous excitation de 450-490 nm.

## **8. Immunohistochimie sur coupes d'organes**

Avant de procéder au marquage par l'Ac primaire, les lames sont saturées pendant 1 heure avec 20% de sérum humain normal dans un tampon phosphate, noté TBS, contenant 10% de Tris-HCl/0,5M/pH 7,6 et 10% de NaCl/1,5M. Les Ac primaires utilisés sont spécifiques des marqueurs humains suivants: CD45, CD4, CD54 (ICAM-1) (Becton

Dickinson, Mountain View, Ca, USA), CD45RO, CD20, CD8, CD23, IgE, HLA-DR (Dako SA, Trappes, France), CD11a, CD49d (VLA-4) (Immunotech, Marseille, France). Tous ces Ac présentent une spécificité vis-à-vis des molécules humaines et la révélation sur des tissus murins est négative. Des IgG1 et IgG2a murines (Dako SA) sont utilisées comme isotypes contrôles.

Après lavages en TBS, et une nouvelle saturation en TBS-20% de sérum humain normal, une incubation avec l'Ac secondaire, un Ac polyclonal de lapin dirigé contre les Ig de souris (Dako SA), suivie d'une incubation avec un complexe phosphatase alcaline/Ac anti-phosphatase alcaline (noté APAAP) (Dako SA), a été réalisée.

Enfin, de façon à amplifier le signal, une deuxième séquence réactionnelle est effectuée, pour la détection de certains marqueurs humains, avec l'Ac de lapin et l'APAAP, utilisés aux mêmes dilutions que précédemment.

La révélation enzymatique finale nécessite du Fast-Red (Sigma) comme substrat (coloration rouge). La réaction est arrêtée avec de l'eau distillée. Finalement, les noyaux sont contre-colorés par de l'hématoxyline pure pendant une trentaine de secondes. Les lames sont ensuite montées en Glycergel (Dako SA), et prêtes pour une observation microscopique.

## **9. Extraction des ARNm**

Les organes sont lysés dans le RNazol (Bioprobe systems, Montreuil-sous-bois, France); 200 µl de chloroforme sont ensuite ajoutés. Suite à une centrifugation 15 min à 12000g à 4°C, l'ARN est alors exclusivement présent dans la phase aqueuse (phase supérieure); les protéines et l'ADN se trouvant dans la phase organique (phase inférieure). L'ARN est précipité dans de 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 pour préparations injectables (PPI). 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.



## 10. RT-PCR à partir d'ARNm extraits d'organes

La rétrotranscription s'effectue sur un volume correspondant à 1 µg d'ARN auquel sont ajoutés des amorces oligo-dT à 0,1µg/ml (Boehringer), et de la RNAsin à 4U/µl (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 RNAsin à 4U/µl, du dithiothréitol (DTT) à 0,1M (Gibco BRL), de l'enzyme MMLV-transcriptase reverse (mouse moloney leukemia virus, Gibco BRL) à 200U/µl, et du dNTP (Pharmacia, Suède) à 10mM. L'ensemble est incubé 1h à 42°C puis chauffé 5min à 95°C. La solution finale correspond à 50 µl 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 à partir d'amorces spécifiques de G3PDH (Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase), d'IL-4 et d'IL-16 humaines (Eurogentec) dans une réaction de PCR de volume final de 25 µl contenant : 100 µM de dATP, dCTP, dGTP et 95 µM dTTP (Pharmacia); 0,1µM digoxigenin-11-dUTP (dans le cas de l'IL-4) (Boehringer); 0,5 µM des amorces; 1,25U/µl 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 le thermocycler (cyclone integra biosciences) pour l'amplification. Les séquences de ces différentes amorces sont les suivantes :

- \* **G3PDH** sens: 5'-GTGGTGCAGGAGGCATTGCTGA-3'  
anti-sens: 5'-GCTCAGACACCATGGGGAAGGT-3'
- \* **IL-4** sens: 5'-AAGCCCGCCAGGCCCCAGAGGTTTCCT-3'  
anti-sens: 5'-CTCACAGAGCAGAAGACTCTG-3'
- \* **IL-16** sens: 5'-GGCTTCAGCCTGGAAGGAGG-3'  
anti-sens: 5'-CTAGGAGTCTCCAGCAGCTGT-3'

Le gène codant pour la G3PDH 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 G3PDH est considérée comme témoin interne des expériences de PCR.

La G3PDH, l'IL-4 et l'IL-16 ont été étudiés conjointement et le nombre de cycles permettant une amplification linéaire des produits de PCR a été déterminé dans des expériences préliminaires (23 ou 28 cycles pour la G3PDH; 28 pour l'IL-4 ; 35 pour l'IL-16). 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 55°C (pour la G3PDH et l'IL-4) ou 66°C (pour l'IL-16) 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 ou Sybr-Green (pour l'IL-16), les produits de PCR sont transférés sur une membrane de nylon (Boehringer) par capillarité, sur la nuit (pour l'IL-4). Après transfert, la membrane est séchée puis fixée aux UV. Les ADNc sont révélés par l'intermédiaire d'un anticorps anti-digoxigénine marqué à la phosphatase alcaline catalysant une réaction de chimioluminescence (CDP-star, Boehringer).

## 11. Administration d'Ac anti-ICAM-1 murine



L'Ac anti-ICAM-1 est produit à partir de la lignée de rat YN 1/1.7.4 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA). Les surnageants de culture sont passés sur colonne de protéine G-sépharose (Pharmacia Biotech). Après élution, la solution est dialysée et concentrée à l'aide de colonne centricon (Amicon, Beverly, MA, USA). La pureté de l'Ac est vérifiée sur gel d'acrylamide 8% - SDS. Toutes les étapes ont été réalisées en conditions endotoxin-free.

Des pompes micro-osmotiques Alzet (Alza Corp., Palo Alto, CA, USA) contenant 0,5mg de l'Ac YN 1/1.7.4 ou de l'IgG contrôle de rat (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA), sont implantées dans un espace sous-cutané situé au niveau dorsal de l'animal anesthésié. La capacité des pompes est de  $90 \pm 4 \mu\text{l}$  et leur capacité de 0,05  $\mu\text{l}$  /heure. Les pompes sont remplacées 3 fois, et ceci tous les 7 jours. Une injection i.p de 0,5 mg d'Ac est réalisée en fin d'expérience, 24 heures avant l'inhalation de Dpt de pré-sacrifice.

## 12. Mesure de l'hyperréactivité des voies aériennes au carbachol

L'HRB est analysée 24 heures après une exposition à un aérosol de Dpt (100 IR). Les animaux sont anesthésiés puis des cathéters sont introduit au niveau de la trachée et de la veine jugulaire. La respiration spontanée est interrompue par injection intraveineuse de bromure de pancuronium (1 mg/kg). Les animaux sont ventilés à l'aide d'un respirateur Palmer (tidal volume: 0,5ml, taux respiratoire: 135 battements/min). Avec ces paramètres respiratoires,

l'équilibre acide/base est maintenu dans la zone physiologique comme le montre l'analyse de la pression artérielle. La résistance pulmonaire, témoin du calibre des voies aériennes, est enregistrée continuellement (PMS PR800, Mumed, London, UK), selon les principes décrits par Amdur *et al* [Kips, 1996], en mesurant le flux d'air passant par la canule trachéale et la pression transpulmonaire à des points d'égal volume au cours du cycle respiratoire. Le flux est mesuré à l'aide d'un pneumotachygraphe (Fleisch, Geneva, Switzerland), alors que la pression transpulmonaire est mesurée à l'aide d'un transducteur de pression différentielle, connecté d'une part à la sortie de la canule trachéale, et d'autre part à une aiguille insérée dans la cavité pleurale. Le carbachol est administré par voie intraveineuse avec une pompe de micro-infusion, à des doses croissantes (1, 3, 10, 30 et 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) jusqu'à ce qu'au moins 50% d'augmentation de la résistance soit observée. Les courbes dose-réponse sont construites, et la dose de carbachol causant 50% d'augmentation de la résistance (PC50) est calculée à partir de extrapolation linéaire d'une courbe dose-réponse semi-logarithmique.

**ANNEXE 2**

***LISTE DES PUBLICATIONS  
ET COMMUNICATIONS***

## PUBLICATIONS

- 1995-1 Tonnel, A.B., Jeannin, P., **Duez, C.**, Cesbron, J.Y., Capron, A. & Pestel, J.  
Human IgE production in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from allergic asthmatic patients.  
*Int. Archs. Allergy. Immunol.* 1995, 107: 223-225.
- 1995-2 Pestel, J., **Duez, C.**, Jeannin, P., André, C., Tonnel A.B.  
Les allergènes recombinants d'acariens, un exemple : Der p1.  
*Rev. Fr. Allergol.*, 1995, 35(3): 278-282.
- 1996-1 **Duez, C.**, Tsicopoulos, A., Janin, A., Tillie-Leblond, I., Thyphronitis, G., Marquillies, P., Hamid, Q., Wallaert, B., Tonnel, A.B. & Pestel, J.  
An in vivo model of allergic inflammation : pulmonary human cell infiltrate in allergen-challenged allergic Hu-SCID mice.  
*Eur. J. Immunol.*, 1996, 26: 1088-93.
- 1996-2 Tsicopoulos, A., Labalette, M., Akoum, H., **Duez, C.**, Wallaert, B., Dessaint, J.P., Tonnel, A.B.  
CD28 expression in patients undergoing rush venom immunotherapy.  
*Clin. Exp. Allergy.* , 1996, 26:1119-1124.
- 1997-1 **Duez, C.**, Akoum H., Marquillies P, Tonnel A.B & Pestel, J.  
Allergen-induced migration of human cells in allergic hu-SCID mice.  
*Scand J Immunol*, 1997, in press.
- 1997-2 Comoy, E. E., Pestel, J., **Duez, C.**, Stewart, G. A., Vendeville, C., Finkelman, F., Capron, A. & Thyphronitis, G.  
The allergen Der p 1 promotes type 2 responses, by modulating the balance between IL-4 and IFN- $\gamma$ .  
*J. Immunol.*, 1997, in press.
- 1997-3 Akoum, H., **Duez, C.**, Vorng, H., Wallaert, B., Tonnel, A.B. & Tsicopoulos, A.  
Rush venom immunotherapy induces *in vivo* basophil desensitization to RANTES.  
submitted.
- 1997-4 Akoum, H., **Duez, C.**, Vorng, H., Wallaert, B., Tonnel, A.B. & Tsicopoulos, A.  
Early modifications of chemokine production and mRNA expression during rush venom immunotherapy.  
submitted.

## COMMUNICATIONS

- 1994 Tonnel, A.B., Jeannin, P., **Duez, C.**, Cesbron, J.Y., Capron, A. & Pestel, J.  
Human IgE production in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from allergic asthmatic patients.  
*Molecular and Clinical Implications for Allergy*, Collegium Internationale Allergologicum, Nantucket, Massachusetts, Sept. 25-29, 1994
- 1995 **Duez, C.** and Pestel, J.  
Induction d'une réponse IgE chez les souris SCID reconstituées avec des cellules mononucléées de patients allergiques.  
Journée recherche de la Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF), Oct. 27th 1994, Paris.  
Rev. Mal. Resp., 1995, 12 : R4.
- 1995 Pestel, J., **Duez, C.**, Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Cesbron, J.Y., Capron, A., & Tonnel, A.B.  
Induction of a specific human IgE response and of a CD45+ human cells lung infiltrate in SCID mice reconstituted with mononuclear cells from allergic patients after allergen inhalation  
51 Ann. Meet. Am. Acad. All. Immunol. (AAAI), february 24th-march 1st 1995, New York.  
*J. All. Clin. Immunol.* 1995, **95**: 174.
- 1995 **Duez, C.**, Pestel, J., Wallaert, B., Marquillies, P., Cesbron, J.Y., Tsicopoulos, A. & Tonnel, A.B.  
Effect of the mode of allergen administration on human IgE response observed in SCID mice engrafted with mononuclear cells from allergic patients.  
51 Ann. Meet. Am. Acad. All. Immunol. (AAAI), february 24th-march 1st 1995, New York.  
*J. All. Clin. Immunol.* 1995, **95**: 175.
- 1996 **Duez, C.**, Tsicopoulos, A., Janin, A., Wallaert, B., Tillie-Leblond, I., André, C., Hamid, Q., Tonnel, A.B. & Pestel, J.  
Development of a pulmonary inflammatory-type reaction in humanized SCID mice after sensitization by allergen aerosols.  
52 Ann. Meet. Am. Acad. All. Asthma Immunol. (AAAAI), March 15-20, New Orleans, Louisiana.  
*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 97 (NO 1 Part 3): A252.
- 1997 **Duez, C.**, Tsicopoulos, A., Janin, A., Tonnel, A.B. & Pestel, J.  
Caractéristique de la réaction inflammatoire pulmonaire induite par l'allergène chez la souris SCID humanisée allergique.  
Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, Nov. 27-29, Paris.
- 1997 **Duez, C.**, Pestel, J., Lassalle, P., Tsicopoulos A. & Tonnel, A.B.  
Allergen-induced migration of the human cells in the lungs, spleen and thymus of allergic hu-SCID mice.  
53 Ann. Meet. Am. Acad. All. Asthma Immunol. (AAAAI), February 21-26, San Francisco, California.  
*J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997.

## **ANNEXE 3**

### ***TABLE DES MATIERES***

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION - GENERALITES</b> .....	<b>3</b>
<b>I- MECANISMES DE LA REACTION ALLERGIQUE:</b>	
<b>CAS DE L'ASTHME ALLERGIQUE</b> .....	<b>3</b>
1- LA REPOSE IgE .....	4
1.1- Les allergènes.....	4
1.1.1- Les allergènes d'acariens.....	4
1.1.1.1- Les principaux allergènes de Dermatophagoïdes .....	5
1.1.1.2- Un exemple d'allergène recombinant: Der p 1 .....	5
* Cartographie des épitopes B de Der p 1 .....	6
* Cartographie des épitopes T de Der p 1 .....	6
1.1.2- Autres allergènes.....	7
1.2- Induction de la synthèse d'IgE.....	8
1.2.1- Les 2 signaux nécessaires à la synthèse d'IgE .....	9
1.2.1.1- Premier signal: l'IL-4 ou l'IL-13 .....	9
1.2.1.2- Deuxième signal: l'interaction CD40-CD40L .....	9
1.2.2- Aspects moléculaires de la commutation vers l'IgE.....	10
1.2.2.1- Structure du gène codant pour la partie constante des.....	10
1.2.2.2- Mécanisme de la commutation isotypique vers l'IgE.....	11
1.2.2.3- Nécessité absolue du transcrit stérile pour la commutation isotypique vers l'IgE.....	13
1.2.2.4- Obtention de différents transcrits productifs après épissage alternatif.....	13
1.3- Régulation de la réponse IgE.....	14
1.3.1- Régulation par des facteurs solubles.....	14
1.3.1.1- Les cytokines de type 1 et 2 .....	14
* Nature des signaux polarisant vers le type Th1 ou Th2 .....	16
* Th1/Th2 et allergie.....	17
* Lymphocytes CD8+ de type 1 et 2.....	17
1.3.1.2- Autres cytokines.....	17
1.3.1.2- Autres facteurs solubles .....	18
1.3.2- Régulation par des contacts cellulaires: rôle des molécules accessoires .....	18
1.3.2.1- Rôle des familles de récepteurs CD28 et B7 .....	19
1.3.2.2- Rôle de l'interaction CD23/CD21 .....	19
1.3.2.3- Rôle de l'interaction ICAM-1/LFA-1 .....	20
1.3.2.4- Rôle de l'interaction CD58/CD2.....	20
1.3.3- Intervention d'autres cellules que les lymphocytes T CD4+ dans la régulation de la synthèse d'IgE.....	21
1.3.3.1- Les cellules T $\gamma/\delta$ et la régulation d'IgE.....	21
1.3.3.1- Les basophiles/mastocytes et la régulation d'IgE.....	21
1.4- Les récepteurs de l'IgE .....	21
1.4.1- Le récepteur de haute affinité: Fc $\epsilon$ R I.....	21
1.4.1.1- Structure et localisation du Fc $\epsilon$ R I.....	22
1.4.1.2- Fonctions du Fc $\epsilon$ R I .....	22
1.4.1.3- Fc $\epsilon$ R I et allergie.....	22
1.4.2- Le récepteur de faible affinité: CD23 ou Fc $\epsilon$ R II.....	23
1.4.2.1- Structure du CD23 .....	23
1.4.2.2- Distribution cellulaire du CD23.....	24
1.4.2.3- Action régulatrice du CD23 sur la synthèse d'IgE.....	24
1.4.2.4- CD23 et allergie.....	25



1.4.3- Mac-2 ou $\epsilon$ BP (epsilon Binding Protein).....	25
2. LA REACTION INFLAMMATOIRE.....	26
2.1- Les cellules impliquées dans l'inflammation pulmonaire allergique.....	27
2.1.1- Les mastocytes.....	27
2.1.2- Les éosinophiles.....	27
2.1.3- Les lymphocytes.....	28
2.1.4- Les macrophages.....	28
2.1.5- Les neutrophiles.....	29
2.1.6- Les plaquettes.....	29
2.1.7- Les cellules épithéliales.....	29
2.2- Intervention des molécules d'adhérence dans l'inflammation pulmonaire allergique.....	30
2.2.1- Les différentes molécules d'adhérence.....	30
2.2.1.1- Les sélectines.....	30
2.2.1.2- Les intégrines.....	33
2.2.1.3- Les molécules de la superfamille des Immunoglobulines.....	35
* Les molécules d'ICAM.....	35
* VCAM-1.....	36
* PECAM-1 ou CD31.....	36
2.2.1.3- Autres molécules impliquées dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium.....	37
* CD44.....	37
* VAP-1 et L-VAP-2.....	38
2.2.2- Recrutement des leucocytes au cours de l'inflammation.....	38
2.2.3- Molécules d'adhérence et asthme.....	39
2.3- Intervention des molécules chimioattractantes dans l'inflammation pulmonaire allergique.....	40
2.3.1- Les différentes molécules chimioattractantes.....	40
2.3.1.1- Les chimiokines.....	40
* Les chimiokines CXC.....	41
* Les chimiokines CC.....	41
* Rôle des chimiokines dans la migration leucocytaire transendothéliale.....	41
* Chimiokines et asthme.....	45
2.3.1.2- Autres molécules chimioattractantes.....	46
* Les cytokines.....	46
* Autres peptides chimioattractants.....	47
* Les médiateurs lipidiques.....	47
3. L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE.....	48
3.1- Caractéristiques de l'HRB.....	48
3.2- Mécanismes impliqués dans l'HRB.....	50
3.2.1- Rôle de l'inflammation pulmonaire.....	50
3.2.2- Les médiateurs impliqués dans l'HRB.....	51
* Les médiateurs lipidiques.....	51
* Les cytokines.....	52
3.2.3- Les contacts cellulaires impliqués dans l'HRB.....	54
* les molécules d'adhérence.....	54
* les molécules de costimulation.....	54
3.2.4- Intervention de la réponse IgE dans l'HRB.....	55
3.2.5- Mécanismes nerveux impliqués dans l'HRB.....	56
* Mécanismes cholinergiques.....	56
* Mécanismes adrénergiques.....	57
* Mécanismes NANC et neuropeptides.....	57

## II. LA SOURIS SCID

1- CARACTERISTIQUES DE LA SOURIS SCID.....	61
1.1- Anomalies immunologiques.....	61
1.2- Réparation défectueuse de l'ADN.....	63
1.3- Réversion de la mutation ou phénomène leaky.....	64

1.4- Gène candidat pour l'anomalie scid .....	65
<b>2- RECONSTITUTION IMMUNOLOGIQUE DE LA SOURIS SCID PAR TRANSFERT DE CELLULES ALLO- ET XENOGENIQUES .....</b>	<b>66</b>
2.1- Transfert de lymphocytes murins dans la souris SCID .....	66
2.2- Transfert de cellules humaines dans la souris SCID.....	67
2.2.1- Greffe d'organes humains .....	67
2.2.1.1- Greffe d'organes hématolymphoïdes .....	67
2.2.2- Greffe d'organes lymphoïdes périphériques: cas particulier de la peau .....	69
2.2.2- Greffe de cellules lymphoïdes humaines.....	70
2.2.2.1- Par injection intraveineuse.....	70
2.2.2.2- Par injection intrapéritonéale .....	70
* Etendue de la reconstitution.....	70
* Fonctions des cellules T injectées.....	71
* Fonction des cellules B injectées .....	72
* Optimisation de la reconstitution .....	74
<b>3- SOURIS SCID ET ETUDE DE LA DIFFERENTIATION DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES.....</b>	<b>77</b>
<b>4- SOURIS SCID ET ETUDE DE PATHOLOGIES HUMAINES .....</b>	<b>79</b>
4.1- Etude des maladies autoimmunes.....	79
4.2- Etude des cancers humains.....	80
4.3- Etude de la pathologie induite par le VIH.....	81
4.4- Etude des maladies parasitaires .....	82
4.5- Etude des maladies allergiques.....	83
<b>CADRE ET OBJECTIFS .....</b>	<b>86</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>88</b>
<b>RESULTATS 1: LA REPOSE IgE CHEZ LES SOURIS SCID.....</b>	<b>88</b>
1- Obtention d'une réponse IgE humaine chez des souris SCID humanisées.....	88
2- Amélioration de la reconstitution.....	89
3- Cinétique de production des IgE humaines chez les souris SCID "allergiques".....	90
4- Etude de la modulation de la production d'IgE: Rôle des cellules CD8+ .....	91
<b>RESULTATS 2: LA REACTION INFLAMMATOIRE CHEZ LES SOURIS SCID ....</b>	<b>88</b>
1- Mise en évidence d'une réaction pulmonaire de type inflammatoire chez les souris SCID "allergiques" après inhalation de l'aéroallergène.....	99
2- Analyse de la migration des cellules humaines chez les souris SCID "allergiques" après inhalation de l'aéroallergène .....	108
3- Effet d'un Ac anti-ICAM-1 murin sur la migration de cellules humaines vers les poumons de souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt.....	127
4- Etude de l'expression d'ARNm codant pour l'IL-16 humaine dans les poumons des souris SCID "allergiques" après inhalation de l'aéroallergène .....	129
<b>RESULTATS 3: L'HYPERREACTIVITE BRONCHIQUE CHEZ LES SOURIS SCID.....</b>	<b>88</b>
1- Analyse de la réactivité bronchique des souris SCID.....	132
2- Développement d'une hyperréactivité bronchique chez les souris SCID "allergiques" exposées à des aérosols de Dpt.....	133
<b>DISCUSSION - CONCLUSIONS.....</b>	<b>136</b>
1- Production d'IgE humaine chez des souris SCID après inhalation d'allergène.....	136
2- Induction d'infiltrat de type inflammatoire chez des souris SCID après inhalation d'allergène .....	144
3- Développement d'une hyperréactivité bronchique chez des souris SCID après inhalation d'allergène .....	151

<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>154</b>
1- Utilisation du modèle de souris SCID "allergique"	
potentiel thérapeutique des peptides et lipopeptides de Derp 1 .....	154
2- Facteurs impliqués dans la régulation de la réaction allergique .....	155
2.1- Rôle des populations CD8+ dans la réaction allergique .....	155
2.2- Rôle de l'IL-16 dans la réaction allergique .....	156
3- Initiation de la réponse IgE chez la souris SCID "allergique" .....	157
3.1- Commutation isotypique des cellules humaines dans la souris SCID .....	157
3.2- Présentation de l'allergène pour la production d'IgE .....	158
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>161</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>193</b>
ANNEXE 1: MATERIELS ET METHODES .....	193
1- Les souris .....	193
2- Les patients .....	193
3- Les cellules mononucléées de sang périphérique humain .....	193
4- Transfert de cellules et protocoles de nébulisation .....	194
5- Dosage des IgE totales et spécifiques vis à vis de Dpt .....	194
6- Préparation de coupes d'organes de souris SCID reconstituées .....	195
7- Hybridation in situ fluorescente .....	196
8. Immunohistochimie sur coupes d'organes .....	196
9. Extraction des ARNm .....	196
10. RT-PCR à partir d'ARNm extraits d'organes .....	197
11. Administration d'Ac anti-ICAM-1 murine .....	197
12. Mesure de l'hyperréactivité des voies aériennes au carbachol .....	197
ANNEXE 2: LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	198
ANNEXE 3: TABLES DES MATIERES .....	200

