

UNIVERSITÉ LILLE I
-SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE-

THÈSE

Présentée à l'Université de Lille I – Sciences et Technologies de Lille pour obtenir le diplôme
de DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
SPÉCIALITÉ : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
FORMATION DOCTORALE : BIOLOGIE SANTÉ

le 19 juin 2002 par

Gersende CARON

**EFFETS DE L'HISTAMINE SUR L'ACTIVATION ET LA
POLARISATION DES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES :
IMPLICATION DANS LA RÉPONSE ALLERGIQUE**

Directeur de Thèse : Dr. Joël PESTEL, DR INSERM U416, Lille

JURY

Dr. Jean-Claude Michalski	Université Lille I	Président du jury
Dr. Michel Dy	DR, CNRS UMR8603, Paris	Rapporteur
Dr. Jean-Pierre Abastado	DR, IDM, Paris	Rapporteur
Dr. Pascale Jeannin	CIPF, St-Julien	Examineur

Je souhaite remercier M. Pierre Fabre, Président des Laboratoires Pierre Fabre, M. Jean-Yves Bonnefoy, ancien Directeur du CIPF, ainsi que Mme Nathalie Corvaia, Directrice du département Biologie, de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de leur laboratoire.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à ceux qui, de différentes façons, ont contribué à la réalisation de ce travail. . .

Tout particulièrement au Dr Pascale Jeannin, pour m'avoir initiée au monde de la recherche, pour sa compétence et sa patience avec lesquelles elle a dirigé mon travail, ainsi que pour sa confiance,

Au Dr Yves Delneste, pour les nombreux échanges très enrichissants que nous avons entretenus et pour son soutien, et au Dr Jean-Pierre Aubry, pour ses précieux conseils et son humour,

Au Dr Joël Pestel, qui a accepté d'être le directeur de ma thèse et qui m'a soutenue jusqu'à sa réalisation finale,

Au Dr Jean-Claude Michalski, qui me fait l'honneur d'examiner ma thèse et de présider ce jury,

Aux Drs Michel Dy et Jean-Pierre Abastado, qui ont aimablement accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce mémoire,

Aux compagnons de tous les jours qui ont contribué à rendre ces années agréables, en particulier Nathalie Herbault, Peggy Charbonnier, Aline Blaecke et Giovanni Magistrelli pour leur aide, leurs conseils amicaux et leur soutien.

Je remercie chaleureusement Thierry, pour m'avoir soutenue et supportée durant ces années de travail, pour sa confiance et ses conseils réconfortants.

Que mes parents trouvent ici la marque de ma reconnaissance pour leur soutien permanent, leur confiance sans faille et leurs encouragements sans lesquels je n'aurais pas pu parcourir tout ce chemin.

Je n'oublierai pas Erzeroum, Oustal, Itantuc et les autres chenapans du Poney Club du Manoir qui m'ont aidée à reprendre confiance en moi dans les moments de doute.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	6
INTRODUCTION	
<i>Chapitre 1. Physiopathologie et mécanismes immunologiques de l'allergie</i>	<i>8</i>
I - L'allergie : historique	8
II - Les maladies allergiques, allergènes associés et traitements.....	9
1 - Les allergies respiratoires	9
2 - Les allergies cutanées	11
3 - Les allergies oculaires ou conjonctivites.....	12
4 - L'allergie alimentaire.....	12
5 - Les allergies généralisées dites systémiques ou chocs anaphylactiques.....	12
6 - Les traitements.....	13
III - Classification des allergies selon les mécanismes immunologiques.....	15
1 - Allergie de type I ou hypersensibilité immédiate.....	15
2 - Allergie de type II ou hypersensibilité cytotoxique	15
3 - Allergie de type III ou hypersensibilité à complexes immuns	15
4 - Allergie de type IV ou hypersensibilité retardée.....	15
IV - Initiation de l'allergie de type I ou hypersensibilité immédiate.....	16
1 - Mécanisme immunologique	16
2 - Les cellules déclenchantes : mastocytes et basophiles	17
3 - Activation des mastocytes et basophiles.....	18
V - Les médiateurs de l'hypersensibilité immédiate.....	19
1 - Les médiateurs préformés.....	19
2 - Les médiateurs néoformés	20
VI - Phase tardive ou inflammatoire de l'hypersensibilité immédiate.....	21
VII - Rôle des médiateurs mastocytaires dans la réponse inflammatoire.....	23
<i>Chapitre 2. Rôle des lymphocytes et des cellules dendritiques dans l'allergie : la réponse Th2.....</i>	<i>25</i>
I - Définitions et propriétés des cellules Th1 et Th2	26
1. Les lymphocytes Th1 et Th2.....	26
2. Pathologies associées aux réponses Th1 et Th2	27
3. Autres réponses Th	28
II - Facteurs responsables de la polarisation Th1/Th2	29
1. Présentation de l'antigène et costimulation.....	30
2. Facteurs solubles impliqués dans la différenciation Th1/Th2	32
3. Le concept DC1/DC2.....	33
III - Mécanismes responsables de la réponse Th2 dans les maladies atopiques	38
1. Facteurs génétiques	39
2. Facteurs environnementaux	41
3. Rôle des cellules dendritiques	42

IV - Nouvelles stratégies immunothérapeutiques pour les maladies atopiques	44
1. Induction de l'anergie des cellules Th2 spécifiques de l'allergène	44
2. Réorientation des réponses Th2 spécifiques de l'allergène	45
3. Ciblage des cellules Th2 ou des molécules effectrices de la réponse Th2	46
V - Conclusion.....	47
Chapitre 3. Pharmacologie et propriétés immunorégulatrices de l'histamine	48
I – Synthèse, stockage et sécrétion de l'histamine.....	48
II - Récepteurs de l'histamine	50
1. Historique	51
2. Le récepteur H1	52
3. Le récepteur H2	53
4. Le récepteur H3	54
5. Le récepteur H4	55
4. Régulation de la fonction des récepteurs de l'histamine	55
III - Propriétés immunorégulatrices de l'histamine	56
1. Régulation de la balance Th1/Th2	57
2. Régulation de la production de cytokines inflammatoires	58
3. Régulation de l'expression de molécules de surface.....	60
4. Régulation de la prolifération cellulaire.....	61
5. Régulation de l'hématopoïèse	62
6. Autres effets de l'histamine	63
7. Facteurs influençant la libération d'histamine	64
IV - Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs de l'histamine	65
1. Inhibiteurs de la synthèse et de la libération d'histamine.....	66
2. Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs H1	66
3. Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs H2	68
4. Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs H3	71
5. Utilisation thérapeutique de l'histamine	72
BUT DU TRAVAIL	74
RESULTATS	75
I - Effet de l'histamine sur l'activation et la maturation des cellules dendritiques	75
1. Méthodologie	75
2. Résultats : publication n°1	75
II - Effet de l'histamine sur la polarisation des cellules dendritiques	85
1. Méthodologie	85
2. Résultats : publication n°2.....	85
DISCUSSION GENERALE	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	100
ANNEXE : AUTRES PUBLICATIONS.....	125

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Historique de l'allergie	8 verso
Tableau 2 : Caractéristiques des différents types de mastocytes	17
Tableau 3 : Médiateurs libérés par les mastocytes lors de l'allergie de type I	18 verso
Tableau 4 : Cytokines produites par les mastocytes	20 verso
Tableau 5 : Substances éosinophiliques	23
Tableau 6 : Principales différences entre les lymphocytes Th1 et Th2	26 verso
Tableau 7 : Principales molécules associées aux cellules dendritiques	29 verso
Tableau 8 : Régulation de la production d'IL-12	34 verso
Tableau 9 : Rôle des cytokines Th2 dans l'inflammation allergique chronique	38 verso
Tableau 10 : Donnée conceptuelles et expérimentales supportant l'hypothèse Th2 dans l'allergie	39
Tableau 11 : Loci chromosomiques contenant des marqueurs génétiques associés à l'atopie	40
Tableau 12 : Nouvelles stratégies immunothérapeutiques pour les maladies atopiques	43 verso
Tableau 13 : Localisation, fonctions et principaux agonistes et antagonistes des récepteurs de l'histamine	51 verso
Tableau 14 : Effet de l'histamine sur la production de cytokines	55 verso
Tableau 15 : Effet de l'histamine sur la croissance tumorale dans des modèles <i>in vivo</i>	72 verso

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques des quatre types d'hypersensibilité	14 verso
Figure 2 : Mécanismes immunologiques de l'allergie de type I ou hypersensibilité immédiate.....	16
Figure 3 : Activation des mastocytes par leurs FcεR	18
Figure 4 : Réactions d'hypersensibilité immédiate et tardive.....	22
Figure 5 : Effets biologiques des principaux médiateurs produits par les mastocytes	25
Figure 6 : Représentation schématique des propriétés et fonctions principales des réponses Th1 et Th2	25 verso
Figure 7 : Activation des lymphocytes T par les DC.....	28 verso
Figure 8 : Maturation des cellules dendritiques.....	30
Figure 9 : Différenciation des différentes lignées de DC à partir de progéniteurs CD34 ⁺	32 verso
Figure 10 : Modèles de génération des DC1 et DC2.....	33 verso
Figure 11 : Polarisation des DC myéloïdes.....	35 verso
Figure 12 : Activation des lymphocytes T par les DC : le concept des 3 signaux.....	37 verso
Figure 13 : Facteurs ayant contribué au changement de l'environnement infectieux pendant l'enfance : <i>l'hypothèse de l'hygiène</i>	41 verso
Figure 14 : Synthèse de la molécule d'histamine	48
Figure 15 : Famille des récepteurs couplés aux protéines G.....	49 verso
Figure 16 : Transduction du signal après fixation de l'histamine sur les récepteurs H1 et H2	52 verso
Figure 17 : L'histamine inhibe la production de TNF-α par les DC matures	85
Figure 18 : Représentation hypothétique des conséquences de la libération d'histamine sur les cellules dendritiques.....	97

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
Ag	Antigène
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
B	lymphocyte B
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
DC	Dendritic Cells
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GvHD	Graft Versus Host Disease
IFN- γ	InterFéroN-gamma
Ig	Immunoglobuline
IL	InterLeukine
LTC4	LeucoTriène C4
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1alpha
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction
NK	lymphocyte Natural Killer
PAF	Platelet-Activating Factor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PGE2	ProstaGlandine E2
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
SCF	Stem Cell Factor
TCR	T Cell Receptor
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
Th	T helper (lymphocyte T auxiliaire)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

AVANT-PROPOS

L'histamine, principal médiateur impliqué dans la physiopathologie de l'allergie, est contenue dans des granules préformés à l'intérieur des basophiles et des mastocytes. Chez les sujets allergiques, un contact avec l'allergène résulte dans l'activation des basophiles et mastocytes par l'intermédiaire des immunoglobulines de type E (IgE). Cette activation conduit à la libération des médiateurs préformés (histamine, protéases...) et à la synthèse de nouveaux médiateurs (prostaglandines, leucotriènes, cytokines...). L'histamine est responsable de la majorité des symptômes de l'allergie, comme la vasodilatation, la contraction des muscles lisses, l'hypersécrétion de mucus et la formation d'œdème. L'histamine possède également des propriétés immuno-régulatrices, puisqu'elle influence l'action et la production de nombreuses cytokines, l'expression des molécules de surface et la prolifération de nombreux types cellulaires. Les effets de l'histamine sont transmis par quatre récepteurs, H1, H2, H3 et H4, associés à des voies de transduction du signal distinctes, et exprimés différemment selon les tissus.

La réaction allergique est associée à une réponse immune dominante de type Th2 que l'on attribue à divers facteurs génétiques et environnementaux. La polarisation de la réponse immune en Th1 ou Th2 est cependant fortement régulée par les cellules présentatrices d'antigène, en particulier par les cellules dendritiques (DC). Les DC situées dans les tissus périphériques y capturent les antigènes, subissent un processus de maturation sous l'influence de facteurs de stress, et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes Th naïfs spécifiques. Ces lymphocytes Th vont alors proliférer et se différencier en Th1 ou Th2. La polarisation en Th1 ou Th2 par les DC serait lié à une polarisation des DC elles-même en DC1 ou DC2 par des facteurs présents dans l'environnement des DC au moment de l'induction de la maturation.

Le but de mon travail de thèse, réalisée au sein du Centre d'Immunologie Pierre Fabre à Saint-Julien-en-Genevois, en collaboration avec l'unité INSERM U416 située à l'institut Pasteur de Lille, a été d'évaluer l'effet de l'histamine sur les cellules dendritiques, notamment sur leur maturation et leur polarisation.

L'introduction de ce mémoire, sous forme de revue bibliographique, se divise en trois chapitres. Tout d'abord, les différents types d'allergie, les mécanismes immunologiques ainsi que les différents médiateurs impliqués dans la réponse allergique seront rappelés. Ensuite, les bases immunologiques de la réponse Th2 associée aux maladies allergiques seront détaillées, avec un point particulier concernant le rôle des DC. La dernière partie sera consacrée aux propriétés

immunorégulatrices de l'histamine, aux différents récepteurs de l'histamine ainsi qu'à l'utilisation thérapeutique de leurs agonistes et antagonistes.

Les résultats, présentés sous forme d'articles publiés, rapportent les effets de l'histamine observés *in vitro* sur l'activation et la polarisation des cellules dendritiques humaines, et sont suivis d'une discussion générale sur le travail effectué.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : PHYSIOPATHOLOGIE ET MECANISMES

IMMUNOLOGIQUES DE L'ALLERGIE

I - L'allergie : historique

Classée au sixième rang des pathologies mondiales, les allergies se sont banalisées et font partie de notre vie et de notre société. L'allergie correspond à une sensibilisation exagérée du système immunitaire vis à vis de corps étrangers. Notre organisme libère alors des substances comme l'histamine qui vont déclencher des réactions inflammatoires à l'origine de troubles divers : rhume des foins, éternuements, nez bouché, larmoiements, crise d'asthme. La peau est aussi un lieu de prédilection des allergies avec l'urticaire et l'eczéma.

Les maladies allergiques sont connues depuis l'Antiquité et sont rapportées par bon nombre d'anecdotes historiques et littéraires, mais la compréhension du phénomène allergique s'étale sur tout le XX^{ème} siècle avec des découvertes majeures (Tableau 1), et c'est au cours de ces quinze dernières années que la compréhension des mécanismes immunologiques impliqués dans la réponse allergique a considérablement progressée.

L'histoire scientifique de l'allergie commence avec la découverte en 1902 du phénomène d'anaphylaxie par Richet et Portier. En voulant accoutumer un animal à certains poisons par injections répétées, ils découvrirent par hasard que si un certain délai était observé entre deux injections, l'injection suivante provoquait un choc pouvant conduire à la mort de l'animal. Le terme d'anaphylaxie, du grec *ana* "à rebours" et *phylaxie* "protection", fut créé pour désigner ce phénomène d'hypersensibilité à une substance dont l'injection entraîne une réaction rapide et violente. Le terme d'allergie provient du grec *allos* "autre" et *ergia* "action, efficacité" et désigne une réaction inhabituelle de l'organisme à un stimulus généralement inoffensif. Il fut créé en 1906 par Clemens Von Pirquet, qui avait remarqué que des individus ayant déjà été au contact du bacille tuberculeux présentaient, 24 à 48 heures après, une réaction cutanée inflammatoire au site d'injection de la toxine du bacille tuberculeux. Actuellement, le terme d'allergie est employé pour désigner tous les phénomènes de sensibilisation, tandis que le terme d'anaphylaxie n'est utilisé que pour désigner le choc anaphylactique.

Tableau 1. Historique des principales découvertes concernant l'allergie.

1906	Création du terme "allergie" par l'Autrichien Clemens Von Pirquet.
1908	Prix Nobel à Ehrlich pour la découverte de cellules impliquées dans l'allergie, les mastocytes.
1908	Schultz et Dale (Prix Nobel 1936) mettent en évidence le rôle de l'histamine dans l'anaphylaxie.
1931	Les expériences de Prausnitz et Küstner soulignent l'existence d'un facteur sérique responsable de l'allergie (appelé "réagine"). Ils montrent que l'injection de sérum d'un sujet sensibilisé au poisson dans la peau d'un sujet sain, suivie le lendemain, au même endroit, de l'injection d'un extrait de l'antigène correspondant, entraîne une forte réaction inflammatoire locale.
1942	Chase et Landsteiner montrent que l'hypersensibilité retardée (de type tuberculinique) n'est pas transmise par le sérum mais par des lymphocytes.
1963	Gell et Coombs proposent une classification des phénomènes d'hypersensibilité en quatre types selon les mécanismes immunologiques impliqués dans la genèse des lésions tissulaires.
1967	Ishizaka puis Johansson et Bennich isolent le facteur sérique, la "réagine atopique", responsable des allergies immédiates : il s'agit d'une nouvelle classe d'immunoglobulines, les IgE.
1980	Samuelsson, Bergström et Vane (prix Nobel 1982) identifient, parmi les médiateurs chimiques libérés par les basophiles et les mastocytes, des substances pro-inflammatoires, chimiotactiques et bronchoconstrictives plus puissantes que l'histamine. Il s'agit des leucotriènes LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 et LTE_4 , et de certaines prostaglandines.



Clemens Von Pirquet
(1874-1929)



Paul Ehrlich
(1854-1915)



Henry Hallett Dale
(1875-1968)



Sune K. Bergstrom
(1916-)



Bengt I. Samuelsson
(1934-)



John R. Vane
(1927-)

Enfin, un troisième terme, atopie (du grec *a* "a privatif" et *topos* "lieu"), fut introduit en 1923 par Coca et Cooke pour désigner l'ensemble des manifestations cliniques associées aux maladies allergiques (rhinites, asthmes, eczémas, urticaires). Par extension, ces manifestations allergiques sont aussi appelées maladies atopiques : elles surviennent chez des sujets ayant des antécédents familiaux de troubles similaires (on parle de terrain atopique) et réagissant à un test cutané aux allergènes aériens communs par une réaction immédiate caractérisée par un œdème et un érythème.

II – Les maladies allergiques, allergènes associés et traitements

Chez les patients allergiques, on retrouve habituellement des antécédents familiaux de rhinites, asthme, eczéma, dermatoses. Par exemple, le risque allergique est estimé pour un enfant entre 40 et 60% lorsque les deux parents souffrent eux-même de cette pathologie. Cependant n'importe quel sujet peut devenir sensible à une substance donnée en dehors de tout antécédent familial, par exemple par suite de la défaillance de certaines fonctions organiques (foie, fonctions éliminatoires, etc.) facilitant la pénétration des antigènes potentiels.

Actuellement, on assiste à une amplification des phénomènes allergiques, venant probablement des modifications des facteurs environnementaux : généralisation d'espèces végétales allergisantes dans les parcs et jardins, tabagisme passif, pollution atmosphérique et automobile. La modification des habitudes alimentaires, en aggravant le bronchospasme, a probablement aussi sa part : excès de sel, de sucre, de graisses saturées, insuffisance d'apport en éléments "relaxants" (magnésium, calcium, etc.), en certains oligo-éléments, en huiles insaturées, ou en vitamines. Enfin, le stress, l'anxiété, l'angoisse sont des facteurs aggravants car ils influencent la libération des médiateurs chimiques responsables de la pathologie allergique.

Le terme "allergie" regroupe un ensemble de maladies souvent complexes qui se caractérisent aussi bien par la variété des organes atteints que par la diversité de la symptomatologie et par la multiplicité des agents étiologiques possibles. Les maladies allergiques les plus fréquentes touchent les tissus très largement exposés à l'environnement, principalement les poumons et la peau.

1. Les allergies respiratoires

Les rhinites

Ce sont les plus fréquentes et les moins graves des manifestations allergiques bien que sources de troubles pénibles : éternuements, irritations nasales, obstruction nasale et rhinorrhée. Elles peuvent se

complicuer de réactions sinusales mais surtout de polyposes nasales difficiles à traiter. Elles peuvent être de nature saisonnière, il s'agit alors du "rhume des foins" associé à des allergènes polliniques (pollens d'arbres, de graminées, herbacées et moisissures). Mais les rhinites peuvent être également annuelles et sont alors provoquées par des allergènes professionnels, des acariens ou des animaux domestiques.

L'asthme

L'asthme est une pathologie qui touche les bronches. Son mécanisme associe à la fois la contraction des muscles péribronchiolaires (bronchoconstriction), un œdème inflammatoire de la muqueuse et une hypersécrétion de mucus. L'obstruction des voies aériennes résultante se manifeste par des sifflements à la respiration, une oppression thoracique et des difficultés respiratoires. La maladie prend des formes cliniques différentes suivant l'intensité et la durée des crises, et aussi suivant l'âge du sujet. La reproduction des symptômes toujours au même endroit ou souvent à la même époque évoque l'origine allergique de l'asthme due à différents pneumallergènes (voir ci-dessous).

Les alvéolites allergiques

Les alvéolites sont des pneumopathies granulomateuses beaucoup plus rares que les rhinites et les asthmes. Il s'agit de réactions d'hypersensibilité du parenchyme pulmonaire, accompagnées de fièvre, de difficultés respiratoires, d'anomalies radiologiques (infiltrats micro-nodulaires) et fonctionnelles respiratoires, de toux avec expectoration et d'un amaigrissement. Ces pneumopathies sont dues à l'inhalation d'une grande variété de particules organiques (foin moisi, poussières de déjections d'oiseaux...) ou de vapeurs chimiques. Ces affections, d'allure aiguë au début, peuvent évoluer par la suite sous le mode chronique, entraînant parfois des dégâts bronchopulmonaires irréversibles (fibrose).

Les pneumallergènes ou allergènes aéroportés

Ces diverses manifestations d'hypersensibilité respiratoire dépendent de la taille des particules inhalées. Les particules de taille relativement élevée (20 à 50 μm), entraînent surtout des manifestations des voies aériennes supérieures, car elles sont arrêtées par la muqueuse nasale. Les particules de taille inférieure (2 à 10 μm) captées par les bronches ou la trachée sont souvent la source de manifestations asthmatiques. Les allergènes aéroportés les plus courants sont les pollens, les moisissures, les céréales, l'urine et les poils d'animaux, les plumes d'oiseaux, les acariens de la poussière de maison, les insectes, la farine. Enfin, les particules très fines (0,1 à 2 μm), comme les

actinomycètes du foin moisi ou les vapeurs chimiques, peuvent pénétrer dans les voies aériennes inférieures et sont responsables des manifestations d'alvéolites.

2. Les allergies cutanées

L'eczéma atopique ou dermatite atopique

C'est l'eczéma du nourrisson, réaction qui apparaît en général autour du troisième mois après la naissance. Il se manifeste par une induration de l'épiderme avec œdème et rougeur. Il a un aspect très caractéristique par ses localisations (face, plis de flexion, cuir chevelu, zone rétro-auriculaire) et s'accompagne de démangeaisons importantes (prurit). Il peut évoluer de façon chronique avec un assèchement de la peau (ichtyose) et des poussées itératives ou encore disparaître pour laisser la place à d'autres manifestations allergiques. Parmi les causes possibles est évoquée l'allergie aux protéines du lait de vache. Cet eczéma peut réapparaître ultérieurement chez l'adulte.

L'eczéma de contact allergique

L'eczéma de contact touche l'adulte et se manifeste par une éruption qui est localisée au niveau des points de contact avec l'allergène sous la forme de plaques prurigineuses associées à des vésicules, et qui apparaît 48 à 72 heures après le contact avec l'allergène. Les allergènes de contact sont habituellement des substances chimiques simples : le nickel, les sels de chrome, le formaldéhyde (formol), l'éthylènediamine, le mercaptobenzothiazole, les thiurames, le paraphénylènediamine, des substances végétales, des médicaments. En raison de la nature de ces allergènes, les eczémas de contact allergiques sont une cause fréquente des allergies dites professionnelles.

L'urticaire allergique

L'urticaire est une allergie qui se manifeste au niveau de la peau par un œdème dermique. Elle est caractérisée par des lésions cutanées sous la forme de papules typiques, surélevées, érythémateuses, très prurigineuses et d'aspect changeant, pouvant apparaître sur tout le corps. Elles sont de durée variable, s'estompant rapidement et pouvant réapparaître 24 ou 48 heures plus tard. La forme aiguë est souvent une manifestation d'allergie alimentaire ou médicamenteuse (fraise, crustacés, aspirine...). L'urticaire chronique est, quant à lui, beaucoup plus difficile à traiter et rebelle à toute thérapeutique, et dure donc plusieurs mois voire plusieurs années.

L'œdème de Quincke

L'œdème de Quincke ou angio-œdème correspond à un urticaire touchant également les tissus sous-cutanés plus profonds et plus lâches, et les muqueuses. Généralement, l'angio-œdème est localisé sur la face, les lèvres et les paupières. Dans certains cas, on peut observer un gonflement de la langue, de la lèvre, voire même du larynx pouvant entraîner une véritable asphyxie. Cette réaction n'est pas nécessairement accompagnée d'érythème et de douleur. Elle apparaît brusquement, dure généralement peu longtemps et disparaît sans laisser de traces en 24 à 72 heures. La forme allergique de cette pathologie est due à des allergènes alimentaires (poissons, crustacés, lait, noix, haricots, pomme de terre, céleri, persil, épices), à des médicaments (pénicilline) ou à des piqûres d'hyménoptères (abeille, guêpe).

3. Les allergies oculaires ou conjonctivites

Toutes les conjonctivites allergiques se manifestent par un érythème, un prurit et un œdème de la conjonctive, muqueuse qui tapisse la face postérieure des paupières et la face antérieure de la membrane externe du globe oculaire et qui est en contact avec l'air ambiant par le biais du film lacrymal. Ces troubles s'accompagnent souvent de manifestations rhinopharyngées. Les conjonctivites saisonnières dues aux pollens et annuelles causées par des acariens ou des phanères d'animaux sont les formes les plus bénignes de ces affections. Les kératoconjonctivites, saisonnières ou atopiques, peuvent au contraire entraîner des complications cornéennes (amincissement et durcissement) conduisant à une réduction de la vision.

4. L'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire vraie (à distinguer de simples intolérances) est relativement rare mais peut être extrêmement grave car elle peut aller jusqu'au choc anaphylactique mortel. Elle se manifeste de façon variable, habituellement par des signes cutanés (urticaires, œdèmes buccaux, eczémas), des troubles digestifs (douleurs, vomissements, diarrhées), des troubles neurologiques (céphalées) et respiratoires (rhinites, asthmes). Les allergènes responsables de ces réactions allergiques (trophallergènes) sont des glycoprotéines contenues dans certains aliments.

5. Les allergies généralisées dites systémiques, ou chocs anaphylactiques

Le choc anaphylactique est la manifestation allergique la plus grave. Ce syndrome clinique systémique se manifeste par des atteintes touchant des organes multiples : les voies respiratoires supérieures (obstruction, bronchospasme, éternuements, œdème péri-orbitaire, prurit pharyngé, rhinites), les yeux (conjonctivites), le système cardio-vasculaire (malaise ou perte de connaissance,

troubles du rythme cardiaque, infarctus du myocarde), la peau (urticaire et œdème de Quincke sur la face et le pharynx), le système gastro-intestinal (crampes, nausées, vomissements, diarrhées, congestion du foie, de la rate ou d'autres organes).

La mort survient, le plus souvent, rapidement par asphyxie ou collapsus vasculaire. Cependant, le décès a parfois lieu plus tardivement par hypovascularisation d'organes vitaux lors du collapsus.

Cette réaction touche aussi bien les sujets atopiques que non atopiques, et implique un traitement d'urgence. Le choc anaphylactique allergique peut être causé par des antibiotiques (pénicilline), par d'autres substances médicamenteuses (extraits allergéniques, vaccins, anesthésiques généraux...), par des protéines étrangères (anti-sérums, anti-toxines, insuline, enzymes, venin d'hyménoptères), par certains aliments (crustacés, fruits secs, légumes, produits laitiers, blanc d'œuf, céréales, graines). Toutes les voies de pénétration de l'allergène ont été décrites dans le déclenchement de l'anaphylaxie mais les formes les plus sévères sont surtout observées lorsque l'allergène pénètre par voie parentérale (piqûre d'insecte, médicament injecté). Les réactions les plus typiques sont dues aux piqûres d'hyménoptères (guêpe, abeille, frelon).

6. Les traitements

Les traitements anti-allergiques comportent deux volets : un *traitement préventif* qui est privilégié par le praticien et qui consiste à identifier le ou les allergènes impliqués pour en conseiller l'éviction, et des *traitements curatifs* qui ont pour objectifs soit d'empêcher ou de réduire la manifestation des symptômes (pharmacothérapie), soit de moduler la réponse immune du patient (désensibilisation).

L'éviction de l'allergène

L'éviction de la source allergénique est la méthode la plus simple pour prévenir l'apparition des symptômes. Elle nécessite l'identification précise de l'allergène responsable de la maladie. Elle peut être assez facilement mise en place dans le cas des allergies aux phanères d'animaux, des allergies aux aliments, des allergies de contact, des allergies aux acariens. Ce traitement préventif ne peut pas être étendu à tous les allergènes, en particulier aux pneumallergènes tels que les pollens.

Les traitements symptomatiques

Ces traitements permettent de réduire ou d'empêcher l'apparition des symptômes suite à l'exposition à l'allergène. Ils ne modifient en rien les mécanismes immunitaires aboutissant à la pathologie. Il existe deux grands types de médicaments :

- les *antihistaminiques*, qui bloquent l'action de l'histamine libérée par les cellules inflammatoires lors de la réaction allergique. Ils sont particulièrement efficaces dans le cas des rhinites, des urticaires et des conjonctivites. Ils peuvent être donnés à titre préventif ou très rapidement après l'apparition des symptômes.

- les *corticoïdes*, qui sont destinés à lutter contre l'inflammation générale que provoque le contact avec l'allergène. En effet, les corticoïdes sont les plus puissants anti-inflammatoires connus. Ils interviennent dans la prolifération et l'activation des lymphocytes T, dans l'attraction des basophiles, des éosinophiles et des lymphocytes vers les tissus, et ils inhibent la dégranulation des basophiles et des mastocytes. Ils inhibent principalement la transcription de gènes intervenant dans la réponse immune, ce qui aboutit notamment au blocage de la synthèse de nombreuses cytokines.

D'autres médications sont également utilisées:

- les *cromones* : ces médicaments diminuent l'accumulation et l'activation des cellules de l'inflammation. Ils sont principalement utilisés dans le traitement de l'asthme.

- les *β -bloquants ou agonistes β -adrénergiques* (adrénaline, salbutamol, terbutaline) : ces molécules entraînent une myorelaxation des muscles lisses bronchiques (effet bronchodilatateur). De plus, ils inhibent l'activation des mastocytes et la libération d'histamine, de tryptase et d'eicosanoïdes. L'adrénaline est particulièrement prisée en cas de choc anaphylactique en raison de son action sur le cœur, les vaisseaux sanguins et le système rénine-angiotensine, qui conduit au rétablissement d'une circulation sanguine satisfaisante.

- la *théophylline* (dérivé du thé) : action bronchodilatatrice et anti-inflammatoire par diminution du nombre des éosinophiles activés (en particulier dans la muqueuse bronchique de l'asthmatique).

L'immunothérapie spécifique (désensibilisation)

Ce traitement, défini empiriquement, consiste à administrer au patient de petites doses croissantes et répétées de l'extrait allergénique pour induire une tolérance aux contacts ultérieurs. Contrairement aux autres traitements, celui-ci permet une modulation de la réponse immunitaire allergique. Son efficacité a été en particulier démontrée pour les allergies aux pollens, aux acariens et aux venins d'hyménoptères (Ebner, 1999). Cependant, sa principale limite est l'induction, dans certains cas, d'incidents allergiques graves voire mortels.

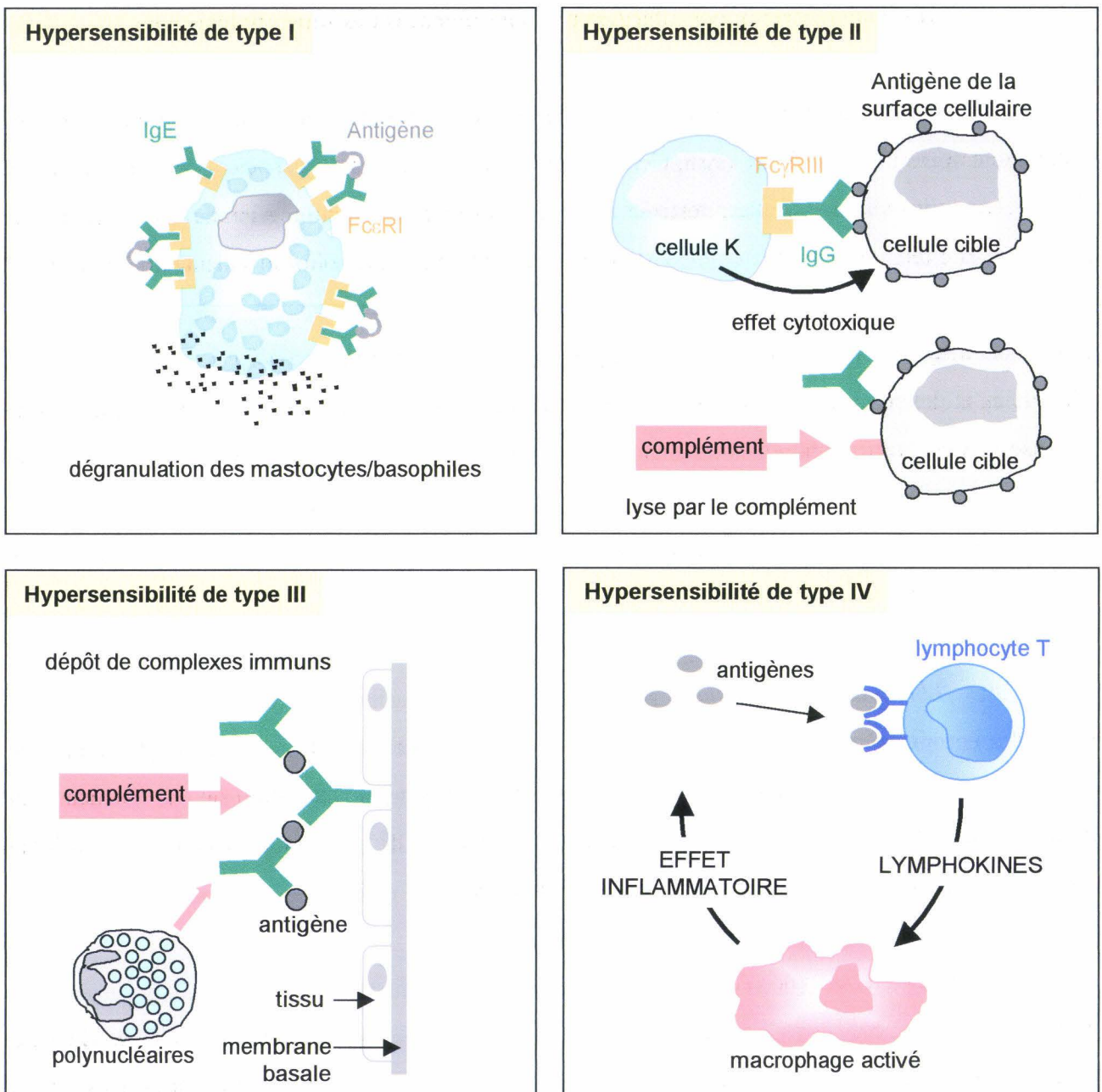


Figure 1. Caractéristiques des 4 types d'hypersensibilité. Selon la classification de Coombs et Gell : allergie de type I (anaphylactique ou atopique) ou hypersensibilité immédiate ; allergie de type II ou hypersensibilité cytotoxique ; allergie de type III ou hypersensibilité à complexes immuns ; allergie de type IV ou hypersensibilité retardée à médiation cellulaire. Les trois premiers types d'allergie sont dus à des anticorps, alors que le quatrième implique essentiellement des cellules T et des macrophages.

III – Classification des allergies selon les mécanismes immunologiques

Quatre types d'hypersensibilité (I, II, III et IV) ont été définis par les immunologistes britanniques Coombs et Gell en 1975. Ces types peuvent être isolés ou associés. Les types II, III et IV concernent les allergies à effets retardés impliquant différents médiateurs humoraux et cellulaires, alors que les effets de l'allergie de type I sont les plus immédiats et les plus spectaculaires (Figure 1).

1. Allergie de type I (anaphylactique ou atopique) ou hypersensibilité immédiate

Elle est impliquée dans l'induction de l'immense majorité des maladies allergiques. Elle est liée à une réponse IgE contre des antigènes sans toxicité propre, comme le pollen, la poussière de maison ou les poils d'animaux. Les mastocytes tissulaires et les basophiles sanguins, sensibilisés par ces IgE, libèrent des médiateurs pharmacologiques (histamine, etc.) qui déclenchent une réaction aiguë pathologique (asthme, rhinite, urticaire, etc.).

2. Allergie de type II ou hypersensibilité cytotoxique

Elle s'observe lorsqu'un anticorps se lie à un antigène cellulaire pour induire une phagocytose, une cytotoxicité de type "natural killer" ou une lyse de la cellule par activation du complément. En pratique, on rattache surtout à ce groupe les accidents d'allergie médicamenteuse, la maladie hémolytique du nouveau-né, les réactions transfusionnelles.

3. Allergie de type III ou hypersensibilité à complexes immuns

Elle apparaît lorsque de grandes quantités de complexes immuns cytotoxiques sont formés (IgG ou IgM associés à des antigènes sériques) et qu'ils ne peuvent être convenablement éliminés. Dès lors, il y a activation du complément, et des réactions inflammatoires destructrices sont activées. Il en résulte des agrégats de plaquettes et de leucocytes aboutissant à des thromboses locales. Se trouvent dans ce groupe les alvéolites allergiques.

4. Allergie de type IV ou hypersensibilité retardée à médiation cellulaire

Elle se manifeste lorsqu'un antigène (bacille tuberculeux par exemple) est phagocyté par un macrophage et n'est pas éliminé. Les lymphocytes T circulants sécrètent alors des lymphokines, qui provoquent l'accumulation de monocytes et de lymphocytes, l'activation des macrophages et le développement d'un processus inflammatoire. Ce type d'allergie se retrouve dans les phénomènes de dermites ou eczémas de contact.

IV - Initiation de l'allergie de type I ou hypersensibilité immédiate

1. Mécanisme immunologique

Les allergies immédiates sont médiées par des IgE dirigées contre les allergènes (Figure 2). Ces anticorps apparaissent progressivement suite à l'exposition répétée avec l'allergène et avant que le moindre symptôme ne soit apparent. Ils possèdent la propriété de se fixer par leur fragment Fc à la membrane des mastocytes tissulaires et des basophiles du sang par l'intermédiaire du récepteur à haute affinité du fragment Fc des anticorps, FcεRI (Turner et Kinet, 1999). Lors d'un deuxième contact, l'allergène se complexe aux IgE spécifiques fixées à la membrane des mastocytes ou des basophiles, et provoque la dégranulation (exocytose du contenu granulaire) de ces cellules et la libération de médiateurs préformés (histamine, protéases...) ou néoformés (leucotriènes, prostaglandines...) qui sont responsables des principales manifestations de l'allergie (Tableau 3). Ce mécanisme explique la rapidité des réactions observées.

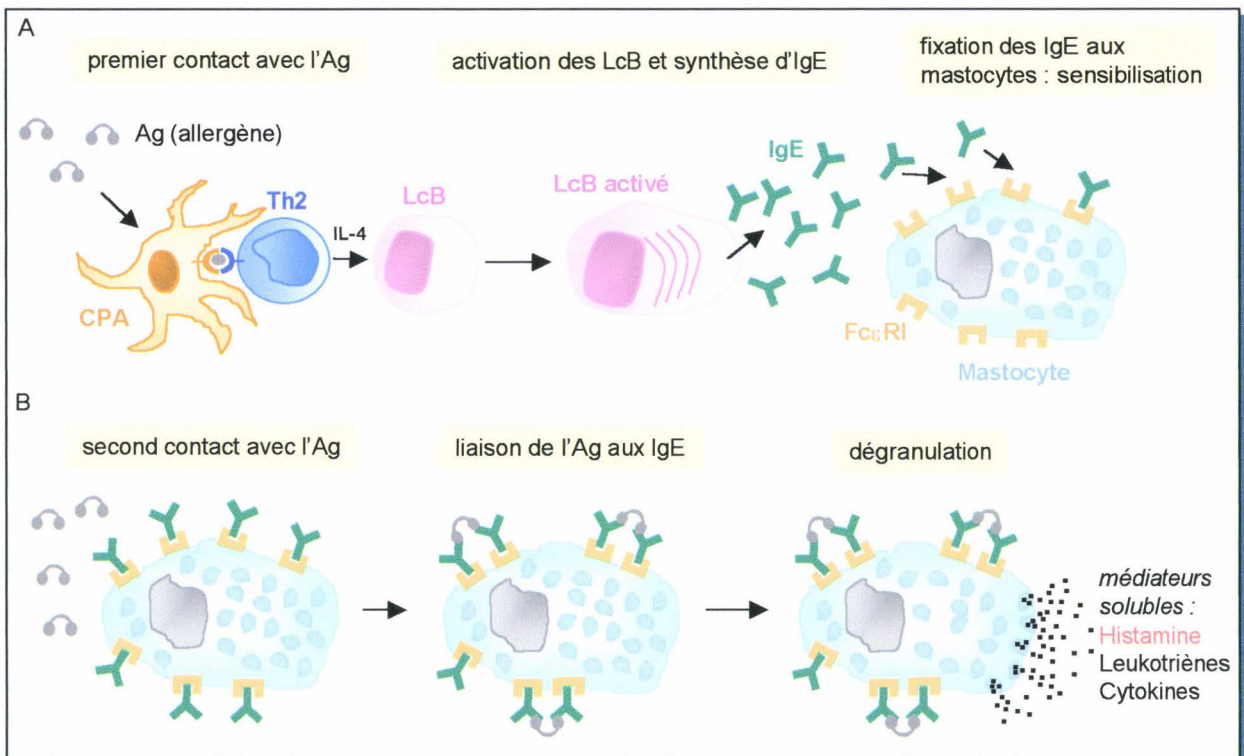


Figure 2. Mécanismes immunologiques de l'allergie de type I ou hypersensibilité immédiate.

A. L'allergène capté par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) est présenté aux lymphocytes T de type Th2 qui vont favoriser la production d'IgE par les lymphocytes B. Les mastocytes fixent ces IgE par leurs récepteurs Fc.

B. Lorsque les mastocytes ainsi sensibilisés se retrouvent de nouveau en présence de l'allergène, un pontage s'établit entre les IgE, déclenchant la dégranulation et la libération des médiateurs responsables des symptômes cliniques.

2. Les cellules déclenchantes : mastocytes et basophiles

Les mastocytes (Metcalf *et al.*, 1997 ; Krishnaswamy *et al.*, 2001) ont été découverts par Ehrlich dans les années 1870 et ont été appelés ainsi ("*mastzellen*") en raison de la présence intracytoplasmique de granules spécifiques dits "métachromatiques". Ce sont des cellules tissulaires de taille variable (15 à 25 µm) qui se différencient à partir de progéniteurs issus de la moelle osseuse, en présence de Stem Cell Factor (SCF) qui interagit avec le SCF récepteur ou *c-kit* exprimé à la surface cellulaire. Les précurseurs migrent alors vers les tissus où, sous l'influence de facteurs microenvironnementaux, ils subissent une phase finale de différenciation et de maturation en mastocytes. Les mastocytes sont divisés en 2 sous-populations, les mastocytes muqueux (ou T pour "Tryptase") et conjonctifs (ou TC pour "Tryptase & Chymase"), dont les caractéristiques sont sensiblement différentes (Tableau 2).

Tableau 2. Caractéristiques des différents types de mastocytes.		
<i>Caractéristiques</i>	<i>Mastocytes muqueux</i>	<i>Mastocytes conjonctifs</i>
Localisation (%)		
Peau	<1	>99
Tissu alvéolaire	93	7
Muqueuse nasale	66	34
Amygdales	40	60
Intestin : muqueuse	81	19
Intestin : sous-muqueuse	23	77
Thymodépendance	oui	non
Granules	peu nombreux	nombreux
Histamine (pg/cell)	0,5 à 2	3 à 15
Protéases neutres	Tryptase	Tryptase Chymase Cathepsine G Carboxypeptidase
Protéoglycanes	Héparine Chondroïtine sulfate	Héparine Chondroïtine sulfate

Les basophiles (Falcone *et al.*, 2000 ; Schroeder *et al.*, 2001) sont des cellules granuleuses circulantes d'environ 10 à 14 µm, qui représentent moins de 1% des globules blancs chez des sujets sains. Contrairement aux mastocytes, les basophiles se différencient complètement dans la moelle

osseuse avant de se retrouver dans la circulation sanguine, où ils restent pour une durée indéterminée, prêts à migrer dans les tissus lors d'une réaction allergique ou inflammatoire.

Les étapes précoces de la maturation des basophiles n'est pas clairement définie et fait l'objet de nombreuses études. Il n'existe pas de facteur de croissance spécifique pour les basophiles, toutefois l'IL-3 est la principale cytokine impliquée dans la croissance et la différenciation de ces cellules (Arock *et al.*, 2002).

Comme les mastocytes, les basophiles possèdent des récepteurs aux IgE, et la fixation de l'allergène aux IgE spécifiques fixées à ces récepteurs déclenchent la libération de nombreux médiateurs, en partie communs aux deux types cellulaires.

3. Activation des mastocytes et des basophiles

Quand les IgE sont fixées sur les FcεRI des mastocytes ou des basophiles, la dégranulation peut être déclenchée par le pontage des IgE, entraînant celui des récepteurs (Figure 3-1 à 3-5), ou directement d'un pontage des récepteurs (Figure 3-6) (Turner et Kinet, 1999).

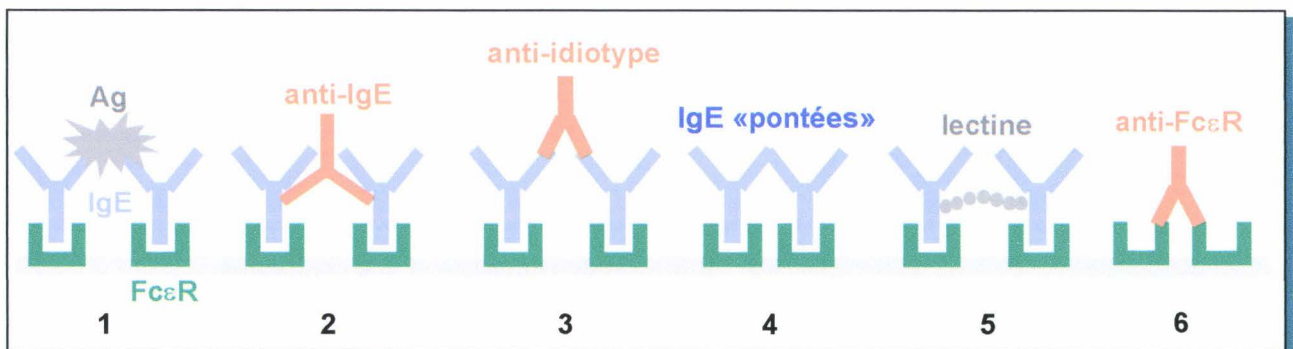


Figure 3. Activation des mastocytes par leurs FcεR. Le pontage des FcεR peut être réalisé par (1) la liaison de l'antigène aux IgE spécifiques, (2) des anticorps anti-IgE, (3) des anticorps reconnaissant des idiotopes de la région Fab des IgE, (4) des dimères divalents d'IgE, obtenus par des agents polymérisants ou (5) des lectines se fixant aux résidus glucidiques des IgE, (6) des anticorps anti-FcεR.

Il existe également des substances très efficaces qui provoquent la dégranulation des mastocytes. *In vivo*, il s'agit principalement des anaphylatoxines C3a et C5a, issues de l'activation du complément. D'autres substances comme les ionophores pour le calcium, la mélitine, le composé 48/80, des médicaments comme l'ACTH synthétique, la codéine ou la morphine, sont capables d'activer directement les mastocytes en induisant un influx de calcium.

Tableau 3. Médiateurs libérés par les mastocytes lors de la réponse allergique.

Médiateurs préformés granulaires	
Histamine	Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire, contraction des muscles lisses bronchiques, augmentation de la sécrétion de mucus
Héparine	Anticoagulant, inhibition de l'agrégation plaquettaire
Protéases	Tryptase : clivage C3 et fibrinogène Chymase : clivage angiotensine, dégradation lipoprotéines Carboxypeptidase : métalloprotéase Cathepsine G : clivage angiotensine, dégradation protéines
Kininogénase	Production de kinines : vasodilatation, œdème
Facteurs chimiotactiques	NCF (<i>neutrophil chemotactic factor</i>) ECF-A (<i>eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis</i>)
Médiateurs néoformés	
<i>Issus de la dégradation des phospholipides membranaires</i>	
- Prostaglandines : PGD ₂	Bronchoconstriction, vasodilatation, spasme des muscles lisses, inhibition de l'agrégation des plaquettes
- Leukotriènes : LTC ₄ LTD ₄ LTB ₄	Bronchoconstriction, trouble de la contraction cardiaque Contraction des muscles lisses, sécrétion de mucus Chimiotactique (neutrophiles, éosinophiles, monocytes, basophiles)
PAF (platelet activating factor) Acether	Contraction des muscles lisses, hypertension pulmonaire, vasoperméation, vasodilatation, trouble de la contraction cardiaque, prurit, chimiotactisme (éosinophiles, neutrophiles, plaquettes, macrophages), activation des plaquettes
<i>Cytokines et facteurs de croissance</i>	TNF α , IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, IFN γ , GM-CSF, TGF- β 1, FGF, NGF, VEGF, PDGF-A Prolifération, activation et différenciation des lymphocytes, polynucléaires ou macrophages, inflammation.
<i>Chimiokines</i>	MCP-1, -2, -3, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-8, éotaxine

V – Les médiateurs de l'hypersensibilité immédiate

Les mastocytes et basophiles une fois activés libèrent instantanément des médiateurs préformés, puis des médiateurs néoformés qui vont participer à la réaction inflammatoire tardive de la réaction allergique (Metcalf, 1997 ; Krishnaswamy, 2001) (Tableau 3).

1. Les médiateurs préformés

La libération des médiateurs préformés, ou dégranulation, fait suite à une cascade d'évènements induits par le pontage des FcεR (Turner et Kinet, 1999), qui sont associés à des protéines G :

- activation de la phospholipase C
- formation d'inositol triphosphate (IP3)
- formation de diacyl-glycérol (DAG)
- mobilisation du Ca⁺⁺ intracellulaire des microtubules
- influx de Ca⁺⁺ extracellulaire
- contraction du cytosquelette
- mouvement des granules vers la membrane plasmique
- exocytose des médiateurs.

Le médiateur principalement associé à l'allergie, l'histamine, représente environ 10% du contenu granulaire des mastocytes. L'histamine exerce la majorité de ces effets lors de la phase immédiate de la réponse allergique, à savoir : vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, contraction des muscles lisses bronchiques et intestinaux, augmentation de la production de mucus. Ces effets sont généralement de courte durée car l'histamine est rapidement métabolisée (Novak et Falus, 1997 ; Bachert, 1998 ; Naclerio, 1999 ; White, 1999).

Deux protéoglycanes, l'héparine et le chondroïtine sulfate E sont associés aux mastocytes, alors que le chondroïtine sulfate A est le protéoglycane dominant des basophiles. Dans les granules, les protéoglycanes forment des matrices de stockage, car les groupes sulfate des glycosaminoglycanes confère des sites de fixation pour les autres médiateurs préformés.

Absente des basophiles, la principale protéase des mastocytes est la tryptase, une sérine protéase tétramérique d'environ 130 kDa, stockée sous sa forme active dans les granules. La tryptase possède différentes propriétés :

- clivage de peptides bronchodilatateurs et vasodilatateurs
- sensibilisation des muscles lisses bronchiques aux agents contractiles
- clivage de composants de la matrice (gélatinase/collagène de type IV, fibronectine, collagène de type VI) et activation de la stromélysine
- activité mitogène pour les fibroblastes et les cellules épithéliales
- stimulation de la production de la chimiokine IL-8
- augmentation de l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules épithéliales.

La tryptase semble avoir un effet très localisé car, en l'absence d'héparine, la forme tétramérique biologiquement active se dissocie rapidement en monomères inactifs.

Comme la tryptase, la chymase est stockée dans les granules des mastocytes conjonctifs sous sa forme active, un monomère de 30 kDa. La chymase dégrade la neurotensine, clive l'angiotensine I en angiotensine II et clive le collagène de type IV. La chymase agit également au niveau de l'inflammation mucosale, en convertissant l'IL-1 β en IL-1, en dégradant l'IL-4 et en stimulant la sécrétion de mucus.

Deux autres protéases, la carboxypeptidase et la cathepsine G, sont associés aux mastocytes conjonctifs. La carboxypeptidase est une métalloprotéase de 34,5 kDa, qui enlève les résidus carboxyliques terminaux de nombreux peptides (angiotensine, leu-enképhaline, kinétensine, neuromédine N, neurotensine).

Lorsque les mastocytes sont activés, la chymase, la carboxypeptidase et la cathepsine G sont relarguées ensemble avec des protéoglycanes, sous la forme d'un complexe de 400 à 500 kDa, et sont susceptibles d'agir en synergie avec les autres enzymes pour dégrader les protéines.

2. Les médiateurs néoformés

L'entrée des ions Ca⁺⁺ induit également la synthèse des médiateurs néoformés (Metcalfé, 1997 ; Krishnaswamy, 2001). Des modifications membranaires associées à l'activation donnent à la phospholipase A2 la possibilité de libérer de l'acide arachidonique qui est métabolisé par deux enzymes, la lipoxigénase ou la cyclo-oxygénase, conduisant respectivement à la production des prostaglandines et leucotriènes.

Les leucotriènes (LT), LTC₄ et ses métabolites LTD₄ et LTE₄, induisent une réponse cutanée prolongée, stimulent la bronchoconstriction, favorisent la perméabilité vasculaire et la sécrétion de mucus, et induisent la contraction des muscles lisses au niveau des artères, des artérioles et de l'intestin. LTB₄, produite uniquement par les mastocytes, possède également des propriétés

Tableau 4. Cytokines produites par les mastocytes.

Famille	Facteur	Propriétés
Cytokines	TNF- α	Inflammation locale, activation de l'endothélium, cytotoxicité envers les cellules tumorales (<i>Walsh et al., 1991 ; Bradding et al., 1994</i>)
	IL-1 β	Fièvre, activation des T et macrophages (<i>Sillaber et al., 1993</i>)
	IL-3	Hématopoïèse (<i>Wodnar-Filipowicz et al., 1989</i>)
	IL-4	Activation des B, synthèse IgE (<i>Bradding et al., 1994</i>)
	IL-5	Croissance et différenciation des éosinophiles (<i>Bradding et al., 1994</i>)
	IL-6	Croissance et différenciation des T et B, phase de réaction aiguë (<i>Bradding et al., 1994</i>)
	IL-10	Suppression des fonctions des macrophages (inhibition de la synthèse de cytokines) (<i>Ishizuka et al., 1999</i>)
	IL-13	Croissance et différenciation des B, inhibe la production de cytokines par les macrophages (<i>Burd et al., 1993</i>)
	IL-16	Chimioattractant pour les T (<i>Rumsaeng et al., 1993</i>)
	Chimiokines	IL-8
MCP-1,2,3		Chimioattractant pour les monocytes, lymphocytes, basophiles et NK (<i>Baghestanian et al., 1997</i>)
MIP-1 α		Chimioattractant pour les monocytes, les T et les éosinophiles (<i>Yano et al., 1997</i>)
RANTES		Chimioattractant pour les monocytes, T, éosinophiles, basophiles, NK et cellules dendritiques (<i>Selvan et al., 1994</i>)
Eotaxine		Chimioattractant pour les éosinophiles (<i>Hogaboam et al., 1998</i>)
TGF- β 1		Inhibe la croissance cellulaire, anti-inflammatoire (<i>Kanbe et al., 2000</i>)
Facteurs de croissance	FGF basique	Permet la croissance des fibroblastes, cellules endothéliales, chondrocytes, cellules des muscles lisses, mélanocytes et autres, induit la différenciation des adipocytes (<i>Qu et al., 1998</i>)
	NGF	Croissance des nerfs (<i>Nilsson et al., 1997</i>)
	VEGF	Croissance des cellules endothéliales vasculaires (<i>Boesinger et al., 1998</i>)
	PDGF-A	Chimioattractant et mitogénique pour les fibroblastes (<i>Kanbe et al., 2000</i>)
Facteurs hématopoïétiques	GM-CSF	Permet la croissance et la différenciation des cellules de la lignée myélo-monocytaire (<i>Wodnar-Filipowicz et al., 1989</i>)

chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles, favorise la libération des enzymes lisosomaux et augmente la production d'anions superoxyde.

La prostaglandine (PG) D₂, non produite par les basophiles, est un puissant inhibiteur de l'agrégation des plaquettes et un chimio-attractant pour les neutrophiles. En synergie avec LTD₄, PGD₂ induit l'accumulation de neutrophiles au niveau de la peau.

Le platelet-activating factor (PAF) provoque l'agrégation et la dégranulation des plaquettes, induit des réactions cutanées, augmente la résistance pulmonaire, et conduit à une hypotension systémique, suggérant un rôle du PAF dans l'anaphylaxie systémique.

Les mastocytes activés produisent de nombreuses cytokines et chimiokines (Tableau 4). Les nombreux travaux réalisés *in vitro* ou *in vivo* montrent que les mastocytes humains expriment un large répertoire de cytokines en réponse à différents stimuli (Metcalf, 1997 ; Krishnaswamy, 2001) : TNF (*Tumor Necrosis Factor*)- α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-16, GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), TGF (*Transforming Growth Factor*)- β , MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*)-1 α , MCP (*Monocyte Chemotactic Protein*)-1, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Ces cytokines jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire tardive. Les mastocytes produisent également du SCF, ce qui permet leur propre différenciation et maturation, notamment au niveau de la peau, du poumon et du cœur. Si la majorité de ces cytokines est synthétisée après activation des mastocytes, au moins trois d'entre elles, le VEGF, le TNF- α et l'IL-8, peuvent également être préformées dans les granules. Les basophiles représentent probablement la source majeure d'IL-4 et d'IL-13, qu'ils produisent rapidement et en grande quantité. Ces deux cytokines, dont les propriétés immunorégulatrices sont reconnues comme cruciales dans la physiopathologie de l'allergie, se retrouvent aux sites de l'inflammation allergique (Schroeder *et al.*, 2001).

VI - Phase tardive ou inflammatoire de l'hypersensibilité immédiate

Au contact de l'allergène auquel il est sensible, un individu allergique peut développer plusieurs types de réactions immunes. La réaction immédiate ou aiguë, largement dépendante de la libération des médiateurs mastocytaires préformés, survient dans les minutes qui suivent le contact avec l'allergène. Cette réaction immédiate est parfois suivie d'une réaction tardive (Lemanske et

Kaliner, 1988), qui débute quelques heures après l'activation (Figure 4) : les médiateurs interagissent avec les tissus environnants et provoquent une inflammation allergique, dont les effets sont déterminés par l'environnement local. Enfin, chez certains patients, la réaction tardive peut conduire avec le temps à une inflammation allergique chronique.

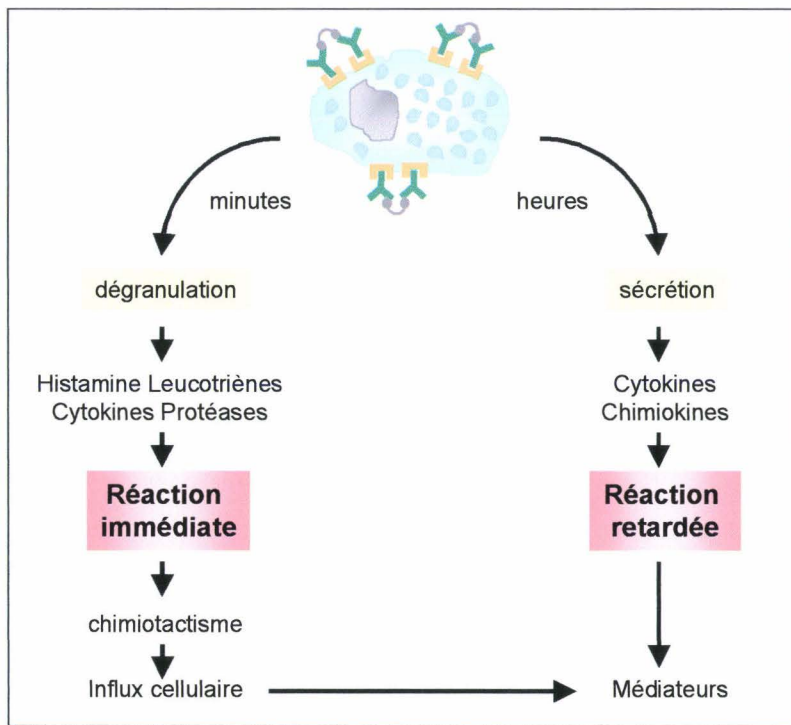


Figure 4. Réactions d'hypersensibilité immédiate et tardive.

La réponse immédiate à l'allergène chez les individus sensibilisés atteint son maximum 15 à 30 minutes après contact, suivie par une réaction tardive maximale après 6 à 12 heures. La plupart des conséquences tardives des réactions IgE-dépendantes, au niveau du tractus respiratoire ou de la peau, reflètent les effets des leucocytes recrutés au niveau de ces sites au moment de la réaction tardive, plutôt que les effets directs des médiateurs relargués par les mastocytes et les autres cellules après contact avec l'antigène (Zweiman, 1993).

La réaction tardive cutanée se caractérise par un dépôt de fibrine extravasculaire et un infiltrat cellulaire. Des quantités élevées de cellules $CD3^+$ et $CD4^+$, d'éosinophiles, de neutrophiles et de cellules produisant de l'ARNm pour l'IL-4 et l'IL-5 sont détectées dès une heure après contact avec l'allergène, et sont maximales après 6 heures. Un infiltrat de basophiles est également observé à 24 heures. Une augmentation faible mais significative de la quantité de macrophages, de cellules $CD8^+$ et $CD25^+$ (IL-2 récepteur) et de cellules sécrétrices d'IL-2 et d'IFN- γ a également été observée, mais seulement après 48 heures. Les réactions tardives asthmatiques et nasales présentent un profil

similaire d'infiltration cellulaire, bien que les basophiles soient moins nombreux dans les voies aériennes inférieures (Metcalfé, 1993 ; MacFarlane *et al.*, 2000).

L'infiltration d'éosinophiles est un fait bien reconnu de la réponse tardive induite par l'allergène et jouerait également un rôle très important dans la pathophysiologie de l'inflammation allergique. Les éosinophiles sont des polynucléaires impliqués dans la défense anti-parasitaire. Leur répartition est surtout tissulaire (intestin, poumon, peau, utérus). Les éosinophiles peuvent sécréter de nombreuses substances, granulaires ou membranaires (Tableau 5), toxiques pour les pathogènes rencontrés mais également pour les tissus environnant lors de l'inflammation allergique. Ces substances semblent avoir un rôle d'amplification de la réaction allergique, avec libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes, hyper-réactivité bronchique dans l'asthme, etc. (Gleich, 2000).

Tableau 5. Substances éosinophiliques.

Produits	Propriétés
<u>Granulaires :</u>	
MBP (protéine basique majeure)	Cytotoxique (épithélium, parasites, cellules tumorales) Histaminolibératrice
EPO (peroxydase éosinophilique)	Cytotoxique en présence d'H ₂ O ₂ et d'ions halogènes (cellules pulmonaires) Histaminolibératrice
ECP (protéine cationique éosinophilique)	Cytotoxique (parasites, système nerveux, cœur) Histaminolibératrice Inhibition de la prolifération lymphocytaire
EDN/EDX (neurotoxine)	Cytotoxique (système nerveux, parasites) Inhibition de la prolifération lymphocytaire T
<u>Membranaires :</u>	
CLC (cristaux de Charcot Leyden)	Lysophospholipase qui forme des cristaux hexagonaux caractéristiques au microscope
Enzymes	Collagénase, catalase, arylsulfatase, histaminase, phospholipase D

VII - Rôle des médiateurs mastocytaires dans la réponse inflammatoire

Les médiateurs produits par les mastocytes peuvent être responsables, de manière indépendante ou en synergie avec les cytokines produites par les macrophages, les lymphocytes T ou les éosinophiles, de l'induction de la réponse inflammatoire chronique (Williams et Galli, 2000 ; Krishnaswami, 2001).

L'histamine se lie aux cellules exprimant ses récepteurs et produit des effets spécifiques des tissus cibles. D'autres molécules contenues dans les granules ont un effet sur la coagulation ou sont

impliquées dans la destruction locale des tissus. Les médiateurs lipidiques, comme LTB₄, LTC₄, PAF et PGD₂, ont des effets directs sur les tissus périphériques (augmentation de la perméabilité vasculaire) qui vont aider les cellules inflammatoires du sang à rejoindre le site de l'inflammation. De plus, ces médiateurs lipidiques ont également des propriétés chimioattractives pour les neutrophiles, les éosinophiles et les lymphocytes. La tryptase, la chymase ou le TNF- α sont capables d'activer les fibroblastes, conduisant à un dépôt de collagène et à une fibrose. Le TNF- α est essentiel pour l'induction *in vivo* de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Walsh *et al.*, 1991). De plus, les granules des mastocytes potentialisent la production d'IL-6 (induite par les endotoxines) par les cellules endothéliales.

Les cytokines et chimiokines produites par les mastocytes régulent la synthèse d'IgE, la migration cellulaire, la libération d'histamine par les basophiles, la prolifération des cellules endothéliales. L'IL-4 et l'IL-13 favorisent la production d'IgE par les lymphocytes B (Gauchat *et al.*, 1993). L'IL-5 active les éosinophiles et augmente la production d'IgA par les lymphocytes B (Terada *et al.*, 1992). Les chimiokines (IL-8) et les leucotriènes (LTC₄) relargués par les mastocytes recrutent les neutrophiles et éosinophiles au site de l'inflammation. L'IL-4 produite par les mastocytes permettrait le développement des lymphocytes Th2 qui sécrètent sélectivement de l'IL-4 et de l'IL-5 après activation (Paul et Seder, 1994). Des données récentes suggèrent que certaines chimiokines sécrétées par les mastocytes, notamment MIP-1 α , favorisent le développement d'un phénotype de type Th1 (sécrétion d'IFN- γ et d'IL-2), alors que d'autres comme MCP-1 conduisent à un phénotype Th2 (Karpus *et al.*, 1997).

Il existe une étroite association entre les mastocytes muqueux et les lymphocytes T, et de nombreuses cytokines produites par les lymphocytes T ou les macrophages (IL-3, IL-4, GM-CSF, SCF) sont requises pour la prolifération des mastocytes. Les lymphocytes T et les mastocytes sont donc complémentaires dans leurs fonctions et participent à l'environnement cytokinique qui conduit à l'inflammation chronique.

En conclusion, l'activation des mastocytes *via* les Fc ϵ RI initie les phases immédiates et tardives de la réponse allergique, la dernière étant associée en partie à la sécrétion de TNF- α et autres cytokines qui influencent le recrutement et la fonction des autres cellules effectrices. Ces cellules recrutées favorisent la progression de la réponse inflammatoire en fournissant d'autres sources de cytokines et médiateurs qui peuvent être ou non produits par les mastocytes. De plus, des cytokines comme le TNF- α , le VEGF ou le TGF- β produites par les mastocytes peuvent contribuer à l'inflammation allergique chronique de part leurs effets sur les fibroblastes, les cellules endothéliales vasculaires et les autres cellules présentes au site de la réaction. Finalement, l'activation des

mastocytes peut induire la production de cytokines par certaines cellules présentes dans les tissus (par exemple dans le tractus respiratoire : macrophages alvéolaires, éosinophiles, cellules épithéliales bronchiques, cellules endothéliales vasculaires, fibroblastes, cellules épithéliales, nerfs). Ensemble, les diverses cytokines produites contribuent aux modifications vasculaires et épithéliales, à la transformation des tissus affectés, à l'angiogenèse et à la fibrose (Figure 5) (Williams et Galli, 2000).

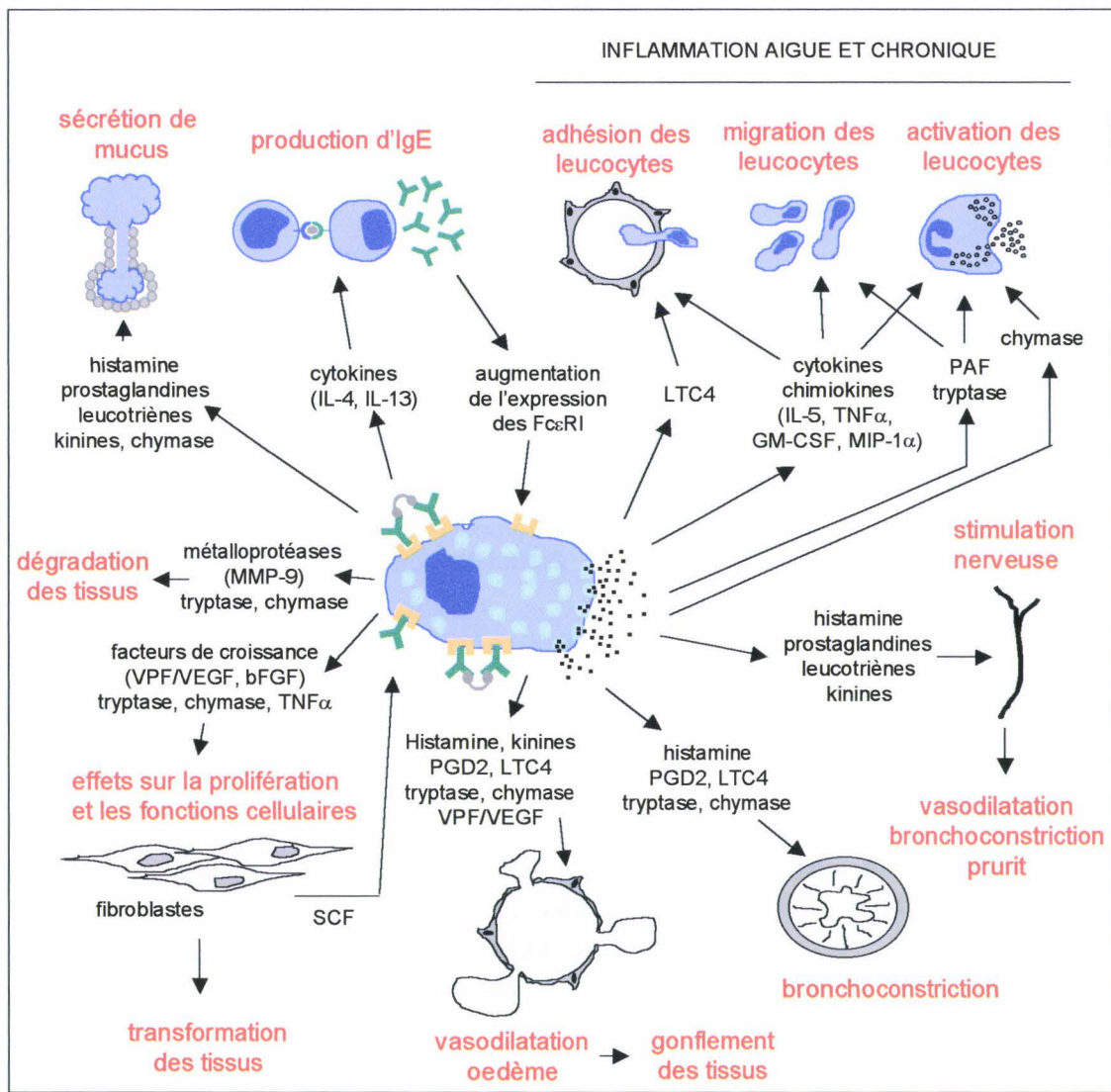


Figure 5. Effets biologiques des principaux médiateurs produits par les mastocytes lors de la phase précoce, de la phase tardive et de l'inflammation chronique associées aux maladies allergiques.

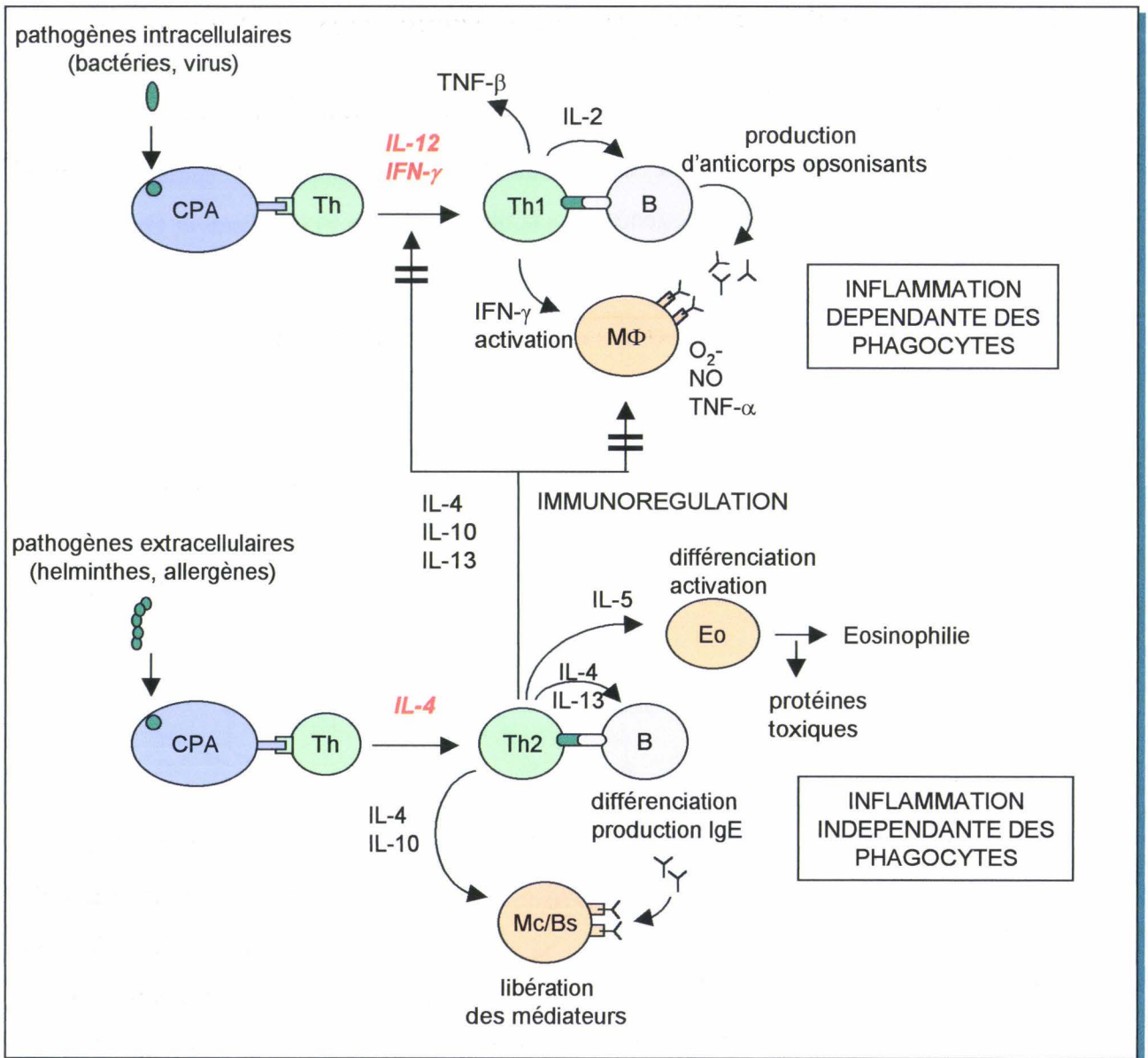


Figure 6. Représentation schématique des propriétés et fonctions principales des réponses Th1 et Th2. CPA : cellule présentatrice d'antigène, Th : lymphocytes T «helper» (auxiliaires), B : lymphocyte B, MΦ : macrophage, Eo : éosinophile, Mc/Bs : mastocyte/basophile, IFN : interféron, TNF : tumor necrosis factor, IL : interleukine. Voir le texte pour les explications (d'après Romagnani, 2000a).

CHAPITRE 2 : ROLE DES LYMPHOCYTES ET DES CELLULES DENDRITIQUES DANS L'ALLERGIE : LA REPONSE TH2

I – Définitions et propriétés des cellules Th1 et Th2

Le concept qu'une sous-population particulière de lymphocytes T est responsable de l'implication à la fois des lymphocytes B producteurs d'IgE, des mastocytes ou basophiles et des éosinophiles dans les réactions allergiques est devenue plus évidente après la démonstration que deux formes polarisées de la réponse immune spécifique existent non seulement chez la souris (Mosmann *et al.*, 1986) mais aussi chez l'homme (Del Prete *et al.*, 1991 ; Romagnani, 1991).

1. Les lymphocytes Th1 et Th2

Les lymphocytes T auxiliaires ("helper") de type 1 (Th1) et les lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) représentent deux sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ impliqués dans la polarisation de la réponse immune (Romagnani, 1995, 1996 ; Del Prete, 1998) (Figure 6 et Tableau 6). Les Th1 sont caractérisées par la production d'IL-2, IFN- γ et TNF- β et sont les principales cellules effectrices de la réponse immune cellulaire lors d'infections causées par des pathogènes intracellulaires. En effet, les cytokines de type Th1 sont capables d'activer les phagocytes et d'induire la production d'anticorps opsonisants par les lymphocytes B (défense de l'hôte dépendante des phagocytes). Cependant, lorsque le pathogène n'est pas rapidement éliminé, la réponse Th1 peut devenir dangereuse pour l'hôte en provoquant une réaction inflammatoire forte et chronique. De l'autre côté, les Th2 produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 et IL-13 et sont impliquée dans la réponse immune humorale et dans les phénomènes d'allergie. D'autres cytokines, comme l'IL-3, le GM-CSF et le TNF- α , sont produites par les deux populations Th1 et Th2.

Les cytokines Th2 induisent la différenciation, l'activation et la survie des éosinophiles (IL-5), la production par les lymphocytes B de grandes quantités d'anticorps, notamment d'IgE (IL-4, IL-13), ainsi que la croissance des mastocytes et basophiles (IL-3, IL-4, IL-9, IL-10). L'IL-4, IL-10 et IL-13 inhibent la plupart des fonctions des macrophages et le développement des Th1. La réponse Th2, indépendante des phagocytes, est en général moins protectrice que la réponse Th1 contre la majorité des agents infectieux, sauf contre des parasites extracellulaires comme les nématodes gastro-

Tableau 6. Principales différences entre les lymphocytes Th1 et Th2.

Propriétés	Th1	Th2
Profil de sécrétion de cytokines	IL-2, IFN- γ , TNF- β	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13
Cytokines nécessaires au développement	IL-12, IFN- γ	IL-4
Type de réponse immune	Cellulaire	Humorale
Effet sur la réponse inflammatoire	Pro-inflammatoire	Anti-inflammatoire
Action sur les macrophages	Activation	Inhibition
Activité phagocytaire	Dépendant	Indépendant
Isotype des anticorps	IgG1	IgE, IgG4
Effet sur les pathogènes	Protège contre les pathogènes intracellulaires	Protège contre les pathogènes extracellulaires
Rôle dans l'allergie	Pas de rôle important	Implication dans les réponses allergiques
Molécules membranaires	CD26, LAG-3, ligands de CD62E et CD62P, IL-18R, IL-12R β_2 , CCR5, CXCR3, TCCR	CD30, ST2L, IFN- γ R β , CCR3, CCR4, CCR8, CRTH2
Pathophysiologies associées	Thyroidite autoimmune de Hashimoto, sclérose en plaque, diabète de type I, maladie de Crohn, sarcoïdose pulmonaire, rejet de greffe, avortements récurrents inexplicés	GVHD chronique, sclérose systémique, syndrome de Ommen, infection au VIH, maladies atopiques

intestinaux. Cependant, les Th2 jouent probablement un important rôle régulateur dans le système immunitaire car une commutation de Th1 vers Th2 peut fournir un effet protecteur lorsque la réponse Th1 devient dangereuse pour l'hôte.

A côté de la production sélective de certaines cytokines, les cellules Th2 sont associées à la production de LIF (*leukemia inhibitory factor*), très important pour l'implantation de l'embryon et donc pour une grossesse réussie (Piccini *et al.*, 1998), ainsi qu'à la production de MDC (*macrophage derived chemokine*) qui contribue probablement à une amplification de l'inflammation allergique (Galli *et al.*, 2000).

Les cellules Th1 et Th2 expriment de manière différentielle certaines molécules de surface (Annunziato *et al.*, 1998 ; Romagnani, 2000a).

Sont préférentiellement exprimés à la surface des Th2 :

- CD30 (famille du TNF récepteur ; Del Prete *et al.*, 1995)
- ST2L (famille de l'IL-1 récepteur ; Xu *et al.*, 1998)
- CD62L (L-sélectine ; Annunziato *et al.*, 1998)
- chaîne β du récepteur à l'IFN- γ (Pernis *et al.*, 1995)
- récepteurs aux chimiokines : CCR3, CCR4, CCR8 (Bonecchi *et al.*, 1998)
- CRTH2 (*chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells*, récepteur à PGD₂, Nagata *et al.*, 1999)

Sont préférentiellement associés aux cellules Th1 :

- CD26 (famille des peptidases, récepteur de l'adénosine déaminase ; Willheim *et al.*, 1997)
- LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*, superfamille des Ig, Annunziato *et al.*, 1996)
- récepteur à l'IL-18 (Chan *et al.*, 2001)
- ligands des sélectines P et E (Astrup *et al.*, 1997)
- sous-unité β_2 du récepteur à l'IL-12 (Rogge *et al.*, 1999)
- récepteurs aux chimiokines : CCR5 et CXCR3 (Bonecchi *et al.*, 1998)
- TCCR (*T cell cytokine receptor*, impliqué dans la génération des Th1, Chen *et al.*, 2000)

2. Pathologies associées aux réponses Th1 et Th2

Les réponses Th1 et Th2 ne sont pas uniquement impliquées dans la défense contre les pathogènes intracellulaires ou les nématodes intestinaux, mais sont également responsables de différents types de réactions immunopathologiques (Romagnani, 1996, 2000a). Une réponse Th1 dominante est

observée dans les maladies auto-immunes organe-spécifiques, le rejet de greffe aigu, les avortements récurrents inexplicables, les dermatites de contact, et certains désordres inflammatoires chroniques. La réponse Th2 est associée aux maladies atopiques, à certaines immunodéficiences comme le syndrome de Omenn (immunodéficiency combinée avec hyper-éosinophilie) ou l'infection au VIH, à la GvHD (*graft vs host disease*) chronique, à une protection réduite contre certains pathogènes intracellulaire et à certaines maladies auto-immunes systémiques (Tableau 6).

La production de cytokines de type Th2 permet également l'induction et le maintien de la tolérance des allogreffes (Nickerson *et al.*, 1994) ainsi que la tolérance fœtale. Les embryons ne sont pas rejetés par le système immunitaire maternel malgré la présence des antigènes CMH du père : ce paradoxe peut en partie être expliqué par une polarisation Th2 au niveau de l'interface materno-fœtale, qui permet la survie du fœtus en inhibant la réponse Th1 (Wegmann *et al.*, 1994).

3. Autres réponses Th

Les réponses de type Th1 et Th2 ne sont pas les seuls profils cytokiniques observés.

En l'absence d'un signal clair de polarisation, les lymphocytes T CD4⁺ expriment des cytokines appartenant aux deux profils. Ce type de réponse est appelé Th0, mais la nature exacte des cellules Th0 n'est pas claire (Del Prete, 1998). Certains auteurs décrivent le phénotype Th0 comme :

- une étape transitoire, les cellules Th0 représentant des précurseurs non encore engagés dans la différenciation Th1/Th2 (Nakamura *et al.*, 1997a ; Kamogawa *et al.*, 1993),
- un phénotype à part entière aux côtés des phénotypes Th1 et Th2, les cellules Th0 produisant à la fois de l'IL-4, de l'IFN- γ et de l'IL-2 pouvant être obtenues après activation des T naïfs en présence d'IL-4 et d'IFN- γ (Miner et Croft, 1998),
- un phénotype mixte, qui reflète la présence d'une population hétérogène de cellules plus ou moins différenciées présentant des profils cytokiniques distincts et limités, la coexpression de cytokines Th1 et Th2 par la même cellule étant exceptionnelle (Bucy *et al.*, 1995 ; Seder et Paul, 1994).

Un autre type de profil, appelé Th3, a également été caractérisé (Weiner, 2001) : les cellules Th3 sont des lymphocytes T immuno-régulateurs qui sécrètent du TGF- β et sont impliquées dans les phénomènes de tolérance induits après l'administration orale d'un antigène. Les Th3 favorisent la production d'IgA et inhibent les réponses Th1 et Th2.

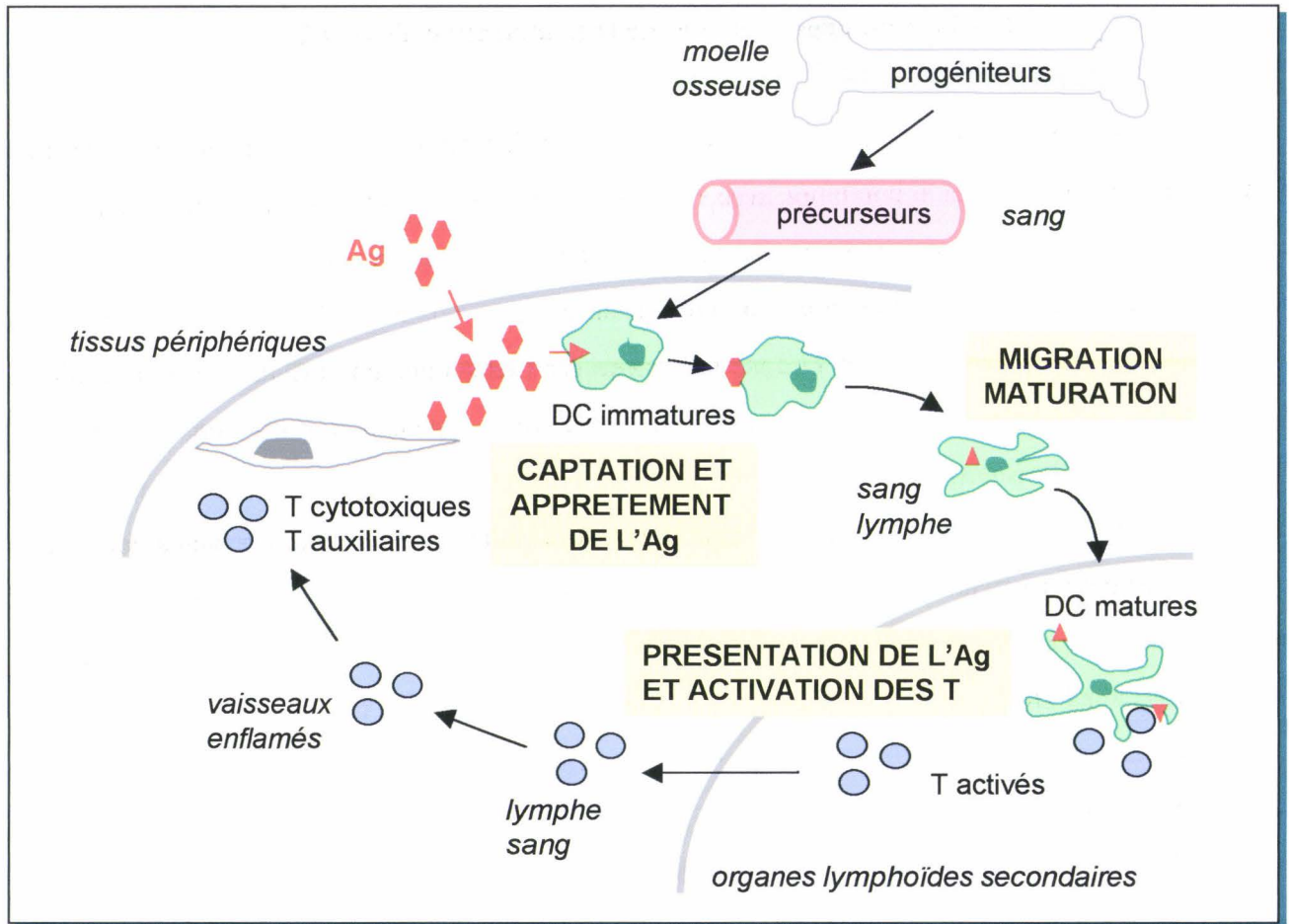


Figure 7. Activation des lymphocytes T par les DC. Les DC immatures, situées dans les tissus périphériques, dérivent successivement de progéniteurs qui prolifèrent dans la moelle osseuse puis de précurseurs circulants dans le sang. Les DC immatures capturent les antigènes (Ag) pouvant être issus de différents pathogènes. Sous l'influence de facteurs de stress, ces DC subissent un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles présentent aux lymphocytes T spécifiques des peptides issus de l'antigène, associés aux molécules du CMH. Les lymphocytes T activés vont proliférer et se différencier, quitter les zones T des organes lymphoïdes secondaires et traverser l'épithélium enflammé pour rejoindre le site original de dépôt de l'antigène. Ceci limite la réponse T au site de l'infection. Les lymphocytes B, non représentés dans ce schéma, se différencient en lymphoblastes dans les organes lymphoïdes secondaires après contact avec les DC et les T. Ils migrent ensuite vers différentes zones (tissus lymphoïdes, muqueuses, moelle osseuse) où ils se différencient en plasmocytes et produisent des anticorps pouvant éventuellement neutraliser le pathogène initial.

II – Facteurs responsables de la polarisation Th1/Th2

Les cellules Th1 et Th2 ne dérivent pas de lignées distinctes, mais se différencient à partir d'un même précurseur. La polarisation a lieu sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques, au niveau de la présentation de l'antigène aux lymphocytes Th naïfs.

Parmi les facteurs environnementaux, la voie d'entrée de l'antigène, la forme physique de l'immunogène, le type d'adjuvant et la dose d'antigène semblent jouer un rôle dans la polarisation (Constant et Bottomly, 1997). Les mécanismes génétiques impliqués dans le contrôle de la polarisation Th1/Th2 restent évasifs.

Ces facteurs environnementaux et génétiques influencent la polarisation Th1/Th2 principalement en modulant des facteurs contact-dépendants, fournis lors de la reconnaissance de l'antigène (signal 1) et des interactions entre molécules de costimulation (signal 2), ainsi que la dominance de cytokines particulières dans le microenvironnement de la cellule Th (signal 3). Ces signaux sont principalement fournis par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), notamment par les cellules dendritiques (Langenkamp *et al.*, 2000).

Les cellules dendritiques (DC) sont les seules CPA capables d'activer les lymphocytes T naïfs lors d'une immunisation primaire et sont optimales pour activer les T mémoire (Cella *et al.*, 1997 ; Banchereau et Steinman, 1998 ; Sallusto *et al.*, 1998). Localisées dans les tissus périphériques, les DC immatures sont des "sentinelles" qui capturent de manière très efficace les antigènes, par différents mécanismes : endocytose médiée par des récepteurs, phagocytose ou macropinocytose (Guermonprez *et al.*, 2002). Sous l'effet de facteurs de stress (molécules d'origine microbiennes) ou de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- α), les DC entrent dans un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes T spécifiques (Figure 7). Les lymphocytes T activés vont alors proliférer et se différencier.

De nombreuses molécules sont associées aux DC (Tableau 7). Les DC immatures expriment des molécules de surface essentiellement liées à leur propriété de capture de l'antigène. Les DC matures ont une forte expression de surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, de molécules d'adhésion et de costimulation, et produisent de nombreuses cytokines. Afin de permettre leur migration, les DC immatures expriment des récepteurs aux chimiokines pro-inflammatoires produites au niveau des tissus enflammés, notamment CCR5 (récepteur aux chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES) et CCR6 (récepteur à MIP-3 α). Au cours de la maturation, les DC vont perdre l'expression des récepteurs CCR5 et CCR6 et exprimer CCR7, le récepteur aux chimiokines constitutives produites au niveau des organes lymphoïdes secondaires,

Tableau 7. Principales molécules associées aux cellules dendritiques.

Fonction	Molécules	Type de protéine
Capture de l'antigène	DEC-205 Dectin-1, CLEC-I, DCIR DORA FcγR (CD32/64), FcεR TLR2, TLR4, TLR5, TLR3 MR SR αvβ5, αvβ3 CD11b, CD88 CD91 CD36	Lectine type C (type I) Lectine type C (type II) Superfamille des Ig Récepteurs Fc Toll-like récepteurs Mannose récepteur Scavenger récepteurs Intégrines Récepteurs au complément Récepteur aux HSP Récepteur pour collagène, thrombospondine, LDL oxydés, acides gras
Présentation de l'antigène	CMH I, CMH II Dectin-1 DC-LAMP ILT3 CD1 CD83	Molécules du CMH Lectine type C (type II) Glycoprotéine lysosomale Superfamille des Ig Superfamille des Ig (famille CMH) Superfamille des Ig (marqueur de maturation)
Migration	CD11a, CD44, CD49d CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR1, CXCR4	Molécules d'adhésion Récepteurs aux chimiokines
Adhésion et costimulation	CD50, CD54, CD58 CD80, CD86, B7RP-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3 OX40L, 4-1BBL, CD27, CD30L DC-SIGN	Molécules d'adhésion Molécules de costimulation, famille B7 Molécules de costimulation, famille du TNF-R Lectine type C (type II)
Activation	CD40, TRANCE/RANK GMCSF-R, IL1-R, IL4-R, IL10-R, TGFβ-R, TNF-R	Famille du TNF-R Récepteurs aux cytokines
Cytokines	IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF, chimiokines	

ELC (*Epstein Barr virus-induced ligand chemokine*, appelée également MIP-3 β) et SLC (*secondary lymphoid tissue chemokine*, appelée également 6Ckine) (Figure 8).

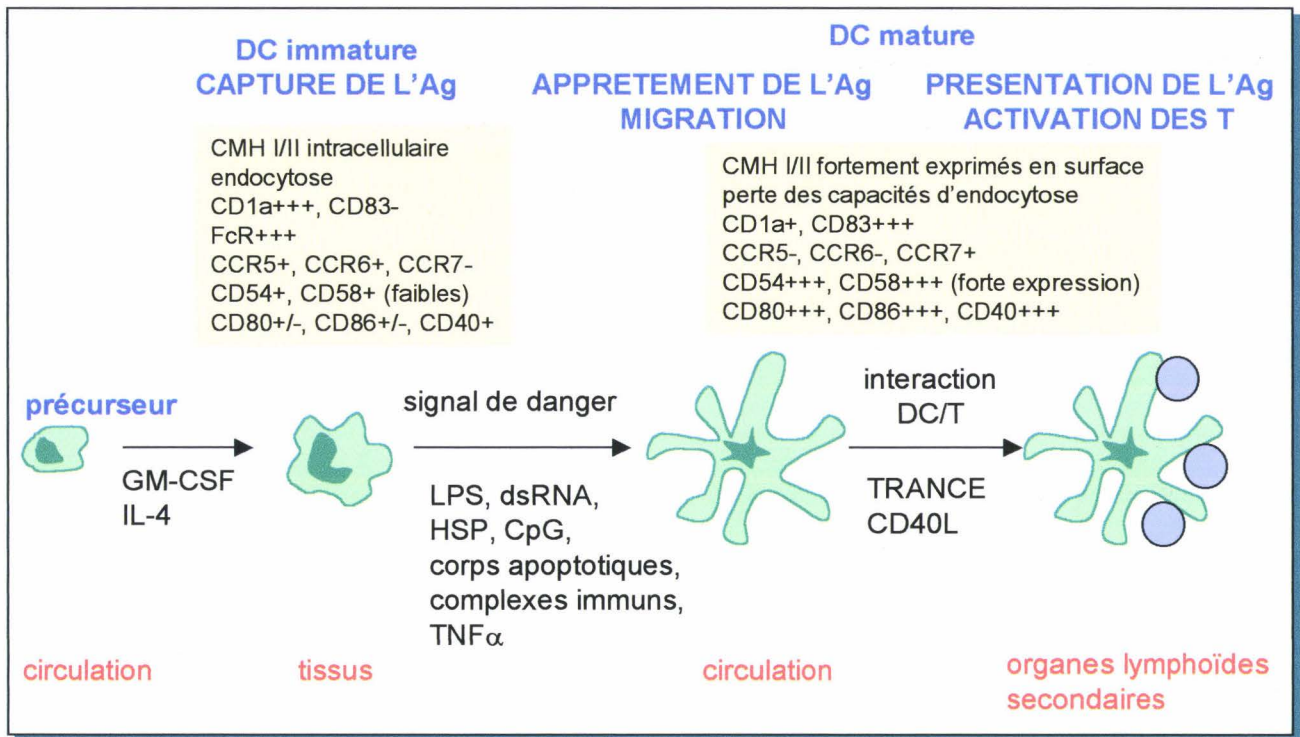


Figure 8. Maturation des cellules dendritiques. Les précurseurs des DC circulent dans le sang et migrent vers les tissus où ils se différencient en DC immatures. Après capture des antigènes, en présence de signaux de danger endogènes (cellules en apoptose, HSP, cytokines...) ou exogènes (produits bactériens ou viraux, parasites...), les DC subissent un processus de maturation et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T. La maturation est complète au moment de l'interaction des DC avec les lymphocytes T spécifiques de l'antigène.

1. Présentation de l'antigène et costimulation

Les cellules Th reconnaissent spécifiquement, *via* leur récepteur T (TCR), les peptides issus de l'antigène présentés par les DC en association aux molécules du CMH de classe II. Dans certains systèmes expérimentaux, de fortes doses d'antigène conduisent à une polarisation Th1 tandis que de faibles doses conduisent à une polarisation Th2 (Constant *et al.*, 1995). L'affinité du peptide pour le CMH ou pour le TCR peut également affecter la polarisation (Pearson *et al.*, 1997) : les peptides de grande affinité permettent la différenciation de Th1 *in vitro*. La voie par laquelle l'antigène est capturé et processé par les DC affecte l'affinité des peptides résultants. Par exemple, en utilisant un antigène natif, des différences entre les peptides produits par des DC traitées à l'IL-6 et des DC non traitées ont été constatées (Drakesmith *et al.*, 1998). De même, la durée de la stimulation *via* le TCR

influence la polarisation des Th : le développement d'une réponse Th2 nécessite un plus long engagement du TCR (96 h) qu'une réponse Th1 (24 h) (Iezzi *et al.*, 1999).

Le signal fourni par la reconnaissance de l'antigène (signal 1) assure la spécificité de la réponse mais n'est pas suffisant pour induire une réponse immune. Une seconde série de signaux, appelés signaux de costimulation (signal 2), est requise pour activer de manière efficace les lymphocytes T. Ces signaux indispensables sont fournis par l'interaction entre molécules de surface exprimées par les DC et par les cellules Th naïves.

Le rôle des interactions entre molécules de la famille B7 (CD80, CD86) et CD28 dans la détermination du phénotype Th reste complexe et controversé, cependant la production d'IL-4 par les lymphocytes T naïfs semble être dépendante des molécules B7 (Lenschow *et al.*, 1996). Il a été suggéré que l'engagement de CD28 conduit à la différenciation Th2 (Webb et Feldmann, 1995), ou que la différenciation Th1 est préférentiellement induite par l'interaction CD28/CD80 et la différenciation Th2 par l'interaction CD28/CD86 (Kuchroo *et al.*, 1995). D'autres études *in vitro* montrent que l'engagement de CD28 conduit à la fois à la production d'IL-4 et d'IFN- γ (Seder *et al.*, 1994) et que des transfectants exprimant CD80 ou CD86 peuvent fournir des signaux de costimulation pour la génération à la fois de Th1 et de Th2 (Lanier *et al.*, 1995 ; Natesan *et al.*, 1995). Il a ensuite été suggéré que la sensibilité aux signaux de costimulation fournis par les molécules B7 puisse être dépendante de la force du signal fourni par l'engagement du TCR. Les Th naïfs semblent n'être sensibles à la production d'IL-4 induite par CD28 que lorsque le signal fourni par le TCR est faible (Tao *et al.*, 1997).

A côté des signaux de costimulation fournis par les molécules B7, les signaux délivrés par l'interaction CD30L/CD30 (Del Prete *et al.*, 1995) et l'interaction OX40L/OX40 (Ohshima *et al.*, 1998 ; Delespesse *et al.*, 1999) favoriseraient la différenciation des Th naïfs en Th2.

La quantité d'IL-4 produite par les Th naïfs semble être également contrôlée par les interactions entre molécules d'adhésion. Le blocage des interactions LFA-1/ICAM-1 ou LFA-1/ICAM-2 augmente fortement la production de cytokines de type Th2 (Salomon et Bluestone, 1998 ; Luksch *et al.*, 1999).

Le ratio DC matures/T naïfs joue aussi un rôle dans la polarisation : un ratio DC/T faible (1/300) favorise une réponse Th2 alors qu'un ratio DC/T élevé (1/4) favorise une réponse mixte Th1/Th2 (Tanaka *et al.*, 2000).

2. Facteurs solubles impliqués dans la différenciation Th1/Th2

Trois cytokines semblent jouer un rôle crucial dans les étapes initiales du développement des cellules Th1 et Th2 : l'IL-4, l'IFN- γ et l'IL-12. Les Th naïfs expriment le récepteur à l'IL-4 (Kubo *et al.*, 1999), les chaînes α et β du récepteur à l'IFN- γ (Bach *et al.*, 1995), mais aucune des chaînes du récepteur à l'IL-12 (Igarashi *et al.*, 1998). Lorsque le Th naïf est activé par l'antigène présenté par une CPA, l'expression du récepteur à l'IL-4 augmente, les chaînes β 1 et β 2 du récepteur à l'IL-12 apparaissent et les chaînes α et β du récepteur à l'IFN- γ sont maintenues. A ce stade, tous les récepteurs semblent être exprimés, et les quantités ainsi que la cinétique d'apparition des différentes cytokines sont déterminantes pour la différenciation Th1/Th2.

Le médiateur principalement impliqué dans la polarisation Th2 *in vitro* est l'IL-4 (Sornasse *et al.*, 1996 ; Ohshima et Delespesse, 1997). Cependant, *in vivo*, la source initiale d'IL-4 est mal définie. Les DC ne produisent pas cette cytokine, mais les Th naïfs eux-mêmes sont capables de produire de petites quantités d'IL-4 lors de leur activation initiale, et la concentration d'IL-4 accumulée lors du développement de la réponse Th augmente avec l'activation des lymphocytes. L'effet de l'IL-4 domine celui de toutes les autres cytokines, et lorsque la quantité d'IL-4 atteint un certain seuil, la différenciation Th2 a lieu. Il a été montré que l'IL-6 produite par les CPA serait capable de favoriser une polarisation Th2 en induisant la production initiale d'IL-4 par les Th naïfs (Rincon *et al.*, 1997). Dans le cas d'une réponse allergique, les mastocytes, les éosinophiles ou les Th2 peuvent être également des sources d'IL-4. Les cellules NK T représenteraient une autre source possible d'IL-4 : d'abord identifiées chez la souris, mais avec une population CD4⁺CD8⁻TCR- α/β ⁺ homologue décrite chez l'homme (Davodeau *et al.*, 1997), ces cellules produisent rapidement de l'IL-4 après liaison du TCR et favoriseraient la production d'IgE *in vivo* (Bendelac *et al.*, 1996). Cependant, ces cellules produisent également de l'IFN- γ , et leur rôle dans la polarisation Th2 reste discutable : des souris déficientes en NK T sont capables de développer une réponse Th2 fonctionnelle, avec sécrétion d'IL-4 et d'IgE (Brown *et al.*, 1996). Tout récemment, Johansson-Lindbom et Borrebaeck (2002) ont montré que les lymphocytes B des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires constituent une source physiologique prédominante d'IL-4 et de ce fait fournissent un environnement adéquat pour la différenciation des Th2 *in vivo*.

En l'absence d'une production précoce d'IL-4, les principales cytokines responsables de la polarisation Th1 sont l'IL-12 et l'IFN- γ . L'IL-12, une cytokine hétérodimérique (deux sous-unités, p40 et p35) de 70 kDa, est rapidement sécrétée par les CPA lors de la présentation de l'antigène, de

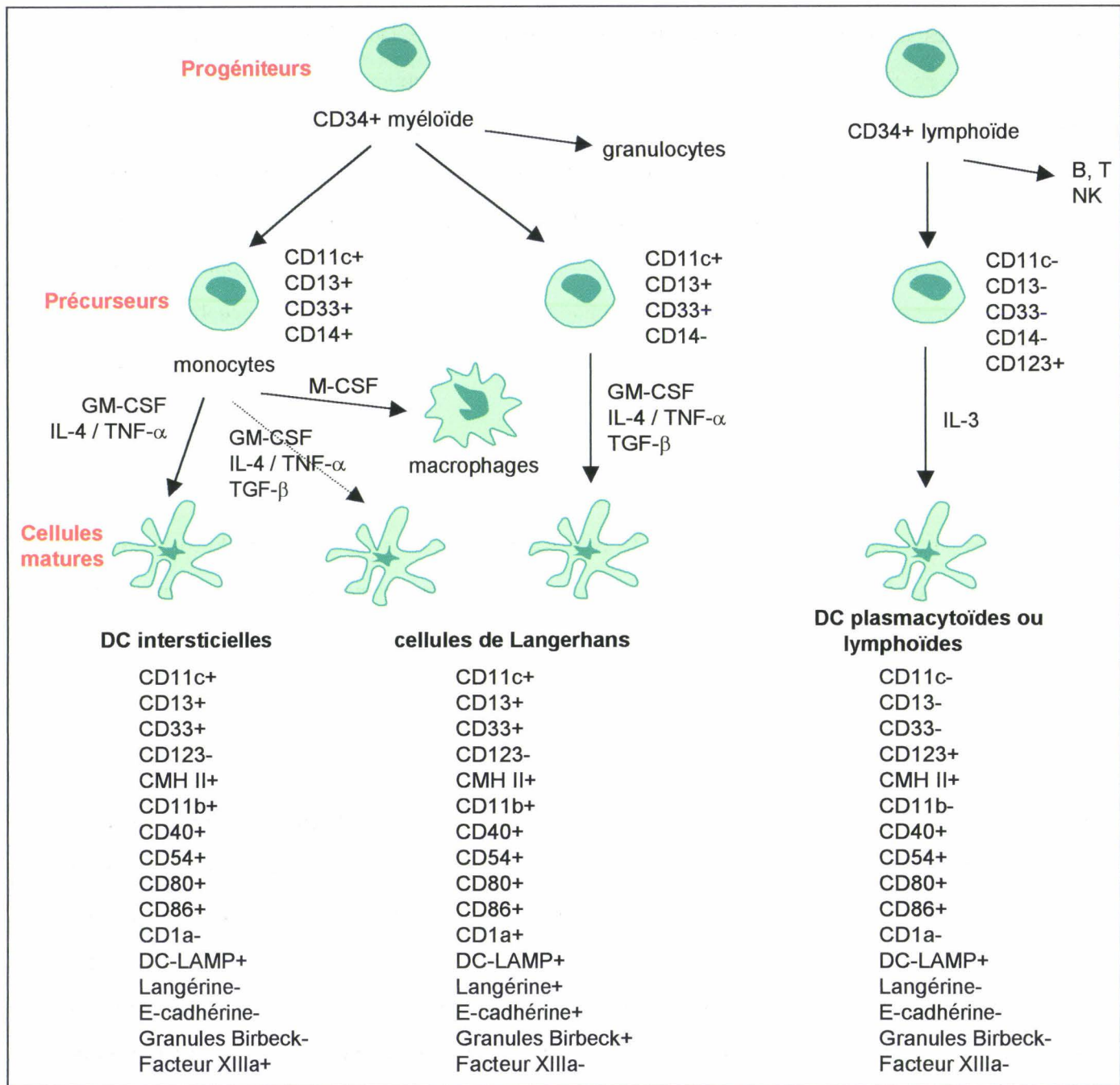


Figure 9. Différenciation des différentes lignées de DC à partir de progéniteurs CD34⁺. Les DC myéloïdes et lymphoïdes peuvent être différenciées à partir de progéniteurs issus de la moelle osseuse et de précurseurs sanguins en présence de différentes combinaisons de facteurs de croissance, comme le GM-CSF, le TNF- α , l'IL-4, le TGF- β et l'IL-3. Les DC interstitielles et les cellules de Langerhans d'origine myéloïde se retrouvent dans des sites en contact avec l'environnement extérieur (muqueuses, peau) alors que les DC plasmacytoides d'origine lymphoïde se trouvent dans les zones T des organes lymphoïdes, dans le thymus et dans le sang (d'après Lipscomb et Masten, 2002).

l'engagement des molécules de costimulation et de l'interaction CD40/CD40L (Macatonia *et al.*, 1995). L'IL-12 se fixe aux lymphocytes NK et aux Th naïfs activés qui expriment le récepteur, induisant la synthèse rapide d'IFN- γ . L'induction initiale d'IFN- γ conduit au renforcement des sous-unités du récepteur à l'IL-12 et à une diminution de l'expression de la sous-unité β du récepteur à l'IFN- γ . Le rôle de l'IL-12 dans le développement de réponses Th1 fonctionnelles a été démontré par des études sur des souris déficientes en IL-12 ou en STAT4 (*signal transducer and activator of transcription 4*, impliqué dans la transduction du signal fourni par la fixation de l'IL-12 à son récepteur) (Gately *et al.*, 1998) ainsi que sur des patients dépourvus de récepteur à l'IL-12 fonctionnel (de Jong *et al.*, 1998).

L'IL-18 joue également un rôle dans la polarisation Th1/Th2. Cependant, les fonctions de l'IL-18 *in vivo* sont très hétérogènes. En principe, l'IL-18 favorise la réponse Th1 induite par l'IL-12, mais peut également stimuler la production de cytokines Th2 et même l'inflammation allergique en absence d'IL-12 (Nakanishi *et al.*, 2001).

3. Le concept DC1/DC2

De manière intéressante, une partie des activités modulatrices de nombreux facteurs polarisants, comme l'IFN- γ , l'IL-4, l'IL-10, la prostaglandine E₂ (PGE₂) ou l'IFN- α , est liée à leur capacité à réguler la production d'IL-12 ou à influencer la réponse à cette cytokine. La polarisation Th1/Th2 est donc étroitement liée à la quantité d'IL-12 produite par les CPA : des Th activés par des CPA qui produisent peu ou pas d'IL-12 vont se différencier en Th2. Selon leur capacité à produire ou non de l'IL-12, donc à favoriser une réponse Th1 ou Th2, les DC ont été nommées DC de type 1 (DC1) ou DC de type 2 (DC2) (Kalinski *et al.*, 1999).

Les DC myéloïdes et lymphoïdes

Dans le sang humain, il existe deux types de précurseurs des DC, issus de lignées différentes : les monocytes d'origine myéloïde (pré-DC1) et des précurseurs d'origine lymphoïde (pré-DC2) (Rissoan *et al.*, 1999 ; Shortman et Liu, 2002) (Figure 9). Au niveau de la peau, deux types de DC myéloïdes se retrouvent : les DC interstitielles (dermales) et les cellules de Langerhans (épidermales). Si les monocytes se différencient en DC1 immatures en présence de GM-CSF et d'IL-4, ou en cellules de Langerhans en présence de TGF- β , la différenciation des pré-DC2 en DC2 immatures nécessite la présence d'IL-3 ou de virus. Les pré-DC2 se caractérisent par un phénotype unique, CD11c⁻ CD4⁺CD123⁺CD45RA⁺HLA-DR⁺, n'expriment pas les antigènes myéloïdes CD11c, CD13 ou CD33,

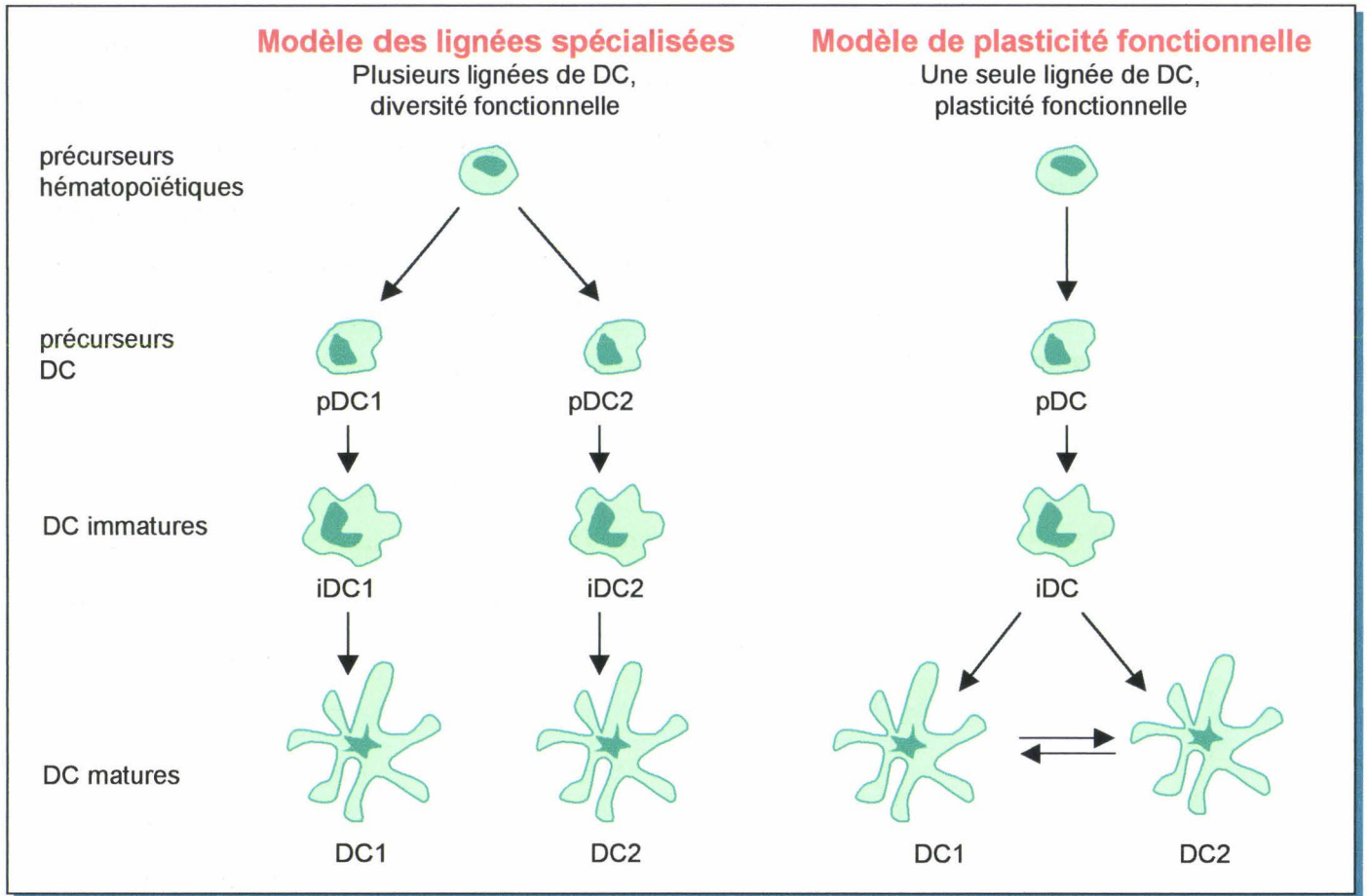


Figure 10. Modèles de génération des DC1 et DC2. Le modèle des lignées spécialisées propose que les différentes sous-populations de DC (DC1 et DC2) dérivent de divergences précoces dans la voie de développement, induisant plusieurs lignées hématopoïétiques distinctes. Le modèle de plasticité fonctionnelle propose que toutes les DC appartiennent à une seule lignée hématopoïétique, les différentes sous-populations de DC étant générées sous l'influence de l'environnement local. La situation réelle serait un mélange de ces deux modèles extrêmes (d'après Shortman et Liu, 2002).

ni de récepteurs au mannose, mais expriment les marqueurs lymphoïdes CD2, CD5 et CD7 ainsi qu'un pré-TCR α . Ces cellules, d'abord étudiées pour leur implication dans la tolérance (de St Groth, 1998), expriment très fortement CD123, le récepteur à l'IL-3, et sont capables de produire de grandes quantités d'interférons de type I (IFN- α et IFN- β) en réponse à une stimulation virale. Alors que l'activation des DC myéloïdes dérivées de monocytes par CD40L conduit à une forte production d'IL-12 et induit préférentiellement le développement d'une réponse Th1, les DC lymphoïdes dérivées de précurseurs plasmacytoïdes produisent de faibles quantités d'IL-12 en réponse à CD40L et sont à l'origine d'une réponse Th2. Chez la souris, dans la rate, des sous-populations de DC CD8 α^- "lymphoïdes" et CD8 α^+ "myéloïdes" ont également été identifiées (Pulendran *et al.*, 1999 ; Maldonado-Lopez *et al.*, 1999). De manière paradoxale, une situation inverse est observée chez la souris : alors que les DC lymphoïdes produisent de grandes quantités d'IL-12, les DC myéloïdes en produisent peu et favorisent une réponse Th2. Dans les deux cas, les études réalisées démontrent l'existence d'une sous-population de DC fortement productrice d'IL-12 favorisant le développement de réponses Th1 et d'une sous-population qui produit peu d'IL-12 et induit des réponses Th2. Cependant, le concept de différentes lignées de DC capables d'induire soit une réponse Th1, soit une réponse Th2, ne permet pas d'expliquer de manière générale une polarisation spécifique d'un pathogène ou d'un tissu. En effet, l'implication de lignées séparées de DC dans la polarisation de la réponse immune nécessiterait un système de reconnaissance spécifique à chaque lignée, permettant de distinguer les pathogènes induisant une réponse Th1 de ceux induisant une réponse Th2. De plus, un système dans lequel une lignée de DC particulière serait programmée pour induire un type de réponse donnée manquerait de flexibilité, par exemple pour réagir efficacement contre des pathogènes nécessitant une réponse Th1 qui infecteraient un tissu normalement prévu pour promouvoir une réponse Th2, et vice-versa. Il est donc admis que chaque population de DC possède une grande plasticité dans sa capacité à polariser les Th (Liu *et al.*, 2001 ; Shortman et Liu, 2002), qui dépend du contexte de leur activation (Figure 10).

Plasticité des DC myéloïdes

Chez l'homme, des molécules issus de pathogènes ou de tissus malades, des facteurs pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires peuvent affecter la fonction des DC. Des DC myéloïdes immatures dérivées de monocytes sont capables d'induire une polarisation Th1 mais également une polarisation Th2, selon les signaux présents au moment de l'induction de leur maturation. Ces signaux qui modulent la capacité des cellules myéloïdes (DC, monocytes, macrophages) à produire de l'IL-12 sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8. Régulation de la production d'IL-12.

Induction	Inhibition
<p>Infectieuse</p> <ul style="list-style-type: none"> Virus, ARN double-brin (poly I:C) Produits bactériens : Lipopolysaccharide (LPS) Acide lipotéichoïque (LTA) Protéines de choc thermique (HSP) ADN bactérien (séquences CpG) Tréhalose dimycolate (mycobactéries) <i>S. aureus</i> Cowan Strain I (SAC) <i>Toxoplasma gondii</i> STAg <i>Leishmania</i> LelF <p>Immune, inflammatoire</p> <ul style="list-style-type: none"> Fragments de hyaluronane CD40 Ligand <p>Amplification</p> <ul style="list-style-type: none"> IFNγ, GM-CSF 	<p>Infectieuse</p> <ul style="list-style-type: none"> Virus de la rougeole, HIV <i>Leishmania</i> promastigotes <i>Histoplasma</i> Toxine cholérique <p>Récepteurs impliqués dans la phagocytose, récepteurs au complément</p> <ul style="list-style-type: none"> FcγR CR3 CD46 Scavenger récepteurs <p>Inhibiteurs endogènes</p> <ul style="list-style-type: none"> IL-10, TGF-β, IL-4, IL-13, IFN de type I, IL-11, MCP-1 à -4, C5a PGE2 glucocorticoïdes, 1,25-dihydrovitamine D3 agonistes β-adrénergiques, histamine adénosine, ATP <p>Inhibiteurs exogènes</p> <ul style="list-style-type: none"> Aspirine, pentoxifylline, thalidomide, Inhibiteurs de ACE (<i>angiotensin converting enzyme</i>)

La plupart des pathogènes intracellulaires induisent directement la production d'IL-12 (Trinchieri, 1998 ; Gately *et al.*, 1998), alors que certains pathogènes induisant une réponse Th2 (helminthes, œufs de *Schistosoma mansoni*) produisent des facteurs inhibant cette production. La production d'IL-12 est également affectée lors d'une infection par le VIH (Chehimi *et al.*, 1994) ou par le virus de la rougeole (Karp *et al.*, 1996 ; Fugier-Vivier *et al.*, 1997).

La quantité d'IL-12 produite par les DC peut être modulée indirectement par des facteurs environnementaux provenant des tissus. Ces facteurs, généralement des cytokines, sont produits de manière constitutive ou induits par des pathogènes. Par exemple, au niveau de la chambre antérieure de l'œil, riche en TGF- β , IL-10 et VIP (*vasoactive intestinal peptide*), les CPA ont une fonction immunosuppressive et favorisent le développement de T régulateurs (Wilbanks *et al.*, 1991). Ce phénotype régulateur, pouvant être induit par du TGF- β ou de l'IL-10 recombinants, serait lié à une incapacité des CPA à produire de l'IL-12 (D'Orazio et Niederkorn, 1998 ; Takeuchi *et al.*, 1998). Dans le système nerveux central, la production d'IL-12 par les cellules microgliales, les principales CPA locales, est inhibée par les astrocytes (Aloisi *et al.*, 1997). La modulation des fonctions des CPA contribuerait également au caractère tolérogénique et au phénotype Th2 associés aux muqueuses intestinales et aériennes. Malgré des fréquences similaires de DC myéloïdes et lymphoïdes dans ces zones, des DC isolées de plaques de Peyer produisent des taux plus élevés d'IL-10 et induisent plus facilement des cytokines Th2 que des DC issues de la rate (Iwasaki et Kelsall, 1999). De même, des DC fraîchement isolées des bronches présentent de faibles capacités à produire de l'IL-12 et à induire une réponse Th1 (Stumbles *et al.*, 1998).

Il existe également des modulations fonctionnelles des CPA dans des conditions pathologiques. Par exemple, la réponse Th2 associée à une exposition aux UV est liée à la production de PGE₂ et IL-10 par les kératinocytes (Shreedhar *et al.*, 1998). Les macrophages de souris cancéreuses montrent des dysfonctionnements dans leurs propriétés stimulatrices et dans leur production de cytokines, et induisent préférentiellement le développement de cellules Th2 (Alleva *et al.*, 1994 ; Maeda et Shiraishi, 1995). Ce phénomène est lié à la production de PGE₂, IL-10 et TGF- β par les cellules tumorales. Un environnement similaire, riche en PGE₂ et IL-10, se retrouve également dans des tumeurs humaines, et aurait un même effet indésirable sur la réponse anti-tumorale (Pugh et Thomas, 1994 ; Huang *et al.*, 1996). Ces données montrent qu'en plus des propriétés stimulatrices des CPA locales, leur production de cytokines et leur capacité à polariser la réponse T peuvent être modulées par des médiateurs inflammatoires relargués localement par les tissus.

La capacité des DC myéloïdes à favoriser une réponse Th1 ou Th2 est également conditionnée par la modulation de leur capacité à produire de l'IL-12 par des médiateurs inflammatoires présents à

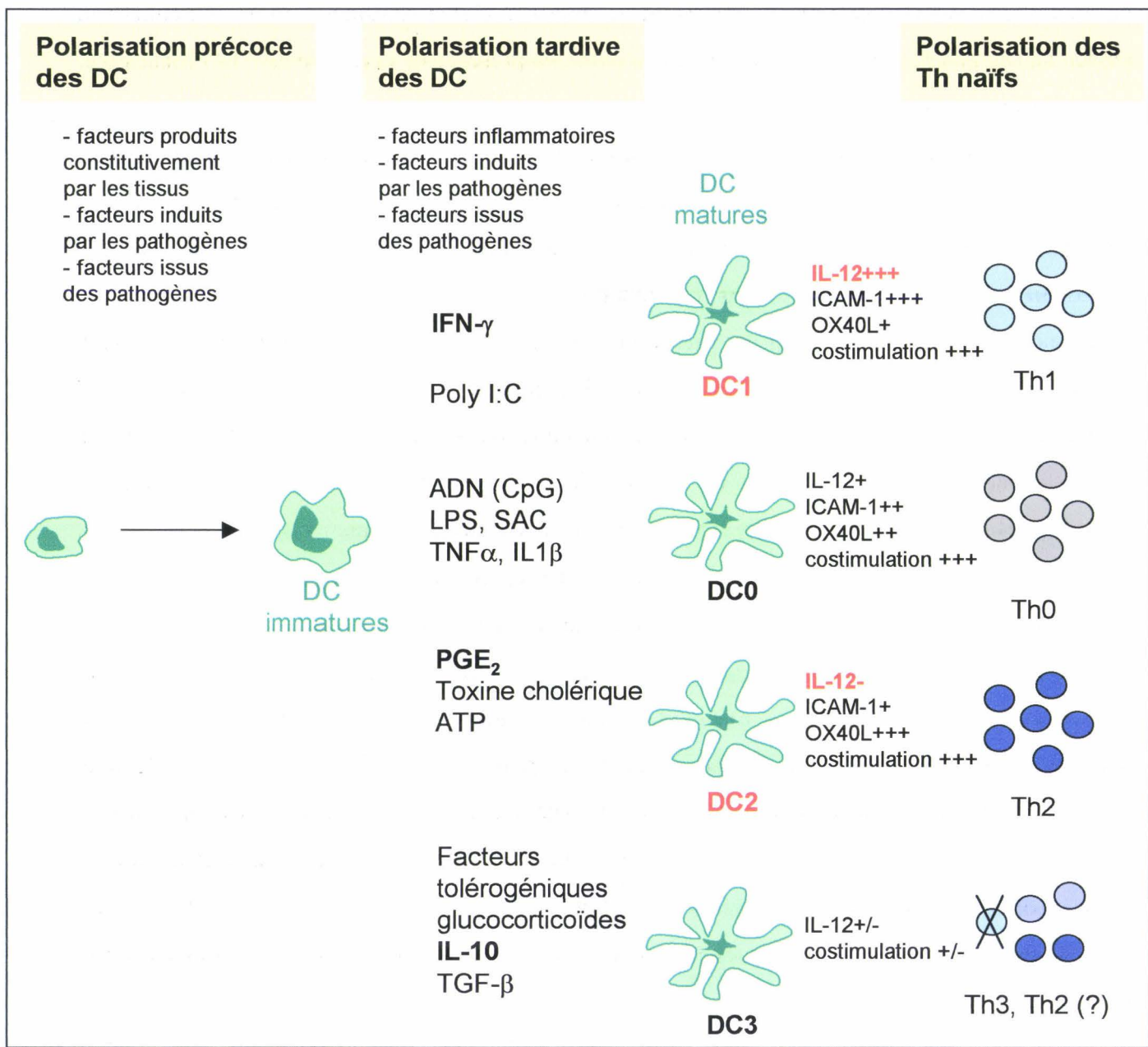


Figure 11. Polarisation des DC myéloïdes. L'IFN- γ , la PGE₂ et l'IL-10 sont les représentants principaux des différents types de facteurs polarisant les DC. La présence d'IFN- γ pendant la maturation des DC conduit au développement de DC1, qui produisent d'importantes quantités d'IL-12 lors du contact avec les Th naïfs et induisent leur différenciation en cellules Th1. PGE₂ inhibe la capacité des DC myéloïdes à produire de l'IL-12 et conduit au développement de DC2, qui favorisent la génération de cellules Th2. Les facteurs suppressifs comme l'IL-10 inhibent la production d'IL-12 par les DC mais également leurs capacités stimulatrices, conduisant au développement de DC3 tolérogéniques avec une fonction polarisante Th2 résiduelle. Une telle modulation fonctionnelle des DC par des facteurs spécifiques des tissus peut avoir lieu durant les étapes précoces du développement des DC, mais également à des étapes plus tardives, affectant les populations locales de DC au moment de l'induction de leur maturation en réponse à une invasion de pathogènes (d'après Kalinski *et al.*, 1999).

différentes étapes du développement de ces DC (Figure 11). Ces mécanismes peuvent être étudiés au moyen de DC générées *in vitro* à partir de monocytes, en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Sallusto et Lanzavecchia, 1994).

PGE₂, une molécule inflammatoire commune produite par les fibroblastes et les cellules épithéliales (Phipps *et al.*, 1991), est un exemple de facteur qui affecte le développement des DC immatures, induisant la différenciation de cellules déficientes en IL-12 qui possèdent la même morphologie et le même potentiel de stimulation que des DC immatures normales, mais qui induisent une polarisation Th2 (Kalinski *et al.*, 1997). La capacité à produire de l'IL-12 peut également être modulée pendant la maturation finale des DC, où la présence de PGE₂ conduit à une polarisation des DC en DC effectrices de type 2, qui produisent de faibles quantités d'IL-12 au moment du contact avec les cellules Th et induisent la production de cytokines Th2 (Kalinski *et al.*, 1998). La même capacité à moduler l'activité des DC semble se retrouver chez de nombreux autres agents connus pour élever la concentration en AMP cyclique (AMPC) intracellulaire, comme les agonistes β -adrénergiques (Panina-Bordignon *et al.*, 1997) ou la toxine cholérique, utilisée comme adjuvant dans les vaccinations par voie nasale (Gagliardi *et al.*, 2000). L'ATP extracellulaire, en se fixant aux purinorécepteurs de la famille P2X exprimés par les DC, inhibe de la même manière leur capacité à initier une réponse Th1. L'effet inhibiteur de l'ATP, contrairement à PGE₂ ou à la toxine cholérique, ne nécessite pas une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPC (La Sala *et al.*, 2001).

Récemment, il a été publié que des DC dérivées de monocytes traitées avec des antigènes solubles (SEA) issus des œufs de l'helminthe *Schistosoma mansoni* induisaient une différenciation Th2. Les SEA augmentent à peine la concentration en AMPC mais induisent fortement l'expression de la molécule OX40L à la surface des DC (de Jong *et al.*, 2002).

La vitamine D3 inhibe la production d'IL-12 par les DC stimulées (D'Ambrosio *et al.*, 1998), mais empêche aussi leur maturation (Canning *et al.*, 2001), ce qui est également observé après l'engagement de CD47, le récepteur de la thrombospondine (Demeure *et al.*, 2000).

Chez la souris, il a été rapporté que la glycoprotéine ES-62, sécrétée par le nématode *Acanthocheilonema viteae*, permet la maturation des DC en DC2, induisant ainsi une réponse Th2 (Whelan *et al.*, 2000).

L'IL-10 inhibe la production d'IL-12 par les DC immatures mais prévient également leur développement lorsqu'elle est présente à des étapes précoces (Buelens *et al.*, 1997 ; De Smedt *et al.*, 1997). L'IL-10 inhibe les capacités stimulatrices des DC et induit le développement de DC tolérogéniques (Steinbrick *et al.*, 1997). Bien qu'elles soient majoritairement suppressives, les DC traitées à l'IL-10 possèdent une fonction polarisante Th2 résiduelle, comme cela a été observé dans

un modèle murin *in vitro* (Liu *et al.*, 1998). Un effet semblable à celui de l'IL-10 sur les DC est également obtenu avec des glucocorticoïdes (Moser *et al.*, 1995 ; De Jong *et al.*, 1999).

La présence d'IFN- γ pendant la maturation permet le développement de DC effectrices de type 1, qui possèdent une forte capacité à produire des quantités élevées d'IL-12 et favorisent la réponse Th1 (Hilkens *et al.*, 1997 ; Vieira *et al.*, 2000). Une telle polarisation peut affecter les DC immatures au niveau des tissus, où elles sont en contact avec des sources locales d'IFN- γ , comme les cellules NK qui sont rapidement recrutées au site d'une infection virale (Biron, 1997). Bien que de nombreux produits d'origine virale ou bactérienne, comme le LPS (Verhasselt *et al.*, 1997), *Staphylococcus aureus* Cowan stain I (SAC) (Hilkens *et al.*, 1997), l'ADN bactérien (Schattenberg *et al.*, 2000) ou l'ARN double-brin (Cella *et al.*, 1999a) induisent ou augmentent la production d'IL-12 par les DC, l'IFN- γ semble être le facteur polarisant le plus puissant, en permettant la génération de DC1 effectrices stables qui produisent d'importantes quantités d'IL-12 au moment de leur interaction avec les lymphocytes T. L'IFN- γ par lui-même n'induit pas la production d'IL-12, mais augmente fortement celle induite par les autres facteurs.

La modulation de la production d'IL-12 par des cellules d'origine myéloïde autres que les DC a également été reportée par différentes études. Les chimiokines MCP-1 à -4 et le facteur chimioattractant naturel C5a, qui n'ont par ailleurs aucun effet sur les DC (Braun *et al.*, 2000), les ligands du récepteur au complément CR3 (Marth et Kelsall, 1997), les complexes immuns (Berger *et al.*, 1997), l'adénosine (Link *et al.*, 2000) ou encore l'histamine (Van der Pouw Kraan *et al.*, 1998) diminuent la capacité des monocytes à produire de l'IL-12 en réponse à divers stimuli. De même, l'interaction des récepteurs Fc γ , des récepteurs au complément et des scavenger récepteurs avec leurs ligands conduit à la suppression sélective de la production d'IL-12 par les macrophages.

Plasticité des DC lymphoïdes.

Les DC lymphoïdes produisent peu d'IL-12 et induisent préférentiellement une réponse de type Th2. Leur capacité à produire de l'IL-12 peut être fortement augmentée par de l'ADN bactérien (motifs CpG) qui agit en synergie avec CD40 ligand (Kadowaki *et al.*, 2001). Cependant la particularité principale de ces cellules est leur forte capacité à produire des interférons de type I, IFN- α et IFN- β , en réponse à des bactéries ou des virus (Cella *et al.*, 1999b ; Siegal *et al.*, 1999). Cette production peut être induite par les motifs CpG de l'ADN bactérien (Kadowaki *et al.*, 2001), par *Staphylococcus aureus* (Svensson *et al.*, 1996), ainsi que par des virus comme celui de la grippe (Cella *et al.*, 2000) ou de l'herpès (HSV) (Kadowaki *et al.*, 2000). Les IFN de type I jouent un rôle essentiel dans

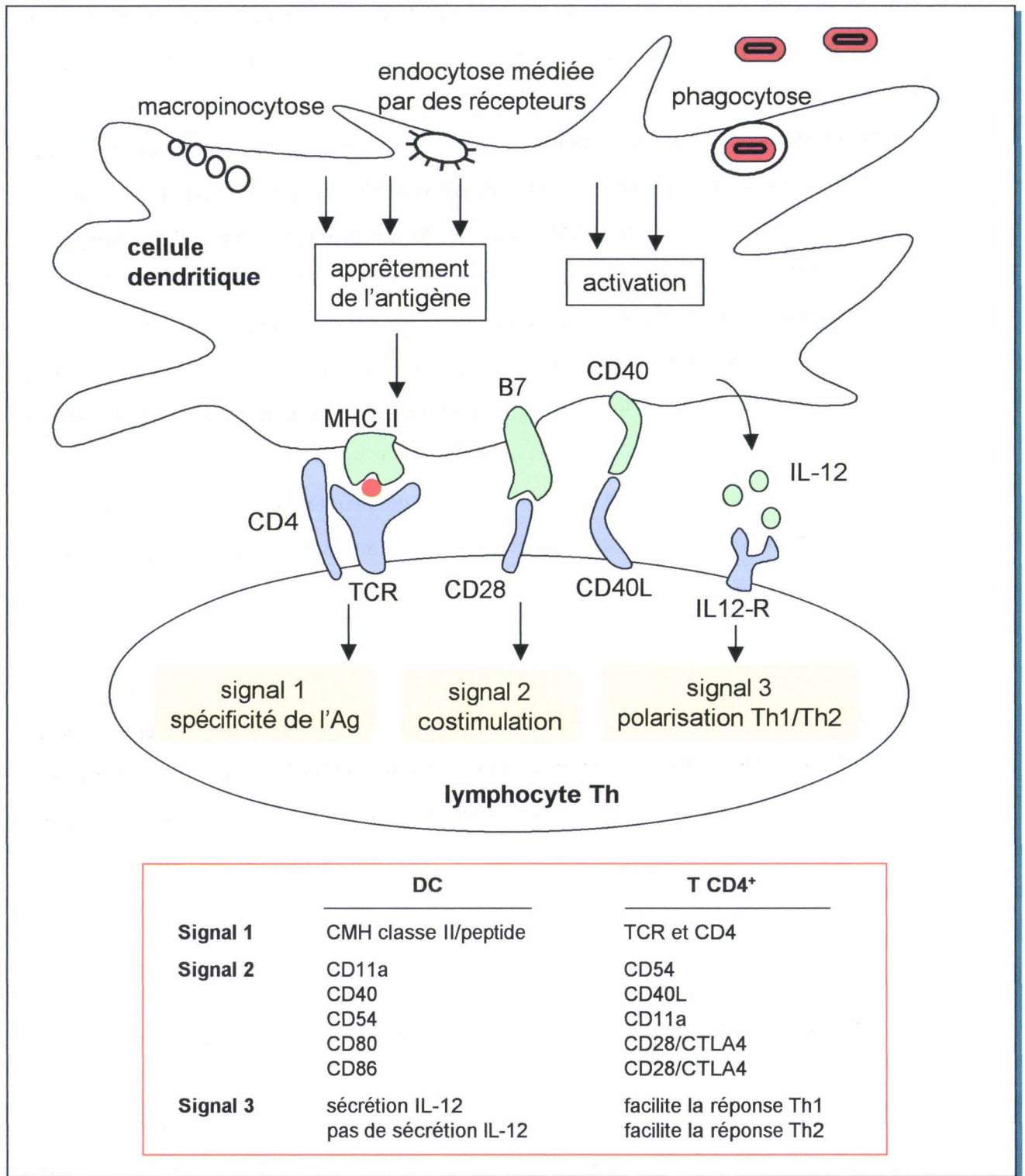


Figure 12. Activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques : le concept des 3 signaux. Le signal 1, fourni par l'interaction du TCR avec le complexe antigène/CMH assure la spécificité de la réponse. Le signal 2 est assuré par les molécules de costimulation et stimule la prolifération des T. Le signal 3 contrôle la polarisation Th1/Th2 ; il est essentiellement fourni par la production de cytokines comme l'IL-12 par les cellules dendritiques.

l'immunité innée antivirale et sont largement utilisés pour traiter les hépatites virales et différents types de cancers (Pfeffer *et al.*, 1998). Ces effets sont liés à une inhibition directe de la réplication virale dans les cellules infectées et aux nombreuses activités immunomodulatrices des IFN de type I, comme l'augmentation de la cytotoxicité des lymphocytes T (Kayagaki *et al.*, 1999), des NK et des macrophages (Pfeffer *et al.*, 1998), l'induction de l'activation des lymphocytes T (Sun *et al.*, 1998) et leur survie (Marrack *et al.*, 1999), ou la stimulation de la production d'IFN- γ par les Th (Demeure *et al.*, 1994).

Lorsqu'elles sont stimulées, les DC lymphoïdes produisent de grandes quantités d'IFN de type I qui, chez l'homme, sont plutôt impliqués dans les réponses de type Th1. Si les IFN de type I n'induisent pas directement la polarisation des Th, ils favorisent la différenciation des Th1, notamment en régulant l'expression du récepteur à l'IL-12 (De Waal Malefyt, 1997 ; Farrar et Murphy, 2000). Les DC myéloïdes, par l'intermédiaire de l'IL-12, induisent la production d'IFN- γ par les Th, alors que les Th stimulées par les IFN de type I produits par les DC lymphoïdes sécrètent à la fois de l'IFN- γ et de l'IL-10 (Kadowaki *et al.*, 2000).

Pour résumer, les réponses immunes primaires sont initiées par les DC, qui informent les Th naïfs d'une invasion de pathogènes en fournissant un "signal 1" spécifique de l'antigène et un "signal 2" de costimulation. En considérant les récentes études montrant que les DC qui se développent ou mûrissent dans des conditions différentes sont fonctionnellement différentes, il est aujourd'hui admis que les DC fournissent un "signal 3" qui contribue à la polarisation initiale des Th naïfs en Th1 ou Th2 (Figure 12).

III – Mécanismes responsables de la réponse Th2 dans les maladies atopiques

Les cellules T CD4⁺ présentes au niveau des sites de l'inflammation allergique (Van der Heijden *et al.*, 1991 ; Del Prete, 1992 ; Robinson *et al.*, 1992) ainsi que les T CD4⁺ spécifiques des allergènes clonés à partir de ces sites (Wierenga *et al.*, 1990 ; Parronchi *et al.*, 1991 ; Van Reijsen *et al.*, 1992) présentent une polarisation Th2. Les cytokines de type Th2, comme l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13 sont responsables d'une grande partie de la pathophysiologie de l'allergie (Tableau 9).

La réaction allergique est donc associée à une réponse T de type Th2 à un ou plusieurs allergènes environnementaux communs. La réponse Th2 spécifique de l'allergène représente le point de départ du recrutement ainsi que de l'implication des autres types cellulaires, des nombreux facteurs solubles

Tableau 9.**Rôle des cytokines Th2 dans l'inflammation allergique chronique (d'après Wills-Karp, 1999).**

<i>Evènement</i>	<i>Cytokines Th2 impliquées</i>	<i>Autres facteurs impliqués</i>
Production d'IgE	IL-4, IL-9, IL-13	IFN- γ , IL-12, IL-18
Développement et accumulation des éosinophiles et basophiles	IL-4, IL-5, IL-9, IL-13	IL-3, GM-CSF, eotaxine-1, -2 et -3, RANTES, MCP-3, MCP-4, VCAM-1
Développement des mastocytes	IL-4, IL-9, IL-13	IL-3, SCF
Hyperréactivité des voies aériennes	IL-9, IL-13	IL-11 et divers facteurs de croissance
Hypersécrétion de mucus	IL-4, IL-9, IL-13	Histamine, LTC ₄ , LTD ₄ , substance P

et molécules d'adhésion conduisant à la réaction inflammatoire. L'allergie atopique peut alors être définie comme une hypersensibilité de type Th2 à des antigènes inoffensifs (allergènes), qui possède des origines génétiques et environnementales complexes. L' "hypothèse Th2" dans l'allergie est aujourd'hui acceptée par la majorité des auteurs (Tableau 10) (Romagnani, 2000b).

Tableau 10.

Données conceptuelles et expérimentales supportant l' "hypothèse Th2" dans l'allergie.

Concept

Les cellules Th2 sont les seules cellules qui peuvent directement reconnaître les peptides issus de l'allergène (TCR) et expliquer la participation commune des cellules B productrices d'IgE (IL-4, IL-13), des mastocytes et basophiles (IL-4, IL-10) et des éosinophiles (IL-5) dans l'inflammation allergique.

Données expérimentales

Chez l'homme

Les allergènes provoquent des réponses Th2 chez les sujets atopiques.

Les cellules Th2 s'accumulent dans les organes cibles des sujets atopiques.

L'immunothérapie spécifique réussie commute la réponse spécifique de l'allergène de Th2 à Th1.

Dans des modèles murins

Le transfert de cellules Th2 dans une souris receveuse induit une éosinophilie, l'hypersécrétion de mucus et une hyperréactivité des voies aériennes.

L'allergie et l'asthme ne sont pas induites dans des animaux mutés génétiquement qui présentent des réponses Th2 déficientes.

Des souris transgéniques qui surexpriment des cytokines Th2 dans l'épithélium des voies aériennes présentent une éosinophilie, une hypersécrétion de mucus et une hyperréactivité des voies aériennes.

Les raisons pour lesquelles certains individus développent des maladies atopiques ne sont pas toutes connues. Le développement préférentiel de cellules Th2 en réponse à des allergènes chez ces individus est déterminé par :

- la nature et l'intensité du signal issu de l'interaction TCR / peptide allergique
- la régulation altérée de la production d'IL-4 par les cellules Th2 et/ou par d'autres cellules, qui semble être contrôlée par des facteurs génétiques et environnementaux.

1. Facteurs génétiques

Il est envisageable que les sujets atopiques possèdent une dérégulation génétique conduisant notamment à la production d'IL-4. Cette hypothèse est supportée par de nombreuses observations :

- des clones T CD4⁺ issus d'individus atopiques sont capables de produire de fortes quantités d'IL-4 et d'IL-5 en réponse à des antigènes bactériens qui d'habitude provoquent des réponses Th1 chez des individus sains (Parronchi *et al.*, 1992) ;

- les individus atopiques possèdent une fréquence plus élevée de cellules T productrices d'IL-4 que des individus sains (Chan *et al.*, 1996) ;
- des clones T générés à partir du sang de cordon ombilical de nouveaux-nés ayant des parents allergiques produisent plus d'IL-4 que les lymphocytes de nouveaux-nés ayant des parents non allergiques (Piccini *et al.*, 1996) ;
- il existe un lien entre les concentrations sériques d'IgE totales et le locus chromosomique 5q31.1 qui se trouve au niveau du gène de l'IL-4 (Marsh *et al.*, 1994) ;
- un polymorphisme a été identifié au niveau du promoteur du gène de l'IL-4 (Song *et al.*, 1996) ;
- des clones T spécifiques de *Parietaria officinalis* groupe 1 (pollen) ont été générés à partir du sang de donneurs possédant des concentrations faibles ou élevées d'IgE sériques : les clones T issus de donneurs possédant des taux élevés d'IgE produisent de fortes quantité d'IL-4 et peu d'IFN- γ , alors que ceux issus de donneurs possédant des taux faibles d'IgE produisent soit beaucoup d'IL-4 et d'IFN- γ à la fois, soit présentent une polarité Th1 (Parronchi *et al.*, 1998).

Ces données sont en accord avec les résultats de diverses études dans lesquelles les rôles potentiels de différents gènes dans l'allergie ont été évalués (Tableau 11), qui suggèrent que les multiples phénotypes des maladies atopiques résultent de combinaisons distinctes au niveau du génotype. Ces gènes qui seraient impliqués dans les maladies atopiques ont un point commun puisqu'ils codent pour des protéines capables d'influencer la balance Th1/Th2 (Biedermann et Rocken, 1999).

Tableau 11.
Loci chromosomiques contenant des marqueurs génétiques associés à l'atopie.

Chromosome	Gène candidat	Phénotype associé
5q31-33	IL-4, IL-9 Récepteur β 2 adrénergique CMH classe II Récepteur aux glucocorticoïdes	IgE totales élevées IgE totales élevées, hyperréactivité bronchique IgE spécifiques élevées IgE totales élevées
6p21.3	CMH classe III TNF- α	IgE spécifiques élevées Asthme
10q11.2	5-lipoxygénase	Asthme
11q13	Fc ϵ RI β	IgE spécifiques élevées Sensibilisation contre des allergènes protéiques
12q	IFN- γ NO synthase I SCF	IgE élevées Asthme
13q14.1-14.2	D estérase	IgE élevées
13q21.3		Asthme
14q	Chaîne α du TCR NF κ B1	IgE spécifiques élevées
16p12.1	Récepteur à l'IL-4	IgE totales élevées, hyperréactivité bronchique

Les altérations qui favorisent la réponse Th2 associée à la production anormale d'IgE chez les sujets atopiques peuvent se situer au niveau de la signalisation intracellulaire impliquée dans le développement des cellules Th2. Après la fixation de l'IL-4 à son récepteur, STAT6 (*signal transducer and activator of transcription*) est activé. Chez les souris déficientes en STAT6, les lymphocytes T ne peuvent pas se développer en cellules Th2 et la production d'IgE et d'IgG1 est fortement réduite (Takeda *et al.*, 1996 ; Shimoda *et al.*, 1996). D'autres facteurs de transcription de la famille NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) peuvent trans-activer le promoteur du gène de l'IL-4, mais ils sont exprimés à la fois dans les cellules Th1 et Th2 (Li-Weber *et al.*, 1997). Le facteur NIP45 (*NF-AT interacting protein*) est exprimé par les cellules Th2 et représente un puissant co-activateur de la transcription du gène de l'IL-4, mais son expression dans les cellules Th1 n'est pas claire (Hodge *et al.*, 1996). En revanche, le proto-oncogène *c-maf* serait exprimé sélectivement dans les clones Th2 et induit pendant la différenciation des Th2 mais pas pendant celle des Th1 (Ho *et al.*, 1996). GATA-3 est le facteur de transcription qui est le plus largement impliqué dans l'induction et le maintien du profil Th2. Il est exprimé par les T immatures ou activés et sélectivement supprimé pendant la différenciation Th1 (Zheng et Flavell, 1997).

2. Facteurs environnementaux

L'importante augmentation des maladies allergiques dans les pays développés durant ces dernières décades suggère qu'en plus des altérations génétiques au niveau des mécanismes qui gouvernent l'expression du gène de l'IL-4, des facteurs environnementaux contribuent à réguler le développement ou la fonction des cellules Th2. Ces facteurs environnementaux qui favorisent l'allergie atopique peuvent agir avant ou après la naissance.

Avant la naissance

Piccini *et al.* (1993) ont montré que la réponse immune à *Dermatophagoides pteronyssus* (acarien) débute pendant le vie fœtale, ce qui a été confirmé par d'autres études (Jones *et al.*, 1996 ; Prescott *et al.*, 1998). Durant la grossesse une polarisation Th2 est observée à l'interface materno-fœtale. Le but de cette polarisation Th2 est de diminuer la réactivité du système immunitaire de la mère contre le fœtus (Wegmann *et al.*, 1994). La progestérone, aux concentrations trouvées au niveau de l'interface materno-fœtale, favorise le développement des T en cellules productrices d'IL-4 (Piccini *et al.*, 1995). L'environnement lié à la grossesse favoriserait ainsi le développement d'une légère réponse Th2 aux allergènes transplacentaires, qui est augmentée sous l'influence d'un fond génétique atopique (Prescott *et al.*, 1998).

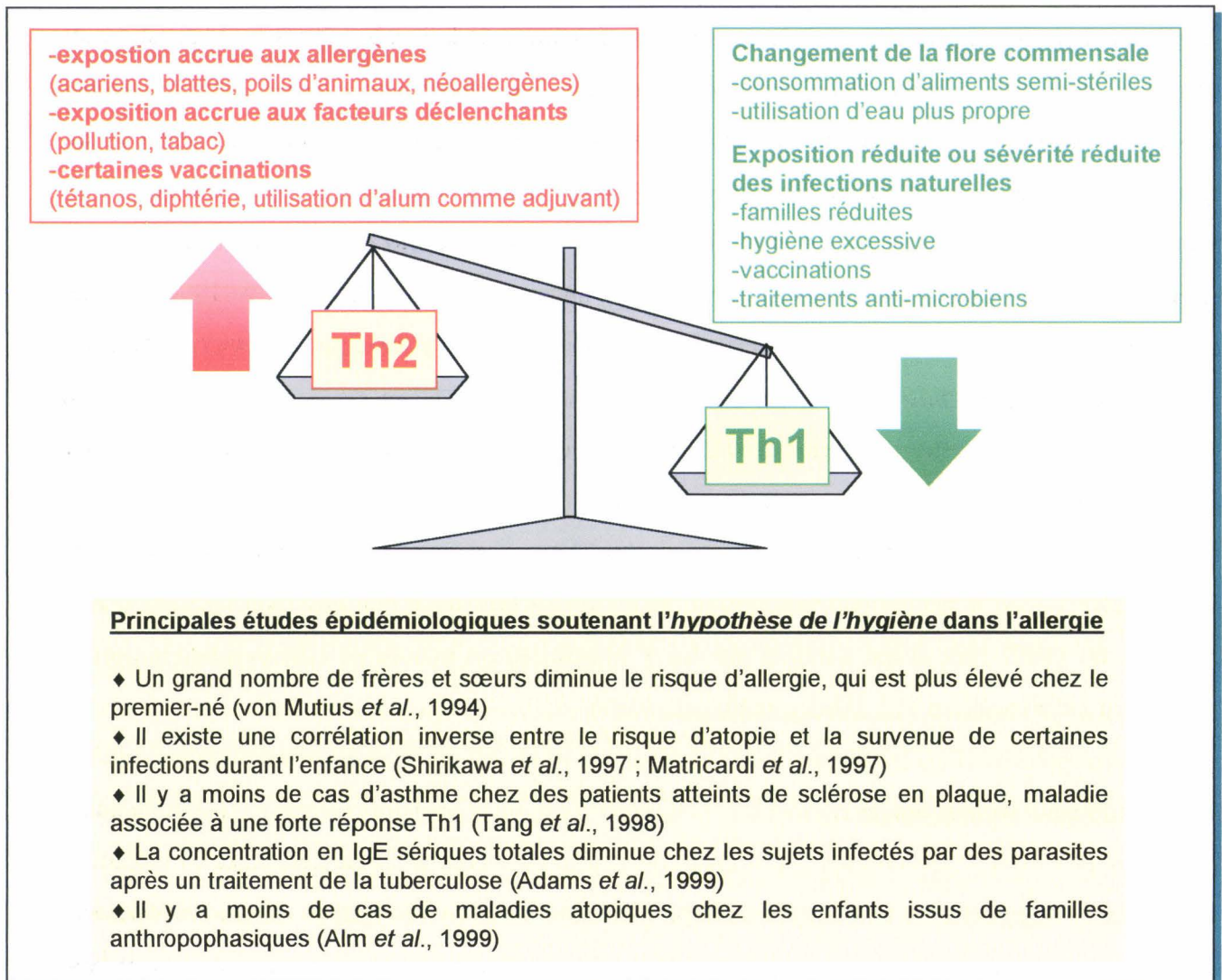


Figure 13. Facteurs ayant contribué au changement de l'environnement infectieux pendant l'enfance : l' « hypothèse de l'hygiène ». Ces facteurs provoquent une dérégulation de la balance Th1/Th2 en faveur d'un phénotype Th2 en réponse à des antigènes inoffensifs (allergènes).

Après la naissance

Après la naissance, spécialement pendant les premières années de la vie, le processus d'éducation du système immunitaire continue en périphérie, au travers des interactions répétées avec les agents infectieux, les antigènes inoffensifs et la flore commensale. Ce processus conduit à un réglage plus fin du répertoire TCR et une réorientation progressive d'un phénotype Th2 vers un phénotype Th1.

Alors que l'augmentation des maladies allergiques dans les pays développés occidentaux a souvent été attribuée à la pollution (données résumées dans Ring *et al.*, 2001), Romagnani (1994) postule que l'augmentation des maladies allergiques est en partie liée à la forte réduction des infections pendant l'enfance, en particulier celles qui induisent la production de cytokines antagonistes du développement Th2. Cette hypothèse est basée sur des données *in vitro* montrant que les cytokines (IL-12 et IFN) produites par les cellules de l'immunité naturelle (macrophages, NK) en réponse à *Mycobacterium tuberculosis* ou à ses composants sont capables de réorienter le développement de lymphocytes T spécifiques de l'allergène d'un profil Th2/0 vers un profil Th1 (Romagnani, 1992 ; Maggi *et al.*, 1992 ; Mannetti *et al.*, 1993). Cette hypothèse a été confirmée par des études chez la souris qui montrent que l'IFN- γ produit lors de la réponse Th1 contre le BCG supprime le développement des réponses inflammatoires Th2 au niveau du poumon (Erb *et al.*, 1998). De plus, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent que les changements dans l'environnement infectieux des enfants représentent un facteur important de l'augmentation des maladies atopiques dans les pays occidentaux développés. Les principales causes du changement de l'environnement microbien qui modifie la balance Th1/Th2 en faveur d'un phénotype Th2 et qui soutient l' "*hypothèse de l'hygiène*" sont résumées dans la figure 13.

3. Rôle des cellules dendritiques

Dans le poumon, le rôle des DC est de fournir une protection contre les agents infectieux en initiant une réponse Th1, ce qui permettrait d'établir un micro-environnement supprimant le développement de réponses Th2. L'exposition à un allergène alors qu'une réponse Th1 se développe dans le poumon peut potentiellement conduire à une réponse Th1 contre l'allergène ou au moins prévenir le développement d'une réponse Th2 contre cet allergène (Lipscomb et Masten, 2002).

Chez les patients allergiques, le développement de cellules Th2 peut être lié à une production inadéquate d'IL-12 par les CPA. La production d'IL-12 dans des cultures de cellules sanguines de patients souffrant d'asthme allergique ou de dermatite atopique est significativement inférieure comparativement à des sujets sains. Cette diminution de la production d'IL-12 est associée à une diminution de la production d'IFN- γ par les Th et à une augmentation de la quantité de PGE₂

produite par les monocytes. Des DC générées *in vitro* à partir de monocytes de patients allergiques montrent également une capacité réduite à produire de l'IL-12 en réponse à CD40 ligand (Reider *et al.*, 2002). L'atopie serait donc reliée au développement de CPA de type 2, caractérisées par un ratio IL-12/PGE₂ faible, capables d'induire une réponse Th2, et qui seraient polarisées par des signaux micro-environnementaux aberrants. Dans les voies aériennes, les DC sont localisées dans l'épithélium de la trachée, qui sécrète de grandes quantités de GM-CSF et de cytokines inflammatoires lors de la réponse allergique. De même, les cellules de la peau de patients souffrant de dermatite atopique produisent des taux de GM-CSF et d'IL-8 plus élevés que celles de sujets sains. Or, le GM-CSF est connu pour favoriser la survie des DC *in vitro*. Cela expliquerait le nombre élevé de DC qui a été constaté dans l'épithélium de sujets atopiques (Kapsenberg *et al.*, 1999, 2000). Le nombre total de DC pulmonaires est également augmenté dans les bronches et bronchioles des individus asthmatiques, ce qui pourrait représenter un facteur important dans la persistance de l'inflammation allergique chronique. Une fois que les Th2 mémoire spécifiques de l'allergène se retrouvent dans le poumon, la présentation répétée de l'antigène par les DC permet un maintien de la stimulation des cellules Th2 (Moller *et al.*, 1996).

Les IgE, présents en grande quantité dans le sérum ou les lavages broncho-alvéolaires des individus asthmatiques, jouent un rôle important dans la polarisation des DC qui vont propager la réponse Th2 (Masten et Lipscomb, 2000). Les DC sont capables de capturer les antigènes par différentes voies, notamment par l'intermédiaire des récepteurs aux fragments Fc des Ig. Or, les DC humaines expriment les récepteurs aux IgE de haute (FcεRI) et de basse (FcεRII ou CD23) affinité. Les FcεRI exprimés par les DC du sang de patients souffrant de dermatite atopique ou par les DC pulmonaires d'individus asthmatiques sont des structures qui permettent de focaliser les allergènes et de favoriser de manière IgE-dépendante leur capture puis leur présentation aux Th mémoire (Maurer *et al.*, 1997a). Ce mécanisme dépend du taux d'IgE complexés à l'allergène ainsi que du niveau d'expression des FcεRI à la surface des DC. Les IgE peuvent également, de manière indirecte, affecter la polarisation des DC locales en se fixant sur les récepteurs présents à la surface des monocytes ou des macrophages. La fixation des IgE à la surface de monocytes du sang périphérique induit la production de TNF-α, d'IL-1 et de PGE₂ (Borish *et al.*, 1991). PGE₂ agit en synergie avec le TNF-α et l'IL-1 pour induire la maturation des DC, qui expriment alors des taux élevés de molécules de costimulation et de CMH de classe II, mais qui sont incapables de sécréter de l'IL-12 (Kalinski *et al.*, 1998). Lors de l'allergie asthmatique, les IgE fixés aux FcεRI exprimés par les CPA du poumon faciliteraient donc la génération de DC2, soit directement en facilitant la capture des allergènes par les DC, soit indirectement en stimulant la sécrétion de médiateurs par les monocytes ou les

Tableau 12.**Nouvelles stratégies immunothérapeutiques possibles pour les maladies allergiques.****● Ciblage des cellules Th2 spécifiques :**

- Induction de l'anergie des cellules Th2 avec des peptides dérivés de l'allergène
- Réorientation des réponses Th2 spécifiques avec :
 - Allergène associé à des cytokines induisant une réponse Th1
 - Peptides de l'allergène altérés
 - Peptides de l'allergène incorporés dans des micro-organismes recombinants ou des adjuvants
 - Thérapie génique avec de l'ADN plasmidique codant pour un épitope de l'allergène
 - Allergène conjugué avec des ODN appropriés

● Ciblage du développement des cellules Th2 ou de la production des molécules effectrices de la réponse Th2 :

- Blocage sélectif des facteurs de transcription impliqués dans la réponse Th2
- Inhibition de l'IL-4
- Inhibition de l'IL-5
- Inhibition de l'IL-13
- Inhibition des IgE

macrophages alvéolaires. De plus, la capture des allergènes *via* les IgE fixées sur les macrophages alvéolaires peut rendre ces cellules plus efficaces pour stimuler les Th mémoire recrutées au niveau du poumon. En plus de permettre le maintien de la réponse Th2 mémoire dans le poumon, les médiateurs produits par les macrophages ont un effet "bystander" sur l'initiation des réponses Th2 à des antigènes nouveaux : comme les DC capturent ces néoantigènes en présence de TNF- α , IL-1 et PGE₂, elles deviennent des DC matures avec des capacités réduites à produire de l'IL-12 lorsqu'elles présentent les peptides issus des néoantigènes aux lymphocytes T (Masten et Lipscomb, 2000).

Concernant les DC lymphoïdes, décrites comme étant naturellement des DC2, leur nombre est augmenté lors de la réponse allergique, dans le sang périphérique de patients atopiques ainsi que dans la muqueuse nasale de patients atteints de rhinite allergique (Jahnsen *et al.*, 2000). L'augmentation de la quantité de DC2 est corrélée avec des taux élevés d'IgE sériques et d'éosinophiles sanguins. Chez les individus sains, il existe un contrôle négatif du développement de ces DC2 : les cytokines Th2 comme l'IL-4 inhibent la survie des DC lymphoïdes induite par l'IL-3. Or, l'IL-4 n'inhibe pas la survie des DC lymphoïdes de patients allergiques cultivées en présence d'IL-3, et permet même leur développement en absence d'IL-3. Cette réponse altérée à l'IL-4 permet ainsi aux DC lymphoïdes de contribuer à la différenciation Th2 associée aux maladies atopiques (Uchida *et al.*, 2001).

IV – Nouvelles stratégies immunothérapeutiques pour les maladies atopiques

L'élargissement des connaissances dans les mécanismes immunologiques qui gouvernent les maladies allergiques fournit des opportunités pour le développement de nouvelles thérapies immunomodulatrices (Parronchi *et al.*, 1999). Ces approches consistent à cibler les T spécifiques de l'allergène (induction d'une absence de réponse des lymphocytes T ou réorientation des réponses Th2) ou leurs molécules effectrices (inhibition des cytokines Th2 ou thérapies anti-IgE) (Tableau 12).

1. Induction de l'anergie des cellules Th2 spécifiques de l'allergène

Alors que les symptômes des réactions précoces ou tardives de l'allergie peuvent être améliorés par de nombreux traitements pharmacologiques, l'immunothérapie spécifique de l'allergène (SIT) représente la seule approche curative pour les allergies spécifiques de type I. La SIT est la plus efficace dans les allergies au venin d'insectes et dans les rhinites allergiques. Cependant, le mécanisme

par lequel la SIT réalise des améliorations cliniques restait très vague jusqu'à récemment. Une augmentation des IgG neutralisants l'allergène, particulièrement des IgG4, la génération de T CD8⁺ et la réduction du nombre de mastocytes et éosinophiles ainsi que de leurs médiateurs, sont associées à une SIT réussie. La SIT peut également conduire à une diminution de la production d'IL-4 et d'IL-5 par les T CD4⁺, et, dans certains cas, à une production élevée d'IFN- γ . L'induction d'un état anergique des lymphocytes T, lié à une augmentation de la production d'IL-10, et la réactivation de la réponse par les cytokines des tissus environnants sont des étapes intermédiaires importantes dans le mécanisme de la SIT (Akdis et Blaser, 2000).

L'anergie (induction d'un état d'absence de réponse fonctionnelle) des cellules Th2 spécifiques d'un allergène a pu être induite *in vitro* par l'incubation de clones Th2 spécifiques de *Dermatophagoides pteronyssimus* groupe 1 (Derp1) (Fasler *et al.*, 1995) avec des doses élevées de peptides relevant issus de cet allergène. Dans ces conditions expérimentales, les clones T spécifiques de Derp1 perdent leur capacité à répondre à une stimulation avec l'antigène total ou avec des CPA, ainsi que leur capacité à fournir une aide aux lymphocytes B pour la production d'IgE. *In vivo*, chez la souris, l'activation des cellules T spécifiques de l'allergène et la synthèse d'Ig peuvent être inhibées par l'injection de Derp1 ou de certains peptides de Derp1 par voie intranasale, orale ou sous-cutanée (Hoyne *et al.*, 1995). L'immunisation sous-cutanée avec un peptide dominant de l'allergène majeur du chat, *Felix domesticus* groupe 1 (Feld1), conduit à une diminution des réponses T à cet allergène (Briner *et al.*, 1993). Chez l'homme, l'immunothérapie avec un mélange de trois peptides issus de la phospholipase A2 (PLA) semble être protectrice contre le venin d'abeille et résulte de l'induction de la tolérance des cellules T vis à vis de l'antigène PLA total (Muller *et al.*, 1998).

Ces différentes études démontrent la possibilité d'utiliser des peptides induisant l'anergie des lymphocytes T pour traiter les maladies allergiques. L'avantage majeur de cette immunothérapie spécifique est son inoffensivité relative en comparaison avec une thérapie classique utilisant des extraits bruts ou des allergènes natifs purifiés. Cependant, à l'heure actuelle, l'immunothérapie utilisant des extraits bruts complexes semble toujours la plus efficace.

2. Réorientation des réponses Th2 spécifiques de l'allergène

Une autre stratégie pour neutraliser la réponse Th2 est de changer le profil de cytokines produites par les cellules Th. Une sécrétion prédominante de cytokines Th1 en réponse à l'allergène conduirait non seulement au développement de réponses effectrices différentes (production d'IgG et activation des macrophages au lieu de production d'IgE et activation des éosinophiles) mais aussi à l'inhibition des réponses Th2 établies par un phénomène de régulation croisée.

Différentes approches peuvent être envisager afin de réorienter de la réponse immune contre l'allergène (Parronchi *et al.*, 1999) :

- utilisation ou induction de cytokines capables d'induire une réponse Th1 (IFN- γ , IFN- α ou IL-12) ;
- utilisation de peptides modifiés ou altérés (augmentation de l'affinité pour les molécules du CMH, polymérisation, mutations ponctuelles...) ;
- utilisation d'allergènes incorporés dans des microorganismes recombinants (*Mycobacteria*, *Salmonella*) ou des adjuvants appropriés (adjuvant complet de Freund, protéines de l'enveloppe du virus de la grippe, polymannose...) ;
- utilisation d'ADN plasmidique codant pour un épitope de l'allergène (vaccin "ADN nu") ;
- utilisation d'allergènes conjugués à des oligodéoxynucléotides (ODN) contenant des motifs immunostimulants (dinucléotides CpG non méthylés).

3. Ciblage des cellules Th2 ou des molécules effectrices de la réponse Th2

Une stratégie immunothérapeutique potentiellement efficace est l'inhibition des cellules Th2 ou des molécules effectrices produites lors de l'activation des cellules Th2. Cette approche est conceptuellement acceptable puisque les réponses Th2 ne sont probablement pas critiques pour la survie ou la protection. En effet, des souris déficientes en IL-4 qui ne développent pas de réponse Th2 sont mieux protégées que des souris sauvages contre la majorité des infections. Les cellules Th2 restent plus protectrices contre les nématodes gastro-intestinaux (elles ne tuent pas les nématodes mais modifient leur habitat par l'intermédiaire des effets de l'IL-4 sur les fonctions gastro-intestinales) qui ne représentent plus un problème de santé dans les pays développés. De plus, des individus homozygotes pour des délétions impliquant le gène ϵ semblent parfaitement normaux, suggérant qu'au moins l'un des plus importants mécanismes dépendant de l'IL-4, la production d'IgE, n'est pas critique.

Le ciblage des cellules Th2 ou des molécules effectrices de la réponse Th2 peut être réalisé par différents mécanismes (Parronchi *et al.*, 1999) :

- blocage des facteurs de transcription associés aux cellules Th2 (oncogène *c-maf*, STAT6) ;
- inhibition de l'IL-4 (récepteurs solubles à l'IL-4, protéine IL-4 mutée) ;
- inhibition de l'IL-5 (Ac humanisés anti-IL-5, inhibiteurs spécifiques de la transcription du gène de l'IL-5) ;
- inhibition des IgE (Ac humanisés anti-IgE "intelligents", qui réagissent contre les IgE solubles ou membranaires des lymphocytes B, mais pas contre les IgE fixés aux mastocytes ou

basophiles). Des études précliniques de la thérapie anti-IgE apparaissent satisfaisantes et les études cliniques semblent prometteuses (Babu *et al.*, 2001).

V – Conclusion

Les réponses Th2 représentent une protection contre les nématodes gastro-intestinaux, et permettent la régulation des réponses Th1 chroniques ou excessives. Depuis quelques années, il est devenu évident que les cellules Th2 spécifiques d'un allergène jouent un rôle crucial dans le recrutement et l'activation des lymphocytes B producteurs d'IgE, des mastocytes et des éosinophiles, cellules largement impliquées dans l'inflammation allergique.

Le développement préférentiel de cellules Th2 en réponse à des allergènes chez les individus atopiques serait déterminé par la nature et l'intensité du signal issu de l'interaction TCR / peptide allergique, ainsi que par la régulation altérée de la production d'IL-4, qui semble être contrôlée par des facteurs génétiques et environnementaux. De nombreux auteurs suggèrent que l'augmentation croissante des allergies serait liée à une forte diminution des infections bactériennes ou virales pendant l'enfance (Erb, 1999 ; Herz *et al.*, 2000). D'autres études mettent en valeur le rôle des CPA dans la polarisation Th2 associée aux maladies atopiques (Kalinski *et al.*, 1999 ; Kapsenberg *et al.*, 1999, 2000). En effet, les CPA et notamment les DC fournissent les signaux essentiels à l'activation et à la différenciation des lymphocytes Th naïfs : le premier signal est fourni par l'interaction TCR/peptide, le second par les molécules de costimulation et le troisième par des médiateurs solubles produits par les CPA. Une variabilité dans ces signaux conduit à une polarisation Th1 ou Th2. Le troisième signal, dont la composante majeure est l'IL-12, est crucial pour l'induction de cette différenciation. Les DC qui produisent de grandes quantités d'IL-12 lors du contact avec les Th ont été appelées DC1 et favorisent une réponse Th1, alors que les DC2 présentent une incapacité à produire des quantités suffisantes d'IL-12 et permettent le développement de cellules Th2. La polarisation des Th est donc associée à une polarisation des DC, qui est elle-même liée aux facteurs présents dans leur environnement au moment de l'induction de la maturation, dont les principaux décrits sont l'IFN- γ (DC1) et la PGE₂ (DC2).

L'hypothèse Th2 dans l'allergie permet aujourd'hui d'envisager le développement de nouvelles stratégies immunothérapeutiques, qui consistent à cibler les T spécifiques de l'allergène (induction d'une anergie ou réorientation des réponses Th2) ou les molécules effectrices (inhibition des cytokines Th2 ou thérapies anti-IgE) (Parronchi *et al.*, 1999).

CHAPITRE 3 : PHARMACOLOGIE ET PROPRIETES

IMMUNOREGULATRICES DE L'HISTAMINE

L'histamine est le principal médiateur impliqué dans la physiopathologie de l'allergie. Elle exerce la majorité de ces effets lors de la phase immédiate de la réponse allergique, à savoir : vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, contraction des muscles lisses bronchiques et intestinaux, augmentation de la production de mucus. L'histamine possède également des propriétés immunorégulatrices, puisqu'elle influence l'expression et l'action de nombreuses cytokines. Elle agit sur de nombreux types cellulaires, comme les cellules musculaires, les cellules endothéliales, les neurones ou les cellules du système immunitaire. L'identification de récepteurs distincts impliqués dans la transduction du signal fourni par l'histamine a permis le développement de différents types d'antihistaminiques utilisés dans le traitement des maladies allergiques.

I – Synthèse, stockage et sécrétion de l'histamine

Chimiquement, l'histamine (β -imidazolyléthylamine) est synthétisée dans l'appareil de Golgi des mastocytes et basophiles par décarboxylation de la L-histidine, sous l'action de l'histidine décarboxylase (HDC), enzyme spécifique et inductible dont l'activité est inhibée par la tritoqualine (Figure 14).

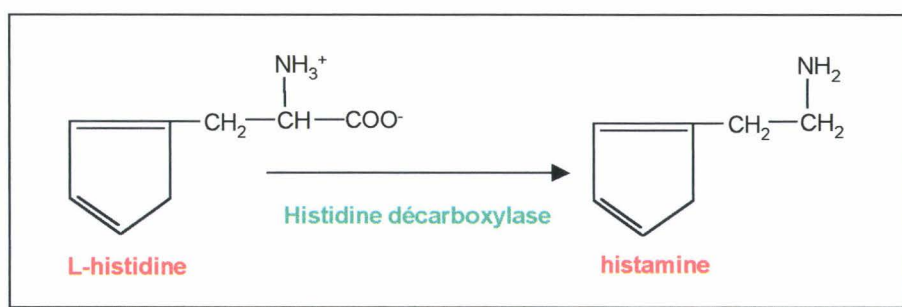


Figure 14. Synthèse de la molécule d'histamine.

L'histamine est ensuite stockée dans les granules à pH acide, associée par liaison ionique avec les groupes carboxyliques des protéines et protéoglycanes (héparine). La quantité d'histamine stockée

dans les mastocytes isolés du poumon, de la peau, des tissus lymphoïdes ou de l'intestin grêle, est de l'ordre de 3 à 15 picogrammes par cellule.

Lors de la dégranulation IgE-dépendante ou IgE-indépendante (asthme de l'effort, effets de molécules comme des composés polybasiques, des peptides, des cytokines, des anaphylatoxines, des dextrans), l'histamine se dissocie du complexe protéique par échange de cation avec le sodium extracellulaire à pH neutre, puis diffuse très rapidement dans les tissus environnants. Elle apparaît dans le sang en 2 minutes et demie, un pic sanguin est observé à 5 minutes et revient à la normale en 30 minutes environ.

Les activités biologiques de l'histamine chez l'homme dépendent de sa concentration plasmatique :

- de 0 à 1 ng/ml : aucun effet
- de 1 à 2 ng/ml : augmentation de la sécrétion d'acide gastrique
- de 3 à 5 ng/ml : tachycardie, réactions au niveau de la peau
- de 6 à 8 ng/ml : diminution de la pression artérielle
- de 7 à 12 ng/ml : broncho-spasmes
- autour de 100 ng/ml : arrêt cardiaque.

Le corps métabolise rapidement l'histamine, atténuant les effets de la crise allergique. Environ 2 à 3% de l'histamine sont excrétés inchangés dans les urines. Le reste est métabolisé selon 2 voies principales : 50 à 70% sont transformés en N-méthyl-histamine par une N-méthyl-transférase, et les 30 à 40% restant en acide imidazole-acétique par une diamine-oxydase (histaminase).

L'histamine est produite par des cellules autres que les mastocytes et les basophiles :

- les cellules gastriques (Hakanson et Sundler, 1991) : au niveau de la muqueuse gastrique l'histamine, alors impliquée dans le contrôle de la sécrétion d'acide gastrique, est stockée au niveau des cellules ECL (*enterochromaffin like*). Elle est relarguée rapidement après stimulation par divers facteurs neurohormonaux, comme la gastrine et l'acétylcholine. Sa synthèse est inhibée par la somatostatine.
- les neurones : dans le cerveau, l'histamine est produite par les neurones histaminergiques et joue un rôle de neuromédiateur, impliqué dans de nombreuses réponses cognitives (Brown *et al.*, 2001).
- les macrophages et les cellules dendritiques : chez la souris, les macrophages (péritonéaux ou dérivés de moelle osseuse) produisent de l'histamine lorsqu'ils sont activés par du LPS (augmentation de la synthèse de l'HDC), et l'IL-3 et le GM-CSF augmentent cette production (Takamatsu *et al.*, 1996). L'histamine serait alors impliquée dans la régulation de l'immunocompétence lors d'infections

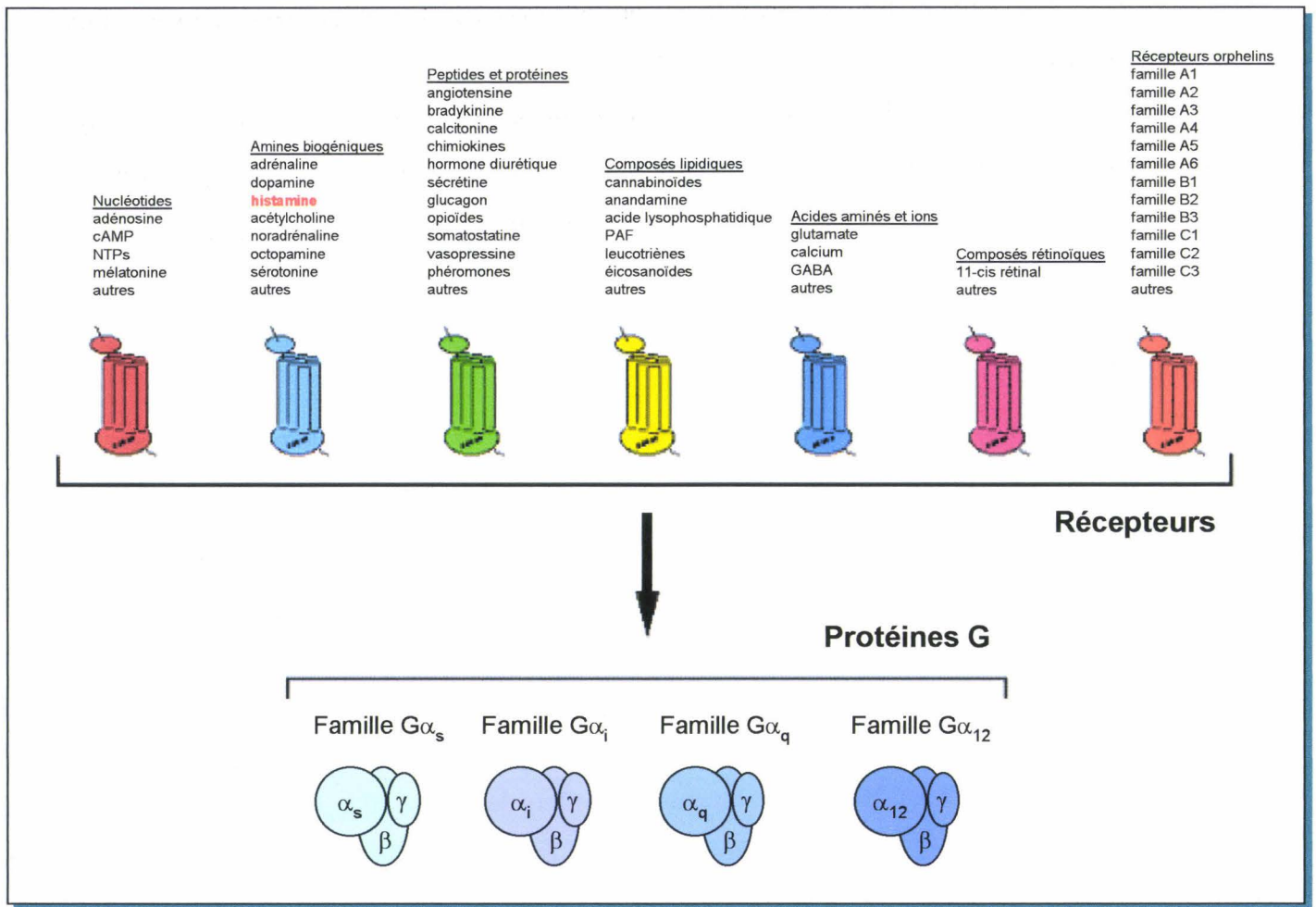


Figure 15. Famille des récepteurs couplés aux protéines G.

microbiennes. Chez l'homme, les monocytes contiennent de l'HDC, dont la synthèse augmente lors de la différenciation *in vitro* en macrophages (Laszlo *et al.*, 1999) ou en cellules dendritiques (Szeberenyi *et al.*, 2001). L'inhibition de la synthèse d'histamine et le blocage de ses récepteurs altère la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, suggérant une relevance fonctionnelle et une action autocrine et paracrine de l'histamine endogène produite lors de la différenciation.

- les lymphocytes T : l'activité HDC et la production d'histamine par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ murins augmentent en présence de concanavaline A. La production d'histamine induite par la concanavaline A est augmentée en présence d'IL-3, de GM-CSF ou d'IL-1 β (Aoi *et al.*, 1989 ; Kubo *et al.*, 1999).

- les précurseurs hématopoïétiques : l'IL-3 et le GM-CSF induisent la synthèse de l'HDC et la production d'histamine par les cellules hématopoïétiques murines issues de moelle osseuse (Dy et Schneider, 1991). *In vivo*, quelques heures après injection de LPS, l'activité HDC est induite dans le foie, la rate et la moelle osseuse (Endo *et al.*, 1992). Chez l'homme, l'IL-3 induit également la synthèse d'histamine dans le système hématopoïétique : moelle osseuse, foie fœtal, cellules du sang de cordon ombilical (Minkowski *et al.*, 1990 ; Arock *et al.*, 1991). Ces données suggèrent une implication de l'histamine dans l'hématopoïèse.

Au niveau du mastocyte, le turn-over de l'histamine est lent : après déplétion, il faut plusieurs semaines pour le retour au niveau initial. Dans la cellule gastrique et le système nerveux, le renouvellement de l'histamine est plus rapide car elle est libérée en continu.

II – Récepteurs de l'histamine

Les récepteurs de l'histamine sont tous de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (Figure 15). Ils possèdent 7 domaines transmembranaires (hélices α), une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C terminale intracellulaire de longueur variable. La fixation d'un ligand à ces récepteurs induit la stimulation de la sous-unité α de la protéine G hétérotrimérique qui relargue du GDP et fixe du GTP à la place. La sous-unité α se dissocie alors du dimère composé des sous-unités β et γ de la protéine G. Les sous-unités α qui fixent et hydrolysent le GTP sont divisées en 4 sous-familles : $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$ (Neer, 1996). Quatre récepteurs de l'histamine ont été identifiés, chacun induisant une voie de transduction du signal différente.

Human Histamine receptors1-4 sequence alignment

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
H3      MERAPPDGPLNASGALAGDAAAAGGARGFSAAWTAVLAALMALLIVATVLGNALVMLAFV
H4      -----MPDTNSTINLSLSTRVTLAFFMSLVAFAIMLGNALVLILAFV
H1      -----MSLPNSSCLLEDKMCEGNKTMASPQLMPLVVLSTICLVTVGLNLLVLVAVR
H2      -----MAPNGTASSCLDSTACKITITVVLVAVLILITVAGNVVVCLAVG
          ..      :      :      :      :      :      :      :      *      *      *
          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
H3      ADSSLRTQNFFLNLAISDFLVGAFCIPLYVPVLTGRWTFGRGLCKLWLVVDYLLCTS
H4      VDKNLRHRSSYFFLNLAISDFFVGVISIPLYIPHTLF-EWDFGKEICVFWLTTDYLLCTA
H1      SERKLHTVGNLYIVSLSVADLIVGAVMPMNIYLLMSKWSLGRPLCLFWLSMDYVASTA
H2      LNRLRNLTNCFIVSLAITDLLLGLLVLPFSAIYQLSCKWSFGKVFCNIYTSDVMLCTA
          :      *      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
H3      SAFNIVLISYDRFLSVTRAVSYRAQQDTRRAVRKMLLVWVLAFLLYGPAILSWEYLSGG
H4      SVYNIVLISYDRYLSVSNAVSYRTQHTGVLKIVTLMVVWVLAFLVNGPMILVSESWKDE
H1      SIFSVILCIDRYRSVQPLRYLKYRTKTR-ASATILGAWFLSFLWVIPILGWNHFMQQT
H2      SILNLFMISLDRYCAVMDPLRYPVLVTPVR-VAISLVLIWVISITLSFLSIHLGWNSRNE
          *      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :      :
          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
H3      SSIP-EGHCYAEFFYNWYFLITASTLEFFTPFLSVTFFNLSIYLNIQRTRLRLDGAREA
H4      GSE-----CEPGFFSEWYILAITSFLEFVIPVILVAYFNMNIYWSLWKRDRL-----
H1      SVRR-EDKCETDFYDVTWFKVMTAIINFYLPTLLMLWFYAKIYKAVRQCHCHRELINRSL
H2      TSKGNHTTSKCKVQVNEVYGLVDGLVTFYLPLLIMCITYYRIFKVARDQAKR-----
          .      .      .      *      *      *      :      :      :      :
          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
H3      AGPEPPPEAQPSPPPPPGCWGCWQKGHGEAMPLHRYGVGEAAVGAEAGEATLGG-----
H4      -----SRCQSHPG-----LTAVSSNICGHSFRGLSRRSLS-----
H1      PSFSEIKLRPENPKGDAKKPGKESPWEVLKRKPKDAGGGSVLKSPSQTPKEMKSPVFSQ
H2      -----IN-----HISSWKAATIREHKATVTLAAVMG-----
          .      :
          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
H3      -----GGGGSVASPTSSSGSSSRGTERPRSLKRGSKPSASASL
H4      -----ASTEVPASFHSERR---RKSSLMFSSRTKMNSNTI
H1      EDDREVDKLYCFPLDIVHMQAAAEGSSRDYVAVNRSHGLKTDEQLNTHGASEISEDQM
H2      -----AFIICWFPYFTAFVY---RGLRGDDAINEVLEAI
          .      *      .      .      :
          370     380     390     400     410     420
          |      |      |      |      |      |
H3      EKRMKMVSQS-----F--TQRFRLSRDR
H4      ASKMGSFSQSD-----SVALHQREHVELLRAR
H1      LGDSQSFSRTDSDTTTETAPGKGKLRSGSNTGLDYIKFTWKLRLRSHSRQYVSGLHMNRRER
H2      VLWLGYANSA-----LNPILYAALNRDF
          .      :      :
          430     440     450     460     470     480
          |      |      |      |      |      |
H3      KVAKSLVAIVSIFGLCWAPYTLLMIIRAACHGHCVP-DYWYETSFWLLWANSAVNPVLYP
H4      RLAKSLAILLGVFAVCWAPYSLFTIVLSFYSSATGPKSVWYRIAFWLQWFNSFVNPLLYP
H1      KAAQLGFIMAAFILCWIPYFIFFMVIAFCKNCCNE--HLHMFTIWLGYINSTLNPLIYP
H2      RTGYQQLFCCRLANRNSHKTSLRSNASQLSRTQSREPROQEEKPLKIQVWSGTEVTAPQG
          :      .      .      :      *      .      .
          490     500     510
          |      |      |
H3      LCHHSFRAFTKLLCPQLKIQPHSSLEHCWK
H4      LCHKRFQKAFLKIFCIKKQPLSQHSRSVSS-
H1      LCNENEFKKTFKRILHIRS-----
H2      ATDR-----
          .
    
```

Alignment data :

```

Alignment length : 512
Identity (*) : 26 is 5.08 %
Strongly similar (:) : 53 is 10.35 %
Weakly similar (.) : 37 is 7.23 %
Different : 396 is 77.34 %

Sequence 0001 : H3 ( 445 residues).
Sequence 0002 : H4 ( 390 residues).
Sequence 0003 : H1 ( 487 residues).
Sequence 0004 : H2 ( 359 residues).
    
```


La pharmacologie, la fonction et la distribution des récepteurs H1, H2 et H3 ont été largement décrites (Hill *et al.*, 1997), alors que le récepteur H4 vient juste d'être identifié génétiquement sur la base de son homologie avec le récepteur H3 (Hough *et al.*, 2001). L'alignement des séquences protéiques correspondant à ces 4 récepteurs de l'histamine chez l'homme est représenté page ci-contre.

1. Historique

Dès 1910, Dale et Laidlaw ont décrit un fort effet contractile de l'histamine sur les muscles lisses. Les effets de l'histamine sont proches des manifestations initiales du choc anaphylactique, conduisant à un intérêt grandissant concernant les effets de l'histamine dans des conditions allergiques. La recherche de drogues capables de contrecarrer les effets de l'histamine dans l'allergie a donc débuté. Bovet et Staub en 1937 ont été les premiers à synthétiser un antagoniste de l'histamine, le mépyramine, et depuis de nombreux produits puissants et sélectifs ont été synthétisés et utilisés pour classifier les réponses de l'histamine dans différents tissus. Ces antihistaminiques étaient efficaces contre les actions de l'histamine sur les muscles lisses des vaisseaux, des intestins et des voies aériennes, mais inefficaces contre les effets de l'histamine au niveau du cœur et de la sécrétion d'acide gastrique. Ces observations ont conduit Ash et Schild en 1966 à suggérer l'existence de deux classes de récepteurs de l'histamine. Cette classification a été définitivement acceptée en 1972 lorsqu'en étudiant les effets pharmacologiques de nombreux analogues de l'histamine, Black *et al.* ont découvert le premier antagoniste sélectif des récepteurs H2, le burimamide. Cette molécule est capable de bloquer les actions de l'histamine sur l'estomac de manière plus efficace que les effets sur les muscles lisses intestinaux, ainsi que de réduire la sécrétion d'acide gastrique chez le chien et l'homme, ce qui a conduit au développement de médicaments anti-ulcéreux très efficaces (cimétidine, ranitidine, famotidine, nizatidine...). Ce sont ces mêmes ligands des récepteurs H2 qui ont permis à Arrang *et al.* en 1983 de définir pharmacologiquement les récepteurs H3 sur des coupes de cortex cérébral de rat. Dans les années suivantes de nombreux agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs H3 ont été identifiés et certaines de ces molécules sont actuellement évaluées pour leur potentiel thérapeutique.

Ce n'est qu'en 1991 que Yamashita *et al.* et Gantz *et al.* ont cloné les récepteurs H1 et H2 et ont démontré leur appartenance à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Le récepteur H3 n'a été cloné qu'en 1999, par Lovenberg *et al.*

La distribution, la fonction principale ainsi que les principaux agonistes et antagonistes des récepteurs de l'histamine sont résumés dans le tableau 13.

Tableau 13. Localisation, fonctions et principaux agonistes et antagonistes des récepteurs de l'histamine.

Récepteur	Localisation	Fonctions	Agonistes	Antagonistes
H1	<ul style="list-style-type: none"> - muscles lisses - cellules endothéliales - médullo-surrénales - cœur - système nerveux central - cellules immunitaires 	<ul style="list-style-type: none"> - contraction des muscles lisses - contraction des cellules endothéliales - vasodilatation - augmentation de la perméabilité vasculaire - stimulation de la sécrétion hormonale - dépolarisation des neurones - ralentissement de la conduction auriculoventriculaire - stimulation des nerfs sensoriels (démangeaisons) - stimulation de la formation de NO - augmentation de la vigilance - diminution de l'appétit - mobilisation du Ca⁺⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> - histamine - 2-[3-(trifluorométhyl)-phényl] histamine - 2-thiazolyléthylamine - 2-méthylhistamine - 2-(3-bromophényl) histamine - histamine trifluorométhyl-toluidide dimaléate (HTMT) 	<ul style="list-style-type: none"> - mépyramine - chlorphéniramine - triprolidine - témélastine - diphenhydramine - prométhazine - loratadine - cétirizine - astémizole - cabastine - clozapine (neuroleptique)
H2	<ul style="list-style-type: none"> - cellules pariétales gastriques - muscles lisses vasculaires - cellules endothéliales - système nerveux central - cœur - cellules immunitaires 	<ul style="list-style-type: none"> - stimulation de la sécrétion d'acide gastrique - relâchement des muscles lisses - stimulation cardiaque (effets chronotropes et inotropes positifs) - hyperpolarisation cellulaire - effets immunorégulateurs - stimulation de l'adénylyl cyclase 	<ul style="list-style-type: none"> - histamine - amthamine - dimaprit - impromidine* - arpromidine* 	<ul style="list-style-type: none"> - cimétidine - ranitidine - tiotidine - zolantidine - famotidine - burimamide*
H3	<ul style="list-style-type: none"> - système nerveux central - nerfs périphériques (cœur, poumon, tractus gastro-intestinal) - cellules endothéliales - cellules entérochromaffines - macrophages alvéolaires 	<ul style="list-style-type: none"> - inhibition de la sécrétion des neurotransmetteurs - contrôle de la synthèse et de la libération d'histamine au niveau du cerveau et du poumon 	<ul style="list-style-type: none"> - histamine - R-α-méthylhistamine - imetit - immepip - SKF91606 - BP2-94 - FUB307 	<ul style="list-style-type: none"> - thiopéramide - clobenpropit - iodophenpropit - iodoproxylan - impentamine - GT2016 - GT2227 - GR175737 - FUB181
H4	<ul style="list-style-type: none"> - moelle osseuse - éosinophiles et neutrophiles - rate - intestin grêle - hippocampe (souris) 	<p><i>Non identifiées (hématopoïèse ?)</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - histamine - R-α-méthylhistamine (faible) - burimamide (effet partiel) - clobenpropit (effet partiel) - clozapine (neuroleptique) 	<ul style="list-style-type: none"> - thiopéramide

* antagonistes H3

2. Le récepteur H1

Structure

L'ADNc codant pour le récepteur H1 bovin a été utilisé comme sonde afin de cloner le gène du récepteur H1 humain (De Backer *et al.*, 1993). Ce gène ne contient pas d'introns et se situe sur le chromosome 3 (3p14-p21). Il code pour une protéine de 487 acides aminés d'un poids moléculaire moyen calculé de 55,7 kDa. La structure déduite du récepteur H1 montre une queue C-terminale relativement courte et une très grande troisième boucle intracellulaire, qui contient de nombreux résidus sérine et thréonine probablement impliqués dans la régulation complexe du récepteur (sites potentiels de phosphorylation). La partie N-terminale contient de nombreux sites de glycosylation.

La séquence des protéines H1 des différentes espèces est très conservée au niveau des domaines intracellulaires (environ 90% d'homologie) mais diffère très fortement dans la longue boucle intracellulaire et la queue N-terminale. Dans le troisième domaine transmembranaire, un résidu aspartate fortement conservé représente probablement le site de fixation de l'histamine. Les résidus thréonine ou asparagine contenus dans le cinquième domaine transmembranaire lient la partie imidazole de l'histamine.

Signalisation transmembranaire

Le récepteur H1 est un récepteur mobilisant le Ca^{++} (Smit *et al.*, 1999) (Figure 16). Son activation est associée à l'hydrolyse de phospholipides membranaires catalysée par la phospholipase C. La stimulation du récepteur conduit à l'hydrolyse du phosphatidyl 4,5 biphosphate, résultant dans la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et de 1,2-diacylglycérol (DAG). L' IP_3 est connu pour mobiliser le Ca^{++} contenu dans des réserves intracellulaires, alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC). Un influx de Ca^{++} extracellulaire provoque une seconde élévation du Ca^{++} intracellulaire. Le mécanisme impliqué dans la stimulation de cet influx reste méconnu.

L'hydrolyse des phospholipides liée à l'activation du récepteur H1 est dépendante de la présence de guanines, indiquant l'implication d'une protéine G. Cette protéine G associée au récepteur H1 est insensible à la toxine de *pertussis* et appartiendrait à la famille $G\alpha_q$.

En plus de l'activation de la phospholipase C, l'élévation du Ca^{++} intracellulaire par l'histamine stimule d'autres activités enzymatiques :

- stimulation de la NO-synthase responsable de la production d'oxyde nitrique (NO) : le NO induit par l'histamine provoque entre autres le relâchement de l'endothélium dans des préparations vasculaires, ainsi que la production de GMP cyclique dans de nombreuses préparations cardiaques ou issues des voies aériennes ;

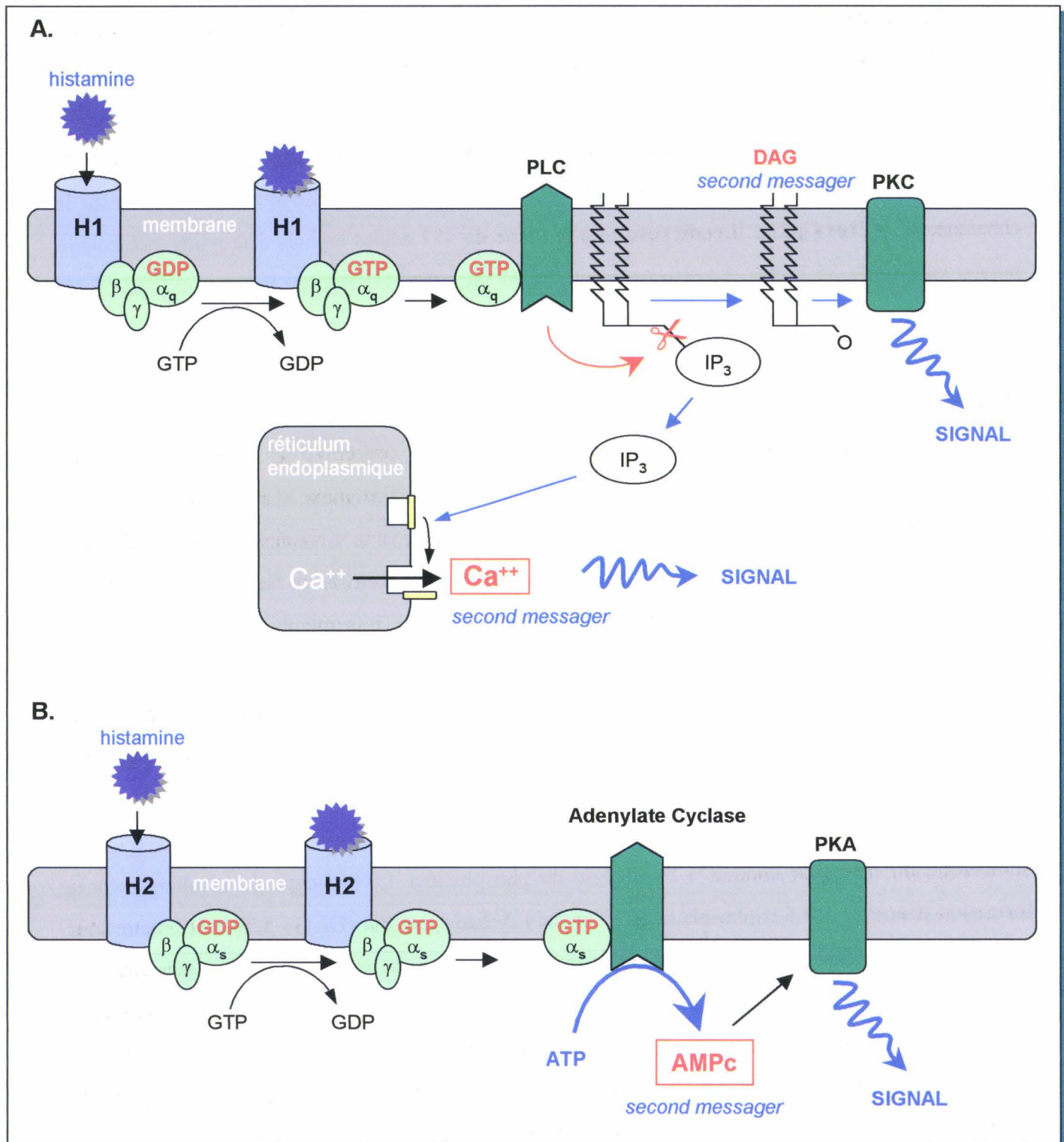


Figure 16. Transduction du signal après fixation de l'histamine sur les récepteurs H1 et H2.

- A. La stimulation du récepteur H1 conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la protéine $G\alpha_q$. La PLC clive le phosphatidyl-biphosphate en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP_3). Le DAG active la protéine kinase C alors que l' IP_3 provoque la libération du Ca^{++} contenu dans les réserves intracellulaires.
- B. La stimulation du récepteur H2 conduit à l'activation de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine $G\alpha_s$. Il s'en suit une accumulation intracellulaire d'AMP cyclique qui est à l'origine de nombreuses réponses cellulaires et active la protéine kinase A.

- génération de métabolites de l'acide arachidonique, la prostacycline et le thromboxane A₂, produits par l'endothélium vasculaire. L'acide arachidonique est libéré à partir des phospholipides membranaires après activation de la phospholipase A₂ ;
- activation de la phospholipase D (cortex cérébral et hippocampe du rat) qui conduit à la production d'acide phosphatidique, une autre source de DAG ;
- implication indirecte dans la régulation des taux d'AMPc.

3. Le récepteur H2

Structure

Le gène du récepteur H2 humain, situé sur le chromosome 5 et cloné en 1991 par Gantz *et al.*, code pour une protéine de 359 acides aminés d'un poids moléculaire moyen calculé de 40,1 kDa présentant toutes les caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G. La différence principale avec le récepteur H1 est l'existence d'une longue queue C-terminale et d'une troisième boucle intracellulaire beaucoup plus courte. La partie N-terminale contient de nombreux sites de glycosylation, et comme pour le récepteur H1, les résidus aspartate du domaine transmembranaire 3 et les résidus aspartate et thréonine du domaine transmembranaire 5 sont impliqués dans la fixation de l'histamine. Dans la seconde boucle intracellulaire, un résidu leucine semble être nécessaire au couplage aux protéines G.

Signalisation transmembranaire

Le récepteur H2 est couplé au système de l'adénylate cyclase (Del Valle et Gantz, 1997) (Figure 16). L'activation du récepteur H2 conduit à l'activation de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire des protéines G_s et induit ainsi une augmentation intracellulaire de l'AMPc, un second messager impliqué dans de nombreuses réponses cellulaires, notamment dans la modulation de l'activité du système immunitaire (Zidek, 1999). Il est également suggéré que l'adénylate cyclase soit activée par la méthylation des phospholipides membranaires lors de la stimulation du récepteur H2.

Le récepteur H2 semble également associé à d'autres systèmes de signalisation. Par exemple, dans les cellules pariétales gastriques, la stimulation du récepteur H2 augmente la concentration cellulaire en Ca⁺⁺. Une réponse calcique similaire en réponse à l'histamine a également été observée après stimulation de cellules de la lignée HL-60 et de cellules dérivées d'un hépatome transfectées avec le récepteur H2 canin. Dans ces dernières, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca⁺⁺ était accompagnée par une accumulation d'IP₃ et d'AMPc (Del Valle *et al.*, 1992). Dans les cellules pariétales, les récepteurs H2 induisent la libération du Ca⁺⁺ des réserves intracellulaires. Cependant,

aucun effet des agonistes H2 n'a été observé sur l'accumulation d'IP₃ ou la concentration en Ca⁺⁺ dans des cellules CHO transfectées avec le récepteur H2 humain (Leurs *et al.*, 1994).

Plusieurs hypothèses peuvent alors être envisagées concernant la transduction du signal par le récepteur H2 :

- l'histamine agit sur différentes sous-classes de récepteurs H2, chacune étant liée à des voies de signalisation différentes ;
- l'histamine agit sur une seule classe de récepteur H2, associée à différentes classes de protéines G conduisant indépendamment aux deux voies de signalisation ;
- l'histamine agit sur une seule classe de récepteur H2, associée à un seul type de protéine G capable de conduire le signal par deux voies de signalisation différentes.

Diverses expériences confirmeraient l'existence d'une seule classe de récepteur H2 couplé directement aux deux voies de signalisation. Le récepteur H2 semble être couplé à des protéines G différentes. Si l'accumulation d'AMPc intracellulaire est associée à l'activation de protéines G α_s , le type de protéine G impliqué dans l'augmentation du Ca⁺⁺ reste à déterminer, bien qu'une participation de protéines G α_q ne soit pas exclue (Del Valle et Gantz, 1997).

4. Le récepteur H3

Bien que son existence ait été démontrée depuis 1983, le gène codant pour le récepteur H3, situé sur le chromosome 20, n'a pu être cloné qu'en 1999 par Lovenberg *et al.* Le récepteur H3 est une protéine de 445 acides aminés de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. L'existence de différentes sous-classes de récepteurs H3 semble probable d'après de nombreux auteurs. Des études moléculaires récentes montrent que le gène du récepteur H3 donne naissance à de multiples ARNm par épissage alternatif, nommés H3_A, H3_B et H3_C chez le rat (Drutel *et al.*, 2001) et H3_L, H3_S chez le cobaye (Tardivel-Lacombe *et al.*, 2000). Les variants diffèrent dans la structure de la troisième boucle. De tels variants n'ont pas été identifiés chez l'homme, bien que l'existence de plusieurs isoformes a été récemment reportée (Willendorf *et al.*, 2000).

Principalement exprimé dans le cerveau, le récepteur H3 a initialement été décrit comme étant un autorécepteur présynaptique qui contrôle la libération d'histamine par les neurones histaminergiques. Au niveau du tractus respiratoire, les récepteurs H3 inhibent la libération d'acétylcholine (nerf vague) et de neuropeptides (nerfs sensoriels). La signalisation trans-membranaire induite par le récepteur H3 est mal connue. Les cellules transfectées par le récepteur H3 sont cependant capables d'inhiber l'adénylate cyclase en réponse à l'histamine, et diverses expériences suggèrent l'association à des protéines G de type G α_i ou G α_o .

5. Le récepteur H4

Les analyses phylogénétiques et d'homologie de séquence montrent que le récepteur H3 est différent des récepteurs H1 et H2, et que son homologie avec tout autre récepteur couplé aux protéines G n'est que de 31% (Leurs *et al.*, 2000). La recherche de nouveaux récepteurs apparentés au récepteur H3 a alors été entreprise par différentes équipes et a permis le clonage d'un nouveau récepteur de l'histamine, appelé H4 (Oda *et al.*, 2000 ; Nakamura *et al.*, 2000 ; Morse *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2001), dont le gène est situé sur le chromosome 18. Ce récepteur est une protéine 390 acides aminés présentant 37 à 43% d'homologie avec le récepteur H3 (58% dans les régions transmembranaires). Les récepteurs H3 et H4 ont des structures génomiques très similaires, avec deux introns et trois exons. Le récepteur H4 semble également être couplé aux protéines $G\alpha_{i/o}$ et inhibe la formation d'AMPc induite par la forskoline (Zhu *et al.*, 2001). Cependant, la distribution du récepteur H4 semble être différente de celle du récepteur H3, puisqu'il est principalement exprimé dans la moelle osseuse et par les leucocytes (en particulier les éosinophiles et neutrophiles), avec des niveaux d'expression modérés dans la rate et l'intestin grêle. Le récepteur H4 serait également exprimé par les mastocytes (Zhu *et al.*, 2001). Des études préliminaires d'expression montrent l'absence de H4 dans le système nerveux central (Oda *et al.*, 2000 ; Morse *et al.*, 2001 ; Nguyen *et al.*, 2001), mais une localisation dans le cerveau a été reportée chez la souris et dans des échantillons humains (Liu *et al.*, 2001).

Pour l'instant, son activité biologique est inconnue, mais sa distribution notamment au niveau de la moelle osseuse suggère un rôle dans l'hématopoïèse.

6. Régulation de la fonction des récepteurs de l'histamine

Les réponses cellulaires aux agonistes des récepteurs couplés aux protéines G sont rapidement atténuées. Le retrait du ligand du fluide extracellulaire, la désensibilisation, l'endocytose et la diminution de l'expression du récepteur sont les mécanismes impliqués dans l'atténuation du signal (Grady *et al.*, 1997). Un composant essentiel de la désensibilisation, qui a lieu dans les secondes ou minutes qui suivent l'activation du récepteur, est la phosphorylation du récepteur activé qui entraîne sa séparation des protéines G. Cette phosphorylation fait intervenir différents types de kinases, comme les GRK (*G protein-coupled receptor kinase*) et les protéines kinases A et C. L'endocytose des récepteurs induite par les agonistes contribue à la désensibilisation en éliminant de la surface cellulaire les récepteurs de haute affinité. La diminution de l'expression des récepteurs (diminution de

Tableau 14. Effet de l'histamine sur la production de cytokines.

A. Stimulation			
<i>cytokine</i>	<i>espèce</i>	<i>cellule</i>	<i>récepteur</i>
IL-10	homme	sang total	H2
	homme	macrophages alvéolaires	H2, H3
	souris	cellules Th2 et splénocytes	H1, H2
IFN- γ	homme	PBMC	H2
	homme	cellules Th1	H1
IL-2	homme	PBMC	H2
	souris	cellules Th	H2
	souris	splénocytes	H2
IL-5	homme	PBMC	H2
	homme	cellules Th2	H2
	souris	lignée Th2	
IL-13	souris	cellules Th2	H1, H2
IL-1	homme	PBMC	H2
	souris	moelle osseuse	H2
	souris	macrophages péritonéaux	H1, H2
IL-18	homme	PBMC	H2
IL-6	homme	HCAEC	H1
	homme	macrophages pulmonaires	H1
	homme	kératinocytes	H1
	homme	CVEC	H1
	homme	PBMC	H1, H2
	homme	HUVEC	H1, H2
	homme	astrocytes	
IL-11	homme	fibroblastes pulmonaires	H1
IL-8	homme	BEC	H1
	homme	CVEC	H1
	homme	CREC	H1
	homme	NEC	
	homme	HCAEC	H1
	homme	HUVEC	H1, H2
IL-16	homme	cellules épithéliales	
	homme	lymphocytes T CD8 ⁺	
RANTES	homme	BEC	
	homme	NEC	H1
GM-CSF	homme	PBMC	H1, H2
	homme	BEC	H1
	homme	CVEC	H1
	homme	CREC	H1

la synthèse et augmentation de la dégradation) est également une forme de désensibilisation qui se déroule lors d'une exposition longue et continue des cellules aux agonistes.

L'histamine est un médiateur libéré lors de la réponse inflammatoire, conduisant à une forte augmentation instantanée de sa concentration extracellulaire. La désensibilisation de ses récepteurs permet alors de prévenir les dommages causés par une stimulation excessive. Cependant, dans les tissus où l'histamine est essentielle pour un fonctionnement normal, la désensibilisation des récepteurs doit être réduite. Toutes les molécules impliquées dans le phénomène de désensibilisation représentent ainsi des cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques.

Les séquences primaires des récepteurs H1 et H2 révèlent l'existence de nombreux résidus sérine et thréonine, qui représentent des sites potentiels de phosphorylation pouvant être impliqués dans la désensibilisation. Alors que la désensibilisation du récepteur H1 a été largement décrite *in vitro* et *in vivo* (Leurs *et al.*, 1995), moins d'informations sont disponibles concernant les mécanismes impliqués dans celle du récepteur H2. La désensibilisation du récepteur H2 a cependant été illustrée par des expériences sur des cellules transfectées (Fukushima *et al.*, 1996 ; Shayo *et al.*, 2001), sur les lignées promyélocyaires HL-60 (Sawutz *et al.*, 1984) et U937 (Lemos Legnazzi *et al.*, 2000), sur les lignées HGT-1 (Prost *et al.*, 1984) et MKN-45 (Nakata *et al.*, 1996) issues de carcinomes gastriques, ainsi que sur des monocytes issus du sang périphérique (Coffey *et al.*, 1990).

III – Propriétés immunorégulatrices de l'histamine

En plus de son implication largement documentée dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, l'histamine possède un rôle plus général dans la régulation de la réponse immune en modulant la prolifération, la cytotoxicité ou la production de cytokines par les cellules immunitaires. L'histamine est également impliquée dans la croissance et le développement tumoral, ainsi que dans la cicatrisation et l'hématopoïèse.

Si l'histamine influence l'expression et l'action de nombreuses cytokines (Tableau 14), la production et la libération de l'histamine sont elles-même régulées par certaines cytokines (Igaz *et al.*, 2001). Parce que de nombreux agents pharmacologiques qui modulent les actions de l'histamine sont largement utilisés dans le traitement de diverses maladies (allergie, ulcère...), l'interaction bidirectionnelle entre l'histamine et les cytokines possède une relevance médicale. Cependant, la situation actuelle des connaissances dans le domaine apparaît très controversée et des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider plus précisément ces interactions complexes.

Tableau 14. Effet de l'histamine sur la production de cytokines (suite).

B. Inhibition			
<i>cytokine</i>	<i>espèce</i>	<i>cellule</i>	<i>récepteur</i>
IL-12	homme	sang total	H2
	homme	monocytes	H2
	homme	macrophages	H2
IFN- γ	homme	PBMC	H2
	homme	sous-populations Th	
	homme (atopique) souris	cellules Th1 cellules Th1 et splénocytes	H2
IL-2	homme	PBMC	H2
	homme	cellules Th	
	souris	cellules Th	H2
	souris	splénocytes	H2
IL-4	homme	PBMC, cellules Th2	H2
	homme (atopique)	cellules Th0	H2
IL-13	homme	cellules Th2	H2
IL-1	homme	PBMC	H2
	homme	monocytes	H2
TNF- α	homme	PBMC	H2
	homme	macrophages	H2
	homme	monocytes	H2
	homme	macrophages alvéolaires	H2, H3
	rat	mastocytes	H2, H3

PBMC *peripheral blood mononuclear cells*
BEC *bronchial epithelial cells*
CVEC *conjunctive epithelial cells*
CREC *corneal epithelial cells*
NEC *nasal epithelial cells*
HCAEC *human coronary artery endothelial cells*
HUVEC *human umbilical vein endothelial cells*

1. Régulation de la balance Th1/Th2

La polarisation des lymphocytes Th représente un mécanisme fondamental de régulation de la réponse immune spécifique. L'histamine module l'expression de cytokines de type Th1 (IL-2, IFN- γ) ou Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), ainsi que les cytokines impliquées dans la polarisation comme l'IL-12.

L'histamine inhibe de manière dose-dépendante la production d'IL-12 dans des cultures de sang total humain (Elenkov *et al.*, 1998), et plus précisément, par les monocytes (Van der Prouw Kraan *et al.*, 1998) et les macrophages (Azuma *et al.*, 2001). Cette inhibition est médiée par les récepteurs H2.

L'histamine diminue également *via* le récepteur H2 la production d'IFN- γ dans des cultures de PBMC (Horvath *et al.*, 1999) et de lymphocytes Th d'individus atopiques (Lagier *et al.*, 1997 ; Krouwels *et al.*, 1998) ou non (Dohlsten *et al.*, 1988a), ainsi que dans des cultures de clones Th1 murins (Osna *et al.*, 2001b). Cependant, des études expérimentales récentes ont révélé l'effet inverse, à savoir une augmentation de la production d'IFN- γ par des PBMC (Kohka *et al.*, 2000) et par des clones Th1 (Jutel *et al.*, 2001a, 2001b) cultivés en présence d'histamine.

La sécrétion d'IL-2, qui est le principal facteur de croissance autocrine pour les lymphocytes T, peut être inhibée ou stimulée par l'histamine selon les conditions expérimentales utilisées. Cependant, la majorité des données soulignent le potentiel inhibiteur de l'histamine (Dohlsten *et al.*, 1988a). Lorsque les lymphocytes Th sont prétraités avec de l'histamine, la production d'IL-2 est augmentée, mais l'administration d'histamine en présence d'antigène à des splénocytes murins inhibe la sécrétion d'IL-2 (Khan *et al.*, 1985) par un mécanisme impliquant la protéine kinase A (Poluektova *et al.*, 1999). D'autres expériences montrent que cette double action de l'histamine dépend du temps : au début de l'induction, l'histamine augmente fortement l'expression des gènes de l'IL-2 et de l'IFN- γ par des PBMC et une lignée cellulaire Th1, mais à des moments plus tardifs, l'histamine inhibe cette expression (Arad *et al.*, 1996).

L'histamine augmente la production d'IL-10 dans des cultures de sang total (Elenkov *et al.*, 1998) et par les macrophages alvéolaires (Sirois *et al.*, 2000). Dans ce dernier cas, l'histamine induit la production d'IL-10 *via* les récepteurs H2 et H3. La sécrétion d'IL-10 par des cellules Th2 et des splénocytes murins est également augmentée par l'histamine, *via* les récepteurs H1 et H2 (Osna *et al.*, 2001a). Dans la majorité des études réalisées sur des cellules Th2 ou Th0, l'histamine inhibe l'expression d'IL-4 (Khan, 1995 ; Lagier *et al.*, 1997 ; Krouwels *et al.*, 1998), augmente l'expression d'IL-5 (Schmidt *et al.*, 1994 ; Khan, 1995) par l'intermédiaire des récepteurs H2 et de l'activation de la protéine kinase A (Poluektova et Khan, 1998), et stimule la synthèse et la sécrétion d'IL-13 (Elliott *et al.*, 2001).

Ces observations montrent que l'histamine interfère avec la régulation de la balance Th1/Th2 à de nombreux niveaux. Il existe de nombreuses différences parmi les données expérimentales, mais la majorité des actions de l'histamine décrites jusqu'à présent semblent en faveur du développement de la réponse Th2. Cependant, une étude récente montre qu'une expression différente des récepteurs de l'histamine par les cellules Th1 et Th2 conduit à une augmentation de la réponse Th1 et une diminution de la réponse Th2 par l'histamine (Jutel *et al.*, 2001a, 2001b). Alors que les récepteurs H1 sont fortement exprimés par les cellules Th1, les cellules Th2 expriment préférentiellement les récepteurs H2. Chez la souris, la déplétion des récepteurs H1 conduit à une suppression de la production d'IFN- γ , une sécrétion dominante de cytokines Th2 (IL-4, IL-13) et une réponse anticorps augmentée. Des souris déficientes en récepteur H2 présentent une augmentation des deux réponses Th1 et Th2. L'histamine favoriserait donc une réponse de type Th1 (production d'IFN- γ) par l'intermédiaire des récepteurs H1, alors qu'elle inhiberait les réponses Th1 et Th2 par différents signaux intracellulaires induits par les récepteurs H2. Ces données suggèrent que l'histamine déclenche un mécanisme de régulation négative, que l'on peut observer lors de l'inflammation allergique et de l'immunothérapie spécifique.

2. Régulation de la production de cytokines inflammatoires

Trois cytokines, le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6, et de nombreuses chimiokines peuvent être considérées comme les régulateurs principaux de la réponse inflammatoire. Ces cytokines sont produites par de nombreux types cellulaires, en outre par les monocytes et macrophages, et contribuent à la régulation de nombreux processus immunologiques ou non. Les chimiokines, comme l'IL-8 ou RANTES, sont également des effecteurs principaux dans les événements locaux et systémiques de l'inflammation.

Concernant l'IL-1, les données de la littérature sont contradictoires. L'histamine augmente la production par des PBMC humains de l'IL-1 β induite par l'IL-1 α (Vannier et Dinarello, 1993), elle induit la production d'IL-1 par les macrophages péritonéaux (Okamoto et Nakano, 1990) et par les cellules stromales de moelle osseuse de souris (Tasaka *et al.*, 1993). En revanche, d'autres auteurs ont montré que l'histamine inhibait la production d'IL-1 par des PBMC (Dohlsten *et al.*, 1988b) ou des monocytes (Manosroi *et al.*, 1987) humains stimulés avec du LPS. L'histamine semble également augmenter la production d'IL-18, une cytokine de la famille de l'IL-1, par des PBMC humains (Kohka *et al.*, 2000).

L'histamine induit la production d'IL-6 par de nombreux types cellulaires humains. Selon les conditions expérimentales, le récepteur impliqué n'est pas le même. L'histamine induit la production d'IL-6 par les cellules épithéliales de la conjonctive (Weimer *et al.*, 1998), par les kératinocytes

(Shinoda *et al.*, 1998) ou par les macrophages pulmonaires (Triggiani *et al.*, 2001) en agissant *via* le récepteur H1. Les deux récepteurs H1 et H2 sont impliqués dans la stimulation par l'histamine de la production d'IL-6 par les PBMC (Mor *et al.*, 1995) et les cellules endothéliales (Delneste *et al.*, 1994). D'après Vannier et Dinarello (1994), le récepteur H2 seul est impliqué dans l'induction de la production d'IL-6 par des PBMC humains stimulés par de l'IL-1 α et de l'histamine. L'histamine augmente également la production d'IL-6 par des astrocytes (Lieb *et al.*, 1998), par des cellules endothéliales des artères coronaires (Li *et al.*, 2001) ou par des lignées B et des glioblastomes (Falus, 1993). La production d'IL-11 (une cytokine de la famille de l'IL-6 qui exerce des effets similaires à ceux de l'IL-6) par les fibroblastes pulmonaires est aussi augmentée par l'histamine, notamment en présence de TGF- β (Zheng *et al.*, 1994).

L'histamine inhibe la production de TNF- α par des PBMC (Vannier *et al.*, 1991), des monocytes (Hotermans *et al.*, 1991) ou des macrophages humains (Azuma *et al.*, 2001) *via* le récepteur H2. Elle inhibe également, mais de manière indirecte, la production de TNF- α par les macrophages alvéolaires humains *via* l'augmentation de la production d'IL-10 (Sirois *et al.*, 2000), ainsi que la production de TNF- α par des mastocytes de rat *via* l'augmentation de la production de PGE₂ (Bissonnette, 1996). Dans ces deux derniers cas, les récepteurs H2 et H3 sont impliqués.

L'histamine régule la production de nombreuses chimiokines impliquées dans le recrutement des granulocytes au site de l'inflammation. Elle augmente notamment la production d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques (Takizawa *et al.*, 1995 ; Aoki *et al.*, 1998), nasales (Takenchi *et al.*, 2001), de la cornée (Sharif *et al.*, 1998) ou de la conjonctive (Weimer *et al.*, 1998), ainsi que par les cellules endothéliales (Jeannin *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 2001). L'histamine augmente aussi la production d'IL-16, une cytokine chimioattractive pour les lymphocytes T CD4⁺ et les éosinophiles, par les lymphocytes T CD8⁺ (Laberge *et al.*, 1995 ; Hart, 2001) et les cellules épithéliales (Arima *et al.*, 1999 ; Hart, 2001). Dans les cellules épithéliales bronchiques (Bayram *et al.*, 1999) ou nasales (Abdelaziz *et al.*, 1998), l'histamine induit la sécrétion de RANTES, et cette induction peut être inhibée par des antagonistes H1. L'expression des ARNm des chimiokines MCP-1, MCP-3 et RANTES est également augmentée par l'histamine dans des cultures d'explants de muqueuse nasale humaine (Fujikura *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que des macrophages alvéolaires bovins stimulés par l'histamine présentaient une activité chimioattractive pour les neutrophiles et les monocytes. Cette activité est liée à l'augmentation de la production de LTB₄ et elle est inhibée par des antagonistes H2 (Nomura *et al.*, 2001).

L'histamine augmente la synthèse de GM-CSF par les cellules épithéliales des bronches (Takizawa *et al.*, 1995), de la conjonctive (Weimer *et al.*, 1998) ou de la cornée (Sharif *et al.*, 1998), ainsi que par les PBMC humains (Mor *et al.*, 1995).

Tous ces exemples montrent que la sécrétion de nombreuses cytokines impliquées dans les processus inflammatoires locaux ou systémiques est influencée par l'histamine, *via* les deux récepteurs H1 et H2, ce qui coïncide avec les effets pro-inflammatoires de l'histamine. Il existe de nombreuses contradictions concernant les interactions entre l'histamine et les cytokines, et des études plus poussées sont nécessaires pour clarifier ce réseau important dans des conditions à la fois normales et pathologiques.

3. Régulation de l'expression de molécules de surface

L'histamine régule l'expression des molécules de surface, et notamment des molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales et épithéliales. Notamment, l'histamine augmente l'expression de la molécule ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) à la surface de cellules endothéliales (Miki *et al.*, 1996) et de kératinocytes (Mittra *et al.*, 1993) stimulés par du TNF- α , ainsi qu'à la surface de cellules épithéliales bronchiques (Vignola *et al.*, 1993). Ce sont les récepteurs H2 qui sont principalement impliqués, bien que l'augmentation de l'expression de ICAM-1 par les cellules épithéliales bronchiques soit également médiée par les récepteurs H1. Cependant, une étude récente montre que l'histamine diminue l'expression de ICAM-1 induite par l'IL-18 à la surface de monocytes humains (Takahashi *et al.*, 2002).

L'histamine augmente également l'expression de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) induite par l'IL-4 ou le TNF- α à la surface de cellules endothéliales vasculaires (Saito *et al.*, 1996). L'expression de la E-sélectine à la surface de cellules endothéliales traitées au TNF- α est aussi augmentée par l'histamine (Miki *et al.*, 1996), de même que la P-sélectine, à la surface de cellules endothéliales vasculaires humaines (Jones *et al.*, 1993) ou de veinules mésentériques de rat (Kubes et Kanwar, 1994).

L'histamine induit l'adhérence et la migration des éosinophiles équins. Cet effet est inhibé par des antagonistes H1 et par des anticorps neutralisants anti-CD18 (Foster et Cunningham, 1998). La molécule CD18 est également impliquée dans l'augmentation de l'adhésion des neutrophiles à la surface de cellules de la lignée HT29 (cellules intestinales épithéliales) traitées par du TNF- α et de l'histamine (Miyata *et al.*, 1999). D'un autre côté, l'histamine inhibe *via* les récepteurs H2 l'adhésion des lymphocytes T CD4⁺ de rat à la matrice extracellulaire (fibronectine et laminine), interaction qui met en jeu des β_1 -intégrines (Hershkoviz *et al.*, 1994).

En modulant l'expression de molécules de surface, l'histamine modifie ainsi l'adhésion et la migration des cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation à la surface des cellules endothéliales.

4. Régulation de la prolifération cellulaire

Il est connu depuis longtemps que l'histamine favoriserait la cicatrisation (Kupietzky et Levi-Schaffer, 1996) et que les tissus qui prolifèrent, comme les tumeurs, expriment fortement le gène de l'histidine décarboxylase et synthétisent des taux élevés d'histamine (Moriarty, 1993). De nombreuses études ont été réalisées concernant les effets de l'histamine sur la prolifération des cellules normales ou tumorales. Les résultats obtenus sont parfois contradictoires, mais de manière générale, l'histamine stimule de manière autocrine la croissance des cellules tumorales alors que les antagonistes, en particulier des récepteurs H2, l'inhibent (Rivera *et al.*, 2000). La dérégulation des gènes de l'histidine décarboxylase et ceux des récepteurs de l'histamine observée dans de nombreuses lignées tumorales représente un outil intéressant pour comprendre les bases moléculaires du cancer et constitue une cible potentielle pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques.

L'histamine est décrite comme un facteur de croissance établi pour les cancers gastriques et colorectaux (Hahm *et al.*, 1996 ; Watson *et al.*, 1993). Elle augmente entre autres la prolifération de différentes lignées de carcinomes et de mélanomes (Reynolds *et al.*, 1996 ; Tilly *et al.*, 1990), de lignées cellulaires issues de tumeurs cérébrales (Finn *et al.*, 1996), des kératinocytes (Maurer *et al.*, 1997b), des fibroblastes de la conjonctive (Leonardi *et al.*, 1999), d'une lignée de cancer ovarien (Batra et Fadeel, 1994) et d'astrocytome (Hernandez-Angeles *et al.*, 2001). L'histamine stimule également le développement tumoral lors d'un modèle expérimental de carcinome mammaire chez le rat (Cricco *et al.*, 1994). Bien que le récepteur H1 soit parfois impliqué, le récepteur H2 exprimé par les cellules tumorales semble jouer un rôle majeur dans l'augmentation de la prolifération cellulaire par l'histamine. L'histamine favorise la croissance de cellules transfectées avec le récepteur H2, et cette augmentation de la prolifération cellulaire est liée à une augmentation de la transcription du proto-oncogène *c-fos* (Wang *et al.*, 1997).

D'un autre côté, une étude récente montre que l'histamine inhibe *via* les récepteurs H1 la prolifération d'une lignée cellulaire humaine issue d'un cancer de la prostate (Valencia *et al.*, 2001). L'histamine, cette fois par l'intermédiaire du récepteur H2, inhibe également la prolifération d'une lignée de carcinome pancréatique (Cricco *et al.*, 2000), ainsi que celle des cellules de la lignée HL-60-Eo dont elle induit la différenciation en éosinophiles (Shimada *et al.*, 2001).

Concernant les cellules normales, il a été rapporté que l'histamine inhibait la prolifération des lymphocytes T induite par la phytohéماغglutinine (Elizondo *et al.*, 1996 ; Bury *et al.*, 1992) ou la concanavaline A (Brostoff *et al.*, 1980). Les sujets atopiques sont plus sensibles à la suppression par

l'histamine de l'activation des lymphocytes que les sujets sains. La présence d'histamine produite localement durant une réponse allergique préviendrait la prolifération des lymphocytes T sensibilisés qui pénètrent dans le site de la stimulation antigénique. Chez les sujets atopiques, cette sensibilité accrue à l'histamine pourrait être protectrice contre des réactions non souhaitables d'hypersensibilité retardée (Brostoff *et al.*, 1980). L'effet inhibiteur de l'histamine sur la prolifération des lymphocytes T est médié par les récepteurs H2.

L'asthme sévère chronique est caractérisé par une augmentation de la masse de muscles lisses au niveau des voies aériennes. L'histamine semble jouer un rôle dans ce phénomène d'hyperplasie et d'hypertrophie puisqu'elle augmente *in vitro* la prolifération des cellules des muscles lisses (Panettieri *et al.*, 1990). Cet effet mitogénique de l'histamine est inhibé par le peptide vasoactif intestinal (VIP), impliqué dans le relâchement musculaire au niveau des voies aériennes (Maruno *et al.*, 1995). Le récepteur H2 est probablement impliqué puisque la cimétidine diminue *in vivo* le phénomène d'hyperplasie des muscles lisses de la carotide de rat (Low *et al.*, 1996).

5. Régulation de l'hématopoïèse

La possibilité d'un rôle de l'histamine dans l'hématopoïèse a été envisagée à partir des travaux de Byron (1977), qui montrent que le 4-méthyl-histamine, un analogue de l'histamine, provoque l'entrée en cycle cellulaire de cellules souches hématopoïétiques (CFU-S, *colony forming unit-spleen*) issues de moelle osseuse de souris. Plus tard, il a été démontré que l'histamine exogène induisait la prolifération des CFU-S (Yi et Xu, 1988), et stimulait la prolifération et la différenciation de progéniteurs granulocytiques (Nakaya et Tasaka, 1988). L'histamine est en fait produite de manière endogène par les progéniteurs hématopoïétiques murins après stimulation avec de l'IL-3 et du GM-CSF (Dy *et al.*, 1981, 1986, 1987), et elle est requise pour l'entrée en cycle cellulaire des CFU-S induite par l'IL-3 (Schneider *et al.*, 1990). L'augmentation de la production d'histamine après stimulation est liée à l'induction rapide de la synthèse d'HDC. L'inhibition de cette enzyme ou de la fixation de l'histamine par des antagonistes des récepteurs diminue fortement les capacités clonogéniques des cellules murines normales (CFU-GM) ou leucémiques (CFU-L) provenant de moelle osseuse (Bencsath *et al.*, 2000).

Les cellules produisant de l'histamine en réponse à l'IL-3 ne sont ni les mastocytes, ni leurs précurseurs directs, ni les autres cellules différenciées de la moelle osseuse, mais probablement de progéniteurs immatures, à une étape de développement intermédiaire entre les cellules souches pluripotentes et les précurseurs spécifiques des différentes lignées hématopoïétiques (Schneider *et al.*, 1993). Il s'agirait notamment de précurseurs des basophiles (Schneider *et al.*, 1999).

Chez l'homme, l'IL-3 induit également la synthèse d'histamine dans le système hématopoïétique, particulièrement au niveau de la moelle osseuse et du sang de cordon (Minkowski *et al.*, 1990 ; Arock *et al.*, 1991).

Les progéniteurs hématopoïétiques murins sont capables de produire de l'histamine mais également d'interagir avec : l'histamine est internalisée par ces cellules par un système de transport spécifique, fortement inhibé par des antagonistes du récepteur H3 alors que les agonistes sont sans effet (Corbel *et al.*, 1997). Un autre type de récepteur semble donc impliqué, et il est possible que ce soit le récepteur H4 puisque ce dernier est fortement exprimé dans la moelle osseuse et peut être inhibé par les antagonistes H3.

6. Autres effets de l'histamine

L'histamine est impliquée dans la régulation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Elle augmente l'activation des CTL *in vivo* et la production d'IL-2 lorsqu'elle est injectée au moment de la phase tardive de la réponse (Droge *et al.*, 1986). Lorsque des CTL humains sont générés en présence d'histamine, la lyse CMH classe II spécifique est augmentée, alors que la génération de CTL CMH classe I spécifiques est inhibée. Cette inhibition est médiée par le récepteur H2 (Khan *et al.*, 1989).

L'histamine augmente les réponses médiées par les récepteurs antigéniques (Banu et Watanabe, 1999). Elle favorise la prolifération des lymphocytes T induite par un anti-CD3 ϵ ainsi que celle des lymphocytes B induite par des anti-IgM. Ces effets ne sont plus observés avec des lymphocytes T et B provenant de souris déficientes en récepteur H1 : les lymphocytes T présentent un faible taux de prolifération *in vitro* en réponse à un anti-CD3 ϵ ou à la stimulation par un antigène et la production d'anticorps est également diminuée, alors que les autres fonctions des lymphocytes T et B ne sont pas affectées. Le signal généré par l'histamine *via* les récepteurs H1 augmente donc les réponses immunes médiées par les récepteurs à l'antigène, suggérant une interaction entre les signalisations induites par ces deux types de récepteurs.

En plus de ses effets sur la production de cytokines et sur la prolifération de divers cellules du système immunitaire, l'histamine inhibe le chimiotactisme des neutrophiles (Bury *et al.*, 1992), effet observé *in vivo* chez l'homme 2 heures après inhalation d'histamine, ainsi que celui de macrophages traités *in vitro* (Azuma *et al.*, 2001). Ces effets de l'histamine sur l'inhibition du chimiotactisme peuvent être mimés par des agonistes H2. L'histamine inhibe également la phagocytose et la production d'anions superoxyde par les macrophages stimulés.

L'histamine joue un rôle dans la protection contre l'infection par le virus *herpes simplex* de type 2 (HSV-2). La déplétion des lymphocytes NK *in vivo* réduit fortement la survie de souris infectées par voie intraveineuse avec HSV-2, et une seule dose d'histamine permet de prolonger la survie de ces souris. Cet effet protecteur de l'histamine est bloqué par la ranitidine, antagoniste H₂ (Hellstrand *et al.*, 1995).

7. Facteurs influençant la libération d'histamine

De nombreuses cytokines influencent la libération de l'histamine par les basophiles ou les mastocytes. Les cytokines qui stimulent la libération de l'histamine sont regroupées sous le terme de HRF, pour *histamine releasing factors* (MacDonald, 1996 ; Igaz *et al.*, 2000).

L'IL-3, principal régulateur de l'hématopoïèse, favorise la sécrétion d'histamine (Kuna *et al.*, 1993). L'IL-3 induit l'expression des ARNm de l'histidine décarboxylase, de l'IL-4 et de l'IL-6 par des précurseurs basophiles murins (Schneider *et al.*, 1999). L'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF conduisent à une augmentation significative de la libération d'histamine par des basophiles humains prétraités avec un agent mobilisant le Ca⁺⁺ intracellulaire (Lie *et al.*, 1998). Cet effet est supérieur chez les patients atopiques (Lie *et al.*, 1999). Cependant, *in vivo*, l'activité de l'IL-3 sur la libération d'histamine est beaucoup moins convaincante (Hovgaard *et al.*, 1997).

En plus de l'IL-3, d'autres cytokines induisent ou augmentent la libération de l'histamine :

- l'IL-1 (Haak-Frendscho *et al.*, 1988 ; Alam *et al.*, 1989),
- l'IL-5 (Sarmiento *et al.*, 1995 ; Lie *et al.*, 1998),
- l'IL-6 (Miadonna *et al.*, 1993 ; Yanagida *et al.*, 1995),
- l'IL-18 (Yoshimoto *et al.*, 1999)
- le GM-CSF (Dy et Schneider, 1991 ; Miadonna *et al.*, 1993 ; Louis *et al.*, 1994a ; Lie *et al.*, 1998).

Les effets du TNF- α sur la libération d'histamine sont plus controversés et semblent dépendre de l'origine (tissus ou espèces) des mastocytes ou des basophiles étudiés. Après traitement au TNF- α , à la fois des effets positifs (Brzezinska-Blaszczyk et Pietrzak, 1997) et négatifs (Alam *et al.*, 1989 ; Kuna *et al.*, 1993) sur la libération d'histamine par des mastocytes ou des basophiles humains ont été reportés. Le TNF- α inhibe la libération de l'histamine par des mastocytes de rat stimulés avec de la concanavale A (Olejnik *et al.*, 1998).

Le PAF (*platelet activating factor*) est un phospholipide bioactif impliqué dans divers processus inflammatoires. Seul, il ne provoque pas la sécrétion d'histamine. En revanche, il potentialise la libération d'histamine induite par l'IL-3, l'IL-5, le GM-CSF (Brunner *et al.*, 1991) ou par un anti-IgE

(Louis *et al.*, 1994b). La molécule CTAP-III (*connective tissue-activating peptide III*) et son dérivé NAP-2 (*neutrophil activating peptide 2*), produits par les plaquettes, sont également capables d'induire la libération de l'histamine par des basophiles humains (Rediggari *et al.*, 1992).

De nombreuses chimiokines induisent la libération d'histamine, et la majorité des chimiokines du groupe CC ont un effet additif sur la libération d'histamine induite par l'allergène (Alam et Grant, 1995). Chez l'homme, MCP-1 et RANTES semblent les plus puissantes (Kuna *et al.*, 1992, 1993). MIP-1 α induit la libération de l'histamine par les basophiles uniquement chez certains donneurs, et plus fréquemment chez les sujets atopiques (Alam *et al.*, 1992). D'autres chimiokines, comme MCP-2, MCP-3 et FIC (*fibroblast-induced cytokine*), induisent de manière dose-dépendante la sécrétion d'histamine par les basophiles (Alam *et al.*, 1994). Concernant l'IL-8, des effets à la fois positifs (Krieger *et al.*, 1992) et inhibiteurs (Kuna *et al.*, 1991) ont été reportés.

Bien que de nombreuses chimiokines semblent moduler la libération d'histamine principalement de manière positive et indépendante des IgE, et que ces effets auraient une relevance *in vivo*, il est important de souligner que l'activité de ces cytokines sur la libération d'histamine est beaucoup plus faible que celle des IgE (Liao et Hsieh, 1992).

IV – Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs de l'histamine

Lorsque les rôles physiologiques et pathologiques de l'histamine ont été mis en évidence au début des années 1900, des recherches intensives ont commencé afin d'identifier des antihistaminiques pouvant être utilisés comme des agents anti-allergiques. Si le but des premières interventions thérapeutiques dans l'allergie était de bloquer la libération d'histamine par les mastocytes et les basophiles, la recherche s'est rapidement concentrée sur la possibilité de contrecarrer les effets de l'histamine en bloquant ses récepteurs, notamment le récepteur H1 dans le cas de l'allergie.

Dans les années 1960, la classification des récepteurs H1 et H2 a conduit au développement d'antagonistes H2 utilisés comme agents anti-ulcéreux. Plus tard, l'utilisation d'agonistes H2 comme cardiostimulants a été envisagée. L'utilisation d'antagonistes H2 comme immunomodulateurs offre également de nouvelles perspectives thérapeutiques notamment dans la lutte anti-tumorale.

Enfin, l'histamine elle-même peut être utilisée comme adjuvant en immunothérapie anticancéreuse, en association avec l'IL-2 et l'IFN- α .

1. Inhibiteurs de la synthèse et de la libération d'histamine

La tritoqualine (HYPOSTAMINE[®]) est un inhibiteur de l'histidine décarboxylase mais, comme il est peu efficace, il doit être utilisé à une posologie élevée. Il s'agit d'un médicament ancien et relativement peu utilisé.

Par des mécanismes pas toujours bien précisés, mais qui font intervenir une stabilisation membranaire par inhibition de la pénétration de Ca^{++} , certains médicaments inhibent la libération d'histamine ainsi que celles d'autres substances parfois désignées sous le terme d'autacoïdes (sérotonine, prostaglandines, leucotriènes...), et sont largement utilisés en thérapeutique. Le premier produit efficace dans ce domaine, et sans doute le plus utilisé, est le cromoglycate (LOMUDAL[®], LOMUSOL[®], OPTICRON[®], NALCRON[®]). Il s'administre par voie locale, bronchique, nasale, oculaire et digestive (il agit sur les muqueuses digestives sans être absorbé). L'indication la plus importante est la prévention des crises d'asthme. Le nédocromil (TILADE[®], TILAVIST[®]) inhibe la libération et la synthèse de divers autacoïdes. Ses propriétés et indications sont relativement semblables à celles du cromoglycate. Il est présenté en aérosol pour le traitement de l'asthme et en collyre pour le traitement des conjonctivites allergiques. Le kétotifène (ZADITEN[®]) est à la fois un inhibiteur de la libération des autacoïdes et un antihistaminique H1. Il possède également un effet anti-PAF. Contrairement au cromoglycate, il est absorbé par le tube digestif et a donc des effets généraux. Il est utilisé dans le traitement prophylactique de l'asthme. L'oxatomide (TINSET[®]) est un inhibiteur de la dégranulation des mastocytes ainsi qu'un antihistaminique H1 sédatif. Il est utilisé dans le traitement de l'urticaire chronique, des dermatites atopiques et des dermographismes. Le lodoxamine (ALMIDE[®]) est un inhibiteur de la dégranulation des mastocytes utilisé comme collyre anti-allergique. L'olopatadine, non commercialisé en France, a des propriétés proches de celles du lodoxamine.

2. Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs H1

Aucune application des agonistes H1 ne semble envisageable, étant donné que ces récepteurs sont principalement impliqués dans les processus pathologiques.

Les antagonistes H1 (antihistaminiques) appartiennent aux plus vieux médicaments modernes. Le premier antihistaminique (phenbenzamine) a été introduit sur le marché juste avant la seconde guerre mondiale, puis de nombreux analogues ont suivi. A l'origine, on pensait que ces molécules pouvaient spécialement être utiles dans le traitement des allergies, mais ce point de vue était un peu trop

optimiste lorsqu'on sait que l'histamine n'est qu'un médiateur parmi d'autres libérés lors de la réaction allergique. La sévérité des effets secondaires observés explique également l'effet limité des antihistaminiques dans le traitement des allergies. A côté des effets causés par l'interférence avec d'autres systèmes de récepteurs (par exemple les récepteurs de la sérotonine ou de l'adrénaline), une sédation sévère, liée au blocage des récepteurs H1 dans le système nerveux central ou périphérique, est fréquemment observée. Des antihistaminiques non sédatifs ont alors été largement développés durant ces quinze dernières années. Ces antihistaminiques, dits de seconde génération, ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique, ne provoquent pas d'effet anti-cholinergique significatif et représentent ainsi des outils thérapeutiques importants dans le traitement des maladies atopiques (Walsh *et al.*, 2001).

Les antihistaminiques H1 inhibent d'une manière compétitive les effets de l'histamine médiés par le récepteur H1, plus particulièrement l'effet vasodilatateur et l'augmentation de la perméabilité capillaire à l'origine des réactions oedémateuses. Ils ne s'opposent pas aux réactions antigène / anticorps, ni à la libération d'histamine. Les antihistaminiques H1 sont utilisés pour le traitement symptomatique de diverses manifestations allergiques cutanées (urticaire) ou muqueuses (rhinite, rhume des foins, conjonctivite). Ils ne sont pas efficaces dans l'asthme. Insuffisants à eux seuls pour traiter un choc anaphylactique ou un œdème du larynx, ils pourraient cependant les prévenir.

Les premiers antihistaminiques commercialisés, la prométhazine (PHENERGAN[®]), l'alimémazine (THERALENE[®]), la dexchlorphéniramine (POLARAMINE[®]), la bromphéniramine (DIMEGAN[®]), la buclizine (APHILAN[®]), la carbinoxamine (ALLERGEFON[®]) et la doxylamine (MEREPRINE[®]), sont sédatifs et provoquent une somnolence pouvant être gênante. Certains, comme la prométhazine, ont un effet anesthésique local. Des antihistaminiques H1 ayant en outre une activité atropinique (bouche sèche, constipation, troubles de l'accommodation, tachycardie...) comme la diphenhydramine (NAUTAMINE[®]) et le dimenhydrate (DRAMAMINE[®], MERCALM[®], NAUSICALM[®]) sont utilisés dans le traitement préventif et curatif du mal des transports, bien que la scopolamine, qui n'est pas un antihistaminique, semble plus efficace en traitement préventif.

Les antihistaminiques de seconde génération ont en général une plus longue durée d'action et une demi-vie plasmatique plus longue que les anciens, ce qui permet de réduire le nombre de prises quotidiennes. Ils n'ont généralement pas, à posologie normale, d'effet atropinique. La terfénadine, un des premiers antihistaminiques non sédatifs, a été retirée du commerce en raison de la survenue de troubles de la conduction cardiaque. La terfénadine est métabolisée en un produit ayant également des propriétés antihistaminiques H1 mais dépourvu d'effet sur la conduction cardiaque, la fexofénadine, actuellement commercialisée (TELFEST[®]). L'astémizole, qui présentait des effets

secondaires identiques à la terféndine lorsqu'il était utilisé en association, a également été retiré du marché. Le méquitazine (PRIMALAN[®]) possède parallèlement à son activité antihistaminique H1 un effet atropinique pouvant se traduire par une sécheresse de la bouche ou un trouble de l'accommodation. La loratadine (CLARITINE[®]) agit en grande partie par l'intermédiaire d'un de ses métabolites, la décarboéthoxyloratadine. En cas de surdosage, la loratadine peut donner une sédation et des effets atropiniques. La cétirizine (VIRLIX[®], ZYRTEC[®]), dérivé carboxylé de l'hydroxyzine utilisé comme sédatif et anxiolytique, outre son effet antihistaminique H1, inhibe la libération de diverses cytokines et leucotriènes. L'utilisation de la mizolastine (MIZOLLEN[®]), antihistaminique plus récent, est déconseillée en association aux macrolides et antifongiques imidazolés en raison d'une inhibition possible de son catabolisme. L'azélastine (ALLERGODIL[®]) est un antihistaminique H1 utilisable par voie locale, en pulvérisation nasale, dans le traitement des rhinites allergiques.

3. Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs H2

Les agonistes H2 peuvent être utilisés pour stimuler la sécrétion d'acide gastrique. La présence de récepteurs H2 sur le ventricule gauche du cœur de mammifère rend attractive l'utilisation des agonistes H2 comme cardiostimulants, spécialement pour des patients réfractaires aux β_2 agonistes (Felix *et al.*, 1991). Pour être utilisables, les agonistes doivent être sélectifs, ils ne doivent pas avoir de propriétés agonistiques H1. L'impromidine est un candidat pour cette application, mais cette molécule stimule trop fortement la sécrétion d'acide gastrique. Des nouveaux agonistes H2 du même type structural, comme l'arpromidine, sont plus prometteurs car leur activité sur la sécrétion d'acide gastrique est plus faible que l'activité cardiostimulante.

Le dimaprit, agoniste sélectif des récepteurs H2, a été utilisé dans des modèles expérimentaux murins de choc endotoxique et d'hépatite (Nakamura *et al.*, 1997b). L'administration orale de dimaprit, une heure avant l'injection de LPS destiné à induire le choc endotoxique, inhibe l'élévation du taux plasmatique de TNF- α induit par le LPS et augmente fortement la survie des souris. De même, dans un modèle d'hépatite, l'absorption de dimaprit avant l'injection de galactosamine et de LPS inhibe fortement la production de TNF- α et l'activité alanine aminotransférase induites par la galactosamine et le LPS. Ces résultats, en accord avec le fait que l'histamine inhibe *in vitro* la production de TNF- α par les macrophages humains stimulés avec du LPS, soulignent l'intérêt de l'utilisation d'agonistes H2 dans des conditions pathologiques impliquant le TNF- α .

Les agonistes H2 peuvent potentiellement être utilisés pour réduire la libération des médiateurs de l'allergie par les mastocytes, mais cette utilisation n'a pas encore conduit au développement d'applications cliniques.

Les antagonistes H2 inhibent compétitivement les récepteurs H2 de l'histamine. La principale conséquence est l'inhibition de la sécrétion gastrique, qu'elle soit basale, diurne et nocturne, ou stimulées par les repas. L'activité antisécrétoire des différents antagonistes H2 semble identique aux posologies conseillées. Les antagonistes H2 sont de ce fait très efficaces dans le traitement des ulcères de l'estomac, du duodénum, de l'œsophage (reflux acide) et du syndrome de Zollinger-Ellison (association d'une tumeur du pancréas, d'une hypersécrétion gastrique et d'un ulcère duodénal). Le premier médicament commercialisé a été la cimétidine (TAGAMET[®]), suivie de la ranitidine (AZANTAC[®], RANIPLEX[®]), la famotidine (PEPDINE[®]) et la nizatidine (NIZAXID[®]). Certains antagonistes H2, comme la famotidine, ont donné des résultats intéressants sur les symptômes productifs et déficitaires de certaines psychoses. La physiopathologie des psychoses est complexe et des médiateurs autres que la dopamine et la sérotonine y sont impliqués. Tous les antagonistes H2 peuvent donner une bradycardie par suppression de l'effet chronotrope positif de l'histamine et divers autres effets indésirables, généralement sans gravité.

L'histamine joue un rôle dans la régulation de l'inflammation, la réaction immunitaire, la coagulation, la fonction cardiovasculaire, ainsi que dans la croissance des tissus normaux ou malins (régulation de la prolifération et de l'angiogénèse). Les récepteurs de l'histamine ont été identifiés à la surface des cellules de la moelle osseuse, des cellules immunocompétentes, des cellules endothéliales, des fibroblastes et également sur des cellules tumorales. L'utilisation d'antagonistes H2 comme immunomodulateurs dans le traitement de certaines maladies cancéreuses, auto-immunes ou de peau a donc été envisagée, en association ou non avec d'autres médicaments (Nielsen, 1996).

Les opérations chirurgicales majeures (nécessitant des transfusions sanguines) ainsi que les événements traumatisants induisent une immunosuppression, liée à la libération d'histamine post-traumatique. La conséquence de cette immunosuppression est l'augmentation des risques de complications infectieuses. Des études expérimentales ont suggéré un effet bénéfique des antagonistes H2 sur l'immunosuppression. Comme l'histamine est libérée immédiatement après un événement traumatisant, le blocage des récepteurs H2 juste avant l'opération chirurgicale aurait un effet optimal (Nielsen, 1995). Les effets positifs de la ranitidine et de la cimétidine dans la réduction de l'immunosuppression post-traumatique ont été observés lors de nombreuses études sur l'homme, lorsqu'elles sont administrées avant la première incision.

Des patients admis en chirurgie pour des tumeurs solides présentent fréquemment une réponse immune déficiente, induite en partie par les cellules tumorales. Les taux d'histamine sont augmentés et son catabolisme diminué chez des patients possédant des tumeurs solides (Moriarty, 1993). Au

départ, la synthèse accrue d'histamine peut avoir un effet bénéfique dans la résistance contre l'établissement de la tumeur, mais elle conduit ensuite à une immunosuppression qui favorise la croissance et la dissémination de la tumeur. La survie réduite de patients possédant de grandes quantités de mastocytes dans l'infiltrat inflammatoire en périphérie de la tumeur souligne le rôle négatif de l'histamine dans la néoplasie établie. Des études expérimentales montrent que les antagonistes H1 ont plutôt tendance à augmenter la croissance tumorale, alors que les antagonistes H2 inhiberaient l'établissement, la croissance et la dissémination des cellules malignes, soit en induisant une immunomodulation, soit en bloquant directement les récepteurs H2 exprimés par ces cellules. Il a été montré que la ranitidine était capable de réduire la suppression de la réponse immune spécifique et ainsi de diminuer la résistance tumorale. La cimétidine prolonge la survie dans le cas de cancers gastriques ou colorectaux, et sa combinaison avec la ranitidine prolonge la survie chez certains patients présentant une dissémination tumorale. La ranitidine est capable d'améliorer la réponse immune contre la tumeur et la survie de certains patients atteints de cancer colorectal avec métastases au niveau du foie, ce qui démontre bien les effets immunomodulateurs et directs des antagonistes H2 en néoplasie (Nielsen, 1996 ; Bolton *et al.*, 2001).

Il a été suggéré un rôle de l'histamine dans l'immunopathologie des leucémies. L'effet potentiel des antagonistes H2 a été étudié dans des formes chroniques de leucémies. La cimétidine améliore la fonction des cellules NK chez des patients souffrant de leucémie lymphocytaire chronique (Allen *et al.*, 1987). La ranitidine améliore la production de superoxyde par les monocytes, tandis que la fonction NK est réduite chez les patients souffrant de myélome multiple (Nielsen *et al.*, 1990).

Le psoriasis est une maladie auto-immune dans laquelle l'histamine est impliquée : le bénéfice potentiel des antagonistes H2 dans cette maladie a donc été évalué. Les résultats des études cliniques concernant la ranitidine dans le traitement du psoriasis sont cependant plutôt décevants : si dans certains cas une amélioration est observée, des études cliniques récentes démontrent que la ranitidine n'a aucun effet significatif sur les symptômes de la maladie (Cetin *et al.*, 1997 ; Zonneveld *et al.*, 1997).

Théoriquement, l'histamine participe également dans la physiopathologie d'autres maladies associées à une réponse immunitaire altérée. Des effets bénéfiques des antagonistes H2 ont été reportés dans l'infection par le HIV (Nielsen *et al.*, 1991), le zona (Miller *et al.*, 1989), la fièvre périodique associée à une stomatite aphteuse, une pharyngite et une adénite cervicale (Feder, 1992), la mastocytose systémique (Gasior-Chrzan et Falk, 1992), la pan-encéphalite subaiguë sclérosante (Anlar *et al.*, 1993), et la rhinite allergique (Testa *et al.*, 2001). Dans ce dernier cas, il a été montré que le traitement de patients souffrant de rhinite allergique avec de la ranitidine induit une

augmentation de la concentration sérique en IFN- γ et à une diminution de l'IL-4, conduisant à une diminution de la production d'IgE.

4. Utilisation thérapeutique des ligands des récepteurs H3

La stimulation des récepteurs H3 conduit à la diminution de la synthèse et de la libération de l'histamine ainsi que d'autres neurotransmetteurs (acétylcholine, GABA, dopamine, noradrénaline, somatostatine...) du système nerveux central ou périphérique. De nombreux progrès ont été réalisés dans la chimie des ligands des récepteurs H3 et la connaissance du rôle physiologique ou pathologique de ces récepteurs, mais jusqu'à présent aucun médicament actif sur le récepteur H3 n'a été développé. Des indications claires concernant le potentiel thérapeutique des agonistes ou antagonistes des récepteurs H3 sont cependant disponibles, et des études cliniques sont actuellement en cours ou planifiées (Leurs *et al.*, 1998).

La régulation négative par le récepteur H3 de la libération d'histamine au niveau des fibres sensorielles et les effets anti-inflammatoires qui en résultent suggèrent une potentielle application périphérique des agonistes H3 dans le traitement de l'asthme, de la migraine, des désordres cardiaques (ischémie myocardique) ou inflammatoires, comme l'arthrite et les maladies intestinales (anti-diarrhéiques). Des agonistes H3 possédant une accessibilité limitée au système nerveux central sont alors plus indiqués, afin d'éviter l'altération de l'exécution cognitive ou l'effet sédatif liés à la stimulation des récepteurs H3.

Les effets des antagonistes H3 sur le système nerveux central en font des candidats intéressants pour traiter les différentes pathologies qui touchent le système nerveux central. Ces molécules montrent des effets thérapeutiques potentiels dans des modèles d'obésité (effet anorexique ; Sakata *et al.*, 1997) et d'épilepsie (Vohora *et al.*, 2001). Des antagonistes H3 ont également montré un effet bénéfique sur l'apprentissage dans des modèles pharmacologiques ou naturels de troubles de mémoire (Passani et Blandina, 1998), suggérant la possibilité d'une application thérapeutique dans les problèmes de mémoire liés à l'âge, la maladie d'Alzheimer ou l'hyperactivité liée à un déficit d'attention. Un rôle antidépresseur des antagonistes H3 a également été envisagé (Perez-Garcia *et al.*, 1999).

La distribution très localisée des récepteurs H3 au niveau du système nerveux central suggère que peu d'effets secondaires seront visibles après traitement avec des antagonistes H3. De plus, au niveau périphérique, le récepteur H3 est principalement quiescent dans des conditions physiologiques normales. De ce fait, aucun effet cardiovasculaire ou neuroendocrinien n'a été reporté après traitement avec des antagonistes H3.

5. Utilisation thérapeutique de l'histamine

L'utilisation thérapeutique de l'histamine a été envisagée dans le traitement de la sclérose en plaque (Gillson *et al.*, 1999). L'hypothèse de départ est la découverte d'une association entre la diminution de la production d'acide gastrique, l'altération de l'hydrolyse des protéines et un taux plasmatique anormalement faible d'histidine chez des patients souffrants de sclérose en plaque. L'altération des fonctions digestives chez ces patients serait donc associée à une faible capacité à synthétiser de l'histamine. Des expériences préliminaires utilisant l'histamine par voie transdermale (crème) ont montré que 67% des patients traités présentaient une amélioration de certains symptômes (force des extrémités, contrôle de la vessie, fatigue, activités journalières, fonctionnement cognitif...). Divers mécanismes d'action sont possibles : augmentation des taux d'histamine dans les tissus cérébraux, amélioration de la fonction électrique des fibres démyélinées, augmentation du flux sanguin cérébral, suppression de réponses autoimmunes, ou stimulation de la remyélination.

La principale utilisation thérapeutique de l'histamine reste cependant son emploi comme adjuvant en immunothérapie anticancéreuse (Hellstrand *et al.*, 2000). Durant ces dernières années, la thérapie utilisant l'IL-2 ou l'IFN- α dans les cancers solides et hématopoïétiques a été complétée avec de l'histamine dihydrochloride, dans le but de contrecarrer les signaux immunosuppresseurs provenant des monocytes et des macrophages.

Les lymphocytes T et NK se retrouvent fréquemment dans les tumeurs ou les tissus inflammatoires environnants. Les fonctions de ces lymphocytes sont souvent altérées en comparaison avec celles des lymphocytes situés dans le sang périphérique ou dans des tissus sains, un phénomène lié à une immunosuppression induite par la tumeur. Les monocytes et les macrophages, sources importantes de cytokines, de ROM (*reactive oxygene metabolites*), d'anions superoxyde ou d'hydrogène peroxyde sont largement impliqués dans cette immunosuppression. Le nombre de maladies néoplasiques humaines dans lesquelles les lymphocytes T et NK subissent une inhibition oxydative est important et comprend les cancers gastriques ou colorectaux, les mélanomes, les cancers des reins, des ovaires, de la prostate, du poumon, le cancer squameux de la tête et du cou, et les maladies hématopoïétiques comme la leucémie aiguë myéloïde. Le degré d'inhibition des lymphocytes est d'autant plus fort qu'ils se trouvent proches de la tumeur et que le stade de la maladie est avancé. Les lymphocytes NK répondent vivement *in vitro* à l'IL-2 par une cytotoxicité anti-tumorale amplifiée, la transcription de gènes de cytokines et la prolifération, mais ces réponses sont fortement inhibées par la production de ROM par des monocytes ou macrophages autologues. Des observations similaires ont été reportées concernant les lymphocytes T. L'IL-2 n'est donc qu'un faible activateur des

Tableau 15. Effet de l'histamine sur la croissance tumorale dans des modèles *in vivo* (d'après Hellstrand *et al.*, 2000).

<i>Auteurs</i>	<i>Modèle tumoral</i>	<i>Traitement à l'histamine</i>	<i>Espèce</i>	<i>Résultats</i>
<i>Burtin et al., 1982</i>	Fibrosarcome murin	6 mg/jour, IP quotidienne	Souris	Survie prolongée, progression tumorale retardée
<i>Tatsuta et al., 1986</i>	Tumeurs intestinales	4 mg/jour, SC quotidienne	Rat	Réduction significative des cancers intestinaux
<i>Hellstrand et al., 1990</i>	Mélanome murin (B16)	2,5 à 250 mg/kg IV une dose	Souris	Réduction significative des métastases pulmonaires
<i>Cricco et al., 1993</i>	Tumeurs mammaires	0,1 mg/kg/jour, SC quotidienne	Rat	Réduction significative des carcinomes mammaires
<i>DellaRovere et al., 1994</i>	Sarcome de Yoshida	0,02 µg/jour, IP quotidienne	Rat	Survie prolongée
<i>Suonio et al., 1994</i>	Adénocarcinome colorectal humain	1 mg/kg/jour, IP quotidienne	Souris	Progression tumorale retardée
<i>Asea et al., 1996</i>	Lymphome murin (YAC-1)		Souris	Augmentation de l'élimination des cellules tumorales dans les poumons par les NK stimulés avec de l'IL-2
<i>Rizell et al., 1997</i>	Adénocarcinome colorectal de rat	0,5 mg/kg/jour, SC quotidienne	Rat	Progression tumorale retardée
<i>Johansson et al., 1998</i>	Adénocarcinome prostatique de rat	4 mg/jour, SC quotidienne	Rat	Amélioration de l'efficacité de l'IL-2 et de la radiothérapie
<i>Johansson et al., 2000</i>	Gliome de rat (BT4C)	4 mg/kg/jour, SC quotidienne	Rat	Réduction de la croissance tumorale en combinaison avec l'IL-2 (monothérapie inefficace)

Injection *IP* *intrapéritonéale*
 SC *sous-cutanée*
 IV *intraveineuse*

lymphocytes anti-tumoraux lorsque ces cellules ont été exposées à des ROM. Ces données ont permis de soulever l'hypothèse d'un effet bénéfique des composés antioxydants, comme des inhibiteurs de la formation de ROM, utilisés comme adjuvants dans l'immunothérapie par l'IL-2. *In vitro*, l'histamine prévient l'effet immunosuppresseur des ROM produits par les monocytes et macrophages sur l'activation des lymphocytes T et NK par l'IL-2. L'histamine semble donc un bon candidat, mais ses propriétés immunosuppressives médiées par les récepteurs H2 doivent être prises en compte. De nombreuses études révèlent que l'administration d'histamine par voie systémique supprime la croissance de nombreux types de tumeurs induites ou greffées chez les rongeurs (Tableau 15).

Chez l'homme, l'histamine a été utilisée comme adjuvant dans le traitement du mélanome malin métastatique (stade IV). L'ajout d'histamine à l'IL-2 et l'IFN- α conduit à une régression de la masse tumorale et à un prolongement de la survie des patients (Hellstrand *et al.*, 1994, 1997). L'histamine semble également bénéfique pour les patients qui présentaient des métastases hépatiques, considérées réfractaires à l'IL-2 et à l'IFN- α . Deux études cliniques de phase III incluant plus de 600 patients souffrants de mélanomes métastatiques sont aujourd'hui en cours, afin d'évaluer l'effet d'un traitement combiné histamine + IL-2 ou histamine + IL-2 + IFN- α .

Une étude clinique de phase III concernant le traitement de leucémies aiguës myéloïdes avec de l'IL-2 et de l'histamine est également en cours. Cette étude est basée sur le fait que, *in vitro*, l'histamine et l'IL-2 agissent en synergie pour stimuler la lyse des blastes leucémiques par les lymphocytes NK. Une étude préalable, dont le but était la protection des patients en rémission contre la rechute, a montré une bonne tolérance et un effet bénéfique du traitement combiné IL-2 + histamine (Brune *et al.*, 1996).

L'utilisation d'histamine comme adjuvant représente ainsi une nouvelle stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité de l'immunothérapie anticancéreuse utilisant l'IL-2 et l'IFN- α , cytokines qui stimulent l'activité antitumorale des lymphocytes NK mais ne sont pas suffisamment efficaces dans la réduction de la tumeur.

BUT DU TRAVAIL

Le but de ce travail est l'étude des effets de l'histamine sur les cellules dendritiques humaines.

Les mastocytes et les cellules dendritiques sont physiquement proches dans les tissus connectifs. De plus, les mastocytes produisent des médiateurs comme le TNF- α qui influencent l'activation et la maturation des cellules dendritiques. L'objectif des expériences a donc été dans un premier temps l'évaluation des effets de l'histamine, libérée par les mastocytes lors de la réaction allergique, sur l'activation et la maturation des cellules dendritiques.

La réaction allergique est non seulement associée à une forte production d'histamine, mais aussi à une réponse immune spécifique de l'allergène de type Th2. Les cellules dendritiques, elles-mêmes polarisées en DC1 ou DC2, sont largement impliquées dans la polarisation des cellules Th. Actuellement, la nature des médiateurs présents sélectivement dans la réaction allergique et impliqués dans la polarisation en DC2 reste à être déterminée. Nous avons ainsi évalué dans un second temps si l'histamine pouvait polariser les cellules dendritiques et de ce fait influencer la différenciation des cellules Th naïves en Th1 ou Th2.

Ces différents paramètres ont été analysés sur des cellules dendritiques humaines immatures qui ont été générées *in vitro* à partir de monocytes isolés du sang périphérique au moyen de billes magnétiques, cultivés pendant 5 jours en présence de GM-CSF et d'IL-4 pour induire leur différenciation.

RESULTATS

I - Effet de l'histamine sur l'activation et la maturation des cellules dendritiques

1. Méthodologie

Les DC humaines immatures générées *in vitro* sont stimulées avec de l'histamine et différents paramètres sont analysés :

- l'expression des molécules de costimulation ou d'adhésion à la surface des DC traitées,
- la maturation des DC traitées (expression de CD83 et des récepteurs aux chimiokines),
- la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les DC traitées,
- les propriétés costimulatrices des DC traitées (MLR).

2. Résultats : publication n°1

Les résultats d'analyses par cytométrie en flux montrent que l'histamine induit l'expression de CD86 sur un pourcentage de DC qui augmente de manière dose-dépendante (significatif à 0,1 μ M et maximum à 50 μ M) et transitoire (maximum 24 heures après stimulation). Cet effet n'étant pas inhibé par la polymixine B, il n'est donc pas lié à une éventuelle contamination de l'histamine par du LPS. Un effet additif de l'histamine et du TNF- α est également observé, quelle que soit la concentration d'histamine ou de TNF- α (**Figure 1** de la publication 1).

En plus de CD86, l'histamine augmente également transitoirement l'expression de différents marqueurs de surface comme CD40, CD49d, CD54, CD80, MHC II (**Table I** de la publication 1). Cependant, quel que soit le temps de stimulation, nous n'avons jamais détecté d'expression de CD83, molécule caractérisant les DC matures. L'histamine n'induit pas non plus l'expression des récepteurs aux chimiokines constitutives CXCR4 et CCR7, ni la diminution de l'expression de CCR5, récepteur aux chimiokines inflammatoires, processus normalement associés à la maturation et à la migration des DC (**Figure 2** de la publication 1). De plus, les DC traitées à l'histamine ne présentent pas une morphologie de DC matures. Ces résultats montrent que l'histamine active les DC, mais n'induit pas leur maturation.

L'histamine induit la production des cytokines proinflammatoires et des chimiokines IL-6, IL-8, MIP-1 α et MCP-1 (dosages ELISA), elle augmente l'expression des ARNm codant pour IL-1 β , RANTES, et MIP-1 β (RT-PCR), mais elle n'induit pas la production de TNF- α , d'IL-10, d'IL-12 ou d'IL-18 (**Figure 3** de la publication 1).

Des DC stimulées 24 heures avec de l'histamine stimulent de manière plus efficace la prolifération de lymphocytes T allogéniques que des DC non traitées (MLR). Alors qu'elles stimulent peu la prolifération de T naïfs, elles induisent de manière aussi efficace que des DC traitées au TNF- α la prolifération des T mémoire (**Figure 4** de la publication 1).

Au moyen d'antagonistes des récepteurs H1, H2 et H3 de l'histamine, nous avons montré que l'activation des DC par l'histamine (expression du CD86 et production d'IL-8) est médiée par les récepteurs H1 et H2 (**Figure 5** de la publication 1).

Les résultats présentés dans la publication n°1 montrent que l'histamine augmente transitoirement l'expression de marqueurs de surface comme CD86 à la surface des DC immatures, qu'elle induit la production de cytokines et particulièrement de nombreuses chimiokines, et que ses effets sont médiés par les deux récepteurs H1 et H2. En conclusion, ces données suggèrent que l'histamine n'est pas seulement impliquée dans la réaction immédiate d'hypersensibilité mais participe également à la réaction tardive d'inflammation. L'histamine, relarguée localement par les mastocytes activés, peut stimuler les DC résidentes et ainsi participer au développement d'une réaction inflammatoire et d'une réponse immune spécifique.

PUBLICATION N°1

The Journal of Immunology, 2001 May 15;166(10):6000-6006.

Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells.

Gersende Caron, Yves Delneste, Edith Roelandts, Catherine Duez, Nathalie Herbault, Giovanni Magistrelli, Jean-Yves Bonnefoy, Joël Pestel, and Pascale Jeannin.

Mast cells and immature dendritic cells (DC) are in close contact in peripheral tissues. Upon activation, mast cells release histamine, a mediator involved in the immediate hypersensitivity reaction. We therefore tested whether histamine could affect human DC activation and maturation. Histamine induces CD86 expression on immature DC in a dose-dependent (significant at 10^{-7} M) and transient manner (maximal after 24-h stimulation). Histamine also transiently up-regulates the expression of the costimulatory and accessory molecules, CD40, CD49d, CD54, CD80, and MHC class II. As a consequence, immature DC exposed for 24 h to histamine stimulate memory T cells more efficiently than untreated DC. In addition, histamine induces a potent production of IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein 1, and macrophage-inflammatory protein 1alpha by immature DC and also up-regulates IL-1beta, RANTES, and macrophage-inflammatory protein 1beta but not TNF-alpha and IL-12 mRNA expression. Histamine activates immature DC through both the H1 and H2 receptors. However, histamine-treated DC do not have a phenotype of fully mature cells, as they do neither show significant changes in the expression of the chemokine receptors, CCR5, CCR7 and CXC chemokine receptor 4, nor expression of CD83 de novo. These data demonstrate that histamine activates immature DC and induces chemokine production, thereby suggesting that histamine, via stimulation of resident DC, may participate locally in T cell stimulation and in the late inflammatory reaction associated with allergic disorders.

Histamine Induces CD86 Expression and Chemokine Production by Human Immature Dendritic Cells

Gersende Caron,^{*‡} Yves Delneste,^{*} Edith Roelandts,[†] Catherine Duez,[‡] Nathalie Herbault,^{*} Giovanni Magistrelli,^{*} Jean-Yves Bonnefoy,^{*} Joel Pestel,[‡] and Pascale Jeannin^{1*}

Mast cells and immature dendritic cells (DC) are in close contact in peripheral tissues. Upon activation, mast cells release histamine, a mediator involved in the immediate hypersensitivity reaction. We therefore tested whether histamine could affect human DC activation and maturation. Histamine induces CD86 expression on immature DC in a dose-dependent (significant at 10^{-7} M) and transient manner (maximal after 24-h stimulation). Histamine also transiently up-regulates the expression of the costimulatory and accessory molecules, CD40, CD49d, CD54, CD80, and MHC class II. As a consequence, immature DC exposed for 24 h to histamine stimulate memory T cells more efficiently than untreated DC. In addition, histamine induces a potent production of IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein 1, and macrophage-inflammatory protein 1 α by immature DC and also up-regulates IL-1 β , RANTES, and macrophage-inflammatory protein 1 β but not TNF- α and IL-12 mRNA expression. Histamine activates immature DC through both the H1 and H2 receptors. However, histamine-treated DC do not have a phenotype of fully mature cells, as they do neither show significant changes in the expression of the chemokine receptors, CCR5, CCR7 and CXC chemokine receptor 4, nor expression of CD83 *de novo*. These data demonstrate that histamine activates immature DC and induces chemokine production, thereby suggesting that histamine, via stimulation of resident DC, may participate locally in T cell stimulation and in the late inflammatory reaction associated with allergic disorders. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 6000–6006.

Dendritic cells (DC)² are the most potent APCs. Located in peripheral nonlymphoid tissues, immature DC are “sentinels” that capture foreign Ags very efficiently (1, 2). After Ag challenge or stimulation with inflammatory stimuli (such as IL-1 and TNF- α), DC migrate to the secondary lymphoid organs (1–3). During their migration, they undergo modulations of phenotype and function, referred to as DC maturation. They express increased levels of surface Ags involved in T cell activation such as costimulatory molecules (e.g., CD54 and CD86) and MHC class I and II molecules (1, 2). They produce numerous cytokines (e.g., IL-1 β and IL-6) and chemokines (e.g., monocyte chemoattractant protein (MCP) 1, macrophage-inflammatory protein (MIP) 1 α , MIP-1 β , IL-8, and RANTES) that favor lymphocyte recruitment and activation (4, 5). Moreover, they also down-regulate the expression of receptors for inflammatory chemokines (e.g., CCR1 and CCR5) and up-regulate those for constitutive chemokines (i.e., CCR7 and CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)), therefore allowing maturing DC to migrate from the periphery to the lymph nodes (6). At the same time, they lose their capacity to process Ag and neoexpress some molecules (such as CD83 on human cells). In

the T cell-dependent areas of the lymphoid organs, myeloid migratory DC have acquired potent immunostimulatory properties and sensitize recirculating naive Ag-specific T cells (1, 2).

Mast cells are present in tissues in proximity to surfaces that interface the external environment. In allergic individuals, a contact with the sensitizing allergen results in the activation of mast cells through allergen-specific IgE bound to high-affinity IgE receptors (Fc ϵ RI). Activated mast cells release preformed (e.g., histamine) and newly synthesized mediators (such as prostaglandins, leukotrienes, cytokines, and chemokines) (7, 8). Among these mediators, histamine elicits almost all of the pathologic processes involved in immediate allergic reaction (such as vasodilation, smooth muscle contraction, mucus hypersecretion, and edema formation) (9–12). Histamine also presents immunoregulatory properties. It induces E-selectin, ICAM-1, and LFA-1 expression (10, 13), IL-6 and IL-8 production by endothelial cells (14, 15), and IL-1, IL-6, IL-18, and IFN- γ production by PBMC (16–18). In parallel to these proinflammatory effects, histamine has immunosuppressive properties. It induces IL-10 and prevents LPS-induced TNF- α and IL-12 production by monocytes/macrophages (19–22). Histamine exerts its effects through three receptors, H1, H2, and H3 (10, 12). Although H1 and H2 receptors are expressed on numerous cell types, including lymphoid cells, monocytes, and endothelial cells, H3 is mainly expressed in the brain where histamine functions as a neurotransmitter. Signaling through H1 receptor involves the activation of the phospholipase C and controls most of the effects of histamine in allergic disorders (smooth muscle contraction and increased vasopermeability). Signaling through H2 receptors involves cAMP generation and controls gastric acid secretion and vasodilation (10, 12).

Because mast cells and immature DC are in close proximity throughout connective tissues (such as those from the respiratory tract and the skin), we have evaluated whether histamine released by activated mast cells may affect DC maturation.

*Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien en Genevois, France; [†]Pharmacie Centrale, Centre Hospitalier, Hazebrouck, France; and [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 416, Institut Pasteur, Lille, France

Received for publication August 28, 2000. Accepted for publication March 6, 2001.

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

¹ Address correspondence and reprint requests to Dr. Pascale Jeannin, Center d'Immunologie Pierre Fabre, 5, Avenue Napoléon III, F-74164 Saint-Julien en Genevois, France. E-mail address: pascale.jeannin@pierre-fabre.com

² Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; MCP, monocyte chemoattractant protein; MIP, macrophage-inflammatory protein; MFI, mean fluorescence intensity; PI, proliferation index; LC, Langerhans cell.

Materials and Methods

Human DC generation

PBMC were isolated from healthy volunteers by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Monocytes were purified from PBMC by positive selection using a MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purity assessed by FACS analysis using a FITC-labeled anti-CD13 mAb (Cymbys, Hants, U.K.) was >98%. Monocytes were cultured in complete medium (CM) consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 10 mM HEPES, and 0.1 mM nonessential amino acids (all from Life Technologies, Cergy Pontoise, France) at 5×10^6 cells/5 ml/well in six-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml GM-CSF (both from R&D Systems, Abingdon, U.K.). At day 7, cells were analyzed by FACS, as described above: only homogeneous immature DC populations characterized by high levels of CD1a (mean fluorescence intensity (MFI) from 100 to 800) and no CD83 expression were used. DC were then recultured at 10^5 cells/200 µl/well in 96-well flat-bottom tissue culture plates (Costar) in cytokine-containing CM without or with different concentrations of histamine (Sigma, St. Louis, MO). In some experiments, DC were also exposed to different concentrations of the H1, H2, or H3 receptor antagonists, mepyramine, cimetidine, or thioperamide (all from Sigma), respectively, for 1 h before addition of histamine. In others, immature DC were stimulated with TNF- α (R&D Systems), LPS (from *Escherichia coli* isotype 0111:B4), or exposed to 10 µg/ml polymixin B sulfate (Sigma).

Flow cytometric measurement of surface Ag expression

FACS analysis was performed using a FACS Vantage cytometer (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) with the following mAbs: FITC-labeled anti-CD1a (Immunoquality Products, Groningen, The Netherlands), anti-CD80, anti-CD86, anti-CCR5 (all from PharMingen, San Diego, CA), anti-CD49d (Immunotech, Marseille, France), anti-CD54, anti-HLA-DR (both from Becton Dickinson), and anti-CD40 mAbs (Serotec, Oxford, U.K.). The binding of the anti-CD83 mAb (Immunotech) was revealed by FITC-labeled anti-mouse IgG Ab (Silenus, Melbourne, Australia). Control isotype mAbs were purchased from Becton Dickinson. Results are expressed as a percentage of positive cells or in MFI values after subtraction of the MFI obtained with the control mAb.

Analysis of mRNA expression by RT-PCR

The expression of the mRNA encoding for IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-18, TNF- α , MCP-1, MIP-1 α , RANTES, CCR5, CCR7, and CXCR4 was determined by RT-PCR. After 8 and/or 30 h of culture with 10^{-5} M histamine, total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Rockville, MD) and the single-strand cDNA was synthesized using 2 µg of total RNA by RT using an oligo(dT) primer (Amersham Pharmacia Biotech). PCR was performed with cDNA corresponding to 50 ng of total RNA and primers designed to amplify the coding sequence of the cytokines and chemokines (4, 5, 23). PCR was as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles (25 cycles for IL-8 and MIP-1 α) 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min followed by a final extension at 72°C for 5 min. RNA integrity and cDNA synthesis were verified by amplifying GAPDH cDNA (5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' and 5'-ACCA CAGTCCATGCCATCAC-3'). The amplified fragments were size-separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide.

Cytokine and chemokine quantification

Day 7 DC were stimulated as described above and the concentration of IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, MCP-1, MIP-1 α , and TNF- α was determined in the 24- or 72-h cell-free culture supernatants by ELISA (R&D Systems) (sensitivity of 0.7, 10, 0.5, 0.5, 5, 10, and 4.4 pg/ml, respectively). Results are expressed in pg/ml or in ng/ml (as mean \pm SD, $n = 4$).

T cell proliferation assays

Day 7 DC were washed, recultured at 2.5×10^6 cells/5 ml/well in six-well culture plates in cytokine-containing CM, and were or were not stimulated with 10^{-5} M histamine or 20 ng/ml TNF- α . After 24 h, DC were irradiated (3000 rad) and cultured with T cells in quintuplicate. In MLR, DC at 2×10^2 , 1×10^3 , or 5×10^3 cells/200 µl/well in 96-well flat-bottom plates were cultured with 10^5 allogenic T cells purified from PBMC from healthy volunteers by rosetting with SRBC (the purity assessed by FACS analysis using a FITC-labeled anti-CD3 mAb was >95%). In anti-CD3 mAb proliferation assays, DC at 5×10^2 , 5×10^3 , 1×10^4 , and 2×10^4 cells/200 µl/well in 96-well flat-bottom plates were cultured with 5×10^4 allogenic

naive (CD45RA⁺) or memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells and stimulated with a suboptimal concentration (10 ng/ml) of anti-CD3 mAb. After rosetting and CD8 depletion, CD4⁺ CD45RA⁺ and CD4⁺ CD45RO⁺ T cells were purified by MACS using a positive selection of CD45RA⁺ or CD45RO⁺ T cells, respectively. After 3 days in anti-CD3 mAb or 5 days in MLR assays, cells were pulsed during the last 16 h with [³H]thymidine (0.25 µCi/well; Amersham Pharmacia Biotech). Radioactive incorporation was measured by standard liquid scintillation counting and results are expressed in cpm (mean of quintuplicate values) or in proliferation index (PI) defined as followed: A/B , where A and B are the cpm values obtained in the presence or absence of stimulus, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Student's t test. Values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Results

Histamine induces a potent and transient expression of CD86 on human immature DC

To evaluate the effect of histamine on DC, human immature DC were exposed to 10^{-8} – 10^{-4} M histamine and CD86 expression was analyzed by flow cytometry. CD86 expression is undetectable on immature DC (<6% positive cells in day 7 monocyte-derived DC) and is induced by histamine on a percentage of cells that increases dose dependently (Fig. 1, *A* and *B*). One day after exposure, CD86 expression is significant with 10^{-7} M histamine ($11\% \pm 4$ of CD86-positive cells, mean% \pm SD, $n = 5$) and maximal with 5×10^{-5} M ($75\% \pm 10$; Fig. 1*B*).

In contrast to LPS (data not shown) or TNF- α (1, 2), histamine-induced CD86 expression is transient (Fig. 1*C*). The expression of CD86 induced by 10^{-5} M histamine is detectable after 6 h, maximal at 24 h (65 ± 10 , mean% \pm SD, $n = 5$), and returns to basal level at later time points. Addition of histamine at 24 h and/or 48 h failed to sustain this effect (data not shown).

As histamine and preformed TNF- α are released concomitantly by mast cells (7, 8), we then tested the addition of these mediators together on immature DC. An additive effect of histamine and TNF- α on CD86 expression on DC is observed at any concentration used (Fig. 1*D*).

Finally, the observation that polymixin B down-regulates LPS but not histamine-induced CD86 expression allows us to exclude contaminating endotoxin in histamine preparation (Fig. 1*E*).

In conclusion, these data show that histamine activates human immature DC as assessed by the induction of CD86 expression.

Histamine transiently up-regulates costimulatory molecule expression on human immature DC

When stimulated by proinflammatory cytokines (e.g., TNF- α) or bacterial products (e.g., LPS), DC undergo a maturation process characterized by an up-regulation of molecules related to Ag presentation, a change in chemokine receptor expression, and the neo-expression of the maturation marker CD83 (1, 2, 6). Exposure of immature DC to histamine results in a marked up-regulation of CD40, CD49d, CD54, CD80, and HLA-DR expression (Table I). As observed for CD86, histamine transiently up-regulates these molecule expressions; the effect of histamine is maximal after 1 day and undetectable after 4 days (Table I).

However, histamine-treated DC do not acquire CD83 expression (Table I) nor present veils (data not shown). At any time point analyzed, histamine does not significantly modulate CCR5 expression as assessed at the transcriptional (Fig. 2*A*) and translational (Fig. 2*B*) levels nor induce CCR7 and CXCR4 mRNA expression (Fig. 2*A*). In contrast, LPS decreases CCR5 expression (Fig. 2*B*) and induces CCR7 and CXCR4 mRNA expression on immature DC (Fig. 2*A*) (24).

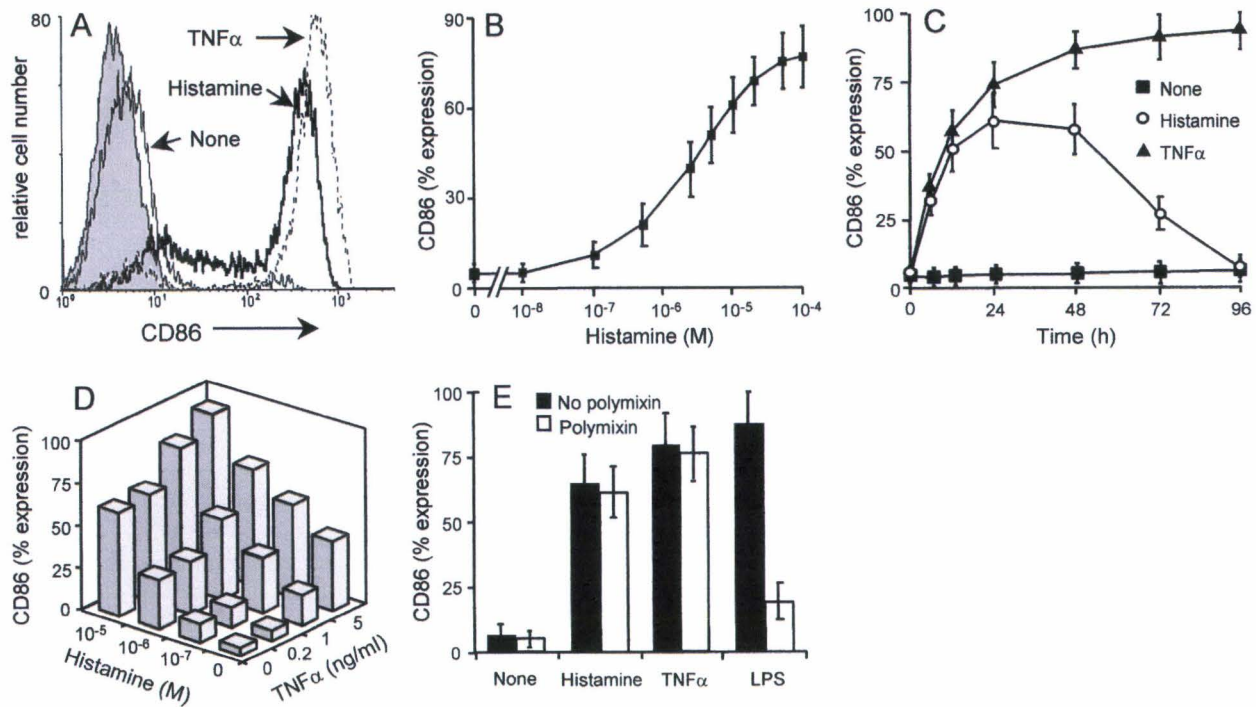


FIGURE 1. Histamine induces CD86 expression on human immature DC. *A*, Immature DC were or were not exposed to 10^{-5} M histamine or 20 ng/ml TNF- α . After 24 h, CD86 expression on untreated (thin line), histamine-treated (bold line), or TNF- α -treated DC (dotted line) was analyzed by FACS using FITC-labeled anti-CD86 mAb (open histograms). Filled histogram shows the binding of an isotype control mAb to histamine-treated DC. *B*, Immature DC were exposed to graded doses of histamine. *C*, Immature DC were either untreated (■) or exposed to 10^{-5} M histamine (○) or 20 ng/ml TNF- α (▲). *D*, Immature DC were exposed to combinations of increasing doses of histamine (from 10^{-7} to 10^{-5} M) and TNF- α (from 0.2 to 5 ng/ml). *E*, Immature DC were exposed to 10^{-5} M histamine, 20 ng/ml TNF- α , or 10 ng/ml LPS in the absence (■) or presence (□) of 10 μ g/ml polymyxin B. *B–E*, CD86 expression was analyzed by FACS after 24 h (*B*, *D*, and *E*) or at different time points (*C*). *B–E*, Results are expressed in percentage of CD86-expressing cells as mean \pm SD of five separate experiments (*B*, *C*, and *E*) or as one representative of three experiments (*D*).

Taken together, these data show that histamine transiently activates immature DC (as assessed by an up-regulation of costimulatory and MHC class II molecule expression) but does not confer to DC all of the characteristics of fully mature cells.

Histamine induces proinflammatory cytokine and chemokine production by human immature DC

Upon stimulation, DC produce proinflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6, IL-12, and TNF- α) and chemokines involved in leukocyte recruitment (such as MIP-1 α , MIP-1 β , IL-8, RANTES, and MCP-1) (4, 5). We therefore tested whether histamine may up-regulate cytokine production by DC. Histamine induces a production of IL-8 by immature DC that is dose dependent, significant at

4×10^{-7} M and maximal at 10^{-5} M (Fig. 3*A*). Histamine also induces IL-6, MCP-1, and MIP-1 α production (Fig. 3*B*). Histamine up-regulates IL-8, IL-6, MCP-1, and MIP-1 α mRNA expression and also IL-1 β , MIP-1 β , and RANTES mRNA expression (Fig. 3*C*).

In contrast, histamine does not induce the production of detectable levels of IL-10, p70 IL-12, and TNF- α by DC after 24 or 72 h (Fig. 3*B*) nor up-regulate IL-10, p35, and p40 IL-12, IL-18, and TNF- α mRNA expression after 8 h (Fig. 3*C*) or 16 h (data not shown). IL-10 is a cytokine that inhibits DC maturation (25). In agreement with the absence of detectable levels of IL-10 in the supernatant of histamine-treated DC, neutralizing anti-IL-10 Ab does not enhance the histamine effect on DC (data not shown).

Table I. Histamine up-regulates costimulatory molecule expression on DC^a

	Day 1			Day 4		
	None	Histamine	TNF- α	None	Histamine	TNF- α
CD40	157 \pm 16	221 \pm 23	415 \pm 52	186 \pm 21	195 \pm 25	594 \pm 69
CD49d	11 \pm 2	20 \pm 4	28 \pm 4	13 \pm 2	14 \pm 3	54 \pm 9
CD54	127 \pm 21	216 \pm 32	550 \pm 61	191 \pm 29	199 \pm 34	957 \pm 84
CD80	10 \pm 1	19 \pm 2	27 \pm 5	12 \pm 2	13 \pm 2	47 \pm 7
CD83 ^b	9 \pm 2	10 \pm 3	114 \pm 19	10 \pm 2	12 \pm 4	197 \pm 23
	(2% \pm 1)	(3% \pm 1)	(86% \pm 11)	(3% \pm 1)	(5% \pm 1)	(96% \pm 4)
CD86 ^b	12 \pm 4	177 \pm 21	192 \pm 35	19 \pm 5	25 \pm 6	253 \pm 46
	(5% \pm 3)	(65% \pm 8)	(81% \pm 10)	(8% \pm 3)	(11% \pm 4)	(95% \pm 5)
HLA-DR	334 \pm 21	555 \pm 25	968 \pm 87	447 \pm 29	489 \pm 26	1695 \pm 178

^a Immature DC were either untreated or exposed to 10^{-5} M histamine or 20 ng/ml TNF- α . CD40, CD49d, CD54, CD80, CD83, CD86, and HLA-DR expression was analyzed by FACS after 1 and 4 days. Results are expressed in MFI values as mean \pm SD of three separate experiments.

^b In parentheses, the percentage of positive cells is shown as mean \pm SD ($n = 3$).

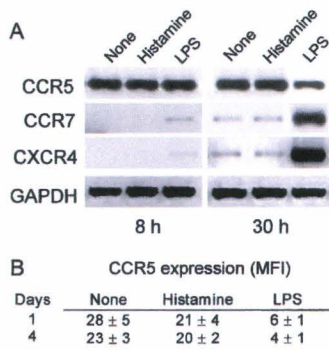


FIGURE 2. Histamine does not induce CXCR4 and CCR7 mRNA expression by immature DC. DC were or were not exposed to 10^{-5} M histamine or 10 ng/ml LPS. *A*, CCR5, CCR7, and CXCR4 mRNA expression was evaluated by RT-PCR analysis after 8 and 30 h. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA. Results are representative of two experiments. *B*, CCR5 expression was analyzed by FACS. Results are expressed in MFI values as mean \pm SD of three separate experiments.

As expected, LPS and TNF- α induce the production of these cytokines (except TNF- α that did not induce IL-12 production by DC) (Fig. 3, *B* and *C*). Although immature DC constitutively express IL-18 mRNA (4, 26), we failed in detecting IL-18 production, in the absence of T cells (27), after stimulation with histamine, LPS, or TNF- α for 24 or 72 h (data not shown).

Thus, histamine induces the expression of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 and of the chemokines IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES by human immature DC.

Histamine enhances DC accessory capacity

Based on the observation that histamine activates immature DC, we therefore tested in T cell proliferation assays whether histamine may enhance DC accessory capacities.

In anti-CD3 mAb assays, naive and memory CD4⁺ T cells were stimulated with a suboptimal concentration of anti-CD3 mAb and cocultured with DC either untreated or treated with histamine or TNF- α (Fig. 4, *A* and *B*). Histamine-treated DC stimulate the proliferation of memory T cells more efficiently than naive T cells (PI = 3.9 ± 0.5 and 1.9 ± 0.2 , respectively, mean \pm SD, $n = 3$, at 10^4 DC/well). As expected, TNF- α -treated mature DC stimulate efficiently both naive and memory T cell proliferation (PI = 4.5 ± 0.8 and 4.8 ± 0.7 ; Fig. 4, *A* and *B*).

CD86 is required for an efficient generation of primary MLR directed against alloantigen (28). In primary MLR assays, we therefore compared the ability of DC either untreated or treated with histamine or TNF- α (positive control) to stimulate the proliferation of T cells from different donors. Histamine-treated DC stimulate allogenic T cell proliferation although to a lower extent than TNF- α -treated DC (PI = 2.8 ± 0.4 and 5.1 ± 0.8 , respectively, mean \pm SD, $n = 3$, at 10^3 DC/well; Fig. 4*C*).

Thus, histamine-treated DC present enhanced costimulatory properties as assessed by an efficient stimulation of memory T cell proliferation.

Histamine activates DC through H1 and H2 receptors

Histamine exerts its effects through three receptors, H1, H2, and H3 (10, 12). Using specific receptor antagonists, we then analyzed which receptor is involved in histamine-induced DC activation. DC were exposed to 10^{-4} M of each of the H1, H2, or H3 receptor

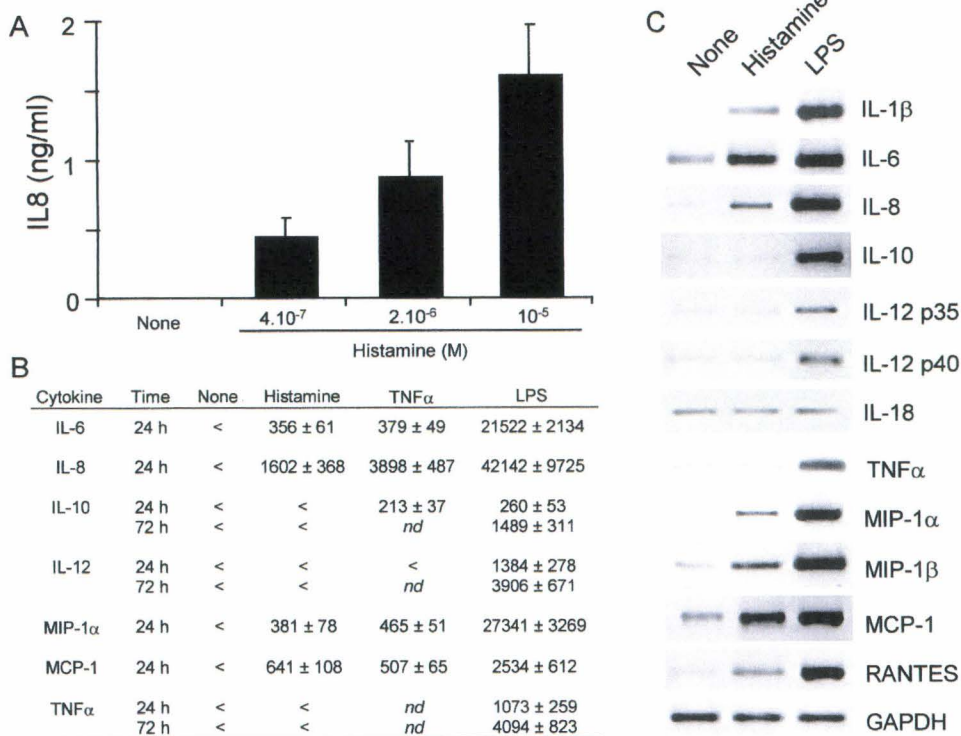
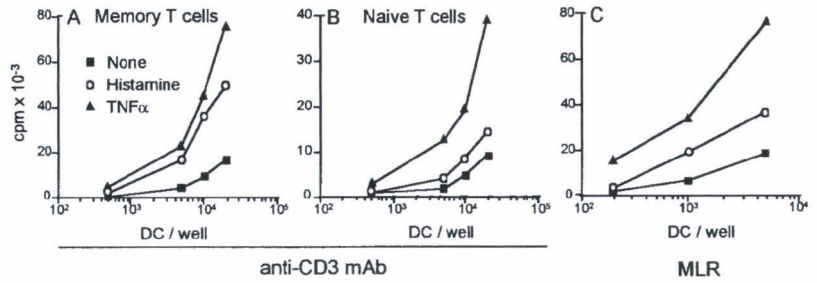


FIGURE 3. Histamine induces cytokine production by human immature DC. *A* and *B*, Immature DC were either untreated or exposed to graded doses of histamine (*A*) or 10^{-5} M histamine, 20 ng/ml TNF- α , or 10 ng/ml LPS (*B*). Cytokines were quantified in the 24-h and/or 72-h supernatants. Results are expressed in ng/ml (*A*) or pg/ml (*B*) as mean \pm SD of four separate experiments. nd, Not done, <, undetectable. *C*, Immature DC were either untreated or exposed to 10^{-5} M histamine or 10 ng/ml LPS. After 8 h, the expression of the mRNA encoding for the mentioned cytokines was evaluated by RT-PCR analysis. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA.

FIGURE 4. Histamine enhances the T cell stimulatory properties of DC. Immature DC were either untreated (■) or exposed to 10^{-5} M histamine (○) or 20 ng/ml TNF- α (▲). After 24 h, DC were irradiated and cultured with freshly isolated CD45RO⁺ CD4⁺ memory (A) or CD45RA⁺ CD4⁺ naive T cells (B), or with freshly isolated allogenic T cells (C), in the absence (C) or presence (A and B) of a suboptimal concentration of an anti-CD3 mAb. T cell proliferation was measured at day 3 (A and B) or day 5 (C). Results are expressed in cpm as mean of quintuplicate values and results are representative of one of three experiments.



antagonists (mepyramine, cimetidine, or thioperamide, respectively) 1 h before addition of 10^{-5} M histamine. None of these antagonists has an effect by itself on CD86 expression or IL-8 production by DC (Fig. 5). Results show that mepyramine and cimetidine significantly prevent histamine-induced CD86 expression (decrease of $58\% \pm 6$ and $72\% \pm 5$, respectively; mean \pm SD, $n = 4$) and IL-8 production by DC (decrease of $86\% \pm 5$ and $92\% \pm 4$, respectively; Fig. 5). In contrast, no effect of thioperamide on histamine-induced DC activation is observed (Fig. 5). Taken together, these data show that histamine activates human DC by acting through both H1 and H2 receptors.

Discussion

We demonstrate that histamine activates human immature DC as assessed by an up-regulation of costimulatory molecule expression and by a production of proinflammatory cytokines and chemokines.

We demonstrate for the first time that histamine up-regulates numerous chemokine production. It induces IL-8, MCP-1, and MIP-1 α production and up-regulates MIP-1 β and RANTES mRNA expression by immature DC. All of these chemokines are involved in the recruitment of numerous cell types including T cells, monocytes, neutrophils, and immature DC (29, 30) and in the development of the cellular influx associated with the late phase

reaction (31). Furthermore, IL-8, MIP-1 α , RANTES, and MCP-1 recruit mast cells/basophils and induce histamine release (29), suggesting a positive feedback that may contribute to sustain the inflammatory reaction.

In addition, histamine acts directly on immature DC to control proinflammatory cytokine production. In agreement with data reporting that histamine induces IL-1 and IL-6 production by PBMC (16, 17) and IL-6 production by endothelial cells (15), we show that histamine up-regulates the expression of the two proinflammatory cytokines by DC. Moreover, in accordance with data obtained using monocytes/macrophages (18–21), histamine does not induce TNF- α nor IL-12 production by DC. Histamine has been shown to induce IL-10 production by alveolar macrophages (22). In contrast, others reported that histamine alone did not induce IL-10 production by PBMC (18, 21). In agreement with this study, we report no detectable effect of histamine on IL-10 production by DC. Finally, although histamine induces IL-18 production by PBMC (18), we failed in detecting an effect of histamine on IL-18 production by DC in the absence of T cells (26, 27). These data point out a tight control of proinflammatory cytokine production by histamine which may differ with the nature of the target cells.

Several hours after an allergen challenge, some allergic patients develop a late inflammatory reaction (also named late phase reaction) characterized by a local infiltrate of eosinophils, memory T cells, and neutrophils that contribute to the tissue damage. The recruitment and activation of these inflammatory cells involve a series of events, including transendothelial migration of leukocytes and subsequent chemotactic movements, that are regulated by proinflammatory cytokines and chemokines (24). Based on the observations that histamine induces IL-8 production by endothelial cells (14) and that histamine challenge increases neutrophil, mast cell, and leukocyte numbers in the bronchoalveolar lavage from healthy subjects (32), it is now suspected that, in addition to its effects in the immediate reaction associated to allergic diseases, histamine also participates in the late inflammatory reaction. The present data show that histamine, in addition to inducing the production of the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6, up-regulates chemokine production by DC and thereby evidence a direct mechanism by which histamine may participate in the initiation of the inflammatory reaction.

Although histamine-treated DC have not all of the characteristics of fully mature cells (compared with stimuli that induce DC maturation and migration such as LPS and TNF- α), they transiently express high levels of CD86 and other costimulatory molecules. In agreement with this observation, results from proliferation assays show that histamine enhances the costimulatory properties of DC. Interestingly, although histamine-treated DC are as effective as fully mature DC in stimulating memory T cell proliferation, they only slightly enhance naive T cell proliferation. Both of these observations are in agreement with the fact that memory T cells require less stringent and sustained cosignals than

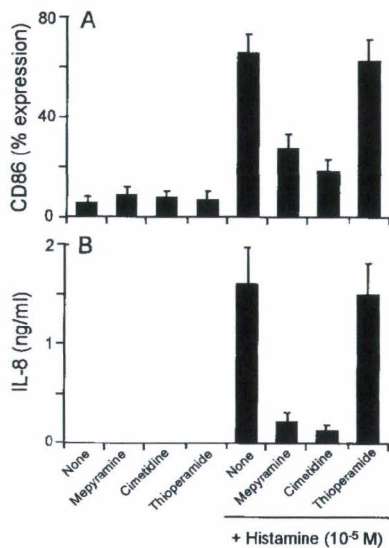


FIGURE 5. H1 and H2 receptors are involved in histamine-induced DC activation. A and B, Day 7 immature DC were either untreated or exposed to 10^{-4} M of the H1, H2, or H3 receptor antagonists (mepyramine, cimetidine, or thioperamide, respectively) for 1 h before addition of 10^{-5} M histamine. After 24 h, CD86 expression was evaluated by flow cytometry (A) and IL-8 was quantified in the supernatants (B). Results are expressed in a percentage of positive cells (A) or in ng/ml (B) as mean \pm SD of four separate experiments.

naive cells to be efficiently activated (33). We also report that histamine only poorly affects the expression of the chemokine receptors CCR5, CCR7, and CXCR4, therefore suggesting that these DC could be unable to migrate from the periphery to the lymph nodes (6). In contrast to naive T cells that migrate to the lymph nodes, memory T cells are preferentially located in peripheral tissue (34, 35). Thus, we could speculate that histamine by activating DC may participate, at the inflammatory site, in memory T cell restimulation (36). This is reinforced by the observation that histamine-treated DC produce chemokines involved in memory T cell recruitment (such as RANTES, MCP-1, and MIP-1 α) (29). Taken together, our *in vitro* data suggest that histamine by acting on immature DC may favor *in situ*-specific T cell stimulation.

In allergic patients, allergen-specific T cells and mast cells produce IL-4, a Th2 lymphokine that plays a central role in IgE synthesis and in the induction and maintenance of allergic responses (37, 38). MCP-1 stimulates IL-4 production by T cells, attracts memory effector T cells, and is required for the development of a Th2 response (39, 40). In contrast, IL-12 induces IFN- γ production and prevents the development of a Th2 response. The findings that histamine induces MCP-1 production and does not affect IL-12 production suggest that histamine may contribute to maintain a Th2 polarization in allergic diseases. However, since histamine also induces IL-18 and IFN- γ production by PBMC (18), whether histamine may modulate Th1/Th2 orientation remains to be evaluated. Nevertheless, the observation that histamine activates DC, added to data from others showing that histamine acts on B and T cells to increase Ag receptor-mediated responses (41), suggest a direct role for histamine in the development of a specific immune response. Thus, histamine may participate in the immune and inflammatory responses associated with allergic disorders.

We report that histamine activates immature DC with an effect significant at concentrations ranging from 10^{-7} to 10^{-4} M. Although it remains difficult to determine precisely the concentration of histamine in the target organ, concentrations from 10^{-6} to 10^{-4} M were reported to be comparable to those measured in tissues after mast cell degranulation (16, 19, 42). For example, after allergen challenge, a concentration of 10^{-7} M was detected in nasal lavages of patients with allergic rhinitis, and this concentration was diluted 10- to 100-fold by the lavage procedure (43). Moreover, upon contact with the sensitizing allergen, mast cells from allergic patients concomitantly release different mediators (such as PGE₂, histamine, and preformed TNF- α) that may act in concert to stimulate DC. TNF- α synergizes with PGE₂ in inducing DC maturation *in vitro* (44). We report here an additive effect between TNF- α and histamine in inducing DC activation. According to these different points, the *in vitro* effects of histamine on DC described here probably reflect its *in vivo* activity at the inflammatory sites. Previous studies reported that epidermal Langerhans cells (LC) are not activated by classical proinflammatory stimuli (45), thus avoiding hyperresponsiveness to harmless Ags after skin damage (45, 46). In agreement with these data, we failed in activating *in vitro*-generated LC (derived from CD34⁺ cells (47) or monocytes (48)) by histamine (data not shown). If we consider that *in vitro*-generated LC are a relevant model, this observation suggests that, in atopic dermatitis (49), histamine released by mast cells after allergen exposure may act preferentially on dermal DC. Thus, these data show that histamine is a new proinflammatory molecule that activates DC and thereby suggests an interaction between immature DC and mast cells.

Histamine has been shown to affect cytokine production by leukocytes and endothelial cells by acting through H1, H2, or H3 receptors. The anti-inflammatory effects of histamine, including inhibition of LPS-induced IL-12 and TNF- α production and up-

regulation of IL-10 production by PBMC, are mediated through H2 (19–22); one report also involves H3 receptors in histamine-induced IL-10 production by macrophages (22). However, histamine has been shown to induce IL-6 and IL-8 production by endothelial cells through both H1 and H2 receptors (14, 15). In agreement with these findings, we observed that both H1 and H2 receptors are involved in histamine-induced DC activation. Finally, histamine increases TNF- α -induced E-selectin, ICAM-1, and LFA-1 expression on endothelial cells through H1 receptors (13). Together, these data suggest an inflammatory activity of histamine that is mediated through both H1 and H2 receptors and an anti-inflammatory role for H1 receptor antagonists.

In conclusion, we show that histamine induces chemokine production and activates DC via both H1 and H2 receptors. Since histamine is produced mainly by mast cells/basophils, these data suggest a direct cross-talk between mast cells and DC. Moreover, the ability of histamine to induce chemokine production demonstrates that histamine is not only involved in the early changes associated with allergic diseases but is also an integral component of the inflammatory response. Its ability to enhance DC costimulatory properties suggests that histamine also favor specific T cell activation.

References

1. Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10.
2. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
3. Roake, J. A., A. S. Rao, P. J. Morris, C. P. Larsen, D. F. Hankins, and J. M. Austyn. 1995. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 181:2237.
4. de Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vanberviel, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Y.-J. Liu, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.* 160:1666.
5. Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 29:1617.
6. Mantovani, A., P. Allavena, A. Vecchi, and S. Sozzani. 1998. Regulation of chemokine receptor expression in dendritic cells. *Res. Immunol.* 149:639.
7. Metcalfe, D. D., D. Baram, and Y. A. Mekori. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033.
8. Marone, G., G. Spadaro, V. De Marino, M. Aliperta, and M. Triggiani. 1998. Immunopharmacology of human mast cells and basophils. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 28:12.
9. White, M. 1999. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:378.
10. Bachert, C. 1998. Histamine: a major role in allergy? *Clin. Exp. Allergy* 28:15.
11. Naclerio, R. 1999. Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:382.
12. Novak, I., and A. Falus. 1997. Molecular biology and role of histamine in physiological and pathological reactions: a review. *Acta Biol. Hung.* 48:385.
13. Miki, I., A. Kusano, S. Ohta, N. Hanai, M. Otoshi, S. Masaki, S. Sato, and K. Ohmori. 1996. Histamine enhanced the TNF- α -induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cell. Immunol.* 171:285.
14. Jeannin, P., Y. Delneste, P. Gosset, S. Molet, P. Lassalle, Q. Hamid, A. Tscopoulos, and A.-B. Tonnel. 1994. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood* 84:2229.
15. Delneste, Y., P. Lassalle, P. Jeannin, M. Joseph, A.-B. Tonnel, and P. Gosset. 1994. Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 98:344.
16. Vannier, E., and C. A. Dinarello. 1993. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells: comparison with IL-1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 92:281.
17. Mor, S., A. Nagler, V. Barak, Z. T. Handzel, C. Geller-Bernstein, and I. Fabian. 1995. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukocyte Biol.* 58:445.
18. Kohka, H., M. Nishibori, H. Iwagaki, N. Nakaya, T. Yoshino, K. Kobashi, K. Saeki, N. Tanaka, and T. Akagi. 2000. Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN- γ in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 164:6640.
19. Vannier, E., L. C. Miller, and C. A. Dinarello. 1991. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor α via histamine H2 receptors. *J. Exp. Med.* 174:281.

20. van der Pouw Kraan, T. C., A. Slijders, L. C. Boeije, E. R. de Groot, A. E. Alewijnse, R. Leurs, and L. A. Aarden. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J. Clin. Invest.* 102:1866.
21. Elenkov, I. J., E. Webster, D. A. Papanicolaou, T. A. Fleisher, G. P. Chrousos, and R. L. Wilder. 1998. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J. Immunol.* 161:2586.
22. Sirois, J., G. Ménard, A. Moses, and E. Y. Bissonette. 2000. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H2 and H3 receptors: stimulation of IL-10 production. *J. Immunol.* 164:2964.
23. Sato, K., H. Kawasaki, H. Nagamaya, M. Enomoto, C. Morimoto, K. Tadokoro, T. Juji, and T. A. Takahashi. 2000. TGF- β 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J. Immunol.* 164:2285.
24. Sallusto, F., P. Schraerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760.
25. Buelens, C., V. Verhasselt, D. De Groot, K. Thielemans, M. Goldman, and F. Willems. 1997. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 27:1848.
26. Brossard, P., F. Grünebach, G. Stuhler, V. L. Reichardt, R. Möhle, L. Kanz, and W. Brugger. 1998. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92:4238.
27. Gardella, S., C. Andrei, A. Poggi, M. R. Zocchi, and A. Rubartelli. 2000. Control of interleukin-18 secretion by dendritic cells: role of calcium influxes. *FEBS Lett.* 481:245.
28. Lanier, L. L., S. O. O'Fallon, C. Somoza, J. H. Philipps, P. S. Linsley, K. Okulura, D. Daisuke, and M. Azuma. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154:97.
29. Zlotnik, A., J. Morales, and J. A. Hedrick. 1999. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit. Rev. Immunol.* 19:1.
30. Mantovani, A. 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* 20:254.
31. Teran, L. M., and D. E. Davies. 1996. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy* 26:1005.
32. Soderberg, M., R. Lundgren, L. Bjermer, N. Stjernberg, and L. Rosenberg. 1989. Inflammatory response in bronchoalveolar lavage fluid after inhaling histamine. *Allergy* 44:98.
33. Dutton, R. W., L. M. Bradley, and S. L. Swain. 1998. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16:201.
34. Mackay, C. R., W. L. Marston, and L. Dudley. 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171:801.
35. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708.
36. Kon, O. M., and A. B. Kay. 1999. T cells and chronic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:133.
37. Romagnani, S. 1998. The Th1/Th2 paradigm and allergic disorders. *Allergy* 53:12.
38. Bacharier, L. B., and R. S. Geha. 1999. Regulation of IgE synthesis: the molecular basis and implications for clinical modulation. *Allergy Asthma Proc.* 20:1.
39. Sallusto, F., A. Lanzavecchia, and C. R. Mackay. 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today* 19:568.
40. Gu, L., S. Tseng, R. M. Horner, C. Tam, M. Loda, and B. J. Rollins. 2000. Control of Th2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404:407.
41. Banu, Y., and T. Watanabe. 1999. Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling. *J. Exp. Med.* 189:673.
42. Bourne, H. R., K. L. Melmon, and L. M. Lichtenstein. 1971. Histamine augments leukocyte adenosine 3',5'-monophosphate and blocks antigenic histamine release. *Science* 173:734.
43. Naclerio, R. M., D. Proud, A. G. Togias, N. F. Adkinson, D. A. Meyers, A. Kagey-Sobotka, M. Plaut, P. S. Norman, and L. M. Lichtenstein. 1985. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 313:65.
44. Rieser, C., G. Bock, H. Klocker, G. Bartsch, and M. Thurnher. 1997. Prostaglandin E₂ and tumor necrosis factor α cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of IL-12 production. *J. Exp. Med.* 186:1603.
45. Geissmann, F., P. Revy, A. Regnault, Y. Lepelletier, M. Dy, N. Brousse, S. Amigorena, O. Hermine, and A. Durandy. 1999. TGF- β 1 prevents the non-cognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J. Immunol.* 162:4567.
46. Mommaas, A. M., A. A. Mulder, R. Jordens, C. Out, M. C. Tan, P. Cresswell, P. M. Kluin, and F. Koning. 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 29:571.
47. Strobl, H., C. Bello-Fernandez, E. Riedl, W. F. Pickl, O. Majdic, S. D. Lyman, and W. Knapp. 1997. Flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor- β 1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90:1425.
48. Geissmann, F., C. Prost, J. P. Monnet, M. Dy, N. Brousse, and O. Hermine. 1998. Transforming growth factor- β 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 187:961.
49. Rudikoff, D., and M. Lebowitz. 1998. Atopic dermatitis. *Lancet* 351:1715.

II - Effet de l'histamine sur la polarisation des cellules dendritiques

1. Méthodologie

Les DC humaines immatures générées *in vitro* sont stimulées avec de l'histamine, en présence ou non de LPS afin d'induire leur maturation, et différents paramètres sont analysés :

- la production d'IL-12 par les DC immatures traitées avec différentes doses d'histamine et de LPS,
- l'effet de l'histamine sur la maturation des DC induite par le LPS,
- la production d'IL-12 par des DC matures stimulées par du CD40 Ligand,
- la polarisation des lymphocytes Th naïfs par des DC matures traitées par l'histamine ou l'IFN- γ .

2. Résultats : publication n°2

L'histamine inhibe de manière dose-dépendante la production d'IL-12 induite par le LPS, quelle que soit la dose utilisée. Par exemple, 10 μ M d'histamine inhibe environ de 80% la production d'IL12 induite par 10 ng/ml de LPS (**Figure 1A** de la publication 2). Des résultats similaires ont été obtenus avec la production de TNF- α (Figure 17) induite par 10 ng/ml de LPS, bien que l'inhibition soit moins importante (de l'ordre de 50% avec 10 μ M d'histamine).

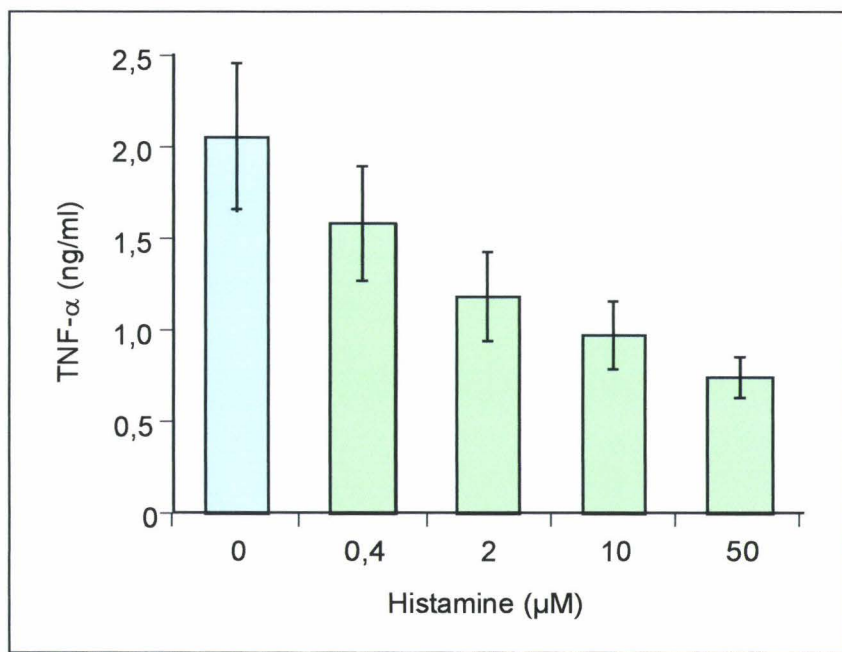


Figure 17. L'histamine inhibe la production de TNF- α par les DC matures. Des DC immatures à 10⁶/ml ont été cultivées pendant 48 heures en présence de 10 ng/ml de LPS et de concentrations croissantes d'histamine. La production de TNF- α est déterminée par ELISA et les résultats sont exprimés en ng/ml.

L'inhibition de la production d'IL-12 par les DC est médiée par les récepteurs H1 et H2 (**Figure 1B** de la publication 2), et n'est pas associée à une inhibition générale du processus de maturation. L'histamine agit en synergie avec le LPS pour la production d'IL-8 (**Figure 1C**) et d'IL-6 ; elle augmente également l'expression de CD86 (**Figure 1D**), de CD83 et les propriétés costimulatrices induites par des concentrations suboptimales de LPS (**Figure 1E** de la publication 2). Elle ne modifie pas non plus l'expression différentielle des récepteurs aux chimiokines induite par le LPS (diminution de CCR5 et expression de CCR7), donc à priori elle n'empêcherait pas la migration des DC.

L'IL-12 produite par les DC matures contrôle la polarisation Th1/Th2. Nous avons donc testé si la présence d'histamine pendant la maturation des DC peut moduler la capacité de DC matures à produire de l'IL-12 après stimulation avec du CD40 Ligand soluble (qui mime l'interaction avec des lymphocytes T). Les DC maturées en présence de LPS produisent peu d'IL-12 après stimulation avec CD40L, et l'addition d'IFN- γ pendant la maturation augmente fortement cette production. Quelle que soit la concentration d'IFN- γ testée, l'histamine inhibe la production d'IL-12 par les DC matures, de manière dose-dépendante, en agissant *via* les récepteurs H1 et H2 (**Figure 2** de la publication 2). En conclusion, l'histamine et l'IFN- γ régulent de manière réciproque la capacité des DC matures à produire de l'IL-12.

Des DC maturées avec du LPS, en présence ou non d'histamine et/ou d'IFN- γ , ont ensuite été cultivées en présence de T CD4⁺ naïfs. Après prolifération, la production d'IL-4 et d'IFN- γ par les lymphocytes T après stimulation a été analysée par cytométrie en flux. Les T naïfs activés avec des DC traitées au LPS conduisent à un faible pourcentage de cellules produisant de l'IFN- γ et de l'IL-4. L'addition d'histamine pendant la maturation conduit à un profil de type Th2 (augmentation des cellules produisant de l'IL-4 et diminution de celles produisant de l'IFN- γ). Les T activés par des DC traitées avec LPS+IFN- γ donnent un profil de type Th1, caractérisé par un fort pourcentage de cellules produisant de l'IFN- γ . Dans ces conditions de maturation, l'addition d'histamine prévient le développement de la réponse Th1 et induit un profil de type Th2 (**Figure 3** de la publication 2).

En conclusion, l'histamine induit une polarisation des DC matures en DC2 et prévient la génération des DC1 induite par l'IFN- γ puisqu'elle diminue la capacité des DC à produire de l'IL12. En conséquence, des DC matures traitées à l'histamine conduisent au développement d'une réponse Th2. Ceci démontre un nouveau mécanisme qui contribue à l'initiation et au maintien d'une réponse Th2 spécifique dans les pathologies allergiques.

PUBLICATION N°2

The Journal of Immunology, 2001 Oct 1;167(7):3682-3686.

Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells.

Gersende Caron, Yves Delneste Y, Edith Roelandts, Catherine Duez, Jean-Yves Bonnefoy, Joël Pestel, and Pascale Jeannin.

Allergic disorders are characterized by allergen-specific Th2-biased responses. Signals controlling Th2 cell polarization, especially those acting by polarizing dendritic cells (DC) into Th2-promoting DC (DC2), are not well known. Histamine, a mediator released by allergen-stimulated mast cells from allergic subjects, has been reported to activate human immature DC. We have therefore tested whether histamine affects DC polarization. We report here that histamine inhibits LPS-induced IL-12 production and polarizes uncommitted maturing DC into effector DC2. DC matured in the presence of histamine fail to produce IL-12 upon subsequent stimulation and prime Th2 responses, even in presence of IFN-gamma, a potent DC1-driving factor. All these effects are mediated through both H1 and H2 receptors. These data show that histamine is a potent DC2-polarizing factor and provide evidence for a novel mechanism that explains the initiation and maintenance of a predominant Th2 response in allergic disorders.

Histamine Polarizes Human Dendritic Cells into Th2 Cell-Promoting Effector Dendritic Cells

Gersende Caron,*[†] Yves Delneste,* Edith Roelandts,[‡] Catherine Duez,[†] Jean-Yves Bonnefoy,* Joel Pestel,[†] and Pascale Jeannin^{1*}

Allergic disorders are characterized by allergen-specific Th2-biased responses. Signals controlling Th2 cell polarization, especially those acting by polarizing dendritic cells (DC) into Th2-promoting DC (DC2), are not well known. Histamine, a mediator released by allergen-stimulated mast cells from allergic subjects, has been reported to activate human immature DC. We have therefore tested whether histamine affects DC polarization. We report here that histamine inhibits LPS-induced IL-12 production and polarizes uncommitted maturing DC into effector DC2. DC matured in the presence of histamine fail to produce IL-12 upon subsequent stimulation and prime Th2 responses, even in presence of IFN- γ , a potent DC1-driving factor. All these effects are mediated through both H1 and H2 receptors. These data show that histamine is a potent DC2-polarizing factor and provide evidence for a novel mechanism that explains the initiation and maintenance of a predominant Th2 response in allergic disorders. *The Journal of Immunology*, 2001, 167: 3682–3686.

Allergic disorders are characterized by Th2 effector cells (IL-4 producers) and IgE specific for the sensitizing allergen(s) (1, 2). The nature of the environmental signals present at the time of T cell priming, especially those provided by DC, that influence Th2 polarization remains unclear (3, 4).

In allergic individuals a contact with the sensitizing allergen results in IgE-dependent activation of mast cells that subsequently release preformed (e.g., histamine and TNF- α) and newly synthesized mediators (e.g., PGE₂) involved in the pathologic processes associated with allergic reaction (5). Among them, histamine participates in vasodilatation, smooth muscle contraction, mucus hypersecretion, and edema formation (6, 7). Histamine also presents immunoregulatory properties as it modulates cytokine production by different cell types (6, 8–13). Histamine exerts its effects through three receptors, H1, H2 (both expressed on lymphoid and nonlymphoid cells), and H3 (mainly expressed in the brain) (6–9, 11, 12). Recently, a new receptor for histamine, H4, has been identified (14).

Dendritic cells (DC)² are the most potent APC. In peripheral tissues, immature DC capture Ags (15, 16) and, upon contact with stress factors (such as TNF- α or LPS), undergo a maturation process; they increase costimulatory and accessory molecule expression, produce cytokines, lose their capacity to process Ags, neo-express CD83 (for human cells), and migrate to the lymphoid organs where they prime naive Ag-specific T cells (15, 16). Based on their ability to favor Th1 vs Th2 differentiation, mature DC have been called DC1 or DC2, respectively (3). Myeloid DC give rise to DC1 or DC2, depending on the nature of the maturation

stimuli influencing IL-12 production (a potent Th1-driving cytokine) (17–27). In addition to many viral and bacterial products (e.g., LPS, *Staphylococcus aureus* Cowan strain I, bacterial DNA, and dsRNA) that can induce or enhance IL-12 production by human myeloid DC (17–21), IFN- γ seems to be the most potent DC1-promoting factor (19, 22). In contrast, PGE₂ (23, 24), cholera toxin (25), and ATP (26) contribute to the development of human DC2. A filarial nematode-secreted product, ES-62, also promotes the differentiation of murine DC toward a DC2 phenotype (27).

To date, the nature of mediator(s) present selectively in allergic disorders and involved in DC2 polarization remains to be determined. As histamine has been reported to inhibit IL-12 production by human monocytes (11) and to activate human immature DC (28), we therefore tested whether it may affect maturing DC polarization. We report that histamine is a potent DC2-polarizing mediator.

Materials and Methods

Human DC generation

PBMC were isolated from healthy volunteers by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Monocytes were purified from PBMC by positive selection using a magnetic cell separator (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purity assessed by FACS analysis using a FITC-labeled anti-CD13 mAb (Cymbus, Chandlers Ford, U.K.) was >98%. Monocytes were cultured in complete medium (CM) consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, and 0.1 mM nonessential amino acids (all from Life Technologies, Cergy Pontoise, France) at 5×10^6 cells/5 ml/well in six-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml GM-CSF (both from R&D Systems, Abingdon, U.K.). On day 7, cells were analyzed by FACS as described above; only homogeneous immature DC populations characterized by high levels of CD1a (mean fluorescence intensity, 100–800) and no CD83 expression were used. DC were then recultured at 10^5 cells/200 μ l/well in 96-well flat-bottom tissue culture plates (Costar) in cytokine-containing CM without or with different concentrations of histamine (Sigma, St. Louis, MO). In some experiments DC were also exposed to 5×10^{-5} M of the H1, H2, or H3 receptor antagonists, mepyramine, cimetidine, or thioperamide (all from Sigma), respectively, 1 h before addition of histamine or were exposed to 10^{-5} M of the H1 and H2 receptor agonists, histamine-trifluoromethyl-toluidide dimaleate and amthamine dihydrobromide, respectively (both from Biomol, Plymouth Meeting, PA). In others, immature DC were stimulated with LPS (from *Escherichia coli*

*Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint Julien en Genevois, France; [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 416, Institut Pasteur, Lille, France; [‡]Pharmacie Centrale, Centre Hospitalier, Hazebrouck, France

Received for publication May 29, 2001. Accepted for publication July 19, 2001.

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

¹ Address correspondence and reprint requests to Dr. Pascale Jeannin, Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5 avenue Napoléon III, 74164 Saint Julien en Genevois, France. E-mail address: pascale.jeannin@pierre-fabre.com

² Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cells; CD40L, CD40 ligand; CM, complete medium.

isotype 0111:B4, Sigma) alone or in combination with IFN- γ (R&D Systems) and/or histamine. When indicated, mature DC were harvested, washed, recultured at 10^5 cells/200 μ l/well in CM without cytokines, and stimulated with 1 μ g/ml soluble recombinant CD40 ligand (CD40L; Apotech Biochemicals, Epalinges, Switzerland).

Flow cytometric measurement of CD86 expression

Immature DC exposed to combinations of increasing doses of histamine and/or LPS for 48 h were stained with a FITC-labeled anti-CD86 (PharMingen, San Diego, CA). Control isotype was purchased from Becton Dickinson. FACS analysis was performed using a FACScan cytofluorometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Results are expressed as a percentage of positive cells.

Mixed lymphocyte reaction

Day 7 DC were washed and recultured at 2.5×10^6 cells/5 ml/well in six-well culture plates in cytokine-containing CM, then were or were not stimulated with 10^{-5} M histamine and different concentrations of LPS. After 24 h, DC were irradiated (3000 rad) and cultured with T cells in quintuplicate. DC at 10^3 cells/200 μ l/well in 96-well flat-bottom plates were cultured with 10^5 allogenic T cells purified from PBMC from healthy volunteers by rosetting with SRBC (the purity was assessed by FACS analysis using a FITC-labeled anti-CD3 mAb was >95%). After 5 days, cells were pulsed during the last 16 h with [3 H]thymidine (0.25 μ Ci/well; Amersham Pharmacia Biotech). Radioactive incorporation was measured by standard liquid scintillation counting, and results are expressed as counts per minute (mean \pm SD of quintuplicate values).

IL-8 and IL-12 quantification

The concentrations of IL-8 and IL-12 were determined in the 24- or 48-h cell-free culture supernatants by ELISA (R&D Systems; sensitivity, 10 and 0.5 pg/ml, respectively). Results are expressed as nanograms per milliliter or picograms per milliliter and are the mean \pm SD ($n = 4$).

Analysis of mRNA expression by RT-PCR

The expression of the mRNA encoding for human histamine H1, H2, and H3 receptors was determined by RT-PCR. Total RNA from immature DC was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies), and the single-strand cDNA was synthesized using 2 μ g total RNA by RT using an oligo(dT) primer (Amersham Pharmacia Biotech). PCR reactions were performed with cDNA corresponding to 50 ng total RNA and primers designed to amplify the coding sequence of the histamine receptors (29). The PCR reaction was as follows: 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min; followed by a final extension at 72°C for 5 min. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA. The amplified fragments were size-separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide.

Induction of memory-type lymphokines in maturing Th cells and intracellular staining

After rosetting and CD8 depletion, CD4 $^+$ CD45RA $^+$ naive T cells were purified by MACS (Miltenyi Biotec) using a positive selection of CD45RA $^+$ cells. Purified naive Th cells (5×10^4) were cocultured with irradiated allogenic DC (2×10^4) matured in presence of 10 ng/ml LPS, 10 ng/ml LPS plus 100 ng/ml IFN- γ , 10 ng/ml LPS plus 10^{-5} M histamine, and 10 ng/ml LPS plus 100 ng/ml IFN- γ plus 10^{-5} M histamine. On day 5, 50 U/ml rhIL-2 (R&D Systems) was added, and the cultures were expanded for the next 7 days. On day 12, the quiescent Th cells were washed and restimulated with 10 ng/ml PMA (Sigma) plus 1 μ g/ml ionomycin (Calbiochem, San Diego, CA) for 5 h. Brefeldin A (Sigma, 10 μ g/ml) was added during the last 2 h of culture. Cells were fixed, permeabilized, stained with FITC-labeled anti-IFN- γ mAb (PharMingen) and PE-labeled anti-IL-4 mAb (BD Biosciences), and analyzed on a FACScan cytofluorometer (BD Biosciences).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Student's *t* test.

Results

Histamine inhibits LPS-induced IL-12 production by DC

IL-12 is a potent Th1-inducing factor. We previously observed that histamine transiently activates immature DC, but does not induce IL-12 production or DC maturation (28). In inflammatory sites,

histamine may act in concert with DC maturation factors such as LPS (15, 16). We therefore tested the combined effects of histamine and LPS on IL-12 production by immature DC.

As expected, LPS (0.1–10 ng/ml) induced IL-12 production by DC (Fig. 1A). At any concentration of LPS tested, histamine dose-dependently decreased LPS-induced IL-12 production, with an effect significant at 10^{-7} M and maximum at 10^{-5} M, the highest concentration tested (Fig. 1A).

Immature DC expressed histamine H1 and H2 receptor mRNA, and the inhibitory effect of histamine on IL-12 production was prevented by H1 and H2 antagonists (Fig. 1B). While 10^{-5} M histamine inhibited 10 ng/ml LPS-induced IL-12 production (decrease of $87 \pm 10\%$ (mean \pm SD); $n = 4$), this inhibition was reduced to 35 ± 7 and $20 \pm 5\%$ by H1 and H2 receptor antagonists, respectively (Fig. 1B). In our experimental conditions no RT-PCR product for H3 receptor was detected in immature DC and 5×10^{-5} M H3 antagonist thioperamide, which also inhibited histamine binding on H4 receptor (14), had no effect on IL-12 production by LPS- plus histamine-treated DC (Fig. 1B). We therefore analyzed whether this down-regulation of IL-12 production induced by histamine is associated with a global inhibitory effect of histamine on LPS-induced DC maturation.

LPS and histamine are known to induce numerous cytokine production by immature DC (i.e., IL-6 and IL-8) (28). We observed that histamine synergized with LPS in inducing IL-8 (Fig. 1C) and IL-6 production (data not shown) by immature DC. Histamine up-regulated costimulatory molecule expression (i.e., CD86, CD54, and MHC class II molecules) and DC costimulatory properties (28). Histamine up-regulated CD86 (Fig. 1D), CD54, CD83, MHC class II expression (data not shown), and DC costimulatory properties (Fig. 1E) induced by suboptimal concentrations of LPS. Thus, these data show that histamine acts together with LPS to induce DC maturation while inhibiting LPS-induced IL-12 production by DC.

Histamine decreases the ability of maturing myeloid DC to produce IL-12 upon stimulation

Immature DC treated for 2 days with 10 ng/ml LPS acquired a phenotype of fully mature CD83 $^+$ DC (15, 16), and addition of histamine during maturation did not affect cell surface molecule expression (i.e., CD54, CD86, CD83, and MHC class I and II molecules) or DC costimulatory properties (data not shown).

IL-12 produced by mature DC at the time of T cell priming controls Th cell polarization (3). As histamine prevents LPS-induced IL-12 production by immature DC, we therefore tested whether the presence of histamine during DC maturation may modulate the ability of mature DC to produce IL-12 upon stimulation with soluble CD40L (to mimic signal provided by T cells).

DC maturation was induced by LPS in the presence of IFN- γ (22) and/or histamine. After 2 days, mature DC were stimulated with soluble CD40L (Fig. 2). In the absence of CD40L stimulation, no IL-12 production was detected in any population of mature DC (data not shown). LPS-matured DC stimulated with CD40L produced low levels of IL-12 (Fig. 2A). As expected (22), addition of IFN- γ during LPS-induced maturation instructed maturing myeloid DC to produce high levels of IL-12 upon stimulation (Fig. 2A). Histamine down-regulated the capacity of LPS-matured DC to produce IL-12. Moreover, at any concentration of INF α tested (0.25–100 ng/ml), histamine greatly impaired the ability of IFN- γ -treated DC to produce IL-12 in response to CD40L (Fig. 2A). This inhibitory effect of histamine was dose dependent, significant at 10^{-7} M, maximum at 10^{-5} M (the highest concentration tested; Fig. 2A), and mediated through both H1 and H2 receptors (Fig. 2B). Treatment with 10^{-5} M histamine inhibited $84 \pm 9\%$

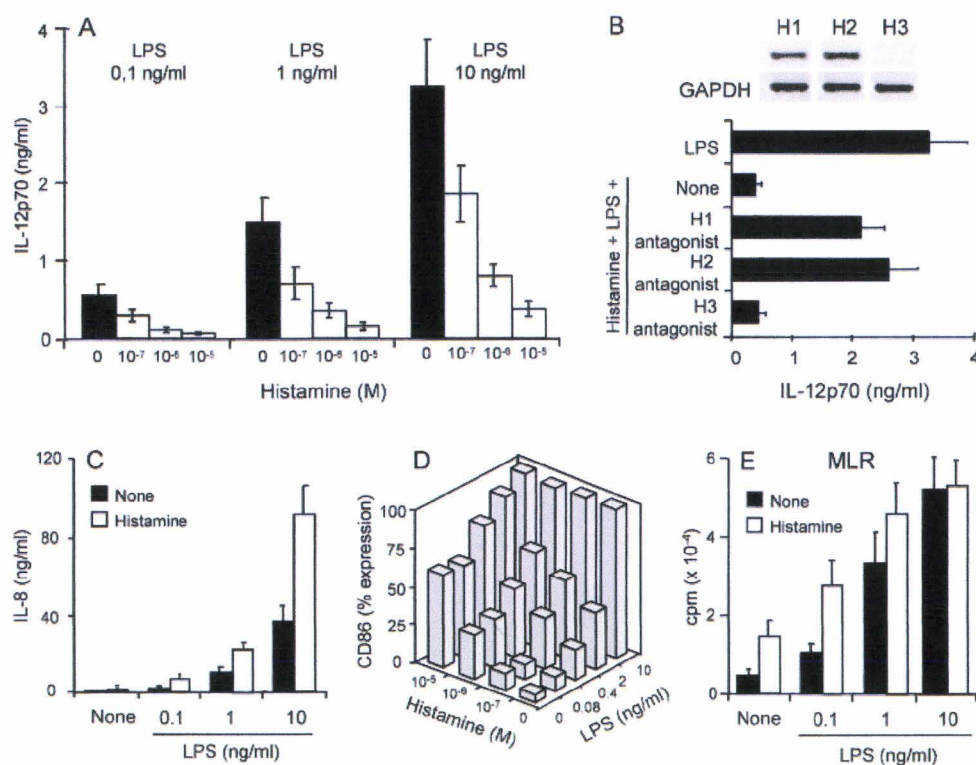


FIGURE 1. Histamine inhibits LPS-induced IL-12 production by DC. *A*, Immature DC were exposed for 48 h to combinations of increasing doses of histamine and/or LPS. IL-12p70 production was determined by ELISA, and results are expressed as nanograms per milliliter and are the mean \pm SD of four separate experiments. *B*, *Upper panel*, Expression by immature DC of mRNA for H1, H2, and H3 receptors was analyzed by RT-PCR. Results show one representative experiment of three. *Lower panel*, LPS-treated DC (10 ng/ml) were or were not exposed to 10^{-5} M histamine, alone or in the presence of 5×10^{-5} M of the H1, H2, or H3 receptor antagonists (mepyramine, cimetidine, and thioperamide, respectively). After 48 h, IL-12p70 production was determined by ELISA, and results are expressed as nanograms per milliliter and are the mean \pm SD of four separate experiments. *C*, Immature DC were exposed for 48 h to increasing doses of LPS in the absence (■) or the presence (□) of 10^{-5} M histamine. IL-8 production was determined by ELISA, and results are expressed as nanograms per milliliter and are the mean \pm SD of three separate experiments. *D*, Immature DC were exposed to combinations of increasing doses of histamine and/or LPS, and CD86 expression was analyzed by FACS after 48 h. Results are expressed as a percentage of positive cells and are representative of three experiments. *E*, Immature DC were either untreated or exposed for 48 h to different doses of LPS in the absence (■) or the presence (□) of 10^{-5} M histamine. Then DC were used as effector cells in MLR assays. Results are expressed as counts per minute $\times 10^{-4}$ and are the mean \pm SD of quintuplicate values.

(mean \pm SD; $n = 4$) of 10 ng/ml LPS- plus 100 ng/ml IFN- γ -induced IL-12 production. In the presence of H1 and H2 receptor antagonists, this inhibition was partly prevented (inhibition of 40 ± 5 and $14 \pm 4\%$, respectively), while no significant effect of the H3 receptor antagonist was observed (Fig. 2*B*). As expected, H2 and, to a lesser extent, H1 receptor agonists also decreased IL-12 production by mature DC (decreases of $68 \pm 8\%$ and $35 \pm 5\%$, respectively).

Treatment of immature DC with TNF- α plus IL-1 β plus IFN- γ also leads to mature DC that produce high levels of IL-12 upon stimulation (23). In this condition of maturation, addition of histamine impairs their ability to produce IL-12 (decrease of $83 \pm 7.5\%$ with 10^{-5} M histamine upon stimulation with CD40L; data not shown).

In conclusion, histamine and IFN- γ reciprocally regulate the capacity of maturing DC to secrete IL-12. The presence of histamine during DC maturation dose-dependently suppresses their ability to produce IL-12 upon stimulation.

Histamine polarizes uncommitted maturing DC toward DC2 and inhibits IFN- γ -induced DC1

Priming of naive T cells with IL-12-deficient DC leads to the generation of Th2-polarized cells (23). We therefore tested whether the presence of histamine during DC maturation may affect naive

Th cell polarization. Mature DC, obtained by treating immature DC for 2 days with LPS in the absence or the presence of IFN- γ and/or histamine, were cultured with naive allogenic CD4⁺ CD45RA⁺ T cells. We then analyzed the pattern of IL-4 and IFN- γ production by T cells after stimulation. In all conditions mature DC induced similar naive T cell proliferative responses (data not shown). Naive T cells primed with LPS-treated DC led to a low percentage of IFN- γ - and IL-4-producing cells ($31 \pm 8\%$ and $7 \pm 3\%$, respectively (mean \pm SD); $n = 3$; Fig. 3) (22). Addition of histamine during LPS-induced DC maturation promoted a Th2 pattern, as assessed by an up-regulation of the percentage of IL-4-producing cells (3.2 ± 0.4 -fold) and a down-regulation of the percentage of IFN- γ -producing cells (1.6 ± 0.2 -fold; Fig. 3). As expected (22), T cells primed with LPS- plus IFN- γ -treated DC differentiated into Th1 cells characterized by a high percentage of IFN- γ -producing cells ($68 \pm 20\%$) and few IL-4-producing cells ($2 \pm 0.5\%$). In this condition of maturation, addition of histamine increased the percentage of IL-4-producing cells (5 ± 0.3 -fold) and down-regulated the percentage of IFN- γ -producing cells (4.6 ± 0.8 -fold), thereby preventing the development of a Th1-biased response and inducing a polarized Th2 response (Fig. 3). Thus, histamine-treated maturing DC drive T cell polarization toward a Th2 phenotype even in presence of IFN- γ , a strong Th1-polarizing stimulus.

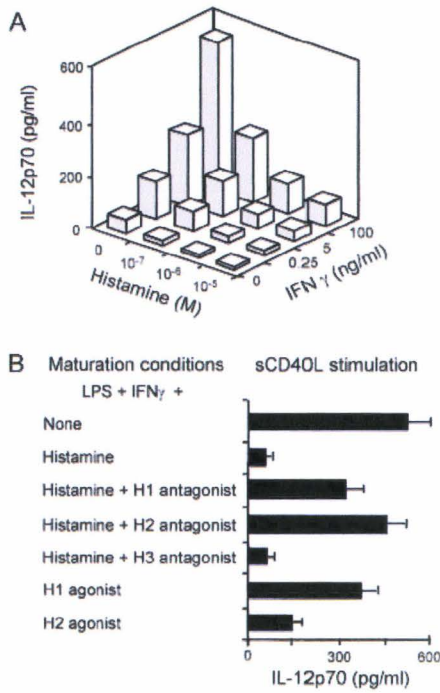


FIGURE 2. Histamine prevents IL-12 production by mature DC. *A*, Maturation of DC was induced by 10 ng/ml LPS in the absence or the presence of increasing doses of IFN- γ and/or histamine. After 48 h, mature DC were stimulated with soluble CD40L (sCD40L). IL-12p70 concentrations were determined by ELISA in the 24-h supernatants. Results are representative of one of three experiments. *B*, Maturing DC (10 ng/ml LPS plus 100 ng/ml IFN- γ) were untreated; exposed to 10^{-5} M histamine; exposed to 5×10^{-5} M concentrations of the H1, H2, or H3 receptor antagonists (mepyramine, cimetidine, and thioperamide, respectively) 1 h before addition of 10^{-5} M histamine; or were exposed to 10^{-5} M H1 or H2 receptor agonists (histamine-trifluoromethyl-toluidide dimaleate and amthamine, respectively). After 2 days, mature DC were restimulated with CD40L, and IL-12p70 production was determined by ELISA. Results are expressed as nanograms per milliliter and are the mean \pm SD of four separate experiments.

Discussion

In allergic subjects, allergen-specific T cells have a Th2-biased phenotype (1, 2). It is thought that factors present upon contact with allergens may favor DC2 polarization and allergen-specific T cell differentiation into Th2 effector cells (4). We demonstrate here that histamine polarizes myeloid DC into mature DC2, even in presence of IFN- γ , a potent DC1-polarizing cytokine (19, 22).

Histamine transiently activates human immature DC in vitro (28). In vivo, bacterial components (such as LPS) and mediators released by activated mast cells (i.e., IL-1 and preformed TNF- α) may act in concert with histamine on peripheral DC (5). When present during the maturation process together with concentrations of maturation factors leading to fully mature DC (such as LPS or TNF- α plus IL-1), histamine does not affect DC costimulatory properties, but polarizes them into DC2. These effects of histamine were significant at concentrations as low as 10^{-7} M. This concentration is comparable to those measured in nasal lavages from allergic subjects after allergen challenge and in tissues after mast cell degranulation (30, 31).

To date, IFN- γ is the most potent DC1-promoting factor described (19, 22). PBMC and T cells from allergic patients stimulated with the sensitizing allergen produce levels of IFN- γ that are similar to or even higher than those in healthy subjects (32). Furthermore, histamine by itself has been shown to induce IFN- γ and

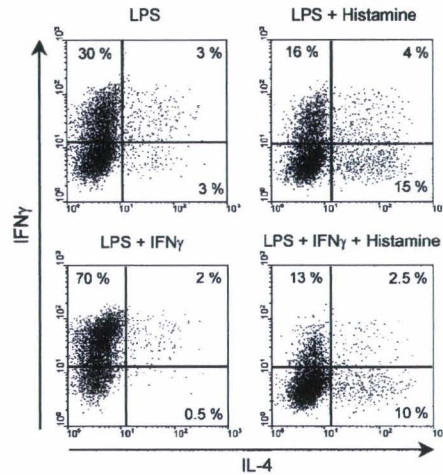


FIGURE 3. Histamine is a DC2 polarization factor. Naive T cells were cocultured for 5 days with allogenic mature DC pretreated with LPS (10 ng/ml), LPS plus IFN- γ (100 ng/ml), LPS plus histamine (10^{-5} M), or LPS, IFN- γ , and histamine. After IL-2 expansion, T cells were stimulated with PMA plus ionomycin for 5 h and analyzed by FACS for IL-4 and IFN- γ expression after intracellular staining. The percentage of positive cells is indicated in the quadrants. Data are representative of one of three experiments.

IL-18 production by PBMC (13). Interestingly, we report that histamine polarizes DC into DC2 even in presence of a high concentration of IFN- γ (i.e., 100 ng/ml). The dual effects of histamine and IFN- γ on DC polarization may contribute to explain why, in allergic subjects, a predominant Th2-biased profile persists together with IFN- γ production in response to allergen.

The actual concept is that DC1/DC2 polarization is mainly associated with their ability to produce high or low levels of IL-12, respectively (17–26). In agreement with this observation, histamine dramatically decreases the IL-12 production induced by LPS plus IFN- γ . Surprisingly, DC treated with histamine, IFN- γ , and LPS or with LPS alone produce similar levels of IL-12, whereas only histamine-, IFN- γ -, and LPS-treated DC trigger a Th2 polarization. This suggests that in addition to IL-12 production, other signals, such as soluble factors or contact-dependent mechanisms, may control Th cell polarization by DC (3).

Using specific receptor agonists and antagonists, we show that histamine inhibits IL-12 production and favors DC2 polarization by acting through both H1 and H2 receptors. The involvement of the H2 receptor is in agreement with the observation that histamine decreases IL-12 production by PBMC through the H2 receptor (11, 12). These observations point out a potential beneficial role for anti-H2 molecules, together with the anti-H1 molecules currently used, in the treatment of allergic disorders.

Signaling through the H2 receptor involves cAMP generation (7). The DC2-polarizing molecules, PGE₂ and cholera toxin, have been shown to favor DC2 polarization by increasing intracellular cAMP (33). Together, these data suggest that high levels of intracellular cAMP may favor DC2 polarization (23). As PGE₂ is produced by activated monocytes and mast cells, it is tempting to speculate that upon mast cell degranulation histamine and PGE₂ may act in concert to favor Th2 polarization in allergic disorders.

In addition, we report that H1 receptor is involved in histamine-induced DC2. Signaling via the H1 receptor involves the activation of phospholipase C and is cAMP independent (6). Finally, it has been reported that the effect of ATP on DC2 generation was not mediated through cAMP (26). Taken together, these data suggest

the existence of both cAMP-dependent and cAMP-independent pathways in DC2 differentiation.

In conclusion, we show here that histamine, a preformed mediator released by mast cells from allergic subjects upon contact with the sensitizing allergen, polarizes maturing DC into DC2 through both H1 and H2 receptors. This demonstrates a new mechanism that contributes to the initiation and maintenance of allergen-specific, Th2-biased responses in allergic disorders. By polarizing DC2, histamine may also favor the induction of Th2-biased responses and sensitization to diverse encountered allergens, as observed in atopics.

References

- Kon, O. M., and A. B. Kay. 1999. T cells and chronic asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 118:133.
- Romagnani, S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 85:9.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20:561.
- Kapsenberg, M. L., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and P. Kalinski. 1999. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells: implications for atopic allergy. *Clin. Exp. Allergy* 29:33.
- Metcalfe, D. D., D. Baram, and Y. A. Mekori. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033.
- Bachert, C. 1998. Histamine: a major role in allergy? *Clin. Exp. Allergy* 28:15.
- Naclerio, R. 1999. Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:382.
- Vannier, E., L. C. Miller, and C. A. Dinarello. 1991. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor α via histamine H2 receptors. *J. Exp. Med.* 174:281.
- Vannier, E., and C. A. Dinarello. 1993. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells: comparison with IL-1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 92:281.
- Mor, S., A. Nagler, V. Barak, Z. T. Handzel, C. Geller-Bernstein, and I. Fabian. 1995. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukocyte Biol.* 58:445.
- van der Pouw Kraan, T. C., A. Slijders, L. C. Boeije, E. R. de Groot, A. E. Alewijnse, R. Leurs, and L. A. Aarden. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J. Clin. Invest.* 102:1866.
- Elenkov, I. J., E. Webster, D. A. Papanicolaou, T. A. Fleisher, G. P. Chrousos, and R. L. Wilder. 1998. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J. Immunol.* 161:2586.
- Kohka, H., M. Nishibori, H. Iwagaki, N. Nakaya, T. Yoshino, K. Kobashi, K. Saeki, N. Tanaka, and T. Akagi. 2000. Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN- γ in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 164:6640.
- Hough, L. B. 2001. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol. Pharmacol.* 59:415.
- Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9:10.
- Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1:311.
- Verhasselt, V., C. Buelens, F. Willems, D. De Groot, N. Haeflner-Cavaillon, and M. Goldman. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.* 158:2919.
- Hilkens, C. M., P. Kalinski, M. de Boer, and M. L. Kapsenberg. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90:1920.
- Schattenberg, D., M. Schott, G. Reindl, T. Krueger, D. Tschoepe, J. Feldkamp, W. A. Scherbaum, and J. Seissler. 2000. Response of human monocyte-derived dendritic cells to immunostimulatory DNA. *Eur. J. Immunol.* 30:2824.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189:821.
- Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg, and P. Kalinski. 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* 164:4507.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, A. Slijders, F. G. Slijdewit, and M. L. Kapsenberg. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E₂, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159:28.
- Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, and M. L. Kapsenberg. 1998. Prostaglandin E₂ induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* 161:2804.
- Gagliardi, M. C., F. Sallusto, M. Marinaro, A. Langenkamp, A. Lanzavecchia, and M. T. de Magistris. 2000. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 30:2394.
- La Sala, A., D. Ferrari, S. Corinti, A. Cavani, F. Di Virgilio, and G. Girolomoni. 2001. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J. Immunol.* 166:1611.
- Whelan, M., M. M. Harnett, K. M. Houston, V. Patel, W. Harnett, and K. P. Ringley. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J. Immunol.* 164:6453.
- Caron, G., Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, N. Herbault, G. Magistrelli, J.-Y. Bonnefoy, J. Pestel, and P. Jeannin. 2001. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J. Immunol.* 166:6000.
- Wang, K.-Y., N. Arima, S. Higuchi, S. Shimajiri, A. Tanimoto, Y. Murata, T. Hamada, and Y. Sasaguri. 2000. Switch of histamine receptor expression from H2 to H1 during differentiation of monocytes into macrophages. *FEBS Lett.* 473:345.
- Naclerio, R. M., D. Proud, A. G. Togias, N. F. Adkinson, D. A. Meyers, A. Kagey-Sobotka, M. Plaut, P. S. Norman, and L. M. Lichtenstein. 1985. Inflammatory mediators in late antigen-induced rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 313:65.
- Soderberg, M., R. Lundgren, L. Bjerner, N. Stjernberg, and L. Rosenhall. 1989. Inflammatory response in bronchoalveolar lavage fluid after inhaling histamine. *Allergy* 44:98.
- Delneste, Y., P. Jeannin, P. Gosset, P. Lassalle, E. Cardot, I. Tillie-Leblond, M. Joseph, J. Pestel, and A.-B. Tonnel. 1995. Allergen-stimulated T lymphocytes from allergic patients induce vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression and IL-6 production by endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 101:164.
- Zidek, Z. 1999. Adenosine-cyclic AMP pathways and cytokine expression. *Eur. Cytokine Network* 10:319.

DISCUSSION

Le travail entrepris dans le cadre de ma thèse a permis de mettre en évidence un effet direct de l'histamine, principal médiateur impliqué dans la physiopathologie de l'allergie, sur les cellules dendritiques humaines, seules CPA capables d'activer les lymphocytes T naïfs.

Dans un premier temps, nous avons montré que l'histamine active de manière puissante mais transitoire les DC humaines. L'histamine n'induit pas la maturation des DC (pas d'induction de CD83), mais augmente fortement l'expression de la molécule de costimulation CD86, ainsi que celle de CD80, CD40, CD54, CD49d et des molécules du CMH de classe II. Contrairement aux effets des facteurs de maturation comme le LPS et le TNF- α , l'effet de l'histamine est transitoire, détectable très rapidement (4 heures après stimulation), maximum à 24 heures et indétectable après 72 heures. Le rajout d'histamine dans le milieu de culture, à 24 heures ou 48 heures, ne permet pas un maintien de cet effet, ce qui est probablement lié à un mécanisme de désensibilisation des récepteurs à l'histamine, déjà reporté dans la littérature. L'effet transitoire et l'absence de maturation des DC par l'histamine ne sont pas liés à une production d'IL-10, cytokine connue pour inhiber la maturation des DC (Buelens *et al.*, 1997), puisque l'histamine n'induit pas la production d'IL-10 par les DC, et que l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-10 ne permet pas d'augmenter les effets de l'histamine.

L'histamine induit la production de nombreuses chimiokines par les DC. Elle induit la production d'IL-8, de MCP-1 et de MIP-1 α et augmente l'expression de l'ARNm de MIP-1 β et RANTES. Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement de nombreux types cellulaires (lymphocytes T, monocytes, neutrophiles et DC immatures) et dans le développement de l'afflux cellulaire associé à la réaction tardive d'inflammation (Teran et Davies, 1996). De plus, il a été montré que l'IL-8, MIP-1 α , RANTES et MCP-1 sont impliqués dans le recrutement des basophiles et mastocytes et induisent la libération d'histamine (Zlotnik *et al.*, 1999), suggérant une boucle de régulation positive qui contribue au maintien de la réaction inflammatoire.

L'histamine agit également au niveau de la production de cytokines inflammatoires par les DC immatures. En accord avec de précédentes observations montrant que l'histamine induit la production d'IL-1 et d'IL-6 par des PBMC (Vannier *et al.*, 1993 ; Mor *et al.*, 1995), l'histamine induit également la production d'IL-1 β et d'IL-6 par les DC immatures. De même, il a été montré que l'histamine n'induisait pas la production de TNF- α ou d'IL-12 par des monocytes / macrophages (Vannier *et al.*, 1991 ; Van der Pouw Krann *et al.*, 1998), et nous observons le même effet avec des DC immatures. L'histamine n'induit pas la production d'IL-10 par les DC, alors qu'elle l'induit lorsque des macrophages alvéolaires sont stimulés (Sirois *et al.*, 2000). De même, nous n'avons pas détecté d'IL-18 dans les surnageants de DC stimulées par l'histamine, alors que d'autres auteurs ont montré que l'histamine induisait une forte production d'IL-18 par des PBMC (Kohka *et al.*, 2000). Ceci

suggère l'existence d'un contrôle de la production de cytokines proinflammatoires par l'histamine qui diffère selon le type de cellule cible.

Bien que l'histamine n'induit pas la maturation des DC, elle augmente l'expression des molécules de costimulation. De ce fait, les DC traitées à l'histamine stimulent de manière plus efficace que des DC non traitées la prolifération de lymphocytes T allogéniques lors d'expériences de MLR. Bien que les DC traitées à l'histamine semblent aussi efficaces que des DC matures générées en présence de TNF- α pour stimuler les lymphocytes T mémoire, l'histamine n'augmente que très faiblement la capacité des DC à stimuler les lymphocytes T naïfs. Ces observations sont en accord avec le fait que les lymphocytes T mémoire nécessitent des signaux de costimulation moins soutenus et moins stringents que les naïfs pour être efficacement activés (Dutton *et al.*, 1998). De plus, l'histamine ne modifie pas l'expression des récepteurs aux chimiokines à la surface des DC, suggérant que les DC stimulées par l'histamine seraient incapables de migrer de la périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires. Or, contrairement aux lymphocytes T naïfs que l'on retrouve préférentiellement dans les organes lymphoïdes secondaires, les T mémoire sont plutôt situés dans les tissus périphériques (Mackay *et al.*, 1990). L'histamine, en activant les DC, pourrait ainsi participer à la restimulation des T mémoire au site de l'inflammation.

L'histamine active donc transitoirement les DC immatures *in vitro*. *In vivo*, des composants bactériens (LPS) ou des médiateurs produits par les mastocytes (TNF- α , IL-1) peuvent agir en association avec l'histamine sur les DC périphériques. Nous avons alors évalué les effets de l'histamine associée avec un facteur de maturation, en l'occurrence le LPS, sachant que des résultats similaires ont été obtenus avec du TNF- α + IL-1 β . L'histamine n'inhibe pas la maturation des DC induite par le LPS. Elle augmente même l'expression des molécules de costimulation et les propriétés stimulatrices des DC induites par des doses suboptimales de LPS. Elle agit également en synergie avec le LPS pour la production d'IL-8. En revanche, l'histamine inhibe fortement la production d'IL-12 induite par le LPS, en accord avec les études précédentes réalisées sur des monocytes (Van der Pouw Kraan *et al.*, 1998).

Les DC myéloïdes traitées par l'histamine en présence de LPS puis mises en contact avec des lymphocytes T naïfs sont capables de favoriser une réponse Th2 et d'inhiber la polarisation Th1 induite par de l'IFN- γ . Tout récemment, Idzko *et al.* (2002) ont mis en évidence que la sphingosine 1-phosphate, lysophospholipide relargué après stimulation des mastocytes et probablement impliqué dans la réaction inflammatoire allergique, favorisait la génération de DC2. De même, les DC2 myéloïdes générées en présence de PGE₂, molécule produite par les monocytes ou les mastocytes

activés, sont capables d'induire une réponse Th2 (Kalinski *et al.*, 1997). Il est donc fort probable que lors de la réaction allergique, tous ces médiateurs agissent ensemble pour favoriser la réponse Th2.

De manière surprenante, alors que des DC traitées avec de l'histamine + LPS + IFN- γ produisent des quantités similaires d'IL-12 par rapport à des DC uniquement traitées au LPS, seules les premières induisent une réponse Th2. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en plus de la production d'IL-12, d'autres signaux, comme des facteurs solubles ou des mécanismes contact-dépendants, contrôlent la polarisation des T par les DC (Kalinski *et al.*, 1999).

L'IFN- γ est le facteur de polarisation en DC1 le plus puissant (Vieira *et al.*, 2000). Les PBMC et les lymphocytes T de patients allergiques produisent de l'IFN- γ , parfois en plus forte quantité que des cellules de patients sains (Delneste *et al.*, 1995). Or, l'histamine est capable de polariser des DC en DC2 même en présence de fortes concentrations en IFN- γ . Les effets opposés de l'IFN- γ et de l'histamine sur la polarisation des DC contribuent à expliquer pourquoi, chez les patients allergiques, une réponse Th2 dominante en réponse à l'allergène persiste malgré la présence d'IFN- γ .

A l'aide d'antagonistes, nous avons montré que les effets de l'histamine sur les DC (induction de CD86 et de la production d'IL-8, inhibition de la production d'IL-12 induite par le LPS) étaient médiés par les deux récepteurs H1 et H2. Les effets anti-inflammatoires de l'histamine, comme l'inhibition de la production d'IL-12 ou de TNF- α et l'augmentation de la production d'IL-10 par les PBMC, sont généralement associés au récepteur H2 (Vannier *et al.*, 1991 ; Van der Pouw Kraan *et al.*, 1998 ; Elenkov *et al.*, 1998) et/ou H3 (Sirois *et al.*, 2000). En revanche, les effets positifs de l'histamine, comme par exemple l'induction de la production d'IL-6 et d'IL-8 ou des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Jeannin *et al.*, 1994 ; Delneste *et al.*, 1995), font plutôt intervenir les récepteurs H1 et/ou H2. C'est donc la première fois que le récepteur H1 est associé à un effet anti-inflammatoire, à savoir la diminution de la production d'IL-12 induite par le LPS. Ces observations suggèrent également un rôle bénéfique des antagonistes H2 dans le traitement des maladies allergiques, en association avec les antagonistes H1 utilisés actuellement.

La transduction du signal par les récepteurs H2 implique la génération d'AMPc. La PGE₂ et la toxine cholérique induisent la polarisation des DC en DC2 en augmentant la concentration en AMPc intracellulaire. Une concentration élevée en AMPc, souvent associée à une inhibition de la production d'IL-12, favoriserait ainsi la génération de DC2. Cependant, le récepteur H1, dont la voie de signalisation fait intervenir la phospholipase C et l'augmentation du Ca⁺⁺ intracellulaire, est

également impliqué dans la polarisation des DC en DC2 par l'histamine, suggérant l'existence de voies dépendantes et indépendantes de l'AMPc dans la différenciation des DC2.

Nous avons par la suite évalué l'effet de l'histamine seule sur l'activation d'autres CPA, comme les cellules de Langerhans générées *in vitro* et les DC lymphoïdes et myéloïdes directement purifiées du sang (résultats non publiés). Des études préalables ont montré que les cellules de Langerhans ne sont pas activées par les stimuli pro-inflammatoires classiques, ce qui permettrait d'éviter une hyper-réactivité aux antigènes inoffensifs après une blessure au niveau de la peau (Geissmann *et al.*, 1999 ; Mommaas *et al.*, 1999). Aucun effet de l'histamine sur les cellules de Langerhans générées à partir de monocytes ou de progéniteurs CD34⁺ n'a pu être observé. Si l'on considère que ces modèles de cellules de Langerhans sont pertinents, cette observation suppose que, dans un cas de dermatite atopique, l'histamine relarguée par les mastocytes agirait préférentiellement sur les DC dermales. Cette hypothèse reste cependant à être vérifiée sur des cellules directement isolées de la peau.

La stimulation de DC myéloïdes isolées du sang périphérique par l'histamine n'augmente pas l'expression de CD86, qui est déjà très fortement exprimée par les DC non traitées. L'histamine augmente légèrement l'expression de CD86 à la surface des DC plasmacytoïdes, mais 48 à 72 heures de stimulation sont nécessaires avec des doses d'histamine supérieures à 10 μ M. L'histamine n'induit pas la production d'IFN- α par ces DC plasmacytoïdes mais inhibe celle induite par du CD40Ligand. L'absence d'effet significatif de l'histamine sur les DC du sang semble logique puisque l'histamine est rapidement métabolisée dans le sang et que sa concentration maximale doit être localisée au niveau des tissus où les mastocytes ont dégranulé. L'histamine aurait donc un effet sur les DC immatures situées dans les tissus et non sur les DC circulantes.

Nous avons donc montré que l'histamine était capable d'activer les DC en induisant l'expression des molécules de costimulation et la production de chimiokines. Comme l'histamine est principalement produite par les mastocytes et les basophiles, ces données suggèrent une interaction directe entre ces cellules et les DC. La capacité de l'histamine à induire la production par les DC de chimiokines impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires démontre que l'histamine est non seulement impliquée dans la réaction immédiate de la réponse allergique mais aussi dans la réaction plus tardive de l'inflammation. Son aptitude à augmenter les propriétés costimulatrices des DC suggère que l'histamine favorise également l'activation des lymphocytes T spécifiques *in situ*.

Les DC proches des mastocytes sont stimulées par l'histamine mais aussi par des facteurs de maturation comme le TNF- α , également produit par les mastocytes. L'histamine n'empêche pas le

processus de maturation des DC induit par le LPS ou le TNF- α , voire le favorise, mais inhibe fortement la capacité de ces DC matures à produire de l'IL-12. Les DC stimulées par l'histamine au moment de l'induction de leur maturation vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs et favoriser leur différenciation en cellules Th2. Une boucle de régulation positive est alors engagée, puisque les cellules Th2 vont faciliter la production d'IgE, le principal médiateur impliqué dans la libération de l'histamine par les mastocytes. Ceci démontre un nouveau mécanisme qui contribue à l'initiation et à la maintenance de la réponse Th2 spécifique associée aux maladies allergiques. En permettant la polarisation des DC en DC2, l'histamine peut également favoriser l'induction de réponses Th2 et la sensibilisation à différents allergènes, comme on peut l'observer chez les sujets atopiques. La figure 18 résume l'effet de l'histamine sur les DC et ses conséquences dans la réponse allergique et dans l'inflammation.

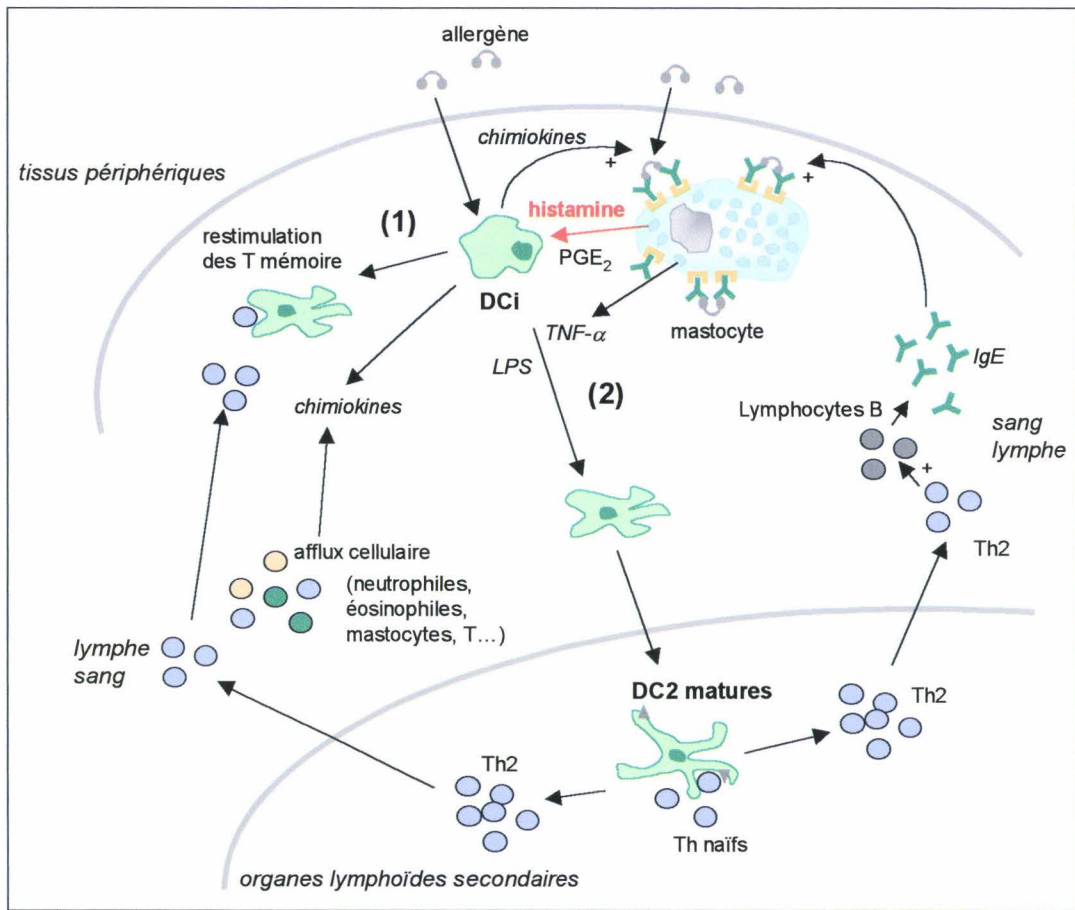


Figure 18. Représentation hypothétique des conséquences de la libération de l'histamine sur les cellules dendritiques : initiation et amplification de la réponse allergique Th2 et de l'inflammation. Au niveau des tissus, les mastocytes libèrent l'histamine lors du contact avec l'allergène, *via* les IgE fixés à leurs récepteurs. Les DC immatures proches vont être activées par l'histamine, et elles vont soit (1) rester sur place et sécréter des chimiokines impliquées dans l'afflux cellulaire au site de l'inflammation ou restimuler les lymphocytes T mémoire, soit (2) maturer sous l'influence de facteurs de stress et migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont permettre la différenciation des cellules Th2. Ces cellules Th2 vont pouvoir stimuler la production d'IgE par les lymphocytes B, permettant de nouveau l'activation des mastocytes. Le signe + indique une activation.

Les DC2 inductrices d'une réponse Th2 peuvent être utiles en immunothérapie, notamment pour le traitement de pathologies associées à une réponse Th1 excessive. La mise en évidence des DC plasmacytoïdes ou pré-DC2 chez l'homme permet d'envisager leur utilisation dans le cas de maladies auto-immunes ou de GvHD (Liu et Blom, 2000). Cependant, si les DC1 myéloïdes ont pu être utilisées en immunothérapie anticancéreuse afin d'obtenir une réponse Th1 antitumorale efficace (Fong et Engleman, 2000), l'application potentielle des pré-DC2 est limitée, notamment parce que la fréquence de ces pré-DC2 dans le sang est faible (0,2 à 0,8%) et que l'identité et la fonction des DC2 matures *in vivo* ne sont pas très claires. Récemment, Arpinati *et al.* (2000) ont montré que le traitement au G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), utilisé lors de transplantations de cellules souches, multipliait par 5 la quantité de pré-DC2 dans le sang, alors que la fréquence des DC myéloïdes restait inchangée. La combinaison du traitement au G-CSF et de la leucaphérèse pourrait offrir la possibilité de générer suffisamment de DC2 pour l'immunothérapie de certaines maladies autoimmunes ou de la GvHD. La compréhension du développement et de la régulation des pré-DC2 à partir des cellules souches hématopoïétiques reste une étape cruciale dans la génération de grandes quantités de DC2. Parce que l'identité des DC2 matures *in vivo* et le devenir des pré-DC2 transférées ne sont pas encore connus, une corrélation directe entre le transfert de pré-DC2 et l'augmentation de la réponse Th2 ainsi que la diminution de la GvHD reste encore à établir. Une autre approche serait alors la génération *ex vivo* de DC2 matures à partir de monocytes des patients. Ces cellules seraient cultivées en présence de PGE₂, d'histamine ou d'agonistes H2, en présence d'un facteur de maturation, puis seraient réinjectées afin de déclencher une réponse Th2.

Une autre possibilité thérapeutique serait l'administration d'agonistes H2 afin de diminuer la réponse Th1 associée par exemple à la sclérose en plaque. Cette hypothèse pourrait être évaluée dans des modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Il a d'ailleurs été montré que la toxine cholérique, qui est également un agent polarisant les DC en DC2, administrée par voie nasale, diminuait les symptômes de l'EAE en diminuant l'intensité de la réponse Th1 (Yura *et al.*, 2001). La toxine cholérique administrée par voie orale diminue également les symptômes de la colite induite par le TNBS (acide sulfonique trinitrobenzène), modèle murin de la maladie de Crohn, associée à une forte production d'IL-12 et une réponse Th1 excessive (Boirivant *et al.*, 2001). L'inhibition de la réponse Th1 par les molécules polarisant les DC en DC2 semble être également une approche envisageable dans le traitement de la maladie de Crohn, ainsi que dans d'autres pathologies associées à une réponse Th1 excessive.

En conclusion, nous montrons que l'histamine active les DC humaines et les polarise en DC2, favorisant ainsi la différenciation de cellules Th2. Les travaux présentés ici mettent ainsi en évidence un nouveau mécanisme à l'origine de l'induction et du maintien de la réponse Th2 lors de la réaction allergique. L'histamine semble donc constituer un lien entre la réaction d'hypersensibilité immédiate et le développement d'une réaction inflammatoire cellulaire, puisqu'elle favorise d'une part la production de chimiokines et cytokines proinflammatoires par différents types cellulaires et, d'autre part, le développement d'une réponse Th2 spécifique.

Il serait intéressant d'évaluer les effets de l'histamine sur les DC en association avec d'autres médiateurs produits par les mastocytes, comme PGE₂ ou la sphingosine phosphate qui présentent également des propriétés de polarisation des DC. Ces observations seraient alors validées sur des cellules de sujets allergiques, par exemple avant et après traitement avec des antihistaminiques, et dans le cadre d'une réponse immune spécifique d'un allergène.

Enfin, la découverte de molécules capables d'induire la polarisation des DC en DC2 est utile d'un point de vue thérapeutique, car il est envisageable d'utiliser de telles cellules dans le traitement de pathologies associées à une réponse Th1 excessive. L'histamine ou des agonistes H2 pourrait ainsi être testés dans des modèles *in vivo* de maladies auto-immunes ou de rejet de greffe afin d'évaluer leur capacité à réorienter ou à diminuer la réponse Th1 pathologique.

BIBLIOGRAPHIE

A.

- Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, Bayram H, Prior AJ, Davies RJ. 1998. Effect of fexofenadine on eosinophil-induced changes in epithelial permeability and cytokine release from nasal epithelial cells of patients with seasonal allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol.* 101:410.
- Adams WJ, Lawson JA, Morris DL. 1994. Cimetidine inhibits in vivo growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo growth. *Gut.* 35:1632.
- Adams JF, Scholvinck EH, Gie RP, Potter PC, Beyers N, Beyers AD. 1999. Decline in total serum IgE after treatment for tuberculosis. *Lancet.* 353:2030.
- Akdis CA, Blaser K. 2000. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy.* 55:522.
- Alam R, Welter JB, Forsythe PA, Lett-Brown MA, Grant JA. 1989. Comparative effect of recombinant IL-1, -2, -3, -4, and -6, IFN-gamma, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, and histamine-releasing factors on the secretion of histamine from basophils. *J Immunol.* 142:3431.
- Alam R, Forsythe PA, Stafford S, Lett-Brown MA, Grant JA. 1992. Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. *J Exp Med.* 176:781.
- Alam R, Forsythe P, Stafford S, Heinrich J, Bravo R, Proost P, Van Damme J. 1994. Monocyte chemoattractant protein-2, monocyte chemoattractant protein-3, and fibroblast-induced cytokine. Three new chemokines induce chemotaxis and activation of basophils. *J Immunol.* 153:3155.
- Alam R, Grant JA. 1995. The chemokines and the histamine-releasing factors: modulation of function of basophils, mast cells and eosinophils. *Chem Immunol.* 61:148.
- Allen JI, Syropoulos HJ, Grant B, Eagon JC, Kay NE. 1987. Cimetidine modulates natural killer cell function of patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Lab Clin Med.* 109:396.
- Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD. 1994. Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF-alpha production. Role of tumor-derived IL-10, TGF-beta, and prostaglandin E2. *J Immunol.* 153:1674.
- Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G. 1999. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet.* 353:1485.
- Aloisi F, Penna G, Cerase J, Menendez Iglesias B, Adorini L. 1997. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. *J Immunol.* 159:1604.
- Anlar B, Gucuyener K, Imir T, Yalaz K, Renda Y. 1993. Cimetidine as an immunomodulator in subacute sclerosing panencephalitis: a double blind, placebo-controlled study. *Pediatr Infect Dis J.* 12:578.
- Annunziato F, Manetti R, Tomasevic I, Guidizi MG, Biagiotti R, Gianno V, Germano P, Mavilia C, Maggi E, Romagnani S. 1996. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production. *FASEB J.* 10:769.
- Annunziato F, Galli G, Cosmi L, Romagnani P, Manetti R, Maggi E, Romagnani S. 1998. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur Cytokine Netw.* 9:12.
- Aoi R, Nakashima I, Kitamura Y, Asai H, Nakano K. 1989. Histamine synthesis by mouse T lymphocytes through induced histidine decarboxylase. *Immunology.* 66:219.
- Aoki Y, Qiu D, Zhao GH, Kao PN. 1998. Leukotriene B4 mediates histamine induction of NF-kappaB and IL-8 in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol.* 274:L1030.
- Arad G, Nussinovich R, Na'amad M, Kaempfer R. 1996. Dual control of human interleukin-2 and interferon-gamma gene expression by histamine: activation and suppression. *Cell Immunol.* 170:149.

- Arima M, Plitt J, Stellato C, Bickel C, Motojima S, Makino S, Fukuda T, Schleimer RP. 1999. Expression of interleukin-16 by human epithelial cells. Inhibition by dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:684.
- Arock M, Schneider E, Boissan M, Tricottet V, Dy M. 2002. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leukoc Biol.* 71:557.
- Arock M, Michel L, Dalloul AH, Guillosson JJ, Debre P, Mossalayi MD. 1991. Soluble CD23 increases IL-3 induction of histamine synthesis by human bone marrow cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 96:190.
- Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. 2000. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood.* 95:2484.
- Asea A, Hermodsson S, Hellstrand K. 1996. Histaminergic regulation of natural killer cell-mediated clearance of tumour cells in mice. *Scand J Immunol.* 43:9.
- Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A. 1997. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385:81.
- Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Hidaka A, Ohura K. 2001. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNFalpha and IL-12 by macrophages via H2-receptors. *Int Immunopharmacol.* 1:1867.

B.

- Babu KS, Arshad SH, Holgate ST. 2001. Anti-IgE treatment: an update. *Allergy.* 56:1121.
- Bach EA, Szabo SJ, Dighe AS, Ashkenazi A, Aguet M, Murphy KM, Schreiber RD. 1995. Ligand-induced autoregulation of IFN-gamma receptor beta chain expression in T helper cell subsets. *Science.* 270:1215.
- Bachert C. 1998. Histamine: a major role in allergy? *Clin Exp Allergy.* 28:15.
- Baghestanian M, Hofbauer R, Kiener HP, Bankl HC, Wimazal F, Willheim M, Scheiner O, Fureder W, Muller MR, Bevec D, Lechner K, Valent P. 1997. The c-kit ligand stem cell factor and anti-IgE promote expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human lung mast cells. *Blood.* 90:4438.
- Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245.
- Banu Y, Watanabe T. 1999. Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling. *J Exp Med.* 189:673.
- Batra S, Fadeel I. 1994. Release of intracellular calcium and stimulation of cell growth by ATP and histamine in human ovarian cancer cells (SKOV-3). *Cancer Lett.* 77:57.
- Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Czarlewski W, Campbell AM, Bousquet J, Davies RJ. 1999. Effect of loratadine on nitrogen dioxide-induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol.* 104:93.
- Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O. 1996. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J Exp Med.* 184:1285.
- Bencsath M, Gidali J, Szeberenyi J, Veszely G, Hegyi K, Falus A. 2000. Regulation of murine hematopoietic colony formation by histamine. *Inflamm Res.* 49:S66.
- Berger S, Chandra R, Ballo H, Hildenbrand R, Stutte HJ. 1997. Immune complexes are potent inhibitors of interleukin-12 secretion by human monocytes. *Eur J Immunol.* 27:2994.
- Biron CA. 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol.* 9:24.

- Bissonnette EY. 1996. Histamine inhibits tumor necrosis factor alpha release by mast cells through H2 and H3 receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14:620.
- Boirivant M, Fuss IJ, Ferroni L, De Pascale M, Strober W. 2001. Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis. *J Immunol.* 166:3522.
- Bolton E, King J, Morris DL. 2000. H2-antagonists in the treatment of colon and breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 10:3.
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med.* 187:129.
- Borish L, Mascali JJ, Rosenwasser LJ. 1991. IgE-dependent cytokine production by human peripheral blood mononuclear phagocytes. *J Immunol.* 146:63.
- Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST. 1994. Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:471-80.
- Braun MC, Lahey E, Kelsall BL. 2000. Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol.* 164:3009.
- Briner TJ, Kuo MC, Keating KM, Rogers BL, Greenstein JL. 1993. Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:7608.
- Brostoff J, Pack S, Lydyard PM. 1980. Histamine suppression of lymphocyte activation. *Clin Exp Immunol.* 39:739.
- Brown DR, Fowell DJ, Corry DB, Wynn TA, Moskowitz NH, Cheever AW, Locksley RM, Reiner SL. 1996. Beta 2-microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. *J Exp Med.* 184:1295.
- Brown RE, Stevens DR, Haas HL. 2001. The physiology of brain histamine. *Prog Neurobiol.* 63:637.
- Brune M, Hellstrand K. 1996. Remission maintenance therapy with histamine and interleukin-2 in acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 92:620.
- Brunner T, de Weck AL, Dahinden CA. 1991. Platelet-activating factor induces mediator release by human basophils primed with IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or IL-5. *J Immunol.* 147:237.
- Brzezinska-Blaszczyk E, Pietrzak A. 1997. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates human adenoidal and cutaneous mast cells to histamine secretion. *Immunol Lett.* 59:139.
- Bucy RP, Karr L, Huang GQ, Li J, Carter D, Honjo K, Lemons JA, Murphy KM, Weaver CT. 1995. Single cell analysis of cytokine gene coexpression during CD4+ T-cell phenotype development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:7565.
- Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. 1997. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur J Immunol.* 27:1848.
- Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. 1995. Activated mast cells produce interleukin 13. *J Exp Med.* 181:1373.
- Burtin C, Scheinmann P, Salomon JC, Lespinats G, Canu P. 1982. Decrease in tumour growth by injections of histamine or serotonin in fibrosarcoma-bearing mice: influence of H1 and H2 histamine receptors. *Br J Cancer.* 45:54.

- Bury TB, Corhay JL, Radermecker MF. 1992. Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T-lymphocyte proliferation in man. *Allergy*. 47:624.
- Byron JW. 1977. Mechanism for histamine H2-receptor induced cell-cycle changes in the bone marrow stem cell. *Agents Actions*. 7:209.

C.

- Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 2001. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol*. 145:351.
- Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 9:10.
- Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. 1999a. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*. 189:821.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. 1999b. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*. 5:919.
- Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. 2000. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*. 1:305.
- Cetin L, Yilmaz E, Alpsoy E, Basaran E. 1997. High-dose ranitidine is ineffective in the treatment of psoriasis. *Br J Dermatol*. 137:1021.
- Chan SC, Brown MA, Willcox TM, Li SH, Stevens SR, Tara D, Hanifin JM. 1996. Abnormal IL-4 gene expression by atopic dermatitis T lymphocytes is reflected in altered nuclear protein interactions with IL-4 transcriptional regulatory element. *J Invest Dermatol*. 106:1131.
- Chan WL, Pejnovic N, Lee CA, Al-Ali NA. 2001. Human IL-18 receptor and ST2L are stable and selective markers for the respective type 1 and type 2 circulating lymphocytes. *J Immunol*. 167:1238.
- Cehimi J, Starr SE, Frank I, D'Andrea A, Ma X, MacGregor RR, Sennelier J, Trinchieri G. 1994. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Exp Med*. 179:1361.
- Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie MH, Gurney A, Grewal IS, de Sauvage FJ. 2000. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature*. 407:916.
- Coffey RG, Alberts VA, Weakland LL. 1990. Prostaglandin-dependent desensitization of human monocyte cAMP responses. *J Leukoc Biol*. 48:557.
- Constant S, Pfeiffer C, Woodard A, Pasqualini T, Bottomly K. 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med*. 182:1591.
- Constant SL, Bottomly K. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*. 15:297.
- Corbel S, Traiffort E, Stark H, Schunack W, Dy M. 1997. Binding of histamine H3-receptor antagonists to hematopoietic progenitor cells. Evidence for a histamine transporter unrelated to histamine H3 receptors. *FEBS Lett*. 404:289.
- Cricco G, Davio C, Bergoc R, Rivera E. 1993. Inhibition of tumor growth induced by histamine-in vivo and in vitro studies. *Agents Action*. 38:C175.
- Cricco GP, Davio CA, Martin G, Engel N, Fitzsimons CP, Bergoc RM, Rivera ES. 1994. Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas. *Agents Actions*. 43:17.

Cricco G, Martin G, Labombarda F, Cocca C, Bergoc R, Rivera E. 2000. Human pancreatic carcinoma cell line Panc-I and the role of histamine in growth regulation. *Inflamm Res.* 49:568.

D.

D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P, Lang R, Sinigaglia F, Panina-Bordignon P. 1998. Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *J Clin Invest.* 101:252.

Davodeau F, Peyrat MA, Necker A, Dominici R, Blanchard F, Leget C, Gaschet J, Costa P, Jacques Y, Godard A, Vie H, Poggi A, Romagne F, Bonneville M. 1997. Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains. *J Immunol.* 158:5603.

De Backer MD, Gommeren W, Moereels H, Nobels G, Van Gompel P, Leysen JE, Luyten WH. 1993. Genomic cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a human histamine H1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 197:1601.

De Jong R, Altare F, Haagen IA, Elferink DG, Boer T, van Breda Vriesman PJ, Kabel PJ, Draaisma JM, van Dissel JT, Kroon FP, Casanova JL, Ottenhoff TH. 1998. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science.* 280:1435.

De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Kapsenberg ML. 1999. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol.* 66:201.

De Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol.* 168:1704.

De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 27:1229.

De St Groth BF. 1998. The evolution of self-tolerance: a new cell arises to meet the challenge of self-reactivity. *Immunol Today.* 19:448.

De Waal Malefyt R. 1997. The role of type I interferons in the differentiation and function of Th1 and Th2 cells. *Semin Oncol* 24:S9-94.

Delespesse G, Ohshima Y, Yang LP, Demeure C, Sarfati M. 1999. OX40-Mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4⁺ T cells into high IL-4-producing effectors. *Int Arch Allergy Immunol.* 118:384.

Della Rovere F, Broccio G, Granata A, Fimiani V. 1994. In vivo experimental demonstration that hyperhistaminism counteracts tumor growth. *Oncol Reports.* 1:175.

Delneste Y, Lassalle P, Jeannin P, Joseph M, Tonnel AB, Gosset P. 1994. Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 98:344.

Delneste Y, Jeannin P, Gosset P, Lassalle P, Cardot E, Tillie-Leblond I, Joseph M, Pestel J, Tonnel AB. 1995. Allergen-stimulated T lymphocytes from allergic patients induce vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression and IL-6 production by endothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 101:164.

Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. 1991. Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest.* 88:346.

Del Prete G. 1992. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy.* 47:450.

- Del Prete G, De Carli M, D'Elis MM, Daniel CK, Almerigogna F, Alderson M, Smith CA, Thomas E, Romagnani S. **1995.** CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. *J Exp Med.* 182:1655.
- Del Prete G. **1998.** The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immunol.* 16:427.
- Del Valle J, Wang L, Gantz I, Yamada T. **1992.** Characterization of H2 histamine receptor: linkage to both adenylate cyclase and [Ca²⁺]_i signaling systems. *Am J Physiol.* 263:G967.
- Del Valle J, Gantz I. **1997.** Novel insights into histamine H2 receptor biology. *Am J Physiol.* 273:G987.
- Demeure CE, Wu CY, Shu U, Schneider PV, Heusser C, Yssel H, Delespesse G. **1994.** In vitro maturation of human neonatal CD4 T lymphocytes. II. Cytokines present at priming modulate the development of lymphokine production. *J Immunol.* 152:4775.
- Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. **2000.** CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 164:2193.
- D'Orazio TJ, Niederkorn JY. **1998.** A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *J Immunol.* 160:2089.
- Dohlsten M, Hedlund G, Sjogren HO, Carlsson R. **1988a.** Inhibitory effects of histamine on interleukin 2 and gamma interferon production of different human T helper cell subsets. *Scand J Immunol.* 28:727.
- Dohlsten M, Kalland T, Sjogren HO, Carlsson R. **1988b.** Histamine inhibits interleukin 1 production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood monocytes. *Scand J Immunol.* 27:527.
- Drakesmith H, O'Neil D, Schneider SC, Binks M, Medd P, Sercarz E, Beverley P, Chain B. **1998.** In vivo priming of T cells against cryptic determinants by dendritic cells exposed to interleukin 6 and native antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14903.
- Droge W, Schmidt H, Nick S, Sonsky B. **1986.** Histamine augments interleukin-2 production and the activation of cytotoxic T lymphocytes. *Immunopharmacology.* 11:1.
- Drutel G, Peitsaro N, Karlstedt K, Wieland K, Smit MJ, Timmerman H, Panula P, Leurs R. **2001.** Identification of rat H3 receptor isoforms with different brain expression and signaling properties. *Mol Pharmacol.* 59:1.
- Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. **1998.** T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 16:201.
- Dy M, Lebel B, Kamoun P, Hamburger J. **1981.** Histamine production during the anti-allograft response. Demonstration of a new lymphokine enhancing histamine synthesis. *J Exp Med.* 153:293.
- Dy M, Lebel B, Schneider E. **1986.** Histamine-producing cell stimulating factor (HCSF) and interleukin 3 (IL 3): evidence for two distinct molecular entities. *J Immunol.* 136:208.
- Dy M, Schneider E, Gastinel LN, Auffray C, Mermod JJ, Hamburger J. **1987.** Histamine-producing cell-stimulating activity. A biological activity shared by interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur J Immunol.* 17:1243.
- Dy M, Schneider E. **1991.** Interleukin-3 (IL-3) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): two cytokines increasing histamine synthesis by hematopoietic cells. *Eur Cytokine Netw.* 2:153.

E.

- Ebner C. **1999.** Immunological mechanisms operative in allergen-specific immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol.* 119:1.
- Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, Fleisher TA, Chrousos GP, Wilder RL. **1998.** Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J Immunol.* 161:2586.

- Elizondo G, Ostrosky-Wegman P. 1996. Effects of metronidazole and its metabolites on histamine immunosuppression activity. *Life Sci.* 59:285.
- Elliott KA, Osna NA, Scofield MA, Khan MM. 2001. Regulation of IL-13 production by histamine in cloned murine T helper type 2 cells. *Int Immunopharmacol.* 1:1923.
- Endo Y, Kikuchi T, Takeda Y, Nitta Y, Rikiishi H, Kumagai K. 1992. GM-CSF and G-CSF stimulate the synthesis of histamine and putrescine in the hematopoietic organs in vivo. *Immunol Lett.* 33:9.
- Erb KJ, Holloway JW, Sobeck A, Moll H, Le Gros G. 1998. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-*Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J Exp Med.* 187:561.
- Erb KJ. 1999. Atopic disorders: a default pathway in the absence of infection? *Immunol Today.* 20:317.

F.

- Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. 2000. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood.* 96:4028.
- Falus A. 1993. Interleukin-6 biosynthesis is increased by histamine in human B-cell and glioblastoma cell lines. *Immunology.* 78:193.
- Farrar JD, Murphy KM. 2000. Type I interferons and T helper development. *Immunol Today.* 21:484.
- Fasler S, Aversa G, Terr A, Thestrup-Pedersen K, de Vries JE, Yssel H. 1995. Peptide-induced anergy in allergen-specific human Th2 cells results in lack of cytokine production and B cell help for IgE synthesis. Reversal by IL-2, not by IL-4 or IL-13. *J Immunol.* 155:4199.
- Feder HM Jr. 1992. Cimetidine treatment for periodic fever associated with aphthous stomatitis, pharyngitis and cervical adenitis. *Pediatr Infect Dis J.* 11:318.
- Felix SB, Buschauer A, Baumann G. 1991. Therapeutic value of H2-receptor stimulation in congestive heart failure. Hemodynamic effects of BU-E-76, BU-E-75 and arpromidine (BU-E-50) in comparison to impromidine. *Agents Actions Suppl.* 33:257.
- Finn PE, Purnell P, Pilkington GJ. 1996. Effect of histamine and the H2 antagonist cimetidine on the growth and migration of human neoplastic glia. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22:317.
- Fong L, Engleman EG. 2000. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 18:245.
- Foster AP, Cunningham FM. 1998. Histamine-induced adherence and migration of equine eosinophils. *Am J Vet Res.* 59:1153.
- Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivailler P, Rissoan MC, Liu YJ, Roubourdin-Combe C. 1997. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med.* 186:813.
- Fujikura T, Shimosawa T, Yakuo I. 2001. Regulatory effect of histamine H1 receptor antagonist on the expression of messenger RNA encoding CC chemokines in the human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 107:123.
- Fukushima Y, Asano T, Katagiri H, Aihara M, Saitoh T, Anai M, Funaki M, Ogihara T, Inukai K, Matsuhashi N, Oka Y, Yazaki Y, Sugano K. 1996. Interaction between the two signal transduction systems of the histamine H2 receptor: desensitizing and sensitizing effects of histamine stimulation on histamine-dependent cAMP production in Chinese hamster ovary cells. *Biochem J.* 320:27.

G.

- Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A, De Magistris MT. 2000. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur J Immunol.* 30:2394.

- Galli G, Chantry D, Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Manetti R, Maggi E, Gray PW, Romagnani S. 2000. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol.* 30:204.
- Gantz I, Schaffer M, DelValle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T. 1991. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:429.
- Gasior-Chrzan B, Falk ES. 1992. Systemic mastocytosis treated with histamine H1 and H2 receptor antagonists. *Dermatology.* 184:149.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 16:495.
- Gauchat JF, Henchoz S, Mazzei G, Aubry JP, Brunner T, Blasey H, Life P, Talabot D, Flores-Romo L, Thompson J, et al. 1993. Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature.* 365:340.
- Geissmann F, Revy P, Regnault A, Lepelletier Y, Dy M, Brousse N, Amigorena S, Hermine O, Durandy A. 1999. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol.* 162:4567.
- Gillson G, Wright JV, DeLack E, Ballasiotes G. 1999. Transdermal histamine in multiple sclerosis: part one -- clinical experience. *Altern Med Rev.* 4:424.
- Gleich GJ. 2000. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 105:651.
- Grady EF, Bohm SK, Bunnett NW. 1997. Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol.* 273:G586.
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 20:621.

H.

- Haak-Frendscho M, Dinarello C, Kaplan AP. 1988. Recombinant human interleukin-1 beta causes histamine release from human basophils. *J Allergy Clin Immunol.* 82:218.
- Hahm KB, Park IS, Kim HC, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Lee SI. 1996. Comparison of antiproliferative effects of 1-histamine-2 receptor antagonists, cimetidine, ranitidine, and famotidine, in gastric cancer cells. *Int J Immunopharmacol.* 18:393.
- Hakanson R, Sundler F. 1991. Histamine-producing cells in the stomach and their role in the regulation of acid secretion. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 180:88.
- Hart PH. 2001. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol.* 79:149.
- Hellstrand K, Asea A, Hermodsson S. 1990. Role of histamine in natural killer cell-mediated resistance against tumor cells. *J Immunol.* 145:4365.
- Hellstrand K, Naredi P, Lindner P, Lundholm K, Rudenstam CM, Hermodsson S, Asztely M, Hafstrom L. 1994. Histamine in immunotherapy of advanced melanoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother.* 39:416.
- Hellstrand K, Asea A, Hermodsson S. 1995. Role of histamine in natural killer cell-dependent protection against herpes simplex virus type 2 infection in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2:277.
- Hellstrand K, Hermodsson S, Brune M, Naredi P, Carneskog J, Mellqvist UH. 1997. Histamine in cancer immunotherapy. *Scand J Clin Lab Invest.* 57:193.

- Hellstrand K, Hansson M, Hermodsson S. 2000. Adjuvant histamine in cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 10:29.
- Hernandez-Angeles A, Soria-Jasso LE, Ortega A, Arias-Montano JA. 2001. Histamine H1 receptor activation stimulates mitogenesis in human astrocytoma U373 MG cells. *J Neurooncol.* 55:81.
- Hershkoviz R, Lider O, Baram D, Reshef T, Miron S, Mekori YA. 1994. Inhibition of T cell adhesion to extracellular matrix glycoproteins by histamine: a role for mast cell degranulation products. *J Leukoc Biol.* 56:495.
- Herz U, Lacy P, Renz H, Erb K. 2000. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr Opin Immunol.* 12:632.
- Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood.* 90:1920.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev.* 49:253.
- Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. 1996. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell.* 85:973.
- Hodge MR, Chun HJ, Rengarajan J, Alt A, Lieberson R, Glimcher LH. 1996. NF-AT-Driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science.* 274:1903.
- Hogaboam C, Kunkel SL, Strieter RM, Taub DD, Lincoln P, Standiford TJ, Lukacs NW. 1998. Novel role of transmembrane SCF for mast cell activation and eotaxin production in mast cell-fibroblast interactions. *J Immunol.* 160:6166.
- Horvath BV, Szalai C, Mandi Y, Laszlo V, Radvany Z, Darvas Z, Falus A. 1999. Histamine and histamine-receptor antagonists modify gene expression and biosynthesis of interferon gamma in peripheral human blood mononuclear cells and in CD19-depleted cell subsets. *Immunol Lett.* 70:95.
- Hotermans G, Bury T, Radermecker MF. 1991. Effect of histamine on tumor necrosis factor production by human monocytes. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 95:278.
- Hough LB. 2001. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol.* 59:415.
- Hovgaard DJ, Stahl Skov P, Nissen NI. 1997. The in vivo effects of interleukin-3 on histamine levels in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Pharmacol Toxicol.* 80:290.
- Hoyne GF, Askonas BA, Hetzel C, Thomas WR, Lamb JR. 1995. Regulation of house dust mite responses by intranasally administered peptide: transient activation of CD4+ T cells precedes the development of tolerance in vivo. *Int Immunol.* 8:335.
- Huang M, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. 1996. Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J Immunol.* 157:5512.

I.

- Idzko M, Panther E, Corinti S, Morelli A, Ferrari D, Herouy Y, Dichmann S, Mockenhaupt M, Gebicke-Haerter P, Di Virgilio F, Girolomoni G, Norgauer J. 2002. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. *FASEB J.* 16:625.
- Iezzi G, Scotet E, Scheidegger D, Lanzavecchia A. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol.* 29:4092.

- Igarashi O, Yamane H, Imajoh-Ohmi S, Nariuchi H. **1998**. IL-12 receptor (IL-12R) expression and accumulation of IL-12R beta 1 and IL-12R beta 2 mRNAs in CD4⁺ T cells by costimulation with B7-2 molecules. *J Immunol.* 160:1638.
- Igaz P, Novak I, Lazaar E, Horvath B, Heninger E, Falus A. **2001**. Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflamm Res.* 50:123.
- Ishizuka T, Okayama Y, Kobayashi H, Mori M. **1999**. Interleukin-10 is localized to and released by human lung mast cells. *Clin Exp Allergy.* 29:1424.
- Iwasaki A, Kelsall BL. **1999**. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med.* 190:229.

J.

- Jaffe JS, Glaum MC, Raible DG, Post TJ, Dimitry E, Govindarao D, Wang Y, Schulman ES. **1995**. Human lung mast cell IL-5 gene and protein expression: temporal analysis of upregulation following IgE-mediated activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13:665.
- Jahnsen FL, Lund-Johansen F, Dunne JF, Farkas L, Haye R, Brandtzaeg P. **2000**. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol.* 165:4062.
- Jeannin P, Delneste Y, Gosset P, Molet S, Lassalle P, Hamid Q, Tsiocopoulos A, Tonnel AB. **1994**. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood.* 84:2229.
- Johansson S, Landstrom M, Hellstrand K, Henriksson R. **1998**. The response of Dunning R3327 prostatic adenocarcinoma to IL-2, histamine and radiation. *Br J Cancer.* 77:1213.
- Johansson M, Henriksson R, Bergenheim AT, Koskinen LO. **2000**. Interleukin-2 and histamine in combination inhibit tumour growth and angiogenesis in malignant glioma. *Br J Cancer.* 83:826.
- Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CA. **2002**. Germinal Center B Cells Constitute a Predominant Physiological Source of IL-4: Implication for Th2 Development In Vivo. *J Immunol.* 168:3165.
- Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW. **1993**. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophys J.* 65:1560.
- Jones AC, Miles EA, Warner JO, Colwell BM, Bryant TN, Warner JA. **1996**. Fetal peripheral blood mononuclear cell proliferative responses to mitogenic and allergenic stimuli during gestation. *Pediatr Allergy Immunol.* 7:109.
- Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. **2001a**. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature.* 413:420.
- Jutel M, Klunker S, Akdis M, Malolepszy J, Thomet OA, Zak-Nejmark T, Blaser K, Akdis CA. **2001b**. Histamine upregulates Th1 and downregulates Th2 responses due to different patterns of surface histamine 1 and 2 receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol.* 124:190.

K.

- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. **2000**. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 192:219.
- Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. **2001**. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c⁻ type 2 dendritic cell precursors and CD11c⁺ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol.* 166:2291.

- Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdwint FG, Kapsenberg ML. 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.* 159:28.
- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. 1998. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 161:2804.
- Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 20:561.
- Kamogawa Y, Minasi LA, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA. 1993. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell.* 75:985.
- Kanbe N, Kurosawa M, Nagata H, Yamashita T, Kurimoto F, Miyachi Y. 2000. Production of fibrogenic cytokines by cord blood-derived cultured human mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 106:S85.
- Kapsenberg ML, Hilkens CM, Wierenga EA, Kalinski P. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy. 1999. *Clin Exp Allergy.* 29 S2:33.
- Kapsenberg ML, Hilkens CM, van Der Pouw Kraan TC, Wierenga EA, Kalinski P. 2000. Atopic allergy: a failure of antigen-presenting cells to properly polarize helper T cells? *Am J Respir Crit Care Med.* 162:S76.
- Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B, Trinchieri G, Griffin DE. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science.* 273:228.
- Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. 1997. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J Immunol.* 158:4129.
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. 1999. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J Exp Med.* 189:1451.
- Khan MM, Melmon KL, Fathman CG, Hertel-Wulff B, Strober S. 1985. The effects of autacoids on cloned murine lymphoid cells: modulation of IL 2 secretion and the activity of natural suppressor cells. *J Immunol.* 134:4100.
- Khan MM, Keaney KM, Melmon KL, Clayberger C, Krensky AM. 1989. Histamine regulates the generation of human cytolytic T lymphocytes. *Cell Immunol.* 121:60.
- Khan MM. 1998. Regulation of IL-4 and IL-5 secretion by histamine and PGE2. *Adv Exp Med Biol.* 383:35.
- Kohka H, Nishibori M, Iwagaki H, Nakaya N, Yoshino T, Kobashi K, Saeki K, Tanaka N, Akagi T. 2000. Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 164:6640.
- Krieger M, Brunner T, Bischoff SC, von Tscherner V, Walz A, Moser B, Baggiolini M, Dahinden CA. 1992. Activation of human basophils through the IL-8 receptor. *J Immunol.* 149:2662.
- Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, Bieber J, Chi DS. 2001. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci.* 6:D1109.
- Krouwels FH, Hol BE, Lutter R, Bruinier B, Bast A, Jansen HM, Out TA. 1998. Histamine affects interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma production by human T cell clones from the airways and blood. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18:721.
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. 2001. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol.* 31:3026.

- Kubes P, Kanwar S. 1994. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol.* 152:3570.
- Kubo M, Yamashita M, Abe R, Tada T, Okumura K, Ransom JT, Nakayama T. 1999. CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. *J Immunol.* 163:2432.
- Kubo Y, Nakano K. 1999. Regulation of histamine synthesis in mouse CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Inflamm Res.* 48:149.
- Kuchroo VK, Das MP, Brown JA, Ranger AM, Zamvil SS, Sobel RA, Weiner HL, Nabavi N, Glimcher LH. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell.* 80:707.
- Kuna P, Reddigari SR, Kornfeld D, Kaplan AP. 1991. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3. *J Immunol.* 147:1920.
- Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY, Kaplan AP. 1992. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol.* 149:636.
- Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Sadick M, Kaplan AP. 1993. Characterization of the human basophil response to cytokines, growth factors, and histamine releasing factors of the intercrine/chemokine family. *J Immunol.* 150:1932.
- Kupietzky A, Levi-Schaffer F. 1996. The role of mast cell-derived histamine in the closure of an in vitro wound. *Inflamm Res.* 45:176.
- L.**
-
- La Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. 2001. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol.* 166:1611.
- Laberge S, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. 1995. Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation. Evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J Immunol.* 155:2902.
- Lagier B, Lebel B, Bousquet J, Pene J. 1997. Different modulation by histamine of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) release according to the phenotype of human Th0, Th1 and Th2 clones. *Clin Exp Immunol.* 108:545.
- Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 1:311.
- Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol.* 154:97.
- Lemanske RF & Kaliner MA. 1988. Late phase allergic reactions. In: *Allergy, Principles and Practice*, by Middleton E, Reed CE & Ellis EF. St Louis, MO: Mosby, p. 224.
- Lemos Legnazzi B, Shayo C, Monczor F, Martin ME, Fernandez N, Brodsky A, Baldi A, Davio C. 2000. Rapid desensitization and slow recovery of the cyclic AMP response mediated by histamine H(2) receptors in the U937 cell line. *Biochem Pharmacol.* 60:159.
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14:233.
- Leonardi A, Radice M, Fregona IA, Plebani M, Abatangelo G, Secchi AG. 1999. Histamine effects on conjunctival fibroblasts from patients with vernal conjunctivitis. *Exp Eye Res.* 68:739.
- Laszlo V, Rothe G, Hegyesi H, Szeberenyi JB, Orso E, Schmitz G, Falus A. 2001. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflamm Res.* 50:428.

- Leurs R, Smit MJ, Menge WM, Timmerman H. 1994. Pharmacological characterization of the human histamine H2 receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol.* 112:847.
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther.* 66:413.
- Leurs R, Blandina P, Tedford C, Timmerman H. 1998. Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonists and antagonists. *Trends Pharmacol Sci.* 19:177.
- Leurs R, Hoffmann M, Wieland K, Timmerman H. 2000. H3 receptor gene is cloned at last. *Trends Pharmacol Sci.* 21:11.
- Li Y, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. 2001. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res.* 61:253.
- Liao TN, Hsieh KH. 1992. Characterization of histamine-releasing activity: role of cytokines and IgE heterogeneity. *J Clin Immunol.* 12:248.
- Lie WJ, Mul FP, Roos D, Verhoeven AJ, Knol EF. 1998. Degranulation of human basophils by picomolar concentrations of IL-3, IL-5, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Allergy Clin Immunol.* 101:683.
- Lie WJ, Knol EF, Mul FP, Jansen HM, Roos D, van der Zee JS. 1999. Basophils from patients with allergic asthma show a primed phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 104:1000.
- Lieb K, Schaller H, Bauer J, Berger M, Schulze-Osthoff K, Fiebich BL. 1998. Substance P and histamine induce interleukin-6 expression in human astrocytoma cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-IL-6. *J Neurochem.* 70:1577.
- Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, Wilder RL, Elenkov IJ. 2000. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol.* 164:436.
- Lipscomb MF, Masten BJ. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82:97.
- Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W, Weiner HL. 1998. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol.* 10:1017.
- Liu YJ, Blom B. 2000. Introduction: TH2-inducing DC2 for immunotherapy. *Blood.* 95:2482.
- Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2:585.
- Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW. 2001. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol.* 59:420.
- Li-Weber M, Salgame P, Hu C, Davydov IV, Krammer PH. 1997. Differential interaction of nuclear factors with the PRE-I enhancer element of the human IL-4 promoter in different T cell subsets. *J Immunol.* 158:1194.
- Lorentz A, Schwengberg S, Mierke C, Manns MP, Bischoff SC. 1999. Human intestinal mast cells produce IL-5 in vitro upon IgE receptor cross-linking and in vivo in the course of intestinal inflammatory disease. *Eur J Immunol.* 29:1496.
- Louis R, Dowlati A, Weber T, Bury T, Corhay JL, Radermecker MF. 1994a. Modulation of immunological histamine release from human lung fragments by stem cell factor, IL-3, IL-5 and GM-CSF: comparison with human leukocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 105:18.

- Louis R, Bury T, Corhay JL, Radermecker MF. 1994b. Potentiation of histamine release from human leucocytes by PAF. *Agents Actions*. 41:5.
- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. 1999. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol*. 55:110.
- Low JD, House AK, Norman PE. 1996. Role of cimetidine in the prevention of intimal hyperplasia in rat carotid artery. *Br J Surg*. 83:72-4
- Luksch CR, Winqvist O, Ozaki ME, Karlsson L, Jackson MR, Peterson PA, Webb SR. 1999. Intercellular adhesion molecule-1 inhibits interleukin 4 production by naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:3023.

M.

- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 154:5071.
- MacDonald SM. 1996. Histamine-releasing factors. *Curr Opin Immunol*. 8:778.
- Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, Zeibecoglou K, Khan LN, Barata LT, McEuen AR, Buckley MG, Walls AF, Meng Q, Humbert M, Barnes NC, Robinson DS, Ying S, Kay AB. 2000. Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin. *J Allergy Clin Immunol*. 105:99.
- Mackay CR, Marston WL, Dudler L. 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med*. 171:801.
- Maeda H, Shiraishi A. 1996. TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 156:73.
- Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Ruggi FS, De Carli M, Ricci M, Romagnani S. 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol*. 148:2142.
- Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*. 189:587.
- Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*. 177:1199.
- Manosroi J, Manosroi A, Vithayasai V. 1987. Effect of histamine and antihistamines on interleukin-1 production by human monocytes. *Microbiol Immunol*. 31:1217.
- Marrack P, Kappler J, Mitchell T. 1999. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med*. 189:521.
- Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH. 1994. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science*. 264:1152.
- Marth T, Kelsall BL. 1997. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med*. 185:1987.
- Maruno K, Absood A, Said SI. 1995. VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 268:L1047.
- Masten BJ, Lipscomb MF. 2000. Dendritic cells: pulmonary immune regulation and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis*. 55:225.

- Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R. 1997. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ*. 314:999.
- Maurer D, Ebner C, Reininger B, Petzelbauer P, Fiebiger E, Stingl G. 1997a. Mechanisms of Fc epsilon RI-IgE-facilitated allergen presentation by dendritic cells. *Adv Exp Med Biol*. 417:175.
- Maurer M, Opitz M, Henz BM, Paus R. 1997b. The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF-alpha inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci*. 16:79.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiol Rev*. 77:1033.
- Miadonna A, Roncarolo MG, Lorini M, Tedeschi A. 1993. Inducing and enhancing effects of IL-3, -5, and -6 and GM-CSF on histamine release from human basophils. *Clin Immunol Immunopathol*. 67:210.
- Miki I, Kusano A, Ohta S, Hanai N, Otsu M, Masaki S, Sato S, Ohmori K. 1996. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. *Cell Immunol*. 171:285.
- Miller A, Harel D, Laor A, Lahat N. 1989. Cimetidine as an immunomodulator in the treatment of herpes zoster. *J Neuroimmunol*. 22:69.
- Miner KT, Croft M. 1998. Generation, persistence, and modulation of Th0 effector cells: role of autocrine IL-4 and IFN-gamma. *J Immunol*. 160:5280.
- Minkowski M, Lebel B, Arnould A, Dy M. 1990. Interleukin 3 induces histamine synthesis in the human hemopoietic system. *Exp Hematol*. 18:1158.
- Mitra RS, Shimizu Y, Nickoloff BJ. 1993. Histamine and cis-urocanic acid augment tumor necrosis factor-alpha mediated induction of keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 expression. *J Cell Physiol*. 156:348.
- Miyata R, Iwabuchi K, Watanabe S, Sato N, Nagaoka I. 1999. Short exposure of intestinal epithelial cells to TNF-alpha and histamine induces Mac-1-mediated neutrophil adhesion independent of protein synthesis. *J Leukoc Biol*. 66:437.
- Moller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM. 1993. Human mast cells produce IL-8. *J Immunol*. 151:3261.
- Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwssen CG, Van Haarst JM, Prens EP, Mulder PG, Postma DS, Hoogsteden HC. 1996. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy*. 26:517.
- Mommaas AM, Mulder AA, Jordens R, Out C, Tan MC, Cresswell P, Kluin PM, Koning F. 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol*. 29:571.
- Mor S, Nagler A, Barak V, Handzel ZT, Geller-Bernstein C, Fabian I. 1995. Histamine enhances granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 production by human peripheral blood mononuclear cells. *J Leukoc Biol*. 58:445.
- Moriarty CM. 1993. Histamine as a marker for solid malignant tumors. *Adv Biosci*. 89:98.
- Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE Jr, Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkin RW, Gonsiorek W, Shin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M, Monsma FJ Jr. 2001. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 296:1058.
- Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, Van Mechelen M, Urbain J, Leo O. 1995. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol*. 25:2818.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 136:2348.

Muller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, Bettens F, Blaser K. 1998. Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol.* 101:747.

N.

Naclerio R. 1999. Clinical manifestations of the release of histamine and other inflammatory mediators. *J Allergy Clin Immunol.* 103:382.

Nagata K, Tanaka K, Ogawa K, Kemmotsu K, Imai T, Yoshie O, Abe H, Tada K, Nakamura M, Sugamura K, Takano S. 1999. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol.* 162:1278.

Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA. 1997a. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 158:1085.

Nakamura T, Ueno Y, Goda Y, Nakamura A, Shinjo K, Nagahisa A. 1997b. Efficacy of a selective histamine H2 receptor agonist, dimaprit, in experimental models of endotoxin shock and hepatitis in mice. *Eur J Pharmacol.* 322:83.

Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. 2000. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun.* 279:615.

Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol.* 19:423.

Nakata H, Kinoshita Y, Kishi K, Fukuda H, Kawanami C, Matsushima Y, Asahara M, Okada A, Maekawa T, Chiba T. 1996. Involvement of beta-adrenergic receptor kinase-1 in homologous desensitization of histamine H2 receptors in human gastric carcinoma cell line MKN-45. *Digestion.* 57:406.

Nakaya N, Tasaka K. 1988. The influence of histamine on precursors of granulocytic leukocytes in murine bone marrow. *Life Sci.* 42:999.

Natesan M, Razi-Wolf Z, Reiser H. 1996. Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. *J Immunol.* 156:2783.

Neer EJ. 1996. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signalling. *Cell.* 80:249.

Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF. 2001. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol.* 59:427.

Nickerson P, Steurer W, Steiger J, Zheng X, Steele AW, Strom TB. 1994. Cytokines and the Th1/Th2 paradigm in transplantation. *Curr Opin Immunol.* 6:757.

Nielsen HJ, Nielsen H, Moesgaard F, Tvede N, Klarlund K, Mansa B, Drivsholm A. 1990. The effect of ranitidine on cellular immunity in patients with multiple myeloma. *Cancer Immunol Immunother.* 32:201.

Nielsen HJ, Svenningsen A, Moesgaard F, Georgsen J, Pedersen C, Mathiesen L, Dickmeiss E, Nielsen JO, Kehlet H. 1991. Ranitidine improves certain cellular immune responses in asymptomatic HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 4:577.

Nielsen HJ. 1995. The effect of histamine type-2 receptor antagonists on posttraumatic immune competence. *Dan Med Bull.* 42:162.

Nielsen HJ. 1996. Histamine-2 receptor antagonists as immunomodulators: new therapeutic views? *Ann Med.* 28:107.

Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, Xiang Z, Hallbook F, Nilsson K, Metcalfe DD. 1997. Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur J Immunol.* 27:2295.

Nomura H, Sato E, Koyama S, Haniuda M, Kubo K, Nagai S, Izumi T. 2001. Histamine stimulates alveolar macrophages to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *J Lab Clin Med.* 138:226.

Novack I, Falus A. 1997. Molecular biology and role of histamine in physiological and pathological reactions: a review. *Acta Biol Hung.* 48:385.

O.

Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. 2000. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem.* 275:36781.

Ohshima Y, Delespesse G. 1997. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J Immunol.* 158:629.

Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G. 1998. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4+ T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood.* 92:3338.

Okamoto H, Nakano K. 1990. Regulation of interleukin-1 synthesis by histamine produced by mouse peritoneal macrophages per se. *Immunology.* 69:162.

Olejnik AK, Brzezinska-Blaszczyk E. 1998. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) modulates rat mast cell reactivity. *Immunol Lett.* 64:167.

Osna N, Elliott K, Khan MM. 2001a. Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in TH2 cells and splenocytes. *Int Immunopharmacol.* 1:85.

Osna N, Elliott K, Khan MM. 2001b. The effects of histamine on interferon gamma production are dependent on the stimulatory signals. *Int Immunopharmacol.* 1:135.

P.

Panettieri RA, Yadvish PA, Kelly AM, Rubinstein NA, Kotlikoff MI. 1990. Histamine stimulates proliferation of airway smooth muscle and induces c-fos expression. *Am J Physiol.* 259:L365.

Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F. 1997. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest.* 100:1513.

Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S. 1991. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:4538.

Parronchi P, De Carli M, Manetti R, Simonelli C, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Del Prete G, Ricci M, Romagnani S. 1992. Aberrant interleukin (IL)-4 and IL-5 production in vitro by CD4+ helper T cells from atopic subjects. *Eur J Immunol.* 22:1615.

Parronchi P, Sampognaro S, Annunziato F, Brugnolo F, Radbruch A, Di Modugno F, Ruffilli A, Romagnani S, Maggi E. 1998. Influence of both TCR repertoire and severity of the atopic status on the cytokine secretion profile of *Parietaria officinalis*-specific T cells. *Eur J Immunol.* 28:37.

Passani MB, Blandina P. 1998. Cognitive implications for H3 and 5-HT3 receptor modulation of cortical cholinergic function: a parallel story. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 20:725.

Paul WE et Seder RA. 1994. Lymphocytes responses and cytokines. *Cell.* 76:241.

Pearson CI, van Ewijk W, McDevitt HO. 1997. Induction of apoptosis and T helper 2 (Th2) responses correlates with peptide affinity for the major histocompatibility complex in self-reactive T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 185:583.

- Perez-Garcia C, Morales L, Cano MV, Sancho I, Alguacil LF. 1999. Effects of histamine H3 receptor ligands in experimental models of anxiety and depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 142:215.
- Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P. 1995. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science*. 269:245.
- Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. 1998. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res*. 58:2489.
- Phipps RP, Stein SH, Roper RL. 1991. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today*. 12:349.
- Piccinni MP, Mecacci F, Sampognaro S, Manetti R, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S. 1993. Aeroallergen sensitization can occur during fetal life. *Int Arch Allergy Immunol*. 102:301.
- Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, et al. 1995. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*. 155:128.
- Piccinni MP, Beloni L, Giannarini L, Livi C, Scarselli G, Romagnani S, Maggi E. 1996. Abnormal production of T helper 2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5 by T cells from newborns with atopic parents. *Eur J Immunol*. 26:2293.
- Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. 1998. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med*. 4:1020.
- Poluektova LY, Khan MM. 1998. Protein kinase A inhibitors reverse histamine-mediated regulation of IL-5 secretion. *Immunopharmacology*. 39:9.
- Poluektova LY, Huggler GK, Patterson EB, Khan MM. 1999. Involvement of protein kinase A in histamine-mediated inhibition of IL-2 mRNA expression in mouse splenocytes. *Immunopharmacology*. 41:77.
- Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD, Holt PG. 1998. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol*. 160:4730.
- Prost A, Emami S, Gespach C. 1984. Desensitization by histamine of H2 receptor-mediated adenylate cyclase activation in the human gastric cancer cell line HGT-1. *FEBS Lett*. 177:227.
- Pugh S, Thomas GA. 1994. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut*. 35:675.
- Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:1036.

Q.

- Qu Z, Kayton RJ, Ahmadi P, Liebler JM, Powers MR, Planck SR, Rosenbaum JT. 1998. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in mast cell secretory granules. Morphological evidence for bfgf release through degranulation. *J Histochem Cytochem*. 46:1119.

R.

- Reddigari SR, Kuna P, Miragliotta GF, Kornfeld D, Baeza ML, Castor CW, Kaplan AP. 1992. Connective tissue-activating peptide-III and its derivative, neutrophil-activating peptide-2, release histamine from human basophils. *J Allergy Clin Immunol*. 89:666.

- Reynolds JL, Akhter J, Morris DL. 1996. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 6:95.
- Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med.* 185:461.
- Ring J, Eberlein-Koenig B, Behrendt H. 2001. Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 87:2.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283:1183.
- Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martin GA, Bergoc RM. 2000. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol.* 10:15.
- Rizell M, Lindner P, Hellstrand K, Naredi P. 1997. Effect of histamine dihydrochloride on tumor growth rate and tumor blood flow. *Int J Microcirc.* 17:98.
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med.* 326:298.
- Rogge L, Papi A, Presky DH, Biffi M, Minetti LJ, Miotto D, Agostini C, Semenzato G, Fabbri LM, Sinigaglia F. 1999. Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo. *J Immunol.* 162:3926.
- Romagnani S. 1991. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol Today.* 12:256.
- Romagnani S. 1992. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today.* 13:379.
- Romagnani S. 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol.* 6:838.
- Romagnani S. 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol.* 15:121.
- Romagnani S. 1996. TH1 and TH2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 80:225.
- Romagnani S. 2000a. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 85:9.
- Romagnani S. 2000b. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 105:399.
- Rumsaeng V, Cruikshank WW, Foster B, Prussin C, Kirshenbaum AS, Davis TA, Kornfeld H, Center DM, Metcalfe DD. 1997. Human mast cells produce the CD4+ T lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J Immunol.* 159:2904.

S.

- Saito H, Shimizu H, Mita H, Maeda Y, Akiyama K. 1996. Histamine augments VCAM-1 expression on IL-4- and TNF-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 111:126.
- Sakata T, Yoshimatsu H, Kurokawa M. 1997. Hypothalamic neuronal histamine: implications of its homeostatic control of energy metabolism. *Nutrition.* 13:403.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179:1109.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 28:2760.

- Salomon B, Bluestone JA. 1998. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol.* 161:5138.
- Sarmiento EU, Espiritu BR, Gleich GJ, Thomas LL. 1995. IL-3, IL-5, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiate basophil mediator release stimulated by eosinophil granule major basic protein. *J Immunol.* 155:2211.
- Sawutz DG, Kalinyak K, Whitsett JA, Johnson CL. 1984. Histamine H2 receptor desensitization in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 231:1.
- Schattenberg D, Schott M, Reindl G, Krueger T, Tschoepe D, Feldkamp J, Scherbaum WA, Seissler J. 2000. Response of human monocyte-derived dendritic cells to immunostimulatory DNA. *Eur J Immunol.* 30:2824.
- Schmidt J, Fleissner S, Heimann-Weitschat I, Lindstaedt R, Szelenyi I. 1994. Histamine increases anti-CD3 induced IL-5 production of TH2-type T cells via histamine H2-receptors. *Agents Actions.* 42:81.
- Schneider E, Piquet-Pellorce C, Dy M. 1990. New role for histamine in interleukin-3-induced proliferation of hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol.* 143:337.
- Schneider E, Ploemacher RE, Nabarra B, Brons NH, Dy M. Schneider E, Ploemacher RE, Nabarra B, Brons NH, Dy M. 1993. Mast cells and their committed precursors are not required for interleukin-3-induced histamine synthesis in murine bone marrow: characteristics of histamine-producing cells. *Blood.* 81:1161.
- Schneider E, Lemoine FM, Breton-Gorius J, Machavoine F, Arnould A, Cramer EM, Guichard J, Dy M. 1999. IL-3-induced coexpression of histidine decarboxylase, IL-4 and IL-6 mRNA by murine basophil precursors. *Exp Hematol.* 27:1010.
- Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. 2001. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol.* 77:93.
- Selvan RS, Butterfield JH, Krangel MS. 1994. Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *J Biol Chem.* 269:13893.
- Sharif NA, Wiernas TK, Griffin BW, Davis TL. 1998. Pharmacology of [3H]-pyrilamine binding and of the histamine-induced inositol phosphates generation, intracellular Ca²⁺ -mobilization and cytokine release from human corneal epithelial cells. *Br J Pharmacol.* 125:1336.
- Shayo C, Fernandez N, Legnazzi BL, Monczor F, Mladovan A, Baldi A, Davio C. 2001. Histamine H2 receptor desensitization: involvement of a select array of G protein-coupled receptor kinases. *Mol Pharmacol.* 60:1049.
- Shimada K, Abe T, Zhao Q, Mio M, Kamei C. 2001. Effects of histamine and related compounds on the differentiation of HL-60-Eo cells into eosinophils. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 23:383.
- Shimoda K, van Deursen J, Sangster MY, Sarawar SR, Carson RT, Tripp RA, Chu C, Quelle FW, Nosaka T, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld G, Paul WE, Ihle JN. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature.* 380:630.
- Shinoda S, Kameyoshi Y, Hide M, Morita E, Yamamoto S. 1998. Histamine enhances UVB-induced IL-6 production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 290:429.
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science.* 275:77.
- Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol.* 2:151.
- Shreedhar V, Giese T, Sung VW, Ullrich SE. 1998. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol.* 160:3783.

- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 284:1835.
- Sillaber C, Bevec D, Butterfield JH, Heppner C, Valenta R, Scheiner O, Kraft D, Lechner K, Bettelheim P & Valent P. 1993. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta mRNA expression in HMC-1 cells: differential regulation of gene product expression by recombinant interleukin-4. *Exp Hematol*. 21:1271.
- Sirois J, Menard G, Moses AS, Bissonnette EY. 2000. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H2 and H3 receptors: stimulation of IL-10 production. *J Immunol*. 164:2964.
- Smit MJ, Hoffmann M, Timmerman H, Leurs R. 1999. Molecular properties and signalling pathways of the histamine H1 receptor. *Clin Exp Allergy*. 29:19.
- Song Z, Casolaro V, Chen R, Georas SN, Monos D, Ono SJ. 1996. Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene. *J Immunol*. 156:424.
- Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. 1996. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med*. 184:473.
- Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 159:4772.
- Stumbles PA, Thomas JA, Pimm CL, Lee PT, Venaille TJ, Proksch S, Holt PG. 1998. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J Exp Med*. 188:2019.
- Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J. 1998. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med*. 188:2335.
- Suonio E, Tuomisto L, Alhava E. 1994. Effects of histamine, H1, H2 and H3 receptor antagonists and alpha-fluoromethylhistidine on the growth of human colorectal cancer in the subrenal capsule assay. *Agents Actions*. 41:C118.
- Svensson H, Cederblad B, Lindahl M, Alm G. 1996. Stimulation of natural interferon-alpha/beta-producing cells by *Staphylococcus aureus*. *J Interferon Cytokine Res*. 16:7.
- Szeberenyi JB, Pallinger E, Zsinko M, Pos Z, Rothe G, Orso E, Szeberenyi S, Schmitz G, Falus A, Laszlo V. 2001. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett*. 76:175.

T.

- Takahashi HK, Yoshida A, Iwagaki H, Yoshino T, Itoh H, Morichika T, Yokoyama M, Akagi T, Tanaka N, Mori S, Nishibori M. 2002. Histamine regulation of interleukin-18-initiating cytokine cascade is associated with down-regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 300:227.
- Takamatsu S, Nakashima I, Nakano K. 1996. Modulation of endotoxin-induced histamine synthesis by cytokines in mouse bone marrow-derived macrophages. *J Immunol*. 156:778.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 380:627.
- Takeuchi M, Alard P, Streilein JW. 1998. TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol*. 160:1589.
- Takeuchi K, Kishioka C, Ishinaga H, Sakakura Y, Majima Y. 2001. Histamine alters gene expression in cultured human nasal epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol*. 107:310.

- Takizawa H, Ohtoshi T, Kikutani T, Okazaki H, Akiyama N, Sato M, Shoji S, Ito K. 1995. Histamine activates bronchial epithelial cells to release inflammatory cytokines in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 108:260.
- Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. 2000. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med.* 192:405.
- Tang L, Benjaponpitak S, DeKruyff RH, Umetsu DT. 1998. Reduced prevalence of allergic disease in patients with multiple sclerosis is associated with enhanced IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol.* 102:428.
- Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. 1997. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. *J Immunol.* 159:5956.
- Tardivel-Lacombe J, Rouleau A, Heron A, Morisset S, Pillot C, Cochois V, Schwartz JC, Arrang JM. 2000. Cloning and cerebral expression of the guinea pig histamine H3 receptor: evidence for two isoforms. *Neuroreport.* 11:755.
- Tasaka K, Mio M, Shimazawa M, Nakaya N. 1993. Histamine-induced production of interleukin-1 alpha from murine bone marrow stromal cells and its inhibition by H2 blockers. *Mol Pharmacol.* 43:365.
- Terada N, Konno A, Tada H, Shirotori K, Ishikawa K, Togawa K. 1992. The effect of recombinant human interleukin-5 on eosinophil accumulation and degranulation in human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol.* 90:160.
- Teran LM, Davies DE. 1996. The chemokines: their potential role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy.* 26:1005.
- Testa B, Meselella C, Mosti MR, Meselella M, Testa D, Motta G. 2001. Changes in serum interferon-gamma, interleukin-4, and interleukin-12 cytokine levels in anti-histamine type 2-treated allergic rhinitis patients. *Laryngoscope.* 111:236.
- Tatsuta M, Iishi H, Ichii M, Noguchi S, Yamamura H, Taniguchi H. 1986. Inhibitory effects of tetragastrin and histamine on carcinogenesis in the small intestines of W rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Natl Cancer Inst.* 76:277.
- Tilly BC, Tertoolen LG, Remorie R, Ladoux A, Verlaan I, de Laat SW, Moolenaar WH. 1990. Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca2(+)-mobilizing H1 receptors. *J Cell Biol.* 110:1211.
- Triggiani M, Gentile M, Secondo A, Granata F, Oriente A, Tagliabate M, Annunziato L, Marone G. 2001. Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H1 receptors. *J Immunol.* 166:4083.
- Trinchieri G. 1998. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* 70:83.
- Turner H, Kinet JP. 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Nature.* 402:B24.
- U.**
-
- Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, Nakagawa N, Tanabe E, Sueishi M, Saito Y, Iwamoto I. 2001. Increase of dendritic cells of type 2 (DC2) by altered response to IL-4 in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 108:1005.
- V.**
-
- Valencia S, Hernandez-Angeles A, Soria-Jasso LE, Arias-Montano JA. 2001. Histamine H(1) receptor activation inhibits the proliferation of human prostatic adenocarcinoma DU-145 cells. *Prostate.* 48:179.
- Van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. 1991. High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol.* 97:389.

- Van der Pouw Kraan TC, Snijders A, Boeije LC, de Groot ER, Alewijnse AE, Leurs R, Aarden LA. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J Clin Invest.* 102:1866.
- Van Reijssen FC, Bruijnzeel-Koomen CA, Kalthoff FS, Maggi E, Romagnani S, Westland JK, Mudde GC. 1992. Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 90:184.
- Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. 1991. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor alpha via histamine H2 receptors. *J Exp Med.* 174:281.
- Vannier E, Dinarello CA. 1993. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. Comparison with IL-1 receptor antagonist. *J Clin Invest.* 92:281.
- Vannier E, Dinarello CA. 1994. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-6 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem.* 269:9952.
- Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haefliger-Cavaillon N, Goldman M. 1997. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol.* 158:2919.
- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol.* 164:4507.
- Vignola AM, Campbell AM, Chanez P, Lacoste P, Michel FB, Godard P, Bousquet J. 1993. Activation by histamine of bronchial epithelial cells from nonasthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 9:411.
- Vohora D, Pal SN, Pillai KK. 2001. Histamine and selective H3-receptor ligands: a possible role in the mechanism and management of epilepsy. *Pharmacol Biochem Behav.* 68:735.
- Von Mutius E, Martinez FD, Fritsch C, Nicolai T, Reitmeir P, Thiemann HH. 1994. Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ.* 308:692.

W.

- Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, Whitaker D, Murphy GF. 1991. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor alpha, which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:4220.
- Walsh GM, Annunziato L, Frossard N, Knol K, Levander S, Nicolas JM, Taglialatela M, Tharp MD, Tillement JP, Timmerman H. 2001. New insights into the second generation antihistamines. *Drugs.* 61:207.
- Wang LD, Hoeltzel M, Butler K, Hare B, Todisco A, Wang M, Del Valle J. 1997. Activation of the human histamine H2 receptor is linked to cell proliferation and c-fos gene transcription. *Am J Physiol.* 273:C2037.
- Watson SA, Wilkinson LJ, Robertson JF, Hardcastle JD. 1993. Effect of histamine on the growth of human gastrointestinal tumours: reversal by cimetidine. *Gut.* 34:1091.
- Webb LMC, Feldmann M. 1995. Critical role of CD28/B7 costimulation in the development of human Th2 cytokine-producing cells. *Blood.* 86:3479.
- Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today.* 14:353.
- Weimer LK, Gamache DA, Yanni JM. 1998. Histamine-stimulated cytokine secretion from human conjunctival epithelial cells: inhibition by the histamine H1 antagonist emedastine. *Int Arch Allergy Immunol.* 115:288.
- Weiner HM. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 182:207.

Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol.* 164:6453.

White M. 1999. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol.* 103:378.

Wierenga EA, Snoek M, de Groot C, Chretien I, Bos JD, Jansen HM, Kapsenberg ML. 1990. Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD2+ T lymphocytes in atopic patients. *J Immunol.* 144:4651.

Wilbanks GA, Mammolenti M, Streilein JW. Wilbanks GA, Mammolenti M, Streilein JW. 1991. Studies on the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). II. Eye-derived cells participate in generating blood-borne signals that induce ACAID. *J Immunol.* 146:3018.

Willheim M, Ebner C, Baier K, Kern W, Schratlbauer K, Thien R, Kraft D, Breiteneder H, Reinisch W, Scheiner O. 1997. Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J Allergy Clin Immunol.* 100:348.

Williams CM, Galli SJ. 2000. The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 105:847.

Wills-Karp M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol.* 17:255.

Wodnar-Filipowicz A, Heusser CH, Moroni C. 1989. Production of the haemopoietic growth factors GM-CSF and interleukin-3 by mast cells in response to IgE receptor-mediated activation. *Nature.* 339:150-2.

X.

Xu D, Chan WL, Leung BP, Huang F, Wheeler R, Piedrafita D, Robinson JH, Liew FY. 1998. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med.* 187:787.

Y.

Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. 1991. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:11515.

Yano K, Yamaguchi M, de Mora F, Lantz CS, Butterfield JH, Costa JJ, Galli SJ. 1997. Production of macrophage inflammatory protein-1 α by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. *Lab Invest.* 77:185.

Yanagida M, Fukamachi H, Ohgami K, Kuwaki T, Ishii H, Uzumaki H, Amano K, Tokiwa T, Mitsui H, Saito H, et al. 1995. Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells. *Blood.* 86:3705.

Yi SN, Xu YH. 1988. The influence of histamine at various concentrations on the cell cycle state of hematopoietic stem cells (CFU-s). *Int J Cell Cloning.* 6:290.

Yoshimoto T, Tsutsui H, Tominaga K, Hoshino K, Okamura H, Akira S, Paul WE, Nakanishi K. 1999. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:13962.

Yura M, Takahashi I, Terawaki S, Hiroi T, Kweon MN, Yuki Y, Kiyono H. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine.* 20:134.

Z.

Zheng T, Nathanson MH, Elias JA. 1994. Histamine augments cytokine-stimulated IL-11 production by human lung fibroblasts. *J Immunol.* 153:4742.

- Zheng W, Flavell RA. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 89:587.
- Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, Boyce R, Alston J, Tierney LA, Li X, Herrity NC, Vawter L, Sarau HM, Ames RS, Davenport CM, Hieble JP, Wilson S, Bergsma DJ, Fitzgerald LR. 2001. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol*. 59:434.
- Zidek Z. Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. 1999. *Eur Cytokine Netw*. 10:319.
- Zlotnik A, Morales J, Hedrick JA. 1999. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol*. 19:1.
- Zonneveld IM, Meinardi MM, Karlsmark T, Johansen UB, Kuiters GR, Hamminga L, Staberg B, van't Veen AJ, Bossuyt PM, van Niel JC, Bos JD. 1997. Ranitidine does not affect psoriasis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled study. *J Am Acad Dermatol*. 36:932.
- Zweiman B. The late-phase reaction: role of IgE, its receptor and cytokine. 1993. *Curr Opin Immunol*. 5:950.

**ANNEXE : AUTRES
PUBLICATIONS**

Mon projet de thèse, à l'origine, visait également à caractériser de nouvelles molécules de costimulation impliquées dans l'activation des lymphocytes T, dans le but d'identifier de nouvelles cibles moléculaires utilisables en immunothérapie. En effet, les lymphocytes T jouent un rôle crucial en tant que cellules effectrices et régulatrices de la réponse immune. Afin d'être correctement activés par l'antigène vis-à-vis duquel ils sont spécifiques, les lymphocytes T naïfs doivent recevoir au moins deux signaux qui sont fournis lors du contact avec les CPA. Le premier signal, fourni par l'interaction du complexe antigène-CMH avec le TCR, assure la spécificité de la réponse. Une deuxième série de signaux, ou signaux de costimulation, est requise pour activer de façon efficace les lymphocytes T. Ces cosignaux sont fournis par l'interaction de molécules exprimées par les CPA avec leurs ligands respectifs exprimés par les lymphocytes T (molécules de la famille B7 ou du TNF-R). Lorsque les lymphocytes T sont activés par un antigène en l'absence de ces cosignaux, ils peuvent devenir anergiques ou tolérants.

La caractérisation de nouvelles molécules immunorégulatrices et notamment de molécules de costimulation présente un intérêt majeur en thérapeutique car, en permettant une modulation de la réponse immune, elles peuvent être utilisées en traitement de cancers ou comme adjuvants dans le développement de vaccins.

1- Méthodologie

La stratégie retenue pour découvrir de telles molécules était la génération d'anticorps monoclonaux (MAbs) dirigés contre des lymphocytes T hyperactivés. Ces anticorps sont sélectionnés pour leur activité biologique, et une technique de clonage par expression est utilisée pour identifier l'antigène correspondant.

a- Génération des anticorps monoclonaux

Des souris sont immunisées au moyen de lymphocytes T CD86⁺ (LT86). Ces cellules sont des LT effecteurs mémoires qui, en plus de leurs puissantes propriétés effectrices, possèdent des propriétés de CPA et expriment à leur surface de nombreuses molécules immunorégulatrices. Ces cellules sont obtenues en cultivant des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) en présence d'anti-CD3 et d'interleukine 2 (IL-2) pendant 15 jours. Quatre heures avant immunisation, les cellules sont stimulées au moyen de PMA/ionomycine. Après lavages, les cellules sont injectées à raison de 5x10⁶/souris, par voie intra-péritonéale et sans adjuvant. La rate de la souris qui présente la meilleure

réponse anti-LT86 est ensuite récupérée et les lymphocytes B obtenus sont fusionnés avec des cellules SP2O (myélome). Environ 2000 hybridomes ont ainsi été générés.

b- lymphoprolifération

Les MAbs produits par les différents hybridomes sont ensuite sélectionnés selon leur activité biologique, notamment sur leur capacité à activer ou à inhiber la prolifération de PBMC humains.

Pour cela, les PBMC issus de 3 donneurs sont cultivés en présence des surnageants d'hybridomes et d'une dose suboptimale ou moyenne d'anti-CD3 activateur. Après 5 jours, la prolifération est évaluée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats obtenus permettent une sélection d'hybridomes produisant des MAbs activateurs ou inhibiteurs. Après clonage de chaque hybridome par dilution-limite, une nouvelle lymphoprolifération est réalisée afin de sélectionner les clones intéressants. Les MAbs produits par ces hybridomes sont ensuite isotypés, produits en grande quantité et dosés.

c- analyses par cytométrie en flux (FACS)

Afin d'éliminer les anticorps dirigés contre des molécules déjà connues, le profil de fixation de l'anticorps sur différents types cellulaires ainsi que sur différents transfectants exprimant des molécules susceptibles d'être reconnues (CD2, CD54, CD9, CD82, CD86) est effectué par FACS.

Pour être utilisables lors des expériences de clonage par expression, les MAbs doivent se fixer sur des LT activés correspondant à la banque d'ADNc utilisée, mais ne doivent pas se fixer sur les cellules 293EBNA non transfectées (NT) destinées à exprimer la banque d'ADNc.

d- Recherche de l'antigène : clonage par expression

Les cellules 293EBNA sont transfectées au moyen d'une banque commerciale d'ADNc de LT activés. Afin d'enrichir la population de cellules transfectées en cellules exprimant la molécule recherchée, 3 cycles d'enrichissement sont réalisés au moyen de l'anticorps et d'un anti-Ig de souris couplé à des billes magnétiques. Les cellules reconnues par l'anticorps sont ensuite clonées (tri cellulaire au cytomètre en flux) à raison de 1 cellule/puits. Après culture, les clones sont testés pour leur capacité à être reconnus par l'anticorps. Après expansion, l'ADN des clones positifs est extrait puis séquencé.

2. Résultats

42 hybridomes ont été sélectionnés et 26 clones ont été caractérisés :

Activateurs	isotype	% activation	Fixation (MFI)	
			sur LT activés	sur 293EBNA NT
2 D2 -18	IgG1	150	-	-
6 C5 -3	IgG2b	300	-	130
7 E10 -10	IgG1	55	300	-
8 G2 -2	IgG1	130	120 (30%)	-
11 G2 -6	IgG1	150	-	-
13 C4 -6	IgM	220	80 (55%)	530
16 B3 -4	IgG2a	410	100 (80%)	41
17 F3 -4	IgM	70	-	-
33 B6 -2	IgG2b	180	-	-
35 F4 -15	IgG2a	55	-	-

Inhibiteurs	isotype	% inhibition	Fixation (MFI)	
			sur LT activés	sur 293EBNA NT
6 D7 -4	IgG1	40	150 (50%)	-
11 G9 -3	IgM	50	-	60
13 E2 -1	IgG1	80	1300	-
14 C4 -1	IgA	85	-	36 (60%)
15 C10 -11	IgG2a	70	1800	-
19 B7 -6	IgG2a	100	-	150
22 E7 -3	IgG2a	100	1100	160
23 B11 -1	IgG2a	100	2400	-
27 C4 -2	IgG2a	90	-	-
29 C8 -1	IgG2a	70	210 (50%)	-
29 F9 -1	IgM	80	-	-
32 D4 -2	IgG2a	100	6600	300
33 C11 -7	IgG2a	100	6000	60
33 G2 -53	IgG1	60	5900	200
37 G10 -6	IgG2a	75	1200	-
40 D8 -2	IgM	80	-	-

L'utilisation de la technique de clonage par expression a permis d'identifier deux anticorps :

- 37G10-6 est un anti-CD48

CD48 est une molécule exprimée par les lymphocytes T et B, les monocytes, et de nombreuses tumeurs lymphoïdes. Ses ligands sont CD2 et 2B4. CD48 joue un rôle dans l'adhésion et l'activation des LT et NK, ainsi que dans la protection de l'apoptose des lymphocytes B. Il a été décrit un anticorps anti-CD48 possédant des propriétés anti-tumorales *in vivo*.

- 15C10-11 est un anti-CD43

CD43 est une sialoglycoprotéine exprimée par les PBMC. Ses ligands sont entre autres : ICAM-1, galectine-I, CMH-I, HSA, E-sélectine... Sa fonction dépend de son taux de glycosylation, mais elle est principalement impliquée dans les phénomènes de contact cellulaire et d'adhésion. Elle joue

également un rôle dans la prolifération des lymphocytes, l'apoptose, l'activation et la maturation des cellules dendritiques et la cytotoxicité NK.

Ces deux molécules sont donc déjà connues pour moduler la lymphoprolifération. Cependant les résultats obtenus ont permis de valider l'approche technique utilisée.

Au moyen des transfectants, nous avons pu vérifier que l'anticorps 27C4-2 était dirigé contre CD2, molécule impliquée dans l'interaction LT auxiliaire / CPA et dans la cytotoxicité T et NK. Mais cependant des anticorps anti-CD2 capables d'inhiber fortement la lymphoprolifération induite par un anti-CD3 ont déjà été décrits.

En utilisant une technique ELISA, nous avons constaté que l'anticorps 13C4-6 était dirigé contre Fas. Fas est une molécule impliquée dans la mort par apoptose. Il existe des anticorps spécifiques dirigés contre Fas capables d'induire un signal apoptotique. Le 13C4-6 n'induit pas la mort par apoptose de cellules sensibles, mais il active la lymphoprolifération induite par l'anti-CD3.

Seules des molécules déjà connues pour moduler l'activité des lymphocytes T ont pu être identifiées, et la caractérisation des molécules reconnues par les autres MAbs a échoué. La principale limite du clonage par expression est la fixation des MAbs aux 293EBNA, ce qui est le cas pour la majorité des MAbs sélectionnés. Une autre approche a été envisagée, utilisant un système de clonage par expression procaryote, mais n'a pas donné de résultats satisfaisants.

La recherche de nouvelles molécules de costimulation par cette approche a donc été pour l'instant abandonnée, mais m'a permis de collaborer activement à diverses études concernant les molécules de costimulation qui ont donné lieu aux publications qui suivent.

Human Effector Memory T Cells Express CD86: A Functional Role in Naive T Cell Priming

Pascale Jeannin,¹ Nathalie Herbault, Yves Delneste, Giovanni Magistrelli, Sybille Lecoanet-Henchoz, Gersende Caron, Jean-Pierre Aubry, and Jean-Yves Bonnefoy

The glycoprotein CD86 expressed on APCs provides a costimulatory signal necessary for an efficient activation of naive T cells. In contrast, there is controversy about the condition of expression and the function of CD86 on T cells. In this study, we have analyzed the phenotype and the biological activity of CD86⁺ T cells generated from human PBMC. Results show that CD86 expression on T cells is induced by long term stimulation via CD3 and IL-2R and is down-regulated as the cells become quiescent. The CD86-expressing cells are memory effector T cells: 1) they express CD45RO and high levels of the activation markers CD25, CD54, and HLA-Dr; 2) they selectively express CD30, CD40-ligand, and CD70; and 3) in response to stimulation, most of them produce IFN- γ before dying by apoptosis. We then analyzed whether CD86 expressed on T cells is functional. Results show that paraformaldehyde-fixed CD86⁺ T cells enhance the proliferation and production of IFN- γ by anti-CD3 mAb-stimulated naive T cells and induce proliferation of resting allogenic T cells. All these effects are prevented by neutralizing anti-CD86 mAbs. In contrast, we report no autocrine effect of CD86 in CD86⁺ T cell activation. In conclusion, these data show that human memory effector T cells express a functional form of CD86 that can costimulate naive T cell responses. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 2044–2048.

Naive T cells require primary and costimulatory signals from APCs to be functionally activated. The primary signal, provided by the CD3/TCR complex, initiates activation. The costimulatory signal, provided by cell surface interactions, induces clonal expansion and differentiation into effector cells (1, 2). Among the different molecules with costimulatory properties, CD28 appears the most potent. The interaction of CD28, expressed on resting and activated T cells, with the B7 molecules, CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2), results in an increase in T cell proliferation, cytokine production, and resistance to apoptosis (3–5). In contrast, T cells that bind the Ag and that do not receive a costimulatory signal are thought to die or to become anergic (1, 2, 5). In addition to CD28, some populations of T cells may also transiently express CTLA-4, a second ligand for CD80 and CD86. CTLA-4 engagement may transduce an “off” signal, disengaging T cells from further activation and proliferation (5, 6). As such, T cell activation is determined by a delicately balanced interplay between positive signals from CD28 and negative signals from CTLA-4.

Numerous APC express the B7 molecules either constitutively or in response to stimulation (3). The expression of these molecules has been also reported on T cells (3, 7–14). Activated, but not resting, human T cells express functional CD80 that is involved in T-T cell interaction (7–9). In contrast, the condition of the expression and the function of CD86 on T cells is debated. Although some freshly isolated murine T cells express CD86 (10, 14), resting human T cells do not (3). Activation down-regulates CD86

expression on murine T cell clones (TCC)² (11), whereas it induces CD86 expression on human T cells (3). Furthermore, CD86 transfected in a murine T cell line (12) or expressed on human TCC fails to provide costimulatory signal through CD28 (13). Moreover, CD86 on human TCC appears in an hypoglycosylated form (13). Nevertheless, it has been recently shown that CD86 on fresh murine T cells was functional (14). As such, we have investigated herein the generation and the function of normal, nontransfected CD86⁺ human T cells.

Materials and Methods

Generation of CD86-expressing T cells

PBMC were isolated from blood from healthy volunteers by centrifugation on Ficoll/Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). PBMC (10×10^6 /ml), cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, and 50 μ g/ml streptomycin (all from Life technologies, Cergy Pontoise, France) were stimulated with 200 ng/ml anti-CD3 mAb (clone OKT3; American Type Culture Collection, Manassas, VA) plus 20 ng/ml IL-2 (R&D Systems, Abingdon, U.K.). IL-2 (20 ng/ml) was added every 4 days. In some experiments, T cells were restimulated with anti-CD3 mAb plus IL-2 after 3 wk.

Cell surface labeling

The FACS analyses were performed using a FACSVantage cytofluorometer (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) with the following mAbs: FITC-labeled anti-CD2 mAb, FITC- and phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD3 mAbs, FITC-labeled anti-CD45RO, -CD54, -CD80, -HLA-Dr (all from Becton Dickinson), -CD70 (PharMingen, San Diego, CA), -CD30 (Dako, Glostrup, Denmark), or -CD40-ligand (CD40-L) (Ansell, Bayport, MN) mAbs and biotin-labeled anti-CD86 mAb (clone IT2.2) revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin (both from PharMingen). Control isotype mAbs were from Becton Dickinson.

² Abbreviations used in this paper: TCC, T cell clones; PFA, paraformaldehyde; L, ligand; PE, phycoerythrin; SI, stimulation index.

Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien en Genevois, France

Received for publication June 18, 1998. Accepted for publication November 6, 1998.

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

¹ Address correspondence and reprint requests to Dr. Pascale Jeannin, Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5, Avenue Napoléon III, BP 97, F-74164 Saint-Julien en Genevois, France. E-mail address: pascale.jeannin@pierre-fabre.com

Simultaneous measurement of membrane CD86 and intracellular IFN- γ expression

Three weeks after the initial stimulation, T cells were restimulated for 6 h with 10 ng/ml PMA (Sigma, St. Louis, MO) plus 1 μ M ionomycin (Calbiochem, San Diego, CA) in the presence of 2.5 μ g/ml brefeldin A (Molecular Probes, Eugene, OR). Cells were then stained with biotin-labeled anti-CD86 mAb revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin. After washing, cells were fixed and permeabilized using the Cytoperm/cytowash kit (PharMingen) according to the manufacturer's recommendations before staining with FITC-labeled anti-human IFN- γ (PharMingen) or control mouse IgG1 (Becton Dickinson) mAbs. Results are expressed in percent of IFN- γ -expressing cells among the CD86⁻ and CD86⁺ T cell populations.

Simultaneous measurement of membrane CD86 expression and apoptosis

Three weeks after stimulation, T cells were restimulated for 24 h with 200 ng/ml anti-CD3 mAb. Then, T cells were stained with biotin-labeled anti-CD86 mAb revealed by allophycocyanin-labeled streptavidin (Molecular Probes), with propidium iodide and with FITC-labeled annexin V, using annexin V kit (Immunotech, Marseille, France) according to the manufacturer's recommendations. Cells were analyzed using a FACSvantage cytometer equipped with two lasers. Annexin V-FITC and propidium iodide emissions (530 nm and 630 nm, respectively) were measured after excitation by an Argon ion laser tuned at 488 nm (Coherent, Santa Clara, CA). Allophycocyanin emission (660 nm) was measured after excitation of an Helium Neon laser (Spectra Physics, Mountain View, CA) tuned at 633 nm. Results are expressed in percent of annexin-V-positive cells in the CD86⁻ and CD86⁺ T cell populations.

Western blotting analysis

Western blot analysis was performed with the following human cells: CD86⁺ T cells collected 1 wk after restimulation with anti-CD3 mAb plus IL-2, the Jurkat T cell line, the B cell lines Daudi and RPMI 8226 (all the cell lines are from American Type Culture Collection), and tonsillar B cells stimulated for 2 days with IL-4 plus anti-CD40 mAb, as described (15). Cells were washed in ice-cold PBS before lysis in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5% Nonidet P40 (Sigma) and protease inhibitors (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Proteins from 5 \times 10⁶ cells were electrophoretically separated on a 10% polyacrylamide gel in reducing conditions and then transferred on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). After saturation, membranes were incubated with a goat IgG anti-human CD86 Ab (R&D Systems). After washing, membranes were incubated with peroxidase-labeled affinity-purified rabbit anti-goat IgG Ab (Dako) and bound Abs were detected using the enhanced chemiluminescence system (Amersham, Amersham, U.K.).

In vitro costimulatory assay

The CD86⁺ T cells were collected 2 wk after restimulation with anti-CD3 mAb plus IL-2. As control, CD86⁻ T cells were isolated 2 wk after the initial stimulation by removing the CD86⁺ T cells by FACS sorting. These two populations contained only T cells; all the cells were labeled with a FITC-labeled anti-CD2 mAb, but not with FITC-labeled anti-CD14 and -CD20 mAbs. The CD86⁺ and CD86⁻ T cells were fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) for 10 min, quenched with 0.2 M L-lysine, and washed three times before use. Naive (CD45RA⁺) CD4⁺ T cells have been purified from PBMC by sheep RBC rosetting followed by a negative selection using anti-CD8 and -CD45RO mAbs (both from Sigma) and anti-mouse Ig Ab-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway); the purity, determined by double color FACS analysis with FITC-labeled anti-CD45RA and PE-labeled anti-CD4 mAbs (both from Becton Dickinson), was >90%. CD45RA⁺ T cells have been stimulated with suboptimal concentration (10 ng/ml) of anti-CD3 mAb in the presence or absence of PFA-fixed CD86⁺ or CD86⁻ T cells in round-bottom 96-well culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark), in quintuplicate. In proliferation assays, CD86⁻ or CD86⁺ fixed T cells and naive T cells have been used at 2.5 \times 10⁵ cells/well. After 3 days, cells were pulsed with 0.25 μ Ci/well [³H]thymidine (Amersham) for 6 h. Radioactive incorporation was measured by standard liquid scintillation counting. Results are given in cpm or in stimulation index (SI) calculated as follows: A/O , in which A and O are the cpm values obtained when cells are cultured or not with fixed T cells, respectively. For the quantification of IFN- γ production, CD86⁻ or CD86⁺ fixed T cells and naive T cells have been used at 10⁶ cells/well. IFN- γ was quantified in the 48 h supernatants using specific mAbs from PharMingen, according to the manufacturer recommendations. Results are expressed in ng/ml or in percent of increase calculated as follows: $(A - O/O) \times 100$, in which A and O are the IFN- γ levels obtained in the presence or absence of

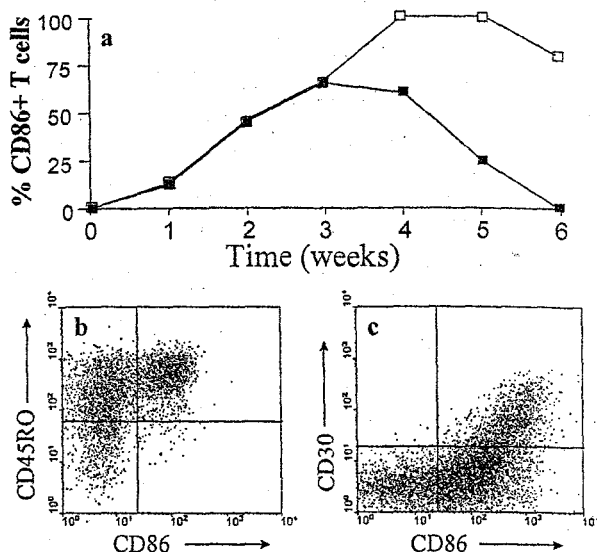


FIGURE 1. Stimulated human T cells express CD86. *a*, Kinetics of induction of CD86 expression on T cells. PBMC have been stimulated with anti-CD3 mAb plus IL-2 and have (□) or have not (■) been restimulated 3 wk later. The expression of CD86 on T cells has been analyzed weekly by FACS using FITC-labeled anti-CD3 mAb and biotin-labeled anti-CD86 mAb revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin. Results are expressed in percent of CD86⁺ cells among the CD3⁺ T cells and are representative of one of seven experiments. *b*, CD86 expression is restricted to memory T cells. Two weeks after the initial stimulation, PBMC were stained with PE-labeled anti-CD3, FITC-labeled anti-CD45RO, and biotin-labeled anti-CD86 mAbs revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin. Cells were gated on CD3⁺ T cells. One representative experiment of five is shown. *c*, CD30 expression is restricted to CD86⁺ T cells. Three weeks after stimulation, the expression of CD30 on CD86⁺ vs CD86⁻ memory T cells has been evaluated by FACS using FITC-labeled anti-CD30 mAb and biotin-labeled anti-CD86 mAbs revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin. One representative experiment of five is shown.

fixed T cells, respectively. In some experiments, 10 μ g/ml of the neutralizing anti-CD86 mAbs IT2.2 (IgG2b) (PharMingen), FUN-1 (IgG1; An-cell), or the isotype control mAbs (PharMingen) were added. Results are expressed in percent of decrease: $(A - O/A) \times 100$, in which A and O are the values obtained in the absence or presence of a neutralizing anti-CD86 mAb, respectively.

Primary allogenic MLR

Naive CD4⁺ T cells have been isolated from PBMC of four donors as described above and have been cultured at 2.5 \times 10⁵ cells/well with 2.5 \times 10⁵ cells/well PFA-fixed CD86⁺ or CD86⁻ T cells, in quintuplicate, in round-bottom 96-well culture plates. In some experiments performed with PFA-fixed CD86⁺ T cells, 10 μ g/ml of the neutralizing anti-CD86 mAbs IT2.2 and FUN-1 or of the isotype control mAbs have been added. After 6 days, cells were pulsed with 0.25 μ Ci/well [³H]thymidine for 6 h. Radioactive incorporation was measured by standard liquid scintillation counting, and results are given in cpm values or in percent of decrease, calculated as described above.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Student's *t* test.

Results

Generation and phenotyping of human CD86⁺ T cells

The expression of CD86 on human T cells is induced by stimulation. The expression of CD86 (Fig. 1*a*) and of the corresponding mRNA (data not shown) is undetectable on freshly isolated peripheral blood T cells (3, 5). Stimulation via CD3 and IL-2R induces CD86 expression on some T cells; the percentage of CD86⁺ T cells is 20 \pm 3% (mean \pm SD, n = 7) 1 wk after stimulation and

Table I. Phenotypic characterization of CD86⁻ vs CD86⁺ memory T cells^a

	CD86 ⁻	CD86 ⁺
CD25	++	+++
CD54	+	++
HLA-Dr	++	+++
CD30	-	++ (40 ± 12%)*
CD40-L	-	+ (10 ± 3%)*
CD70	-	++ (39 ± 8%)*
CD80	+	++

^a Three weeks after stimulation, the phenotype of the CD86⁻ and CD86⁺ T cells has been compared by double color FACS analysis using biotin-labeled anti-CD86 mAb revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin and FITC-labeled anti-CD25, -CD54-HLA-Dr, -CD30, -CD40-L, -CD70, and -CD80 mAbs. *, percentage of positive cells ± SD, n = 5.

reaches a maximum after 3 wk (61 ± 25%) (Fig. 1a). When restimulated at day 21, all of the T cells become CD86⁺ within 1 wk for 1–2 wk (Fig. 1a). In the absence of restimulation, CD86 expression is down-regulated as the cells become quiescent (Fig. 1a).

CD86⁺ T cells are effector memory cells

We have analyzed by FACS the phenotype of the CD86⁺ T cells. Results show that CD86 expression is restricted to CD45RO⁺ (memory) T cells (Fig. 1b). After stimulation, the percentage of CD45RO⁺ cells increases in a time-dependent manner, with all of the cells being CD45RO⁺ after 3 wk (data not shown). At this time point, we have compared the phenotype of CD86⁺ T cells with those of CD86⁻ T cells. Results show that CD86⁺ T cells express higher levels of the activation markers CD25, CD54, and HLA-Dr and that some of them selectively express CD30 and CD70 (Fig. 1c and Table I). A transient expression of CD40-L is also observed on some CD86⁺ T cells (Table I). As expected, stimulation also induces CD80 on T cells (7, 9). The expression of CD80 is not restricted to a subset of T cells (Table I) and is more transient than CD86 expression, which is detectable 3 wk after stimulation; CD80 expression disappears within 1 wk in the absence of restimulation (data not shown) (7–9).

Then, to test whether CD86⁺ T cells have specific biological properties, we have compared, in 3-wk cultures, the response to stimulation of CD86⁺ vs CD86⁻ T cells. Results show that, after 6 h of stimulation with PMA plus ionomycin, a higher percentage of CD86⁺ than CD86⁻ T cells produce IFN-γ (69 ± 12% and 23 ± 6%, respectively, mean ± SD, n = 5) (Fig. 2, a and b). Nevertheless, a higher percentage of apoptosis in CD86⁺ than

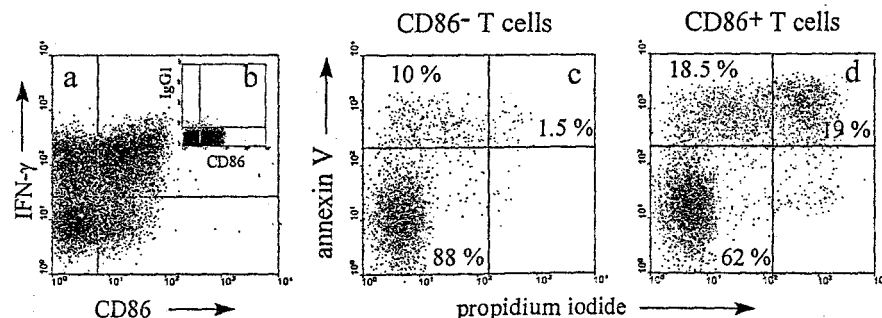


FIGURE 2. Biological activity of CD86⁺ T cells. a, Intracellular measurement of IFN-γ in CD86⁻ and CD86⁺ T cells. Three weeks after the initial stimulation, T cells were restimulated for 6 h with PMA plus ionomycin in the presence of brefeldin. After staining with biotin-labeled anti-CD86 mAb, revealed by Cy-chrome-labeled streptavidin, cells were fixed, permeabilized, and labeled with specific mAb to detect intracellular IFN-γ (a) or with isotype control mAb (b). One representative experiment of five is shown. b, Activation-induced cell death measurement in CD86⁻ and CD86⁺ T cells. Three weeks after the first stimulation, T cells were restimulated with anti-CD3 mAb for 24 h. After staining with biotin-labeled anti-CD86 mAb, revealed by allophycocyanin-labeled streptavidin, cells were labeled with FITC-annexin V and with propidium iodide. Cells were gated on CD86⁻ (c) and CD86⁺ (d) T cells. One representative experiment of five is shown.

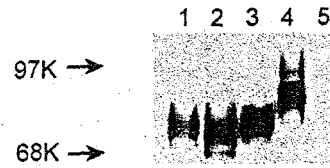


FIGURE 3. CD86 expressed on human T and B cells has a molecular mass of ~70 kDa. Whole lysates from the Daudi human B cell line (lane 1), human tonsillar B cells stimulated for 2 days with IL-4 plus anti-CD40 mAb (lane 2), CD86⁺ T cells obtained 1 wk after restimulation (lane 3), the human B cell line RPMI 8866 (lane 4), and the human T cell line Jurkat (lane 5) have been examined for CD86 expression by Western blot analysis in reducing condition using polyclonal IgG anti-CD86 Ab.

CD86⁻ T cells was observed after 24-h incubation with PMA plus ionomycin (90 ± 2% and 50 ± 18%, mean ± SD, n = 5, respectively) (data not shown) or with anti-CD3 mAb (40 ± 15% and 10 ± 5%, respectively) (Fig. 2, c and d). As expected, freshly isolated CD45RO⁺ T cells are resistant to PMA plus ionomycin or anti-CD3 mAb-induced cell death (less than 5% of apoptosis after 24-h incubation with each of these stimuli) (data not shown) (16). Collectively, these data suggest that CD86-expressing T cells are effector memory T cells.

CD86 on T cells efficiently costimulates naive T cell responses

The glycoprotein CD86 expressed on human B and T cells is identical. Based on the observation that CD86 expressed on TCC had an apparent molecular mass of ~70 kDa, whereas CD86 on CD86-transfected Chinese hamster ovary cells or on EBV-transformed B cells had a molecular mass of ~90 kDa, it has been reported that CD86 expressed on human T cells was hypoglycosylated (13). We show here that CD86 expressed on CD86⁺ T cells, IL-4 plus anti-CD40 mAb-stimulated tonsillar B cells, and the Daudi cells run with the same apparent molecular mass of ~70 kDa (Fig. 3 and Ref. 3). Furthermore, sequencing shows that CD86 expressed by T cells is homologous to the nucleic acid sequence reported in the GenBank database (data not shown). Nevertheless, we report that CD86 on RPMI 8866 B cells has a higher molecular mass of ~90 kDa (Fig. 3). As a control, CD86 expression is undetectable on the Jurkat T cells (Fig. 3 and Ref. 13). These results show that human T and B cells express the same isoform of the glycoprotein CD86.

CD86 expressed on T cells costimulates naive T cell responses

We also evaluated whether CD86 expressed on T cells is functional. CD86⁺ T cells, obtained 2 wk after restimulation, have

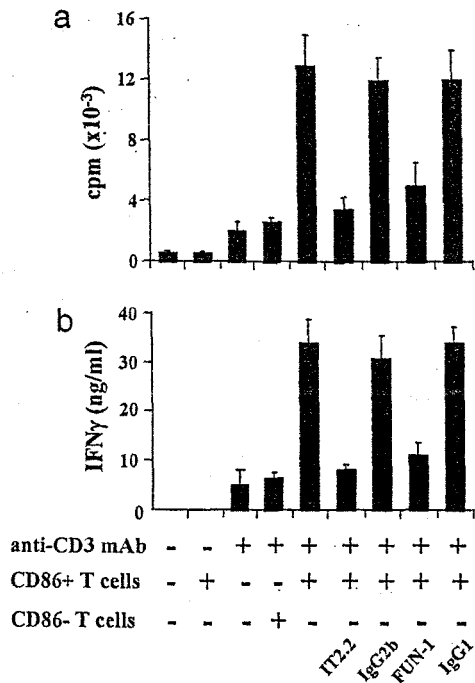


FIGURE 4. CD86 expressed on T cells potentiates anti-CD3 mAb-induced naive T cell activation. Naive (CD45RA⁺) CD4⁺ T cells have been stimulated with 10 ng/ml anti-CD3 mAb in the absence or presence of PFA-fixed CD86⁺ or CD86⁻ T cells. In some experiments, the neutralizing anti-CD86 mAbs, IT2.2, or FUN-1 or isotype control mAbs (IgG2b and IgG1, respectively) were added. *a*, Naive T cell proliferation was evaluated at day 3. *b*, IFN- γ production was quantified in the 48-h supernatants by ELISA. *a* and *b*, Results are expressed in mean \pm SD of quintuplicate values and are representative of one of five separate experiments.

been fixed with PFA and used either as costimulators in anti-CD3 mAb assays or as stimulators in primary allogenic MLR. CD86⁻ T cells have been purified 2 wk after the initial stimulation, fixed with PFA, and used as control. CD80 expression was undetectable by FACS analysis on CD86⁺ and CD86⁻ T cells (data not shown).

In anti-CD3 mAb assays, naive CD4⁺ T cells have been stimulated with a suboptimal concentration of anti-CD3 mAb in the absence or presence of fixed CD86⁺ or CD86⁻ T cells. Results from five separate experiments show that the presence of CD86⁺ T cells potentiates anti-CD3 mAb-induced proliferation (SI = 7.2 \pm 2, mean \pm SD, *n* = 5) and IFN- γ production (increase of 580 \pm 5%, mean \pm SD, *n* = 5). Both of these effects are partly prevented by adding the neutralizing anti-CD86 mAbs, FUN-1 (decrease of 80 \pm 7% and 78 \pm 18%, respectively, mean \pm SD, *n* = 5) or IT2.2 (decrease of 72 \pm 5% and 67 \pm 10%, respectively). In contrast, fixed CD86⁻ T cells are ineffective. The results from a representative experiment are shown in Fig. 4.

Prior studies have shown that CD86 is required for an efficient generation of a primary MLR directed against alloantigen (4, 17). As CD86⁺ T cells express MHC classes I and II, they have been used as stimulators in a primary MLR culture with freshly isolated T cells from four different donors used as responders. Results show that fixed CD86⁺, but not CD86⁻ T cells, induce an MLR response (SI = 8 \pm 2, mean \pm SD, *n* = 4) that is partly decreased by the neutralizing anti-CD86 mAbs FUN-1 and IT2.2 (decrease of 80 \pm 18% and 63 \pm 13%, respectively, mean \pm SD, *n* = 4). Representative results obtained with the cells of two of four donors are shown in Fig. 5.

We have also tested whether CD86⁺ T cells are capable of autocrine costimulation. Results show that the neutralizing anti-

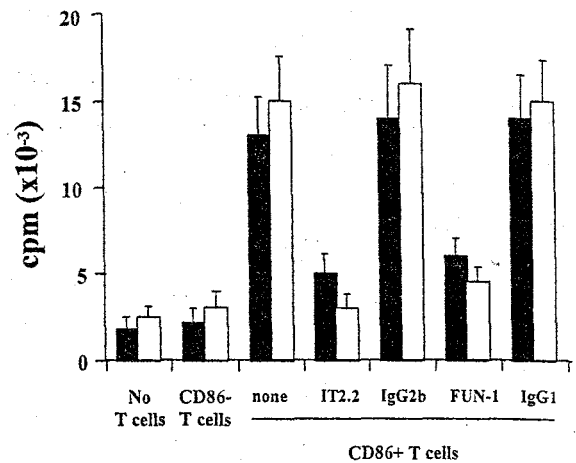


FIGURE 5. CD86⁺ T cells stimulate a primary alloantigen MLR. Naive T cells from two different donors (■ and □) have been cultured with PFA-fixed CD86⁺ T cells in the presence or absence of the neutralizing anti-CD86 mAbs, IT2.2, or FUN-1 or of the isotype control mAbs (IgG2b and IgG1, respectively). As controls, T cells have been cultured alone or with PFA-fixed CD86⁻ T cells. T cell proliferation was measured at day 6. Results are expressed in cpm, mean \pm SD of quintuplicate values and are representative of the data obtained with two of four donors.

CD86 mAbs do not affect anti-CD3 mAb-induced IFN- γ production, apoptosis, and proliferation of CD86⁺ T cells (data not shown).

Taken together, these data suggest that CD86 expressed on human memory T cells is functional.

Discussion

We show here that the stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces the generation of effector memory cells expressing CD86. In vitro data suggest that CD86 expressed on T cells is functional and can costimulate naive T cell responses.

Our results show that the expression of the costimulatory molecule CD86 on T cells varies with their state of activation. CD86 expression is induced on memory T cells by stimulation and is down-regulated as the cells become quiescent. In contrast, it has been reported that activation down-regulates CD86 expression on murine TCC (11). As such, the regulation of CD86 expression may differ in human and mouse T cells. Nevertheless, our data are in agreement with a previous study showing that CD86 is detectable on human peripheral blood T cells 10 days after stimulation (3).

In agreement with these observations, we report that CD86⁺ T cells express high levels of activation markers and selectively express the cell surface molecules CD30, CD40-L, and CD70, whose expression is activation dependent (2, 18, 19). More precisely, CD30 expression on T cells has been shown to be dependent on the presence of exogenous IL-4 or on CD28 triggering (20). In agreement with others (21), we report the generation of CD30⁺ T cells in the absence of exogenous IL-4. Nevertheless, because CD86 expression on T cells occurs earlier than CD30 expression (data not shown), CD30 expression could be induced through an autocrine CD86-CD28 interaction. Although controversial (21), it has been also proposed that CD30 expression could be restricted to IL-4-producing T cells (22). However, we find that CD30 expression is restricted to CD86⁺ T cells and that most of the CD86⁺ T cells produce IFN- γ . Moreover, in additional experiments, we have observed that human Th1, Th2, and Th0 TCC express CD86 (data not shown). As such, CD86 does not appear as a marker

specific for T cells producing preferentially Th1 vs Th2 lymphokines.

Previous reports have shown that although freshly isolated T cells are resistant to apoptosis, the sensitivity to anti-CD3 mAb triggered cell death gradually increases upon activation and IL-2-dependent culture of T cells (16). In agreement with these observations, we find that CD86⁺ T cells are highly sensitive to anti-CD3 mAb-triggered apoptosis. Until now, the mechanism(s) that controls the death/survival of long term stimulated memory T cells has not been completely understood (2). Using a Fas-Fc molecule, we only partly prevented anti-CD3 mAb-induced CD86⁺ T cell death (data not shown). Moreover, addition of a neutralizing anti-CD86 mAb to CD86⁺ T cells does not modulate anti-CD3 mAb-induced apoptosis or lymphokine production, thereby showing that an autocrine T-T interaction between CD86 and CD28 or CTLA-4 that can be transiently expressed after activation does not modulate T cell activation.

Collectively, these findings show that CD86⁺ T cells express high levels of activation markers, produce high levels of cytokines, are sensitive to activation-induced cell death, and are poorly dependent of costimulatory signals to be efficiently activated, suggesting that CD86⁺ T cells are effector memory T cells.

The CD86 molecule expressed on human NK cells and Daudi B cells has been initially described as an ~70 kDa glycoprotein (3). Recently, it has been reported that CD86 on human TCC was hypoglycosylated based on the observation that CD86 on EBV-infected human B cell lines and on CD86-transfected Chinese hamster ovary cells had ~90 kDa whereas CD86 on TCC was ~70 kDa (13). Our data also suggest that CD86 may present different levels of glycosylation according to the cell types in which it is expressed. Nevertheless, we report that both activated human B cells, which are professional APC, and effector memory T cells express a CD86 molecule of 70 kDa.

We report here that CD86 expressed on effector memory T cells has costimulatory properties. In contrast, it has been reported that CD86 on human TCC was not functional because it failed to provide a costimulatory signal to another TCC (13). It has been now extensively reported that T cell response to stimulation is dependent on the strength of the T cell-APC interaction and on the status of T cell activation, resting naive T cells having more stringent requirements than effector memory cells (1, 2, 23). TCC are effector memory cells that are poorly dependent of costimulatory signals to be efficiently activated. As such, it could be hypothesized that authors have reported no costimulatory effect of CD86 on human TCC due to the use of TCC as responder T cells (13). The observation that CD86 on effector memory T cells does not influence their own activation reinforces this hypothesis. Reciprocally, using memory T cells as responders, others have suggested that the T-T cell interaction between CD2 and CD58 was involved in T cell activation (13, 24). We found here that CD58 is expressed at similar levels on CD86⁺ and CD86⁻ T cells and that a neutralizing anti-CD58 mAb (clone TS2/9; Ref. 24) poorly affects the capacity of CD86⁺ T cells to activate naive cells (data not shown). These results suggest that the interaction between CD80/CD86 and CD28 could be more potent than the interaction between CD58 and CD2 in providing costimulatory signal to resting naive T cells. Nevertheless, the main point is that CD86 expressed on effector memory T cells is functional and able to costimulate naive T cell responses. To our knowledge, this result is the first demonstration of a functional role of CD86 expressed by human T cells.

In conclusion, this study shows that long term stimulated human T cells express functional CD86. Interestingly, CD86 expression seems to be restricted to effector memory T cells. Moreover, CD86 expressed by T cells can provide the accessory signal required for

an efficient priming of naive T cells. As such, although T cells are less efficient than professional APC in presenting Ag, they can express costimulatory molecules that are crucial for the initiation of an immune response. This result suggests that activated memory T cells may favor the proliferation of naive T cells that have been activated via the TCR in a paracrine manner.

References

- Janeway, C., and K. Bottomly. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76:275.
- Swain, S. L., M. Croft, C. Dubey, L. Haynes, P. Rogers, X. Zhang, and L. M. Bradley. 1996. From naive to memory T cells. *Immunol. Rev.* 150:143.
- Azuma, M., D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. H. Philipps, L. L. Lanier, and C. Somoza. 1993. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366:76.
- Lanier, L. L., S. O. O'Fallon, C. Somoza, J. H. Philipps, P. S. Linsley, K. Okumura, D. Daisuke, and M. Azuma. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J. Immunol.* 154:97.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233.
- Allison, J. P., and M. F. Krummel. 1995. The yin and yang of T cell costimulation. *Science* 270:932.
- Azuma, M., H. Yssel, J. H. Philipps, H. Spits, and L. L. Lanier. 1993. Functional expression of B7/B71 on activated T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 177:845.
- Sansom, D. M., and N. D. Hall. 1993. B7/B71, the ligand for CD28, is expressed on repeatedly activated human T cells in vitro. *Eur. J. Immunol.* 23:295.
- Wyss-Corray, T., D. Mauri-Hellweg, K. Bauman, F. Bettens, R. Grunow, and W. J. Pichler. 1993. The B7 adhesion molecule is expressed on activated human T cells: functional involvement in T-T cell interactions. *Eur. J. Immunol.* 23:2175.
- Krummel, M., and J. P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182:459.
- Prabhu Das, M. R., S. S. Zamvil, F. Borellio, H. L. Weiner, A. H. Sharpe, and V. K. Kuchroo. 1995. Reciprocal expression of co-stimulatory molecules, B7-1 and B7-2, on murine T cells following activation. *Eur. J. Immunol.* 25:207.
- Greenfield, E. A., E. Howard, T. Paradis, K. Nguyen, F. Benazzo, P. McLean, P. Holsberg, G. Davis, D. A. Hafler, A. H. Sharpe, G. J. Freeman, and V. K. Kuchroo. 1997. B7.2 expressed by T cells does not induce CD28-mediated costimulatory activity but retains CTLA-4 binding. *J. Immunol.* 158:2025.
- Hollsberg, P., C. Scholz, D. E. Anderson, E. A. Greenfield, V. J. Kuchroo, G. J. Freeman and D. A. Hafler. 1997. Expression of a hypoglycosylated form of CD86 (B7-2) on human T cells with altered binding properties to CD28 and CTLA-4. *J. Immunol.* 159:4799.
- Hakamada-Taguchi, R., T. Kato, H. Ushijima, M. Murakami, T. Uede, and H. Nariuchi. 1998. Expression and co-stimulatory function of B7-2 on murine CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 28:865.
- Jeannin, P., Y. Delneste, S. Lecoanet-Henchoz, J.-F. Gauchat, J. Ellis and J.-Y. Bonnefoy. 1997. CD86 (B7-2) on human B cells: a functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J. Biol. Chem.* 272:15613.
- Wesselborg, S., O. Janssen, and D. Kabelitz. 1993. Induction of activation driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 150:4338.
- Azuma, M., M. Cayabyab, D. Buck, J. H. Philipps, and L. L. Lanier. 1992. CD28 interaction with B7 co-stimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175:353.
- Ellis, T. M., P. E. Simms, D. J. Sliwnick, H.-M. Jack, and R. I. Fisher. 1993. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO⁺ T cells. *J. Immunol.* 151:2380.
- Agematsu, A., T. Kobata, K. Sugita, T. Hirose, S. F. Schlossman, and C. Morimoto. 1995. Direct cellular communications between CD45RO and CD45RA T cell subsets via CD27/CD70. *J. Immunol.* 154:3627.
- Gilfillan, M. C., P. J. Noel, E. R. Podack, S. L. Reiner, and C. B. Thompson. 1998. Expression of costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J. Immunol.* 160:2180.
- Hamann, D., C. M. Hilkens, M. L. Grogan, S. M. Lens, M. L. Kapsenberg, M. Yazdanbakhsh, and R. A. Van Lier. 1996. CD30 expression does not discriminate between human Th1- and Th2-type T cells. *J. Immunol.* 156:1387.
- Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerighina, C. K. Daniel, M. M. D'Elois, G. Zancuoghi, F. Vinante, G. Pizzolo, and S. Romagnani. 1995. Preferential expression of CD30 by human CD4⁺ T cells producing Th2-type cytokines. *FASEB J.* 9:81.
- Viola, A., and L. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104.
- Brod, S. A., M. Purvee, D. Benjamin, and D. A. Hafler. 1990. T-T cell interactions are mediated by adhesion molecules. *Eur. J. Immunol.* 20:2259.

Soluble CD86 Is a Costimulatory Molecule for Human T Lymphocytes

Pascale Jeannin,*§ Giovanni Magistrelli,*§
Jean-Pierre Aubry,* Gersende Caron,*
Jean-François Gauchat,* Toufic Renno,*
Nathalie Herbault,* Liliane Goetsch,*
Aline Blaecke,* Pierre-Yves Dietrich,†
Jean-Yves Bonnefoy,*‡ and Yves Delneste*
*Centre d'Immunologie Pierre Fabre
5 avenue Napoléon III
F-74164 Saint Julien en Genevois
France

†Laboratoire d'Immunologie des tumeurs
Hôpital Cantonal Universitaire de Genève
CH-1124 Genève
Switzerland

Summary

CD86 is an important costimulatory molecule for the priming and activation of naive and memory T cells, respectively. Here, we show that soluble CD86 is detected in human serum. Soluble CD86 is produced by resting monocytes and results from an alternatively spliced transcript (CD86 Δ TM) characterized by deletion of the transmembrane domain. Recombinant CD86 Δ TM binds to CD28 and CTLA-4 and induces the activation of T cells after stimulation with anti-CD3 mAb. CD86 Δ TM also induces IFN γ production by virus-specific CD8⁺ memory human T cells stimulated with the Flu M1 peptide. The concentrations of soluble CD86 found in human serum are sufficient to induce biological activity. Soluble CD86 molecule, therefore, appears to be a functional costimulatory molecule playing a potentially important role in immune surveillance.

Introduction

Naive T cells require primary and costimulatory signals from antigen-presenting cells (APC) to be functionally activated. The primary antigen-specific signal initiates activation with costimulatory signals inducing clonal expansion and differentiation into effector cells (Lenschow et al., 1996; Chambers and Allison, 1997; Greenfield et al., 1998). Costimulatory signals are provided by the interaction of membrane molecules expressed by T cells and APC. The biological activity of the costimulatory molecule CD28 has been extensively studied. CD28 is constitutively expressed by T cells and interacts with the B7 molecules CD80 (B7.1) (Yokochi et al., 1982; Linsley et al., 1990) and CD86 (B7.2) (Azuma et al., 1993; Freeman et al. 1993). This interaction results in an increased T cell proliferation, IL-2 production, and resistance to apoptosis (Linsley et al., 1991a; Croft et al., 1992). T cells that bind antigen and do not receive a costimulatory signal are thought to die or to become

anergic (Harding et al., 1992; Gribben et al., 1995). More recently, ICOS, a new member of the CD28 family, has been described (Hutloff et al., 1999). The expression of ICOS on naive T cells is induced by activation (Hutloff et al., 1999; Yoshinaga et al., 1999). ICOS interacts with B7-RP1 (Yoshinaga et al., 1999), also described as B7h (Swallow et al., 1999), which is constitutively expressed on B cells and macrophages (Yoshinaga et al., 1999) and upregulated by activation (Swallow et al., 1999). B7-H1, a third member of the B7 family, is a costimulatory molecule for human T cells, the ligand for which remains undetermined (Dong et al., 1999). In addition to CD28 and ICOS, activated T cells may also transiently express CTLA-4, a second ligand for CD80 and CD86 (Linsley et al., 1991b; Azuma et al., 1993). CTLA-4 engagement can transduce an "off" signal, disengaging T cells from further activation and proliferation (Walunas et al., 1994; Krummel and Allison, 1995; Saito, 1998). However, only CD28 is constitutively expressed by resting naive T cells, suggesting that the CD28/B7 ligand pairs play an important role in the generation of an immune response. In agreement with this observation, CD28-deficient mice (Shahinian et al., 1993) and transgenic mice producing a soluble CTLA-4-Fc molecule (Linsley et al., 1992) present a reduced Th response.

CD80 and CD86 are type I membrane glycoproteins belonging to the immunoglobulin supergene family (Bajorath et al., 1994). In humans, their expression patterns differ according to the nature of the APC. CD86 expression is constitutive on monocytes (Azuma et al., 1993; Hathcock et al., 1994) and dendritic cells (Caux et al., 1994; Yokozeki et al., 1996) and is upregulated by activation (Engel et al., 1994; McLellan et al., 1995). In contrast, CD80 is expressed at low levels on APC and upregulated following activation (Fleischer et al., 1996). CD80 and CD86 are also induced on T cells after activation (Hakamada-Taguchi et al., 1998; Jeannin et al., 1999). Despite having the same ligands, CD80 and CD86 appear to be involved in different mechanisms; CD80 can be more potent than CD86 in inducing an anti-tumoral response (Matulonis et al., 1996), while CD86 preferentially induces the production of a Th2 response (Freeman et al., 1995; Kuchroo et al., 1995). In CTLA-4-Ig transgenic mice, blocking the interaction of CD80/CD86 with their ligands results in defective T cell priming (Linsley et al., 1992). Due to its constitutive expression on human APC, CD86 has been suspected of being involved in the initiation of the immune response (Caux et al., 1994; Yi-qun et al., 1996; Manickasingham et al., 1998).

In this study, we report that soluble CD86 is detected in human serum. Soluble CD86 is produced by resting monocytes and results from an alternatively spliced transcript characterized by the deletion of the transmembrane domain. Soluble CD86 provides a costimulatory signal to memory human T cells.

Results

Detection of Soluble CD86 in Human Serum and Identification of a CD86 mRNA Spliced Variant

A soluble immunoreactive form of CD86 was detected in the freshly isolated serum of 10 of 60 healthy subjects

‡To whom correspondence should be addressed (e-mail: jean.yves.bonnefoy@pierre-fabre.com).

§These authors contributed equally to this work.

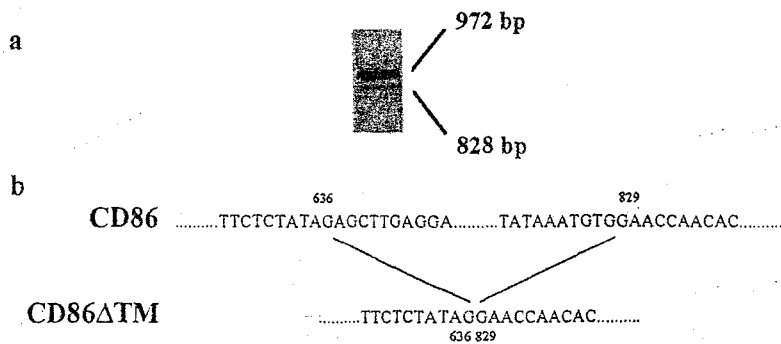


Figure 1. PBMC Express an Alternatively Spliced Variant of Human CD86 mRNA

(A) Identification of two CD86 transcripts in human PBMC. RT-PCR was performed to amplify the coding sequence of CD86 mRNA in human PBMC. The membrane CD86 and CD86 Δ TM cDNA fragments were visualized by ethidium bromide staining.

(B) Nucleotide sequence at the splice junction of CD86 and CD86 Δ TM. Nucleotide sequence at the splice junction and the deduced amino acid sequence of CD86 Δ TM are shown.

(6.3 ± 4.5 ng/ml, mean \pm SEM, ranging from 1 to 15 ng/ml), 6/40 cancer patients (3.7 ± 3.1 ng/ml, ranging from 1 to 10 ng/ml), and 8/40 subjects suffering from autoimmune disease (4.6 ± 2.1 ng/ml, ranging from 2 to 12 ng/ml) (data not shown). Soluble CD86 can be produced either by the shedding of the membrane form or through an alternative mRNA splicing. RT-PCR analysis of CD86 mRNA revealed the constitutive expression of two transcripts in resting human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (Figure 1A). The largest form (972 bp) was identical to the published CD86 sequence (Azuma et al., 1993; Freeman et al., 1993; data not shown). The smallest cDNA fragment (828 bp), named CD86 Δ TM, has a deletion from nucleotide (nt) 686 (starting from ATG codon) to nt 829 and encodes for a 275 amino acid polypeptide. According to the *cd86* genomic organization (Jellis et al., 1995), this cDNA is generated by alternative splicing of the CD86 mRNA in which the exon 6 (encoding for the transmembrane region) is deleted (Figure 1B). The deletion does not affect the reading frame (Figure 1B).

Our results show that a soluble form of CD86 can be detected in human serum and that human PBMC express two CD86 mRNA variants.

Recombinant CD86 Δ TM Is Expressed as a Soluble Molecule

The deletion of exon 6 (encoding for the transmembrane domain) suggested that CD86 Δ TM could be produced as a soluble molecule. Recombinant CD86 and CD86 Δ TM expressed in COS cells have an apparent molecular weight of 65 and 48 kDa in nonreducing conditions, respectively (Figure 2A). Membrane CD86 was detected by FACS on the surface of COS cells transfected with CD86 but not with CD86 Δ TM cDNA (Figure 2B). A soluble molecule reactive with anti-CD86 mAbs was detected by ELISA in the cell-free supernatant of CD86 Δ TM-transfected cells but not in the supernatants of CD86-transfected cells and mock cells (Figure 2C).

These results show that recombinant CD86 Δ TM is a soluble molecule.

Soluble CD86 Detected in Human Serum Is Encoded by the CD86 Δ TM Transcript

In order to selectively detect CD86 Δ TM, a specific polyclonal serum was produced by immunizing rabbits with the peptide DEAQRVFKSKTSSCDKSD, located within the intracellular domain of CD86. Western blotting analysis showed that the serum recognized both membrane CD86 and CD86 Δ TM molecules produced in COS cells (Figure 3A). In ELISA, the polyclonal antibody recognized recombinant CD86 Δ TM but not the CD86-Fc and CD80-

Fc protein (extracellular domain of CD86 or CD80 fused to the CH2 and CH3 domains of mouse Fc γ 1) (Figure 3B). The preimmune rabbit serum did not recognize human

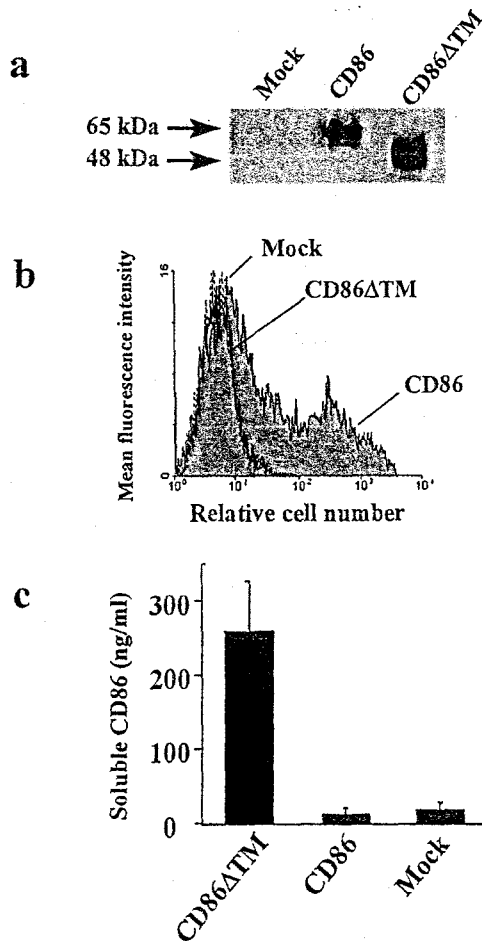


Figure 2. Recombinant CD86 Δ TM Is Produced as a Soluble Molecule

COS cells were transiently transfected with the pCDNA3.1 vector containing CD86 or CD86 Δ TM cDNA. After 48 hr, protein extracts were size separated by nonreducing SDS-PAGE, and CD86 expression was analyzed by Western blotting (A). Membrane CD86 expression was analyzed by FACS (B), and soluble CD86 was determined by ELISA in the concentrated culture supernatants (C). The concentration of soluble CD86 was determined using purified recombinant CD86 Δ TM as a standard. Results are expressed in nanograms/milliliter (mean \pm SD, n = 5).

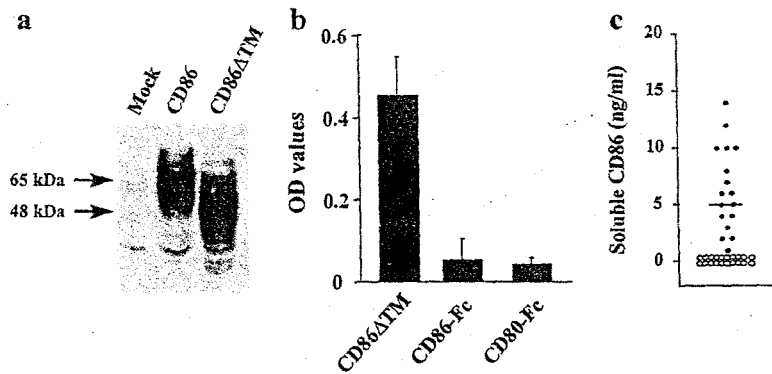


Figure 3. Soluble CD86 Detected in Human Serum Is Identical to CD86 Δ TM.

(A and B) Characterization of the anti-CD86 Δ TM-specific polyclonal Ab. (A) Western blot analysis shows that the anti-CD86 Δ TM polyclonal Ab recognizes both recombinant CD86 Δ TM and membrane CD86 expressed by COS-transfected cells. (B) The anti-CD86 Δ TM polyclonal Ab recognizes recombinant CD86 Δ TM but not CD86-Fc and CD80-Fc-fusion proteins by ELISA. Results are expressed in optical density values.

(C) Soluble CD86 Δ TM is detected in human serum. Serum containing the highest levels of soluble CD86 (n = 17) (closed circle) as determined by ELISA using the anti-CD86

mAb and negative serum (n = 20) (open circle) were tested by ELISA using the anti-CD86 Δ TM polyclonal Ab. The concentration of soluble CD86 was determined using purified recombinant CD86 Δ TM. Results are expressed in nanograms per milliliter.

serum and recombinant CD86 Δ TM and CD86-Fc (data not shown). The CD86 Δ TM-specific polyclonal antibody detected soluble CD86 in 17/24 CD86⁺ serums, whereas no signal was observed in 20/20 CD86⁻ serums tested (Figure 3C). The levels detected in the different serums with the ELISA for soluble CD86 or specific for CD86 Δ TM were identical. However, due to a lower sensitivity of the ELISA, levels of soluble CD86 lower than 5 ng/ml were not detected in this assay.

Taken together, these results show that the soluble form of CD86 detected in human serum can be generated by translation of the CD86 Δ TM mRNA.

Resting Monocytes Constitutively Express CD86 Δ TM mRNA and Produce Soluble CD86

The expression of CD86 versus CD86 Δ TM mRNA was evaluated in different cell types by RT-PCR. Results show that the two splice variants are constitutively expressed by nonstimulated monocytes (Figure 4A), while only CD86 mRNA was expressed by peripheral blood and tonsillar B cells, in vitro-generated dendritic cells, alveolar macrophages (Figure 4A), and different transformed cell lines expressing membrane CD86 (data not shown). None of the CD86 transcripts were detected in T cells, NK cells, neutrophils, lung epithelial cells, or microvascular endothelial cells (data not shown). Activation of monocytes with 100 ng/ml LPS, 10 U/ml IFN γ , or 1 μ g/ml anti-CD40 mAb resulted in the preferential expression of membrane CD86 mRNA (Figure 4B). Using either mAbs (data not shown) or the CD86 Δ TM-specific serum (Figure 3C), results showed that monocytes spontaneously released soluble CD86. As expected, no soluble CD86 was observed in B cell, dendritic cell, or alveolar macrophage culture supernatants. Soluble CD86 production was abolished in monocytes by activation with LPS, anti-CD40 mAb, or IFN γ (Figure 4C).

These data demonstrate that nonstimulated human monocytes produce soluble CD86 Δ TM and that activation inhibits this production.

CD86 Δ TM Is a Costimulatory Molecule

We further analyzed the biological activity of soluble CD86. In a first set of experiments, we evaluated whether the molecule CD86 Δ TM can bind to its ligands, CD28 and CTLA-4. The expression of CD28 and CTLA-4 by COS cells was analyzed by FACS (Figures 5A and 5C). Results show that 10 μ g/ml recombinant CD86 Δ TM binds to CD28-transfected cells (MFI = 72 \pm 8, n = 3)

(Figure 5B) or CTLA-4-transfected cells (MFI = 49 \pm 6) (Figure 5D) but not to mock-transfected cells (Figures 5B and 5D). This binding is inhibited by 10 μ g/ml anti-CD86 mAb (83% \pm 10% and 94% \pm 8% inhibition on CD28 and CTLA-4 transfected cells, respectively; mean \pm SD, n = 4) (Figure 5B) and by 5 μ g/ml CTLA-4-Fc (68% \pm 8% and 75% \pm 6% inhibition, respectively) (data not shown) but not by an anti-CD80 mAb (data not shown). Recombinant CD86 Δ TM (10 μ g/ml) also binds to the human T lymphoma cell line Jurkat (MFI = 38 \pm 8, mean \pm SD, n = 3) (data not shown), which constitutively expresses CD28. This binding is also inhibited by an anti-CD86 mAb (70% \pm 12% inhibition) and CTLA-4-Fc (68% \pm 8% inhibition) but not by an anti-CD80 mAb. We next evaluated the biological activity of recombinant soluble CD86 Δ TM. In vitro assays showed that CD86 Δ TM increased the proliferation of T cells stimulated with a suboptimal concentration of an anti-CD3 mAb. This effect was significant at 10 ng/ml (stimulation index [SI] = 8.4 \pm 1.3; mean \pm SD, n = 6; p < 0.05) and maximal at the highest concentration tested (1 μ g/ml) (SI = 25 \pm 4; p < 10⁻⁴) compared to stimulation with the anti-CD3 mAb alone (SI = 2.5 \pm 0.6) (Figure 6A). T cell proliferation was inhibited by 10 μ g/ml neutralizing anti-CD86 mAb (80% \pm 6% inhibition) or 5 μ g/ml CTLA-4-Fc (82% \pm 9% inhibition) but not by anti-CD80 and the isotype control mAbs (Figure 6B). No proliferation was induced by soluble CD86 Δ TM in the absence of the anti-CD3 mAb. As a control, anti-CD3 plus anti-CD28 mAb induced a stronger T cell proliferation (SI = 74 \pm 11; mean \pm SD, n = 5) (Figures 6A and 6B). T cell proliferation was associated with cytokine production. CD86 Δ TM, used at the optimal concentration of 100 ng/ml, induced a higher production of IFN γ (12 \pm 2.5 ng/ml; mean \pm SD, n = 6) (Figure 6C) and IL-2 (5.6 \pm 0.9 ng/ml) (Figure 6D) by anti-CD3 mAb-stimulated T cells compared with a stimulation with the anti-CD3 mAb alone (4 \pm 0.8 ng/ml and 1.9 \pm 0.2 ng/ml, respectively) (Figures 6C and 6D). Both IFN γ and IL-2 production was inhibited by 10 μ g/ml neutralizing anti-CD86 mAb (66% \pm 10% and 52% \pm 8% inhibition, respectively) or 5 μ g/ml CTLA-4-Fc (72% \pm 13% and 61% \pm 9% inhibition, respectively) (Figures 6C and 6D) but not by anti-CD80 or isotype-matched mAbs (data not shown). As a control, IFN γ and IL-2 production by T cells activated with anti-CD3 plus anti-CD28 mAb was 25 \pm 4.5 and 6.8 \pm 1.1 ng/ml, respectively (Figures 6C and 6D). Lymphokine production was undetectable when soluble CD86 Δ TM was used alone (data not shown). Previous studies have

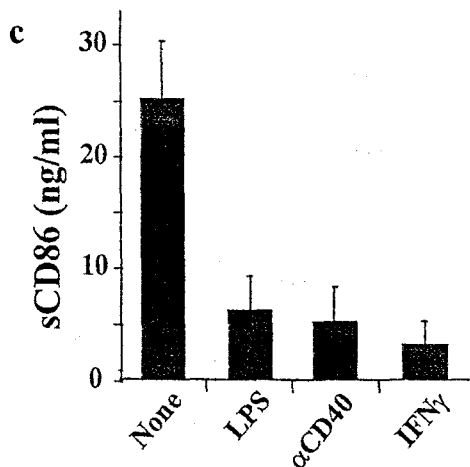
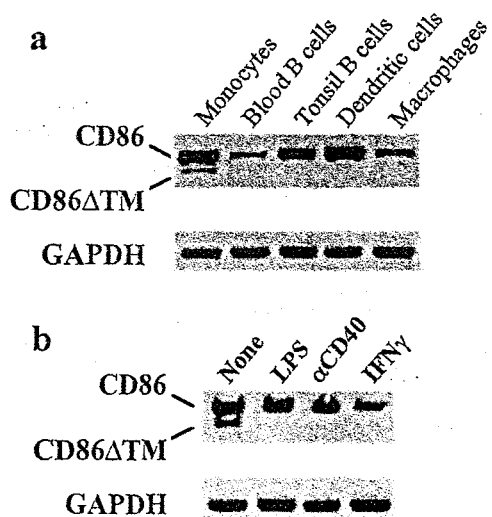


Figure 4. CD86 Δ TM Expression Is Restricted to Human Monocytes and Regulated by Activation

(A) CD86 Δ TM mRNA is selectively expressed in monocytes. The expression of the CD86 Δ TM transcript was analyzed by RT-PCR in freshly isolated monocytes, peripheral blood, tonsillar B cells, in vitro-generated dendritic cells, and alveolar macrophages. The amplified fragments were size separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining.

(B) Regulation of CD86 Δ TM mRNA expression in human monocytes. Human monocytes were either nonstimulated or stimulated with LPS, anti-CD40 mAb, or IFN γ . The CD86 Δ TM transcript expression was analyzed after a 6 hr stimulation. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA.

(C) Nonactivated human monocytes produce soluble CD86 Δ TM. Human monocytes were nonstimulated or stimulated with LPS, anti-CD40 mAb, or IFN γ . After an overnight incubation, soluble CD86 was detected by ELISA using the specific CD86 Δ TM polyclonal serum as detection Ab. The concentration of soluble CD86 was determined using purified recombinant CD86 Δ TM. Results are expressed in nanograms per milliliter.

reported that Vav is phosphorylated in response to CD28 ligation (Klasen et al., 1998). We thus evaluated whether CD86 Δ TM could also induce the phosphorylation of this protein. Immunoprecipitation and Western blotting analysis showed that like the anti-CD28 mAb, cross-linked CD86 Δ TM could induce the phosphorylation of Vav in Jurkat cells (Figure 6E).

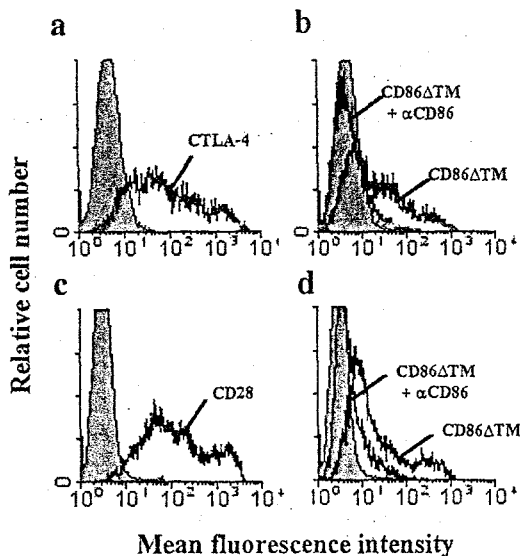


Figure 5. CD86 Δ TM Binds to CD28 and CTLA-4

The binding of CD86 Δ TM to its ligands CD28 and CTLA-4 was evaluated by FACS using CD28⁻ (A) and CTLA-4-transfected COS cells (C). The binding of c-myc-tagged CD86 Δ TM on transfected cells (B and D) was evaluated using an anti-c-myc mAb (clone 9E10) revealed with an FITC-labeled anti-mouse Ig Ab. In some experiments, CD86 Δ TM was incubated with neutralizing anti-CD86 mAb before the binding assay.

These results show that as previously reported for membrane CD86 (Linsley et al., 1991a; Azuma et al., 1993; Freeman et al., 1993), CD86 Δ TM in association with anti-CD3 mAb potentiates proliferation and lymphokine production by T cells. CD86 Δ TM acts, at least in part, by inducing the phosphorylation of Vav.

CD86 Δ TM Costimulates Memory T Lymphocytes

Naive T cells require a strong costimulatory signal to be efficiently activated, while memory T cells require low stringency activation signals (Croft et al., 1992; Liu and Janeway, 1992; Yi-qun et al., 1996; Manickasingham et al., 1998). We have thus evaluated whether soluble CD86 Δ TM can provide a similar activation signal to naive and memory T lymphocytes. Cell cycle analysis revealed that 16% \pm 1.6% (mean \pm SD, n = 3) of CD45RO⁺ proliferate in response to CD86 Δ TM plus anti-CD3 mAb, while only 11.2% \pm 1.2% (p < 0.05) proliferate in response to anti-CD3 mAb alone (Figure 7A). Naive T cells also proliferate in response to CD86 Δ TM plus anti-CD3 mAb when compared to a stimulation with anti-CD3 mAb alone (6.5% \pm 0.6% compared to 4.7% \pm 0.9%, respectively) (Figure 7A). We have thus evaluated whether soluble CD86 provides the costimulatory signal required to activate antigen-specific memory cells. The influenza-specific memory CD8⁺ T cells circulate in a state whereby they can rapidly display effector function following stimulation (Bednarek et al., 1991; Lalvani et al., 1997). T cells from HLA-A2 subjects were stimulated for 6 hr with the influenza nonapeptide GILGFVFTL (Bednarek et al., 1991) plus CD86 Δ TM, and intracytoplasmic IFN γ production was detected among CD8⁺ T cells. Representative data obtained from one of five subjects are presented. CD86 Δ TM induced an increase of IFN γ production in CD45RO⁺ T cells compared with CD45RA⁺ T cells

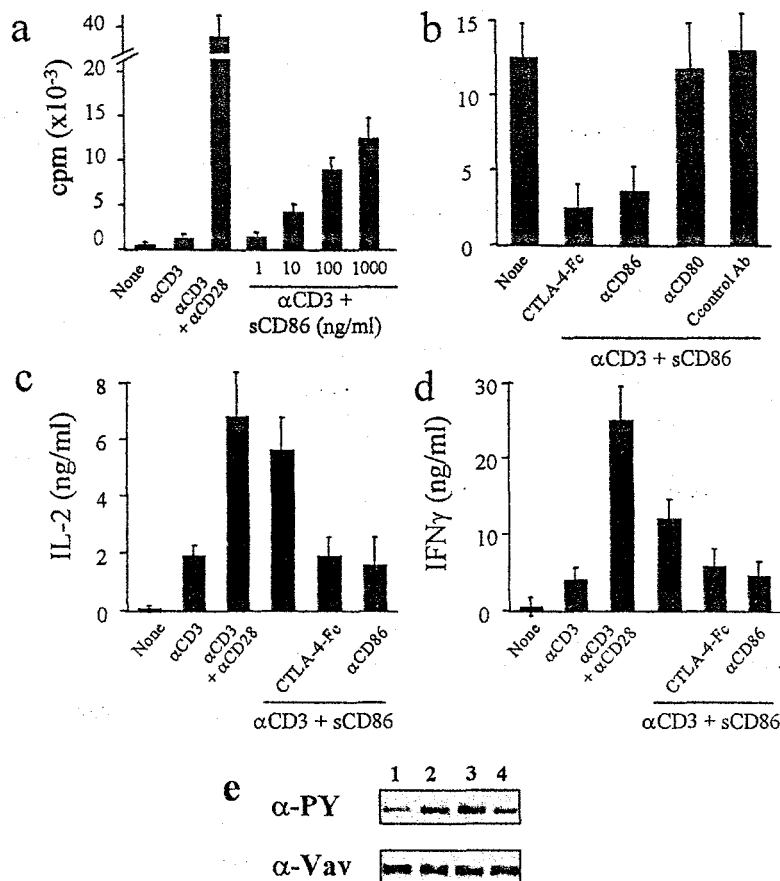


Figure 6. CD86 Δ TM is a Costimulatory Molecule for Human T Cells

(A and B) T cell proliferation was determined after 72 hr stimulation by [³H]thymidine incorporation. Results are expressed in counts per minute, mean \pm SD. (A) CD86 Δ TM potentiates the proliferation of anti-CD3 mAb-activated T cells. Human T cells were stimulated with a suboptimal concentration of anti-CD3 mAb without or with recombinant CD86 Δ TM. Positive control of T cell proliferation was induced by anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs. (B) CD86 Δ TM-induced T cell proliferation is inhibited by blocking CD86. Human T cells were stimulated with a suboptimal concentration of anti-CD3 mAb plus CD86 Δ TM without or with CTLA-4-Fc, anti-CD86, anti-CD80, or isotype control mAbs.

(C and D) CD86 Δ TM potentiates the production of IFN γ and IL-2 by anti-CD3 mAb-activated T cells. T cells were stimulated with anti-CD3 mAb without or with recombinant CD86 Δ TM. In some experiments, neutralizing anti-CD86 mAb or CTLA-4-Ig were added. IFN γ and IL-2 production was determined by FACS analysis as mentioned in the Experimental Procedures section. A stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs was performed as a control. Results are expressed in nanograms per milliliter.

(E) CD86 Δ TM induces tyrosine phosphorylation of Vav. Jurkat T cells were nonstimulated (1) or stimulated with cross-linked CD86 Δ TM (2), an anti-CD28 mAb (3), or with an anti-c-myc plus goat anti-Ig antibody (4) for 5 min at 37°C. After immunoprecipitation, the tyrosine phosphorylation of Vav was analyzed by immunoblotting using anti-phosphotyrosine mAb (α -PY, upper panel). The levels of Vav expression were determined by immunoblotting using an anti-Vav Ab (lower panel).

(0.66% and 0.03%, respectively) or nonstimulated cells (0.05% and 0.02%, respectively) (Figure 7B). Similar results were obtained by activating T cells with the peptide plus anti-CD28 mAb (1.4% and 0.06% among CD8⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RA⁺ cells produce IFN γ , respectively) (Figure 7B). In contrast, the frequency of IFN γ -producing cells was not modified when cells were stimulated with CD86 Δ TM alone (Figure 7B).

These results show that CD86 Δ TM costimulates antigen-specific memory T cells.

Discussion

We report here the detection of soluble CD86 in human serum. Soluble CD86 is generated from an alternative splicing of the CD86 mRNA (CD86 Δ TM), which results in the deletion of the transmembrane domain. CD86 Δ TM is expressed by nonactivated monocytes. Soluble recombinant CD86 Δ TM potentiates proliferation and lymphokine production by human T cells stimulated with anti-CD3 mAb or a recall antigen.

The human *cd86* gene is a single-copy gene organized into eight exons (Jellis et al., 1995). The transcript CD86 Δ TM is generated by the splicing of exon 6, which results in the deletion of the transmembrane domain. The acceptor and donor sites conform with the consensus splice-junction sequences (Mount, 1982). Alternatively spliced variants of murine B7 molecules have been

previously reported. A spliced variant of the CD80 mRNA, characterized by the deletion of exon 3 and resulting in the loss of the C-like domain, has been found in lymphoid organs (Inobe et al., 1994, 1996; Guo et al., 1995). Exons 1 and 5 of murine CD86 can be used in alternative fashion to generate four transcripts (differing in their 5' untranslated and signal regions) that encode the same molecule (Borriello et al., 1995). An additional alternatively spliced variant of murine CD86 encoding a partial IgV-like domain has also been reported (Borriello et al., 1995). The expression of these spliced transcripts is controlled by activation, as observed here with human CD86. However, no spliced variant generating soluble CD86 has been described in mice, hindering the evaluation of biological activity of soluble CD86 in vivo mouse models. Thus, to our knowledge, these data are the demonstration of a naturally occurring alternative splicing of the CD86 mRNA, resulting in the synthesis of a soluble costimulatory molecule. The Ig-like structure of CD86 is maintained by two intrachain disulfide bonds between Cys⁴⁰-Cys¹¹⁰ (V-type domain) and Cys¹⁵⁷-Cys²¹⁸ (C-type domain) (Azuma et al., 1993; Freeman et al., 1993; Bajorath et al., 1994) with ligand binding involving at least the V-type domain (Rennert et al., 1997). The reading frame of the CD86 Δ TM mRNA is not affected. Moreover, recombinant CD86 Δ TM binds to CD28 and CTLA-4 and costimulates T cells in a CD28-dependent manner, demonstrating that the binding sites of

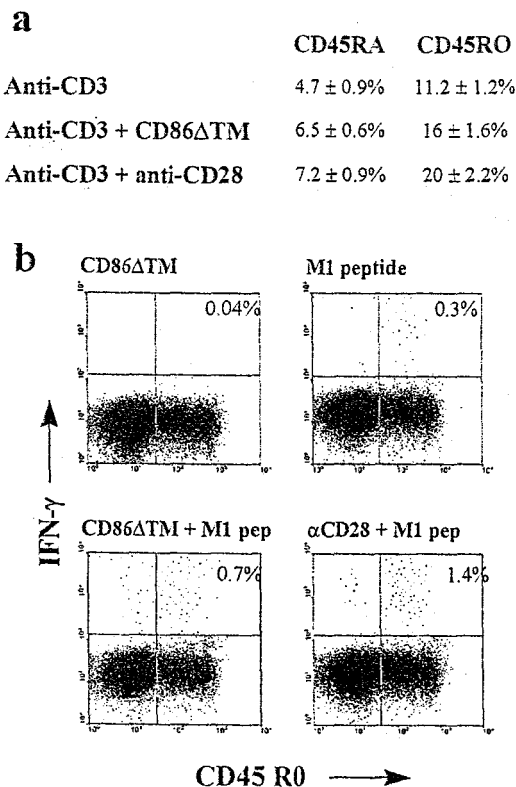


Figure 7. CD86ΔTM Is a Costimulatory Molecule for Human Memory T Cells

(A) CD86ΔTM induces the proliferation of CD45RO⁺ T cells. After stimulation with an anti-CD3 mAb, without or with CD86ΔTM, the phenotype of proliferating T cells was measured by Hoechst 33342 staining and labeling with anti-CD45RA and anti-CD45RO mAbs. T cell activation with anti-CD3 plus anti-CD28 mAb was performed as a control. Results are expressed as a percentage of cells in S+G2M phases of the cell cycle among naive and memory subpopulations, mean ± SD.

(B) CD86ΔTM induces IFN γ production by CD8⁺ T cells stimulated with the influenza M1 peptide. PBMC from HLA-A2 donors were incubated with the flu M1 nonapeptide with or without CD86ΔTM. As a control, cells were incubated with the peptide plus an anti-CD28 mAb. The frequency of IFN γ -producing CD8⁺ cells among the CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T lymphocytes was determined by FACS. Representative results obtained with one subject are presented.

CD86ΔTM are conserved. These data are also in agreement with the observation that the V-like domain of B7 molecules is sufficient to activate T cells (Rennert et al., 1997).

As previously reported for membrane CD86 (Linsley et al., 1991a), recombinant soluble CD86ΔTM potentiates the proliferation and lymphokine production by anti-CD3 mAb-stimulated T cells. Interestingly, dimeric soluble CD86ΔTM (produced as a GST fusion protein) was equally potent as anti-CD28 mAb in increasing the proliferation of anti-CD3 mAb-stimulated T cells (data not shown). The covalent homodimeric molecules CD28 and CTLA-4 have two binding sites (2:2 stoichiometry) (Linsley et al., 1995), and the oligomerization or clustering of membrane CD80/CD86 has been proposed in order to explain the higher avidity of CTLA-4-Ig to membrane CD86 compared to monomeric CD86 (Symington et al., 1993). This higher avidity should enhance the signaling by increasing the time of receptor occupancy by the

ligand. These results are in agreement with the observation that anti-CD28 mAb (Linsley et al., 1991a) and dimeric CD86ΔTM transduce a more potent costimulatory signal than monomeric CD86ΔTM. The lower amplitude of T cell activation induced by monomeric CD86ΔTM could result either from a lower avidity between soluble CD86 and its ligand or a higher dissociation rate compared with membrane CD86, which could be responsible for the generation of a lower costimulatory signal. In contrast with monomeric CD86ΔTM, the cross-linking of the fusion protein CD86-Ig was required to potentiate the anti-CD3 mAb-stimulated T cell proliferation (Rennert et al., 1997). One can speculate that the monomeric structure of soluble CD86ΔTM is sufficient to activate T cells or that soluble CD86 can exist in a noncovalent oligomeric form. A recent study showing that soluble CD80 can form homodimers in solution (Ikemizu et al., 2000) is in favor of this hypothesis. Interestingly, cross-linked CD86ΔTM induced the phosphorylation of the CD28 signal-transducing molecule Vav (Klasen et al., 1998). Although we cannot exclude the possibility that CD86ΔTM may also interact with CTLA-4 and thus generate an inhibitory signal, these data demonstrate that soluble CD86 acts, at least in part, by inducing a CD28-dependent activation signal.

Membrane CD86, which is constitutively expressed by monocytes, B cells, and dendritic cells (Caux et al., 1994; Engel et al., 1994; Vyth-Dreese et al., 1995; Yokozeki et al., 1996), has been shown to play an important role in the priming of naive T cells and activation of memory T cells (Yi-qun et al., 1996; Manickasingham et al., 1998). Since the activation of naive T cells requires strong activation signals that are provided by professional APC (Liu and Janeway, 1992), and the activation of recently activated memory T cells can be elicited with anti-CD3 mAb alone (Van de Velde et al., 1993), most memory T cells are still dependent on CD28 triggering for their activation (Yi-qun et al., 1996). FACS analysis revealed that soluble CD86ΔTM potentiated the proliferation of memory and naive T cells.

We have also observed that CD86ΔTM potentiates the activation of memory T cells stimulated with a recall antigen: recombinant CD86ΔTM increased the frequency of IFN γ -producing influenza-specific memory T cells stimulated with the flu M1 peptide. These results are in agreement with the fact that memory T lymphocytes are less dependent than naive T cells on the amplitude of the costimulatory signal to be efficiently activated (reviewed by Croft, 1994). These data suggest that soluble CD86 could be involved (1) in the activation of memory T cells and/or (2) in maintaining the "activation" status of CD45RO⁺ T lymphocytes (Zinkernagel et al., 1996). A similar role for membrane CD86 in the regulation of a memory antigen-specific restimulation has been previously reported (Keane-Myers et al., 1997). Moreover, the expression of CD86ΔTM mRNA and production of soluble CD86 are restricted to nonactivated human monocytes, suggesting that soluble CD86 could be involved in the early phase of the immune response, when activation of memory T cells may occur. These results are in favor of a role for soluble CD86 in the immune surveillance. In contrast, the initiation of a specific immune response requires the exclusive expression of membrane CD86, which provides a potent costimulatory signal to naive T cells.

In agreement with an important immunoregulatory role played by soluble CD86, an immunoreactive form

of CD86 was detected in human serum. The existence of a biologically active form of soluble CD86 has been previously suspected. Porcine endothelial cells constitutively release a soluble factor that mediates a CD28-dependent T cell proliferation (Davis et al., 1996). However, we did not detect an alternatively spliced variant of CD86 in human endothelial cells, suggesting that soluble CD86 found in human serum could be predominantly produced by monocytes. Interestingly, the concentration range of soluble CD86 found in human serum is similar to that which induces *in vitro* biological activity. We cannot exclude the possibility that in some conditions, soluble CD86 could also be generated by shedding of the membrane form. Collectively, our results show that serum-soluble CD86, generated by alternative splicing, is likely to be produced by circulating monocytes, which represent a large fraction of the PBMC. This soluble costimulatory molecule can thus play an important role in the immune surveillance against recall antigens and acts as a constant activation stimulus involved in the regulation of memory human T cell homeostasis.

Experimental Procedures

Detection of Soluble CD86

Soluble CD86 was evaluated by ELISA using commercial mAbs in the culture supernatants or serum of healthy subjects ($n = 60$) and subjects suffering from cancer ($n = 40$) and autoimmune disease ($n = 40$). In order to verify that soluble CD86 is identical to CD86 Δ TM and not generated by shedding of the membrane form, a specific CD86 Δ TM polyclonal antibody was generated by immunization of a rabbit with the peptide DEAGRQVFKSSKTSSCDKSDT, whose sequence is localized in the intracytoplasmic tail of CD86. This domain is conserved in soluble CD86 Δ TM. After incubation with the human serum, plates were incubated with the rabbit serum diluted at 1:5000, and bound Abs were detected using a peroxidase-labeled anti-rabbit Ig Ab (Pierce, Rockford, IL) revealed with the substrate *o*-phenylene diamine. Results are expressed in optical density values after subtraction of the value obtained with the preimmune rabbit serum.

Isolation and Activation of Human Cells

Human PBMC were isolated by centrifugation on Ficoll/Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). T cells were purified by rosetting with sheep red blood cells; the purity, determined by flow cytometry on a FACScan cytofluorometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) using an FITC-labeled anti-CD3 mAb (Becton Dickinson), was >95%. Human peripheral blood B cells were purified by flow cytometry using an FITC-labeled anti-CD19 mAb (Becton Dickinson). Tonsillar B cells were isolated from Ficoll-separated tonsillar mononuclear cells by a two-step negative-selection procedure using sheep erythrocyte rosetting and magnetic bead depletion (Dyna, Oslo, Denmark) to remove T cells, as previously reported (Jeannin et al., 1995). B cell purity was routinely >98% as determined by FACS analysis using an FITC-labeled anti-CD20 mAb (Becton Dickinson). Monocytes were either purified by FACS on the basis of FSC/SSC parameters or using immunomagnetic beads coated with an anti-CD14 mAb (MACS; Miltenyi, Bergish Gladbach, Germany); purity was >98%. Dendritic cells were generated *in vitro* by activating monocytes for 7 days with IL-4 plus GM-CSF (R&D Systems, Abingdon, UK); purity was >98% as assessed by CD1a expression and absence of CD83 labeling (Immunotech, Marseille, France). In some experiments, monocytes were cultured in complete medium (RPMI 1640 medium supplemented with 5% FCS and antibiotics reagent) (all from Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and were either unstimulated or stimulated with 10 ng/ml LPS (Sigma, St Louis, MO), 10 U/ml IFN γ (R&D Systems), or 1 μ g/ml anti-CD40 mAb (Ancell, Bayport, MN).

Cloning and Sequencing of CD86 mRNA Variants

Total RNA was extracted with the Trizol reagent (Life Technologies), and poly(A)⁺ RNA was purified using oligo-dT-coated magnetic beads (Dyna) according to the manufacturer's recommendations. Single-strand cDNA was synthesized using 1 μ g of poly(A)⁺ RNA by reverse transcription using an oligo-dT primer (Amersham Pharmacia Biotech). Total RNA from human alveolar macrophages, lung epithelial cells, and microvascular endothelial cells were kindly provided by Dr. P. Gosset (Institut Pasteur de Lille, Lille, France). PCR reactions were performed with cDNA corresponding to 10 ng poly(A)⁺ RNA. CD86 mRNA was amplified with primers designed to amplify the entire coding sequence of CD86 (5'-ATGGGACTGAGTACATTCTCTTTGTGATGGCCT-3' and 5'-CTCGAGTAAAAACATGTATCACTTTTGTGCGCATGA-3'). The PCR reaction was performed as follows: 94°C for 4 min, then 25 cycles 94°C for 30 min, 60°C for 30 min, and 72°C for 1 min followed by a final extension at 72°C for 5 min. The amplified fragments were size separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide. After excision from the gel, each amplified cDNA fragment was subcloned into a TA cloning vector (pCRII; InVitrogen, Leek, The Netherlands). Sequencing was performed using the ABI-PRISM Dye Terminator Cycle Ready Reaction kit (Perkin Elmer, Foster City, CA). Two cDNAs of different size were amplified and called CD86 and CD86 Δ TM (see the Results section). The expression of CD86 mRNA in activated versus non-stimulated human monocytes was evaluated by PCR using the above mentioned primers. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA (5'-TCCACCACCTGTTGCTGTA-3' and 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3').

CD86 and CD86 Δ TM Transfected COS Cells

The CD86 and CD86 Δ TM cDNAs were subcloned in the vector pCDNA3.1 and pCDNA3.1-A Myc-His (InVitrogen) and used to transfect COS cells. COS cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine, and antibiotics (all from Life Technologies) and transfected by lipofection (Fugene; Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Expression of membrane recombinant molecules was evaluated by FACS analysis using FITC-labeled anti-CD86 mAb (PharMingen, San Diego, CA). The production of soluble recombinant CD86 was assessed by ELISA in the cell-free supernatants. Briefly, the anti-CD86 mAb (clone T2.2) (PharMingen) was coated (1 ng/100 μ l/well) in 96-well plates (Life Technologies) in 0.1 M phosphate buffer (pH 4.0) (16 hr at 4°C) before incubation for 2 hr at room temperature with PBS/BSA 1%. After washing, plates were incubated for 16 hr at 4°C with culture supernatant (200 μ l/well). Bound CD86 was detected with a biotin-labeled anti-CD86 mAb (clone FUN-1) (PharMingen) followed by incubation with streptavidin-biotinylated HRP (used at 1/5000; Amersham Pharmacia Biotech) and revealed by the substrate *o*-phenylene diamine (Sigma). CD86 expression in transfected COS cells was also evaluated by Western blotting. Cells were washed in ice-cold PBS before lysis in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1% Nonidet P40 (Sigma) and protease inhibitors (Boehringer Mannheim). Proteins from 5×10^6 cells were electrophoretically separated on a 10% polyacrylamide gel in reducing conditions and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Biorad, Ivry sur Seine, France). After saturation, membranes were incubated with an anti-CD86 mAb (R&D Systems). After washing, membranes were incubated with peroxidase-labeled anti-mouse IgG Ab (Amersham Pharmacia Biotech), and bound antibodies were detected using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

Production and Purification of Recombinant CD86 Δ TM

The recombinant CD86 Δ TM molecule was produced in Sf9 cells. The CD86 Δ TM cDNA was inserted in the pAcSecG2T baculovirus transfer vector (PharMingen) into which was introduced an enzymatic cleavage site for the protease 3C (Walker et al., 1994) between the CD86 Δ TM and GST fragments. Viral particles were prepared as recommended by the manufacturer. Sf9 insect cells were grown at 27°C in TNM-FH medium (Life Technologies). Recombinant baculovirus was generated *in vivo* in Sf9 cells using Baculogold viral DNA (PharMingen). Sf9 cells were infected at a multiplicity of infection of 0.5. After 12 hr, the culture medium was changed to serum-free Sf-900-II medium (Life Technologies). The cell culture supernatants

were harvested at 72 hr and analyzed by ELISA for the presence of recombinant CD86 Δ TM. Cells and cellular debris were sedimented by centrifugation. The supernatants were 20-fold concentrated and the CD86 Δ TM molecule was purified on a GSH-Sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech). After an overnight incubation at 4°C under agitation, the column was washed and resuspended with PreScission cleavage buffer before addition of GST-PreScission (Amersham Pharmacia Biotech). After a 4 hr incubation at 4°C under agitation, the unbound fraction was collected and dialyzed against PBS. Protein purity was assessed by Coomassie blue staining and Western blotting.

Binding Experiments

The binding of recombinant CD86 Δ TM to CD28 was measured by FACS. COS cells were transfected with pCDNA3.1 containing CD28 or CTLA-4 cDNA. Expression of membrane CD28 and CTLA-4 on transfected cells was verified by FACS analysis using FITC-labeled anti-CD28 and anti-CTLA-4 mAbs (PharMingen). Transfected cells were incubated with 10 μ g/ml c-myc-tagged recombinant CD86 Δ TM. Bound CD86 Δ TM was detected with a biotin-labeled anti-c-myc mAb revealed by FITC-labeled streptavidin (PharMingen). In some experiments, a neutralizing anti-CD86 mAb (PharMingen) or CTLA-4-Ig (AnCell) were added. Results are expressed as mean of fluorescence intensity (MFI) values.

T Cell Activation Assays

T cell activation induced by recombinant CD86 Δ TM was measured by [3 H]thymidine incorporation and IFN γ and IL-2 production. Human PBMC (2.5×10^5 cells/ml), cultured in 96-well culture plates (Life Technologies) (200 μ l/well), were either nonstimulated or stimulated with 100 pg/ml anti-CD3 mAb, 30 pg/ml anti-CD3 plus 10 ng/ml anti-CD28 mAbs, or 100 pg/ml anti-CD3 mAb plus 1–1000 ng/ml recombinant CD86 Δ TM. In some experiments, 10 μ g/ml of the neutralizing anti-CD86 mAb IT2.2 or the isotype control mAbs (both from PharMingen) were added. After 5 days, cells were pulsed with 0.25 μ Ci/well [3 H]thymidine (Amersham Pharmacia Biotech) for 6 hr. Radioactive incorporation was measured by standard liquid-scintillation counting. Results are given in counts per minute (cpm), in stimulation index (SI) calculated as follows: A/O, where A and O are the cpm values obtained when cells were stimulated or not, respectively, or as a percent of decrease, (A-O/A) \times 100, where A and O are the values obtained in the absence or presence of a neutralizing anti-CD86 mAb, respectively. In other experiments, the frequency of naive versus memory proliferating T cells was measured using a FITC-labeled anti-CD45RA or anti-CD45RO mAbs (Dako, Glostrup, Denmark) after labeling with Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR). To measure lymphokine production, PBMC were cultured in 24-well plates (Life Technologies) at 2×10^6 cells/ml, 2 ml/well and stimulated with 100 pg/ml anti-CD3 mAb, 30 pg/ml anti-CD3 plus 10 ng/ml anti-CD28 mAbs, or 30 pg/ml anti-CD3 mAb plus 100 ng/ml recombinant CD86 Δ TM. IFN γ production was measured 24 hr later using Quantiflow Immunoassay kits (BioE, St Paul, MN). Briefly, 100 μ l of supernatants were incubated with anti-IFN γ or anti-IL-2 antibody-coated beads. After 2 hr, beads were washed and incubated with PE-conjugated anti-IFN γ or anti-IL-2 antibodies. After washing, beads were analyzed by flow cytometry (FACScan). The fluorescent signal given by the beads was detected in log scale, and the settings of the PE-channel photomultiplier (PMT) were adjusted using the blank beads provided in the kit. The cytokine concentration of the samples was determined by comparing the mean channel fluorescence of PE obtained with the standard curve built by plotting mean channel fluorescence versus cytokine concentration, for IFN γ and IL-2 standards recorded. The IFN γ and IL-2 concentration was given in nanograms per milliliter.

Analysis of Vav Phosphorylation

Jurkat cells were incubated for 5 min with 5 μ g/ml c-myc-tagged CD86 Δ TM, anti-CD28, or control mAb. Cross-linking was performed using an anti-c-myc or goat anti-mouse Ig antibody. Cell lysates were incubated with 2 μ g anti-Vav polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) adsorbed on protein A-Sepharose beads. After incubation, beads were washed five times before resuspension in loading buffer. Aliquots were subjected to SDS-PAGE

and electrotransferred on nitrocellulose membranes. For immunoblotting, membranes were probed with a Vav-specific antibody or an anti-phosphotyrosine mAb (clone 4G10; UBI, Lake Placid, NY). After washing, membranes were incubated with peroxidase-labeled anti-mouse or -rabbit antibodies, and bound antibodies were detected using ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Activation of Influenza-Specific CD8 $^+$ T Cells

The frequency of activated influenza M protein-specific T cells was evaluated as previously reported (Lalvani et al., 1997). Briefly, PBMC at 1×10^6 cells/ml in 200 μ l complete medium were cultured for 6 hr and stimulated with 10 μ g/ml HLA-A2-restricted influenza peptide FluM1_{58–86} (GILGFVFTL), in the presence of recombinant CD86 Δ TM or 3 μ g/ml anti-CD28 mAb (Becton Dickinson). Brefeldin A (Sigma), an inhibitor of intracellular transport that prevents secretion of synthesized cytokines, was added in the last 4 hr. Cells were then washed once in cold PBS and then resuspended in 2 ml PBS containing 1 mM EDTA. After 10 min incubation at 37°C, cells were washed and resuspended in 200 μ l PBS/1% BSA/0.01% NaN₃. Cells were then incubated for 30 min at 4°C with an allophycocyanin (APC)-labeled anti-CD8 mAb (Caltag, Burlingame, CA) and either phycoerythrin-labeled anti-CD45RA or -CD45RO mAb (Dako). After washing, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at 4°C and permeabilized by a 15 min incubation at 4°C in PBS/1mM HEPES/0.1% saponin in the presence of 5 μ g/ml FITC-labeled anti-human IFN γ mAb or FITC-labeled isotype control mAb (both from PharMingen, San Diego, CA). After two washes in PBS/1mM HEPES/0.01% saponin, cells were analyzed on a FACSvantage (Becton Dickinson). For each sample, 30,000 events were acquired after gating on CD8 $^+$ cells.

Acknowledgments

We thank Dr. Thien N'Guyen for permanent support, Dr. Greg Elson for critical reading of the manuscript, and Thierry Champion for peptide synthesis. We greatly appreciate the excellent technical help of Alexandra Gonzales and Fabienne Damien. We are grateful to Dr. Philippe Gosset (Unité INSERM U416, Institut Pasteur, Lille, France) for providing RNA from different human cells.

Received February 23, 2000; revised July 27, 2000.

References

- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Philipps, J.H., Lanier, L.L., and Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76–79.
- Bajorath, J., Peach, R.J., and Linsley, P.S. (1994). Immunoglobulin fold characteristics of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86). *Protein Sci.* 3, 2148–2150.
- Bednarek, M.A., Sauma, S.Y., Gammon, M.C., Porter, G., Tamhankar, S., Williamson, A.R., and Zveerink, H.J. (1991). The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J. Immunol.* 147, 4047–4053.
- Borriello, F., Oliveros, J., Freeman, G.J., Nadler, L.M., and Sharpe, A.H. (1995). Differential expression of alternate mB7-2 transcripts. *J. Immunol.* 155, 5490–5497.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L.L., and Banchereau, J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180, 1841–1847.
- Chambers, C.A., and Allison, J.P. (1997). Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 396–404.
- Croft, M. (1994). Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 6, 431–437.
- Croft, M., Duncan, D.D., and Swain, S.L. (1992). Response of naive antigen-specific CD4 $^+$ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J. Exp. Med.* 176, 1431–1437.
- Davis, T.A., Craighead, N., Williams, A.J., Scadron, A., June, C.H., and Lee, K.P. (1996). Primary porcine endothelial cells express membrane-bound B7-2 (CD86) and a soluble factor that co-stimulate

- cyclosporin A-resistant and CD28-dependent human T cell proliferation. *Int. Immunol.* **8**, 1099-1111.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365-1369.
- Engel, P., Gribben, J.G., Freeman, G.J., Zhou, L.J., Nozawa, Y., Abe, M., Nadler, L.M., Wakasa, H., and Tedder, T.F. (1994). The B7-2 (B70) costimulatory molecule expressed by monocytes and activated B lymphocytes is the CD86 differentiation antigen. *Blood* **84**, 1402-1407.
- Fleischer, J., Soeth, E., Relling, N., Grage-Griebenow, E., Flad, H.D., and Ernst, M. (1996). Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* **89**, 592-599.
- Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A., Lombard, L.A., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* **262**, 909-911.
- Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Anumanthan, A., Bernstein, G.M., Ke, X.Y., Rennert, P.D., Gray, G.S., Gribben, J.G., and Nadler, L.M. (1995). B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* **2**, 523-532.
- Greenfield, E.A., Nguyen, K.A., and Kuchroo, V. (1998). CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 389-418.
- Gribben, J.G., Freeman, G.J., Boussiotis, V.A., Rennert, P., Jellis, C.L., Greenfield, E., Barber, M., Restivo, V.A., Ke, X., Gray, G.S., and Nadler, L.M. (1995). CTLA-4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 811-815.
- Guo, Y., Wu, Y., Zhao, M., Kong, X.P., and Liu, Y. (1995). Mutational analysis of an alternatively spliced product of B7 defines its CD28/CTLA4-binding site on immunoglobulin C-like domain. *J. Exp. Med.* **181**, 1345-1355.
- Hakamada-Taguchi, R., Kato, T., Ushijima, H., Murakami, M., Uede, T., and Nariuchi, H. (1998). Expression and co-stimulatory function of B7-2 on murine CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **28**, 865-873.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulat, D.H., and Allison, J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**, 607-609.
- Hathcock, K.S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* **180**, 631-640.
- Hutloff, A., Dittlich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-266.
- Ikemizu, S., Gilbert, R.J., Fennelly, J.A., Collins, A.V., Harlos, K., Jones, E.Y., Stuart, D.I., and Davis, S.J. (2000). Structure and dimerization of a soluble form of B7.1. *Immunity* **12**, 51-60.
- Inobe, M., Linsley, P.S., Ledbetter, J.A., Nagai, Y., Tamakoshi, M., and Uede, T. (1994). Identification of an alternatively spliced form of the murine homologue of B7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 443-449.
- Inobe, M., Aoki, N., Linsley, P.S., Ledbetter, J.A., Abe, R., Murakami, M., and Uede, T. (1996). The role of the B7-1a molecule, an alternatively spliced form of murine B7-1 (CD80), on T cell activation. *J. Immunol.* **157**, 582-588.
- Jeannin, P., Delneste, Y., Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J.F., Life, P., Holmes, D., and Bonnefoy, J.Y. (1995). Thiols decrease human interleukin (IL) 4 production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis. *J. Exp. Med.* **182**, 1785-1792.
- Jeannin, P., Herbault, N., Delneste, Y., Magistrelli, G., Lecoanet-Henchoz, S., Caron, G., Aubry, J.P., and Bonnefoy, J.Y. (1999). Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J. Immunol.* **162**, 2044-2048.
- Jellis, C.L., Wang, S.S., Rennert, P., Borriello, F., Sharpe, A.H., Green, N.R., and Gray, G.S. (1995). Genomic organization of the gene coding for the costimulatory human B-lymphocyte antigen B7-2 (CD86). *Immunogenetics* **42**, 85-89.
- Keane-Myers, A., Gause, W.C., Linsley, P.S., Chen, S.J., and Willis-Karp, M. (1997). B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. *J. Immunol.* **158**, 2042-2049.
- Klasen, S., Pages, F., Peyron, J.F., Cantrell, D., and Olive, D. (1998). Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein. *Int. Immunol.* **10**, 481-489.
- Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**, 459-465.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., and Glimcher, L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718.
- Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V., and McMichael, A.J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 859-865.
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258.
- Linsley, P.S., Clark, E.A., and Ledbetter, J.A. (1990). T cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/B-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5031-5035.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991a). Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721-730.
- Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L.S., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. (1991b). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561-569.
- Linsley, P.S., Wallace, P.M., Johnson, J., Gibson, M.G., Greehe, J.L., Ledbetter, J.A., Singh, C., and Tepper, M.A. (1992). Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* **257**, 792-795.
- Linsley, P.S., Nadler, S.G., Bajorath, J., Peach, R., Leung, H.T., Rogers, J., Bradshaw, J., Stebbins, M., Leytze, G., Brady, W., et al. (1995). Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J. Biol. Chem.* **270**, 15417-15424.
- Liu, Y., and Janeway, C.A. (1992). Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3845-3849.
- Manickasingham, S.P., Anderson, S.M., Burkhart, C., and Wraith, D.C. (1998). Qualitative and quantitative effects of CD28/B7-mediated costimulation on naive T cells in vitro. *J. Immunol.* **161**, 3827-3835.
- Matulonis, U., Dosiou, C., Freeman, G., Lamont, C., Mauch, P., Nadler, L.M., and Griffin, J.D. (1996). B7-1 is superior to B7-2 costimulation in the induction and maintenance of T cell-mediated antileukemia immunity. Further evidence that B7-1 and B7-2 are functionally distinct. *J. Immunol.* **156**, 1126-1131.
- McLellan, A.D., Starling, G.C., Williams, L.A., Hock, B.D., and Hart, D.N. (1995). Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2064-2068.
- Mount, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**, 459-472.
- Rennert, P., Furlong, K., Jellis, C., Greenfield, E., Freeman, G.J., Ueda, Y., Levine, B., June, C.H., and Gray, G.S. (1997). The IgV domain of human B7-2 (CD86) is sufficient to co-stimulate T lymphocytes and induce cytokine secretion. *Int. Immunol.* **9**, 805-813.
- Saito, T. (1998). Negative regulation of T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 313-321.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K.P., Kundig, T.M., Kishihara, K.,

Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P.S., Thompson, C.B., and Mak, T.W. (1993). Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.

Swallow, M.M., Wallin, J.J., and Sha, W.C. (1999). B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNF α . *Immunity* 11, 423-432.

Symington, F.W., Brady, W., and Linsley, P.S. (1993). Expression and function of B7 on human epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 150, 1286-1295.

Van de Velde, H., Lorré, K., Bakkus, M., Thielemans, K., Ceuppens, J.L., and de Boer, M. (1993). CD45RO⁺ memory T cells but not CD45RA⁺ naive T cells can be efficiently activated by remote co-stimulation with B7. *Int. Immunol.* 5, 1483-1487.

Vyth-Dreese, F.A., Dellempijn, T.A., Majoor, D., and de Jong, D. (1995). Localization in situ of the co-stimulatory molecules B7.1, B7.2, CD40 and their ligands in normal human lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* 25, 3023-3029.

Walker, P.A., Leong, L.E., Ng, P.W., Tan, S.H., Waller, S., Murphy, D., and Porter, A.G. (1994). Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. *Biotechnology* 12, 601-605.

Walunas, T.L., Lenschow, D.J., Bakker, C.Y., Linsley, P.S., Freeman, G.J., Green, J.M., Thompson, C.B., and Bluestone, J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405-413.

Yi-qun, Z., Joost van Neerven, R.J., Kasran, A., de Boer, M., and Ceuppens, J.L. (1996). Differential requirements for co-stimulatory signals from B7 family members by resting versus recently activated memory T cells towards soluble recall antigens. *Int. Immunol.* 8, 37-44.

Yokochi, T., Holly, R.D., and Clark, E.A. (1982). B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J. Immunol.* 128, 823-827.

Yokozeki, H., Katayama, I., Ohki, O., Matsunaga, T., Watanabe, K., Satoh, T., Azuma, M., Okumura, K., and Nishioka, K. (1996). Functional CD86 (B7-2/B70) on cultured human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 106, 147-153.

Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., et al. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.

Zinkernagel, R.M., Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H. (1996). On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 333-367.

Identification of an Alternatively Spliced Variant of Human CD86 mRNA

Giovanni Magistrelli, Gersende Caron, Jean-François Gauchat, Pascale Jeannin, Jean-Yves Bonnefoy, and Yves Delneste¹

Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint Julien en Genevois, France

Received November 25, 2000

CD86 is a costimulatory molecule constitutively expressed by human antigen presenting cells which interacts with CD28 and CTLA-4 expressed by T cells. We have recently reported the identification of an alternatively spliced CD86 mRNA variant (CD86 Δ TM) characterized by the deletion of exon 6 which encodes for the transmembrane domain. We report here the identification of an alternatively spliced variant (called CD86 Δ EC) expressed by nonstimulated human monocytes and characterized by the deletion of exons 4 and 5 which encode for the extracellular V-like and C-like domains, respectively. The activation of monocytes by IFN γ (i) induces the preferential expression of the transcript encoding for the membrane form and (ii) increases the expression of CD86 and of the accessory molecules CD40, CD49d and CD54. These results suggest that resting human monocytes may constitutively express different forms of CD86 which can then influence the activation of T cells. © 2001 Academic Press

The efficient activation of T cells requires two signals: (i) an antigen specific signal generated by the interaction of the antigen (presented by the MHC) with the TCR and (ii) a second signal resulting from the interaction between costimulatory molecules belonging to the B7 family expressed on the antigen presenting cells (APCs) with molecules belonging to the CD28 family on T cells (1, 2). Due to its constitutive expression, the biological activity of the costimulatory molecule CD28 has been extensively studied. CD28-mediated signalling is required to induce proliferation, activation and effector functions of antigen-specific T cells (3, 4). Blocking the interaction between CD28 and its ligands using neutralizing anti-CD28 or anti-CD86 mAbs induces T cell anergy (5). More recently, the

¹To whom correspondence should be addressed at Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5, avenue Napoléon III, F-74164 Saint Julien en Genevois, France. Fax: +33 4 50 35 35 90. E-mail: yves.delneste@pierre-fabre.com.

cloning of a CD28-like costimulatory molecule, inducible co-stimulator (ICOS), has been reported (6). ICOS is expressed on activated and resting memory T cells and induced on naive T cells (6, 7). ICOS interacts with B7-RP1 which is constitutively expressed on B cells and macrophages (7) and upregulated by activation (8). B7-H1, a third member of the B7 family, is a costimulatory molecule for human T cells whose ligand remains undetermined (9). CTLA-4, a second ligand for CD80 and CD86, transduces an "off" signal, disengaging T cells from further activation and proliferation (10, 11).

The role played by costimulatory molecules in the initiation of the immune response has been clearly illustrated in animal models. CD28-deficient mice present reduced Th responses and Ig class switching although the cytotoxic T cell response is not affected (12). The priming of T cells is affected in CTLA-4-Ig transgenic mice in which the CD28-CD80/CD86 interaction is blocked (13).

In contrast to CD80, CD86 is constitutively expressed by most human APC (14–16) and has thus been suspected to play an important role in the initiation of a specific immune response (15, 17). We have recently shown that nonstimulated human monocytes constitutively express an alternatively spliced variant characterized by the loss of exon 6 and resulting in the synthesis of a soluble form of the molecule (19). In this study, we report that human monocytes constitutively express an additional alternatively spliced variant of the CD86 mRNA characterized by the deletion of exons 4 and 5.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and activation of human monocytes. Monocytes were isolated from heparinized venous blood from healthy subjects. Briefly, PBMC from healthy donors were isolated by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and monocytes were subsequently purified from PBMC by positive selection using anti-CD14 mAb coated magnetic beads (MACS; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Ger-



many). The purity, assessed by FACS analysis using a FITC-labelled anti-CD13 mAb (Cymbys, Hants, UK), was >95%. Monocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine and antibiotics (all from Life Technologies, Cergy Pontoise, France) at 5×10^6 cells/5 ml/well in 6-well tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA). Monocytes were either unstimulated or stimulated for 24 h with 100 ng/ml IFN γ (R&D Systems, Abingdon, UK). Expression of membrane HLA-DR, CD40, CD49d, CD54, CD80, and CD86 was analysed by FACS using specific FITC-labeled mAbs (Pharmingen, San Diego, CA). The control isotypes were purchased from Pharmingen. Results are expressed in MFI values after subtraction of the MFI obtained with the control mAb (mean \pm SEM, $n = 5$) or as a percentage of increase.

Cloning and sequencing of the CD86 mRNA variants. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies) and polyA+ RNA subsequently purified using oligo-dT coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway) accordingly to the manufacturers recommendations. First-strand cDNA was synthesized using 2 μ g of poly-A+ RNA by reverse transcription using an oligo-dT primer (Amersham Pharmacia Biotech). PCR reactions were performed with cDNA corresponding to 10 ng of polyA+ RNA, an enzyme mix containing KlenTaq-1 polymerase and a proof reading polymerase (Clontech, Palo Alto, CA) and primers designed to amplify the coding sequence of CD86 (predicted size: 972 bp) (18). PCR was performed as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 2 min followed by a final extension at 72°C for 5 min. The amplified fragments were size-separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide. After purification from the gel, each amplified cDNA fragment was subcloned into a TA cloning vector (InVitrogen, Gröningen, The Netherlands) and sequenced using the ABI-PRISM Dye Terminator Cycle Ready Reaction kit (Perkin Elmer, Foster City, CA). The expression of CD86 mRNA in activated *versus* non-activated monocytes was determined by RT-PCR as described above. RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA (18).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of an additional alternatively spliced variant of human CD86 mRNA. RT-PCR amplification of the CD86 coding sequence showed the expression of three transcripts by nonactivated human monocytes, whose sizes were approximately 1000, 800, and 350 bp (Fig. 1a). Sequencing of the cDNA fragments show that they encode alternatively spliced isoforms of CD86. The largest form (970 bp) showed complete homology with membrane CD86 (data not shown) (14, 19). The 800 bp form represents a deletion from nt 686 (starting from the ATG start codon) to 829. The 350 bp form has a deletion from nt 47 to 686. According to the genomic organization of the human CD86 gene (20), the two smaller cDNA are generated by alternative splicing of the CD86 mRNA where exon 6 (Fig. 2a) and both exons 4 and 5 (Fig. 2b) are spliced out, respectively. Interestingly, the open reading frames in these two variants (called CD86 Δ TM and CD86 Δ EC, respectively) are unaffected (Fig. 2).

Regulation of CD86 mRNA expression in human monocytes. The three CD86 mRNA variants are constitutively expressed by nonstimulated monocytes, the two larger being expressed at a higher level than the smaller fragment (Fig. 1a). We therefore evaluated

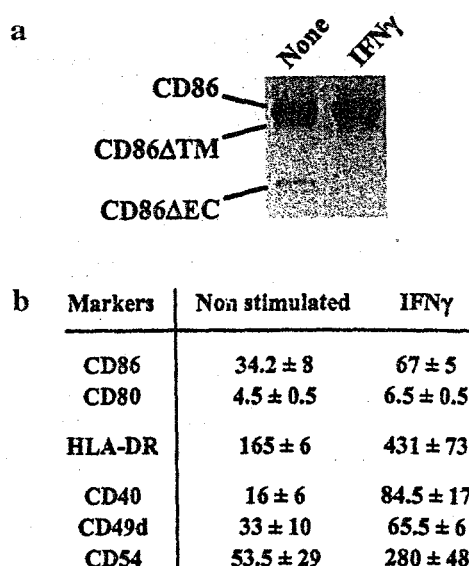


FIG. 1. Regulation of CD86 mRNA and CD86 expression in human monocytes. (a) Identification and regulation of CD86 mRNA. The expression of the CD86 mRNA variants was analyzed by RT-PCR in human monocytes either unstimulated or stimulated for 14 h with 100 ng/ml IFN γ . RNA integrity and cDNA synthesis was verified by amplifying GAPDH cDNA. The amplified fragments were size-separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under UV. (b) Regulation of membrane costimulatory and accessory molecules expression. The expression of HLA-DR, CD86, CD40, CD49d, and CD54 by monocytes either unstimulated or stimulated with 100 ng/ml IFN γ for 16 h was analysed by FACS. Results are expressed in MFI values (mean \pm SEM, $n = 5$).

their expression after activation with IFN γ which is a potent activator of human monocytes (21). A stimulation with 100 ng/ml IFN γ resulted in a preferential expression of the membrane CD86 mRNA accompanied by a suppression of the expression of the two spliced transcripts (Fig. 1a). Stimulation of monocytes with IFN γ for 16 h resulted in an increase of membrane CD86 (110 \pm 52% increase; mean \pm SEM, $n = 5$), of the accessory molecules CD40 (464 \pm 119% increase), CD49d (146 \pm 13% increase), and CD54 (792 \pm 189% increase) and of HLA-DR (1601 \pm 351% increase) (Fig. 1b). In contrast, CD80 expression was not modulated (Fig. 1b).

Discussion and Concluding remarks. In addition to the previously described alternatively-spliced variant CD86 Δ TM (18), we report here the identification of a second alternatively spliced mRNA variant called CD86 Δ EC which is also constitutively expressed by nonstimulated human monocytes and characterized by the deletion of exons 4 and 5.

The human *cd86* gene is a single copy gene organized into 8 exons (20). Exons 1 and 2 contain the 5' untranslated region. Exon 3 codes for the secretory signal peptide. Exons 4 and 5 encode the Ig C-type and V-type domains, respectively. Exon 6 encodes the transmembrane domain and the cytoplasmic domain is split be-

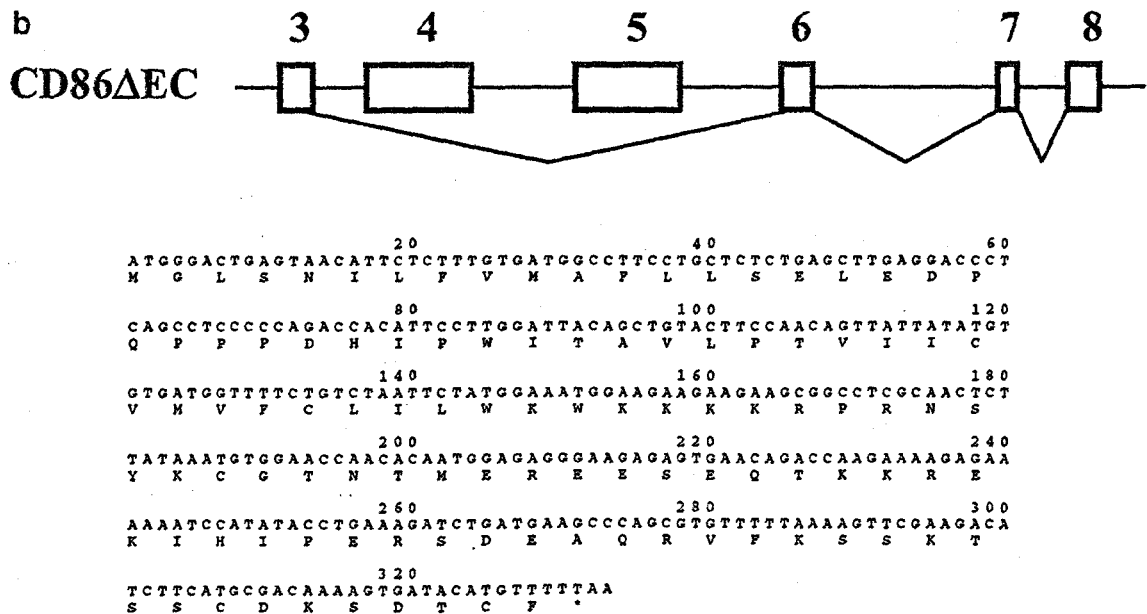
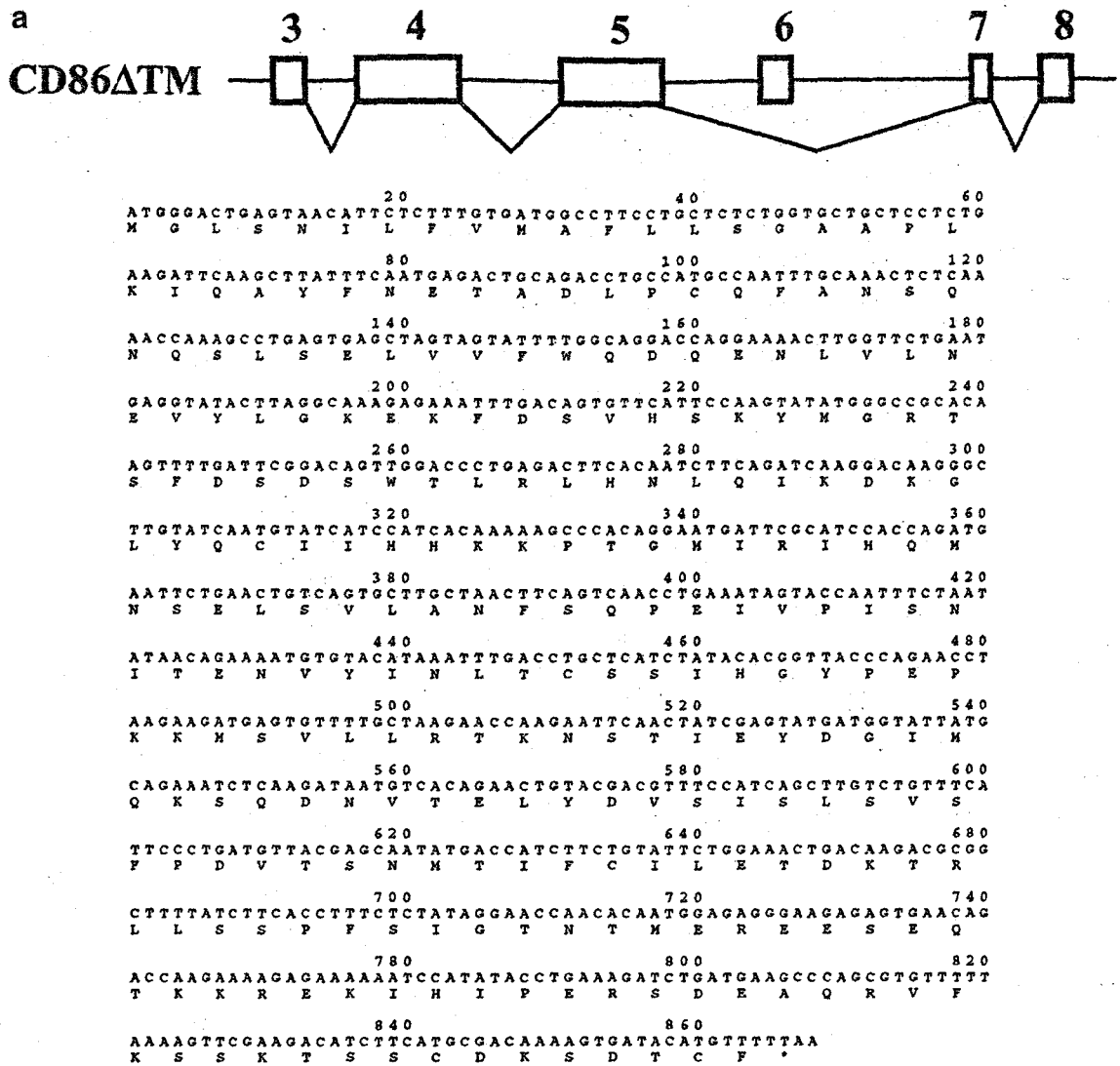


FIG. 2. Nucleotide sequences of the CD86 Δ TM and CD86 Δ EC mRNA variants. The complete nucleotide sequences of the CD86 Δ TM (a) and CD86 Δ EC (b) alternatively spliced variants are shown. The stop codon is indicated by an asterisk. The predicted amino acid sequences are also presented. A schematic representation of the alternatively spliced transcripts is shown with exons 3 to 8 which are depicted as white boxes.

tween exons 7 and 8. Alternatively spliced variants of CD86 differing in their 5' UT regions have been previously reported (14, 19, 20). The alternatively spliced variant CD86 Δ TM, characterized by the loss of exon 6 which encodes the transmembrane domain, is a costimulatory molecule for human T lymphocytes (18). We describe here an additional alternatively spliced variant, called CD86 Δ EC, characterized by the loss of both exons 4 and 5. In both cases, the acceptor and donor sites conform with the consensus splice junction sequences and the splicing does not affect the reading frames. Exons 4 and 5 encode the two Ig-like extracellular domains. The Ig-like structure of CD86 is maintained by two intrachain disulfide bonds between Cys⁴⁰-Cys¹¹⁰ (V-type domain) and Cys¹⁵⁷-Cys²¹⁸ (C-type domain) (14, 18, 22) and the ligand binding requires at least in part the V-type domain (23). As a consequence of the deletion of exons 4 and 5, the cysteine residues are lost in CD86 Δ EC, suggesting that the CD86 Δ EC translation product is expressed as a membrane molecule lacking its binding sites to CD28 and CTLA-4. Previous studies have reported that the homodimeric molecules CD28 and CTLA-4 can interact with either CD80 or CD86 resulting in their oligomerization or clustering (2:2 stoichiometry) (24). This clustering induces a high avidity binding which can result in increased signaling by increasing the time of receptor occupancy by the ligand. One could thus hypothesize that CD86 Δ EC interferes with the formation of CD86 clusters and thus acts, in contrast to CD86 Δ TM, as a negative regulator of T cell activation.

RT-PCR analysis showed that only the membrane CD86 transcript is expressed by monocytes activated with IFN γ . As previously reported (25, 26), the activation also results in an increase of membrane CD86 which plays a crucial role in the priming of naive T cells. This increase is associated with an upregulation of other molecules involved in the regulation of the immune response such as HLA-DR (27), and the accessory molecules CD40, CD49d and CD54 (28, 29). Among these, CD40, by interacting with CD40L expressed by activated T cells, is involved to enhance the presentation of CD86 on the APCs and to prevent anergy (28). These data also suggest that, upon activation, monocytes preferentially express membrane CD86 which is required for efficient T cell priming (1, 2).

In conclusion, our study shows that nonstimulated human monocytes express at least three CD86 mRNA variants which could play different regulatory roles in T cell activation. In contrast, activated monocytes express preferentially membrane CD86 which is involved in the initiation of a specific T cell response.

REFERENCES

- Chambers, C. A., and Allison, J. P. (1997) *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 396-404.
- Greenfield, E. A., Nguyen, K. A., and Kuchroo, V. (1998) *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 389-418.
- Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A. (1991) *J. Exp. Med.* **173**, 721-730.
- Croft, M., Duncan, D. D., and Swain, S. L. (1992) *J. Exp. Med.* **176**, 1431-1437.
- Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H., and Allison, J. P. (1992) *Nature* **356**, 607-609.
- Hutloff, A., Dittrich, A. M., Beier, K. C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R. A. (1999) *Nature* **397**, 263-266.
- Yoshinaga, S. K., Whoriskey, J. S., Khare, S. D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M. A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G. S., Hui, A., McCabe, S. M., Scully, S., Shahinain, A., Shakkle, C. L., Van, G., and Senaldi, G. (1999) *Nature* **402**, 827-832.
- Swallow, M. M., Wallin, J. J., and Sha, W. C. (1999) *Immunity* **11**, 423-432.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., and Chen, L. (1999) *Nat. Med.* **5**, 1365-1369.
- Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K., and Ledbetter, J. A. (1991) *J. Exp. Med.* **174**, 561-569.
- Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., Thompson, C. B., and Bluestone, J. A. (1994) *Immunity* **1**, 405-413.
- Shahinian, A., Pfeffer, K., Lee, K. P., Kundig, T. M., Kishihara, K., Wakeham, A., Kawai, K., Ohashi, P. S., Thompson, C. B., and Mak, T. W. (1993) *Science* **261**, 609-612.
- Linsley, P. S., Wallace, P. M., Johnson, J., Gibson, M. G., Greene, J. L., Ledbetter, J. A., Singh, C., and Tepper, M. A. (1992) *Science* **257**, 792-795.
- Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Philipps, J. H., Lanier, L. L., and Somoza, C. (1993) *Nature* **366**, 76-79.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., and Banchereau, J. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 1841-1847.
- Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P., and Hodes, R. J. (1994) *J. Exp. Med.* **180**, 631-640.
- Manickasingham, S. P., Anderson, S. M., Burkhart, C., and Wraith, D. C. (1998) *J. Immunol.* **161**, 3827-3835.
- Jeannin, P., Magistrelli, G., Aubry, J. P., Caron, G., Gauchat, J. F., Renno, T., Herbault, N., Goetsch, L., Blaecke, A., Dietrich, P. Y., Bonnefoy, J. Y., and Delneste, Y. (2000) *Immunity* **13**, 303-312.
- Freeman, G. J., Gribben, J. G., Boussiotis, V. A., Ng, J. W., Restivo, V. A., Lombard, L. A., Gray, G. S., and Nadler, L. M. (1993) *Science* **262**, 909-911.
- Jellis, C. L., Wang, S. S., Rennert, P., Borriello, F., Sharpe, A. H., Green, N. R., and Gray, G. S. (1995) *Immunogenetics* **42**, 85-89.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J. C. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 749-795.
- Bajorath, J., Peach, R. J., and Linsley, P. S. (1994) *Protein Sci.* **3**, 2148-2150.
- Rennert, P., Furlong, K., Jellis, C., Greenfield, E., Freeman,

Cutting Edge: Outer Membrane Protein A (OmpA) Binds to and Activates Human Macrophages

Caroline Soulas, Thierry Baussant, Jean-Pierre Aubry, Yves Delneste, Nicolas Barillat, Gersende Caron, Toufic Renno, Jean-Yves Bonnefoy, and Pascale Jeannin¹

Outer membrane protein (OmpA) is highly represented and conserved in the *Enterobacteriaceae* family. Using a recombinant OmpA from *Klebsiella pneumoniae* (P40), we have analyzed the interaction between OmpA and macrophages. We report that Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 binds (at 4°C) to murine and human macrophages in a dose-dependent manner and is rapidly internalized (at 37°C). No binding or internalization of the Alexa⁴⁸⁸-labeled glycophorin A control protein is observed under the same conditions. Furthermore, P40 up-regulates the production of IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12, and TNF- α by human macrophages and of NO by the RAW 264.7 murine macrophage cell line. P40 also synergizes with IFN- γ and suboptimal concentrations of LPS to up-regulate the production of these mediators. In conclusion, P40 binds to and activates macrophages. These data suggest that recognition of OmpA by macrophages may be an initiating event in the antibacterial host response. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 2335–2340.

The effective host defense against bacterial infection is dependent primarily upon the rapid clearance of bacteria by neutrophils and macrophages. On initial encounter with bacteria, macrophages recognize and phagocytose bacteria before killing them intracellularly and secreting proinflammatory mediators and chemokines that activate and recruit leukocytes into the bacterial foci (1–4). This may result in a proinflammatory amplification loop between macrophages, neutrophils, and lymphocytes. In addition to an antibacterial activity, inflammatory mediators activate APCs and allow the initiation of a specific immune response (1, 5). Later, resident leukocytes produce a second wave of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, which down-regulate the inflammation (2).

Macrophages discriminate between infectious agents and self by using a restricted number of receptors that recognize structures

shared by large groups of pathogens. Pathogen recognition by most of these receptors triggers macrophage activation. These receptors can be divided into the following three types: humoral proteins circulating in the plasma (i.e., soluble CD14), endocytic receptors expressed on the cell surface (mannose and scavenger receptors), and signaling receptors (i.e., Toll-like receptors) (4, 5). Bacterial components such as cell-surface structures (e.g., LPS and lipoproteins in Gram-negative bacteria; Refs. 1 and 6), heat shock proteins (7), and unmethylated CpG motif (8) stimulate macrophage functions. For most of these molecules, the nature of the receptor and the signaling pathways they use remain undefined. In addition to lipoproteins, Gram-negative bacteria express other outer membrane proteins (Omp)² such as OmpA and porins (OmpC and F). The observations that the OmpC from *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages (9) and that peptides derived from the OmpF from *Escherichia coli* enhance macrophage cytotoxicity (10) suggest that these proteins may interact with macrophages.

OmpA is one of the major Omp that assembles into the outer membrane via an N-terminal eight-transmembrane amphipathic β -barrel region with the C-terminal region retained in the periplasm. Unlike other surface-exposed components of the bacterial cell envelope, OmpA is highly conserved among the *Enterobacteriaceae* family and throughout evolution (11). Functions attributed to OmpA include maintenance of structural cell integrity and a role in bacterial conjugation as well as bacteriophage binding. It also contributes to the ability of Gram-negative bacteria to invade mammalian cells; OmpA-deficient *E. coli* mutants grow normally but exhibit attenuated virulence, invasive capacity, and resistance to serum bactericidal activity (12). However, due to the difficulty of purifying this class of proteins without contamination by lipoprotein or endotoxin, their interactions and effects on cells involved in innate immunity remain unknown (1).

We analyzed here the interaction between macrophages and the OmpA from *K. pneumoniae* (an enterobacteria responsible for respiratory tract and urinary infections). We report that this recombinant 40-kDa OmpA (P40) (13) binds to, is internalized by, and activates macrophages.

Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien en Genevois, France

Received for publication April 13, 2000. Accepted for publication July 7, 2000.

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

¹ Address correspondence and reprint requests to Dr. Pascale Jeannin, Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5, Avenue Napoléon III, F-74164 Saint-Julien en Genevois, France. E-mail address: pascale.jeannin@pierre-fabre.com

² Abbreviations used in this paper: Omp, outer membrane protein; MFI, mean fluorescence intensity.

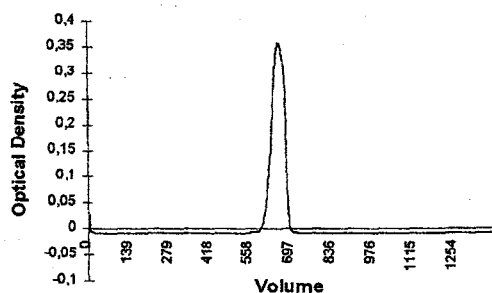


FIGURE 1. Analytical size-exclusion chromatography of P40. P40 was submitted to analytical size-exclusion chromatography on 1.6×60 cm Fractogel EMD BioSEC column. P40 is detected by UV absorption at 279 nm.

Materials and Methods

Recombinant P40

P40 was expressed in *E. coli* and purified as described (13, 14) with the following final additional steps. After ethanol precipitation and solubilization in 7 M urea, P40 was submitted to size-exclusion chromatography in water, using Fractogel EMD BioSEC (Merck, Nogent sur Marne, France). Urea was removed by this final gel filtration step as shown by enzymatic urea assay (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Analytical size-exclusion chromatography of final P40 showed that the peak obtained was

homogeneous without the presence of protein aggregates (Fig. 1). The two last purification steps were performed with water for injection and using depyrogenated vessels, gels, and columns; endotoxin levels determined by the *Limulus* assay were <0.25 EU/mg of P40. P40 batches contained <10 pg DNA/mg protein as observed by dot blot (data not shown), and were produced according to pharmaceutical quality standards intended for clinical trials.

Cell purification and culture

Monocytes were purified from PBMC by positive selection using a magnetic cell separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Macrophages were generated by culturing monocytes for 5 days with 10^6 cells/ml in culture medium consisting of complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, and 0.1 mM nonessential amino acids (all from Life Technologies, Cergy Pontoise, France) in the presence of 20 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, Abingdon, U.K.). Macrophages were stimulated with P40 in the presence or absence of 0.2 ng/ml LPS (from *E. coli* isotype 0111:B4; Sigma, Saint Louis, MO). In some experiments, macrophages were stimulated overnight with 10 ng/ml IFN- γ (R&D Systems) before stimulation with P40. As a positive control, cells were stimulated with 10 ng/ml LPS. In some experiments P40 was preincubated with 10 μ g/ml polymixin B sulfate (Sigma). Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). RAW 264.7 cells cultured at 0.5×10^6 /ml in complete RPMI 1640 were primed or not 6 h with 5 μ g/ml murine IFN- γ (R&D Systems), and stimulated with different concentrations of P40.

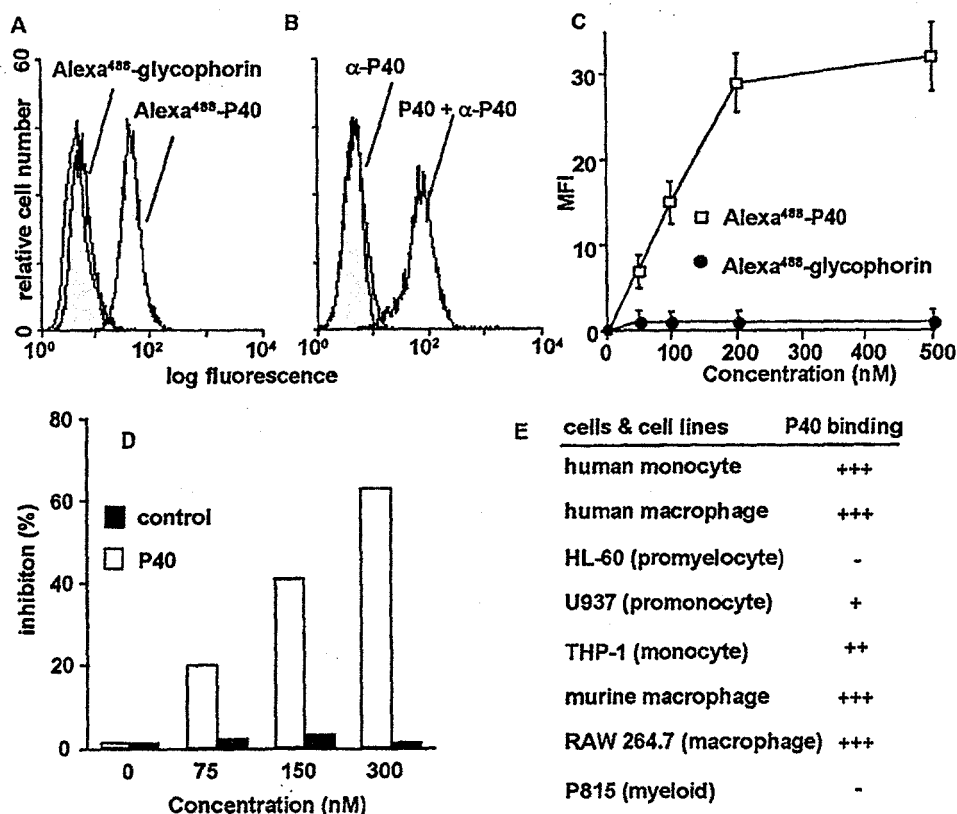


FIGURE 2. P40 binds to macrophages. *A*, Human monocyte-derived macrophages were incubated (white histograms) or not (gray histograms) for 20 min at 4°C with $0.5 \mu\text{M}$ Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 or glycophorin A, washed, and analyzed by FACS. *B*, Macrophages were incubated (right histogram) or not (left histograms) for 20 min at 4°C with $0.5 \mu\text{M}$ Alexa⁴⁸⁸-labeled P40, washed, and incubated (white histograms) or not (gray histogram) with an IgG1 anti-P40 mAb revealed by FITC-labeled anti-mouse Ig analyzed by FACS. *A* and *B*, Results are representative of one of ten experiments. *C*, Human macrophages were incubated with different concentrations of Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 (\square) or glycophorin A (\bullet) and analyzed by FACS; results are expressed in MFI values (mean \pm SD; $n = 3$). *D*, Human macrophages were incubated with different concentrations of P40 or glycophorin A for 10 min at 4°C before addition of $0.2 \mu\text{M}$ Alexa⁴⁸⁸-labeled P40. Results are expressed as a percentage of inhibition as described in *Materials and Methods*, and are representative of one of three experiments. *E*, Human monocytes, human macrophages, murine thioglycolate-elicited macrophages, and the human HL-60, U937, and THP-1, and murine RAW 264.7 and P815 myeloid cell lines were incubated with $0.5 \mu\text{M}$ Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 and analyzed by FACS. Results are presented as a relative level of MFI values.

Cytometry and confocal microscopy

P40 was labeled with Alexa⁴⁸⁸ (Molecular Probes, Eugene, OR). Flow cytometric analysis was performed using a FACSVantage cytofluorometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). P40 (2×10^5 cells/well in a 96-V-bottom wells plate) were incubated for 20 min at 4°C in FACS buffer (RPMI 1640 medium-0.1% BSA) with Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 or glycoporphin A. In other experiments, macrophages were incubated with 0.5 μ M P40, washed in FACS buffer, incubated with 5 μ g/ml purified IgG1 anti-P40 mAb or IgG1 control mAb (Becton Dickinson), and revealed by FITC-labeled anti-mouse IgG Ab (Silenus, Hawthorn, Australia). Results are expressed either as mean fluorescence intensity (MFI) or as a relative level of MFI values. In neutralization experiments, macrophages were preincubated for 10 min in FACS buffer with different concentrations of P40 or glycoporphin A before the addition of 0.2 μ M Alexa⁴⁸⁸-labeled P40. Results are expressed as a percentage of inhibition defined as follows: $A-B/A \times 100$, where A and B are the MFI obtained in the absence or presence of the unlabeled protein, respectively. For confocal microscopy, human macrophages were incubated 20 min at 4°C in FACS buffer with 0.5 μ M Alexa⁴⁸⁸-labeled P40, Alexa⁴⁸⁸-labeled glycoporphin A, or with 0.5 μ M Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 plus an anti-HLADR Ab coupled to Cy3 using the Cy3 Ab labeling kit (Amersham, Arlington Heights, IL), washed in FACS buffer, incubated or not 10 min at 37°C, cytospun, and examined using a LSM510 Zeiss (Oberkochen, Germany) inverted microscope with a $\times 63$ plan apochromat objective. In some experiments, 150 μ M dimethyl amiloride (Sigma) was added in the FACS buffer. Alexa⁴⁸⁸ fluorescence was measured with a 530-nm filter after excitation with a 488-nm argon ion laser. Cy3 fluorescence was measured at 565 nm after excitation with a 543-nm HeNe laser.

Cytokine and NO measurement

IL-1 β , IL-8, and biologically active IL-12 (p75) were quantified by ELISA using commercial kits (R&D Systems; sensitivity of 1, 10, and 0.5 pg/ml, respectively). TNF- α and IL-10 were quantified by ELISA using specific capture and detection Abs from R&D Systems and PharMingen (San Diego, CA), respectively (sensitivity of 1 ng/ml and 10 pg/ml, respectively). Results are expressed in pg/ml or in ng/ml. Nitrite production was determined using the Griess reaction with NaNO₂ as standard (sensitivity of 2 μ M).

PCR analysis

The expression of IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12 p35, IL-12 p40, and TNF- α mRNA was evaluated by RT-PCR. The sequences of the primers have been previously reported (15). RNA integrity and cDNA synthesis were verified by amplifying GAPDH cDNA. Amplified fragments were size separated by electrophoresis and visualized by ethidium bromide.

Results and Discussion

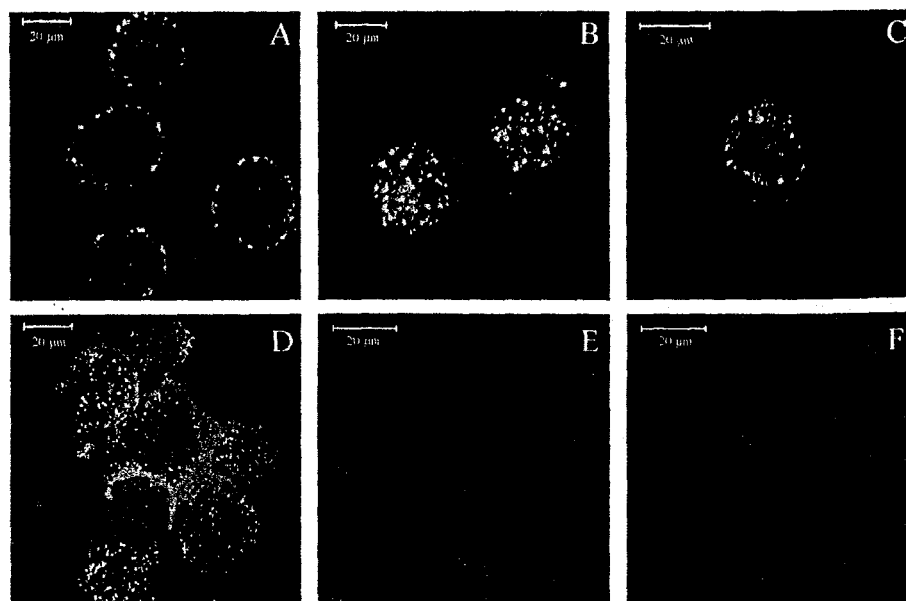
P40 binds to macrophages

We analyzed the binding at 4°C of P40 to human macrophages. Results from FACS analysis show that Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 binds to macrophages (Fig. 2A). No binding of Alexa⁴⁸⁸-labeled glycoporphin A, a transmembrane protein used as a negative control, is observed (Fig. 2A). Similar results are obtained using unlabeled P40 revealed by a specific mAb (Fig. 2B). The binding of Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 is dose-dependent, significant at 50 nM P40 and saturable at 0.5 μ M P40 (the highest concentration tested; Fig. 2C), and partly competed by unlabeled P40 but not by a control protein (Fig. 2D). Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 also binds to thioglycolate-elicited murine macrophages, to the RAW 264.7 cell line, and to the U937 human monocytic cell line (Fig. 2E). In contrast, no binding is detectable on the murine P815 and human HL60 myeloid cell lines (Fig. 2E). The partial saturability of P40 binding to macrophages and the absence of binding to some myeloid cells suggest the existence of P40-binding element(s) on macrophages. Similar observations were made using the OmpA purified from *E. coli* (data not shown), thereby suggesting that macrophages may recognize this class of protein. The conservation of OmpA throughout evolution is in agreement with this hypothesis (5).

P40 is internalized by macrophages

We then analyzed by confocal microscopy whether P40 binding to macrophages is followed by its internalization. After incubation at 4°C, fluorescence is located on the surface of the macrophages (Fig. 3A). A further incubation at 37°C leads to the appearance of fluorescent endosomes the sizes of which vary from 0.8 to 2 μ m in the cytosol as early as 5 min after incubation (Fig. 3B). Dimethyl amiloride, an inhibitor of macropinocytosis (16), prevents the formation of these P40-containing endosomes (Fig. 3C), thereby suggesting a macropinocytotic uptake. In agreement with previous data showing that P40 is a potent carrier protein (14, 17), we also report that P40 colocalizes intracellularly with MHC class II molecules (Fig. 3D). In contrast, no binding or internalization of Alexa⁴⁸⁸-labeled glycoporphin A is observed (Fig. 3, E and F). These data show that P40 binds to and is internalized by macrophages.

FIGURE 3. P40 is endocytosed by macrophages. Human macrophages were incubated for 20 min at 4°C with 0.5 μ M Alexa⁴⁸⁸-labeled P40, washed, and analyzed by confocal microscopy before (A) or after a further incubation for 10 min at 37°C in the absence (B and D) or presence (C) of dimethyl amiloride. D, Macrophages were incubated for 20 min at 4°C with 0.5 μ M Alexa⁴⁸⁸-labeled P40 and Cy3-labeled anti-MHC class II mAb, washed, and incubated for 10 min at 37°C before analysis. E and F, Macrophages were incubated for 20 min at 4°C with 0.5 μ M Alexa⁴⁸⁸-labeled glycoporphin A, washed, and analyzed by confocal microscopy before (E) or after (F) a further incubation for 10 min at 37°C.



Macrophages phagocytose opsonized pathogens through Fc and complement receptors (1). Because our experiments were performed in a medium free of Ig and complement, and macrophages from SCID mice bind P40 (data not shown), we have excluded a binding of P40 through these receptors. To recognize pathogens, macrophages have evolved a restricted number of phagocytic receptors like mannose receptors or scavenger receptors (1, 5). Using a neutralizing anti-mannan mAb (3.29 IgG1 mAb; generous gift from M. Cella, Basel Institute for Immunology, Basel, Switzerland), we failed to prevent P40 binding. Currently, the identification of OmpA-binding elements is under investigation.

P40 activates macrophages

We then evaluated whether P40 recognition is coupled to macrophage activation. TNF- α is a major activator of macrophages that also mediates lung antibacterial host defense in murine *K. pneumoniae* (18, 19). We show that P40 induces TNF- α production by macrophages in a dose-dependent manner; P40-induced TNF- α production is significant at 0.04 μ M P40, maximal at 1 μ M (Figs. 4A and 5), and detectable as early as 3 h after stimulation (data not shown). Macrophages contain a pool of TNF- α mRNA (18), which expression is enhanced by P40, thereby suggesting that P40 acts at the transcriptional level (Fig. 4B). Polymixin B inhibits LPS- but not P40-induced TNF- α (Fig. 4A). Moreover, compared with macrophages from C3H/HeN mice, macrophages from LPS-resistant C3H/HeJ mice (carrying a mutant of Toll-like receptor 4) produce comparable levels of murine TNF- α in response to P40 but lower levels in response to LPS (Ref. 20; data not shown). Both of these observations show that the effect of P40 is not mediated by contaminating endotoxin, and that P40 does not act through Toll-like receptor 4. Moreover, the observation that P40 binds to but does not induce cytokine production by the U937 cell line (data not shown) suggests that the molecules involved in P40 binding and signaling may differ (21).

When stimulated, macrophages produce other mediators such as IL-1 β , IL-8, IL-12, NO, and IL-10 that are involved in the antibacterial response. IL-1 is an inflammatory cytokine that stimulates numerous cell types (22). IL-8 controls neutrophil and lymphocyte infiltration and protects mice challenged with *K. pneumoniae* intraperitoneally (2, 23). IL-12 induces IFN- γ production and favors cytotoxic responses (24). NO up-regulates macrophage phagocytosis and killing, especially in *K. pneumoniae* infection (25). IL-10, produced at a later stage, down-regulates the inflammatory response (3).

We show that P40 up-regulates the production of human IL-1 β and IL-8 in a manner that is dose-dependent and significant at 0.04 μ M, induces low but detectable levels of bioactive IL-12 (<5 pg/ml at 1 μ M), and induces the production of IL-10 that is detectable 3 days after stimulation (Figs. 4A and 5). P40 enhances the expression of the mRNA encoding for all these cytokines (Fig. 4B). Finally, P40 also induces NO production by the RAW macrophage cell line (Fig. 5). As expected, LPS used as a positive control induces the expression of all these mediators (Fig. 4A). These data show that P40 triggers a signal leading to macrophage activation.

P40 synergizes with LPS and IFN- γ to activate macrophages

Because Gram-negative bacteria express LPS, we analyzed the combined effect of P40 and LPS on macrophage activation. P40 synergizes with LPS to induce TNF- α production with a maximal effect seen at a concentration of 0.2 ng/ml LPS (Fig. 5). In the presence of 0.2 ng/ml LPS, P40 up-regulates the production of IL-1 β , IL-8, IL-10, and NO (with a significant effect at 8 nM P40 for IL-1 β , IL-8, and TNF- α and at 40 nM P40 for IL-10 and IL-12) (Fig. 5).

IFN- γ produced locally by T cells also exerts antibacterial immune effects. Although it induces a limited production of cytokines by itself, it primes macrophages to produce cytokines in response to a second stimuli (26). When added to IFN- γ -primed macrophages, the effect of P40 on TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-10, and IL-12 is highly enhanced (a significant effect of P40 on IL-1 β , IL-8, IL-10, and TNF- α being observed with 8 nM P40 and on IL-12 with 40 nM P40) (Fig. 5). Taken together, these data show that P40 synergizes with LPS to induce IL-12 and TNF- α (two cytokines that induce IFN- γ production; Refs. 18 and 24) and with IFN- γ to induce TNF- α and IL-12 production, and thereby suggest a paracrine positive-feedback cycle with local T cells.

Concluding remarks

We show that P40 binds to macrophages, is endocytosed, and triggers macrophage activation. These data, in accordance with the crucial role played by macrophages in the elimination of *K. pneumoniae* in the lung (27), suggest that upon contact with an enterobacteria, OmpA may participate in the activation of resident macrophages. The observation that LPS and IFN- γ potentiate the production of cytokines induced by P40 suggests that a limited number of Gram-negative bacteria could be sufficient to efficiently stimulate macrophages. Furthermore, as macrophages process and

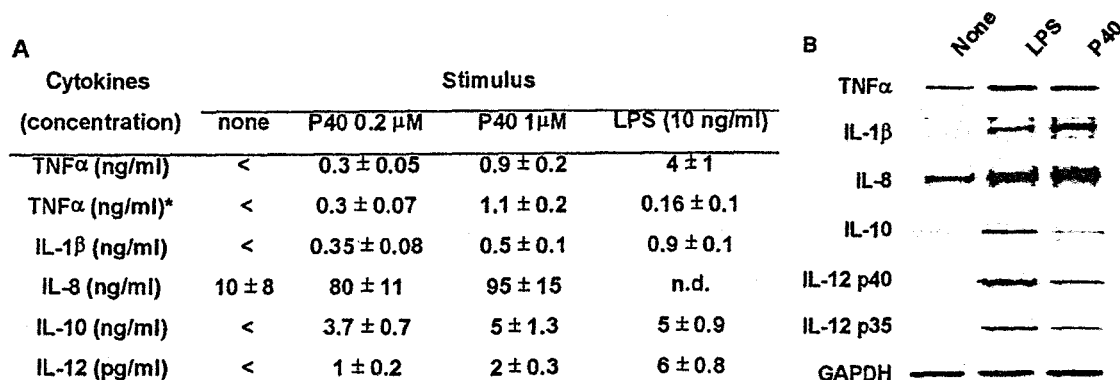
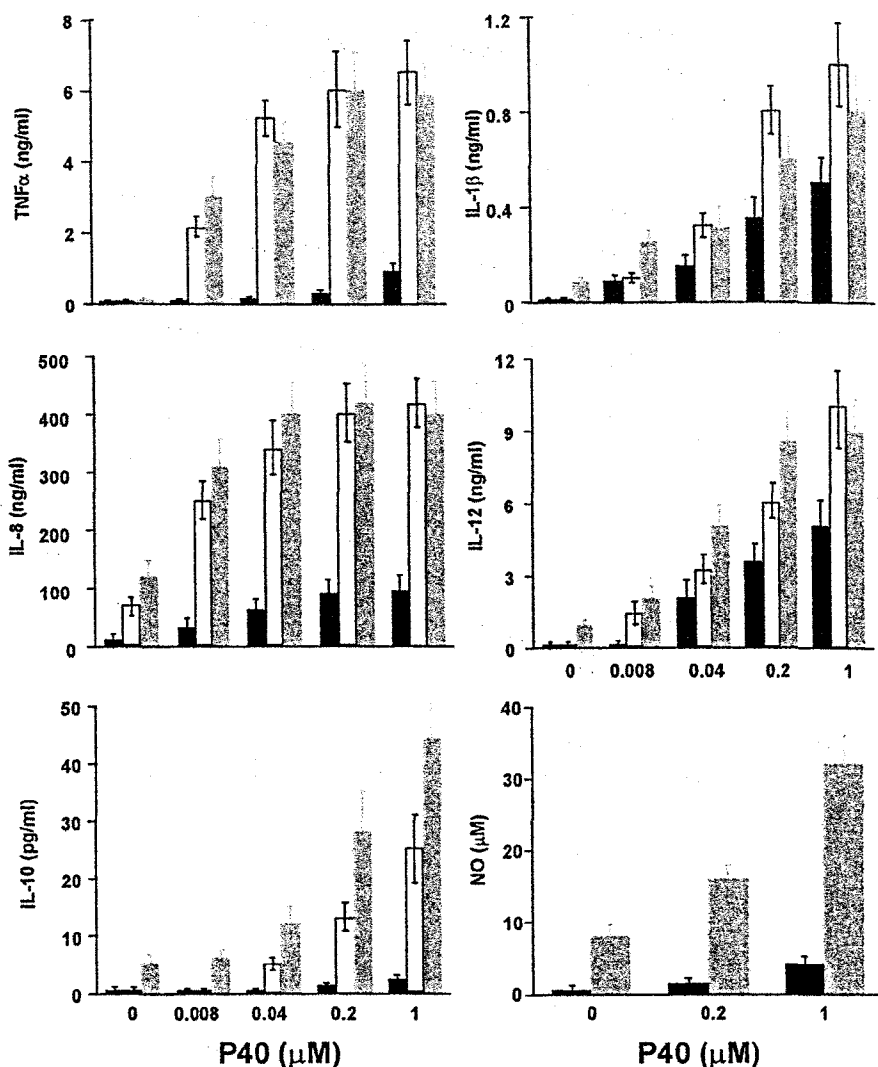


FIGURE 4. P40 induces cytokine production by human macrophages. *A*, Human macrophages were incubated without or with 0.2 or 1 μ M P40 or with 10 ng/ml LPS in the absence (*) of polymixin B. The cytokines were quantified in the cell-free supernatants by ELISA. IL-1 β , IL-8, and TNF- α were quantified after 24-h incubation, IL-12 after 48 h, and IL-10 after 72 h. Results (mean \pm SD of four separate experiments) are expressed in ng/ml, except IL-12 in pg/ml; <, Undetectable. *B*, Macrophages were incubated without or with 1 μ M P40 or 10 ng/ml LPS. After 12 h, total RNA was isolated and the mRNA encoding for IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , and GAPDH was analyzed by RT-PCR.

FIGURE 5. P40 synergizes with IFN- γ and/or LPS to up-regulate NO and cytokine production by macrophages. Human monocyte-derived macrophages were (□) or were not (■, ▨) primed for 6 h with IFN- γ and were incubated or not with different concentrations of P40 in the absence (■, □) or presence (▨) of 0.2 ng/ml LPS. IL-1 β , IL-8, and TNF- α were quantified by ELISA in the supernatants after 24 h, IL-12 after 48 h, and IL-10 after 72 h. Results (mean \pm SD of three separate experiments) are expressed in ng/ml, except IL-12 in pg/ml. The murine RAW 264.7 cell line was (□) or was not primed for 6 h with IFN- γ (■, ▨) and was incubated or not with different concentrations of P40 in the absence (■, □) or presence (▨) of 0.2 ng/ml LPS. NO was measured in the 24-h supernatants. Results are expressed in μ M as mean \pm SD of three separate experiments.



present Ag to T cells, these properties of P40 may contribute to explain why OmpA is highly immunogenic in the absence of adjuvant (14, 17).

Because OmpA is highly represented in bacterial cell walls and conserved among the *Enterobacteriaceae*, one could speculate that the immune system has acquired the ability to recognize and to be activated by this class of protein. The identification of the phagocytic cell surface receptor(s) and of the molecular pathway involved in P40-induced macrophage activation is currently under investigation. Finally, OmpA appears as a new class of molecules expressed by bacteria that is recognized by and activates macrophages.

References

1. Hauschildt, S., and B. Kleine. 1995. Bacterial stimulators of macrophages. *Int. Rev. Cytol.* 161:263.
2. Standiford T. J., S. L. Kunkel, M. J. Greenberger, L. L. Laichalk, and R. M. Strieter. 1996. Expression and regulation of chemokines in bacterial pneumonia. *J. Leukocyte Biol.* 59:24.
3. Merhad, B., and T. J. Standiford. 1999. Role of cytokines in pulmonary antimicrobial host defense. *Immunol. Res.* 20:15.
4. Aderem, A., and D. M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593.
5. Medzhitov, R., and C. A. Janeway. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9:4.
6. Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R.-B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, et al. 1999.

Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 285:732.

7. Kol, A., A. H. Lichtman, R. W. Finberg, P. Libby, and E. Kurt-Jones. 2000. Heat shock protein 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *J. Immunol.* 164:13.
8. Gao, J. J., E. G. Zuvanich, Q. Xue, D. L. Horn, R. Silverstein, and D. C. Morrison. 1999. Bacterial DNA and LPS act in synergy in inducing nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J. Immunol.* 163:4095.
9. Negm, R. S., and T. G. Pistle. 1999. The porin OmpC of *Salmonella typhimurium* mediates adherence to macrophages. *Can. J. Microbiol.* 45:658.
10. Vordermeier, H. M., P. Hoffman, F. O. Gombert, G. Jung, and W. G. Bessler. 1990. Synthetic peptide segments from *Escherichia coli* porin OmpF constitute leukocyte activators. *Infect. Immun.* 58:2719.
11. Poolman, J. T. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. In *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*, S. Cohen, and A. Shaffer, eds. Plenum, New York, p. 73-77.
12. Weiser, J. N., and E. C. Gotschlich. 1991. Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* 59:2252.
13. Nguyen, T., P. Samuelson, F. Sterky, C. Merle-Poitte, A. Robert, T. Baussant, J. F. Haeuw, M. Uhlen, H. Binz, and S. Stahl. 1998. Chromosomal sequencing using a PCR-based biotin-capture method allowed isolation of the complete gene for the outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*. *Gene* 27: 93.
14. Haeuw, J. F., I. Raully, L. Zanna, C. Libon, C. Andreoni, T. Nguyen, T. Baussant, J. Y. Bonnefoy, and A. Beck. 1998. The recombinant *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 15:446.
15. De Saint-Vis, B., I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vambervliet, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Y. L. Liu, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. The

- cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.* 160:1666.
16. Swanson, J. A., and C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424.
 17. Raully, I., L. Goetsch, J. F. Haeuw, C. Tardieux, T. Baussant, J. Y. Bonnefoy, and N. Corvaia. 1999. Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67:5547.
 18. Camussi, G., E. Albano, C. Tetta, and F. Bussolino. 1991. The molecular action of tumor necrosis factor- α . *Eur. J. Biochem.* 202:3.
 19. Laichalk, L. L., S. L. Kummel, R. M. Strieter, J. M. Danforth, M. B. Bailie, and T. J. Standiford. 1996. Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64:5211.
 20. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.-Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, et al. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085.
 21. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811.
 22. Dinarello, C. A. 1998. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* 16:457.
 23. Vogels, M. T., L. J. Lindley, J. H. Curfs, W. M. Eling, and J. W. Van der Meer. 1993. Effects of interleukin-8 on nonspecific resistance to infection in neutropenic and normal mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:276.
 24. Gately, M. K., L. M. Renzetti, J. Magram, A. S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D. H. Presky. 1998. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:495.
 25. Tsai, W. C., R. M. Strieter, D. A. Zisman, J. M. Wilkowski, K. A. Bucknell, G. H. Chen, and T. J. Standiford. 1997. Nitric oxide is required for effective innate immunity against *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 65:1870.
 26. Schultz, R. M., and W. J. Kleinschmidt. 1983. Functional identity between murine γ -interferon and macrophages activating factor. *Nature* 305:239.
 27. Broug-Holub, E., G. B. Toews, J. F. Van Iwaarden, R. M. Strieter, S. L. Kunkel, R. Paine, and T. J. Standiford. 1997. Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 65:1139.

Human NK cells constitutively express membrane TNF- α (mTNF α) and present mTNF α -dependent cytotoxic activity

Gersende Caron¹, Yves Delneste¹, Jean-Pierre Aubry¹, Giovanni Magistrelli¹, Nathalie Herbault¹, Aline Blaecke¹, Anthony Meager², Jean-Yves Bonnefoy¹ and Pascale Jeannin¹

¹ Centre d'Immunologie Pierre Fabre, Saint-Julien en Genevois, France

² National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, GB

We have evaluated the expression and the involvement of membrane-associated TNF- α (mTNF- α) in human NK cell-mediated cytotoxicity. Results from FCM analysis show that peripheral blood NK cells constitutively express mTNF- α . In contrast, mTNF- α expression is undetectable on resting T cells, B cells and monocytes. Western blotting analysis confirmed that freshly purified NK cells express the 17-kDa soluble form (sTNF- α) and the 26-kDa transmembrane form of TNF- α . Stimulation with IL-2, IL-15 and IL-18 up-regulates TNF- α mRNA, sTNF- α and mTNF- α expression in NK cells. The role of mTNF- α in the cytotoxic activity of resting NK cells has been evaluated in *in vitro* cytotoxic assays using freshly purified NK cells fixed with paraformaldehyde as effector cells (in order to avoid the participation of cytotoxic soluble mediators such as perforin, granzymes or sTNF- α) and the TNF- α -sensitive Fas ligand- and TRAIL-resistant cell line KYM-1-D4 as target cell. Results show that fixed NK cells kill the KYM-1-D4 cells and that neutralizing anti-TNF- α antibodies partly prevent this effect. In contrast to the other types of peripheral blood mononuclear cells NK cells from adult blood constitutively express functional mTNF- α in the absence of prior contact with target cells or activation. These data demonstrate a novel mechanism of cell-mediated cytotoxicity by non-activated human peripheral blood NK cells.

Key words: Membrane TNF- α / Human NK cell / Cytotoxicity / Tumoral cell

Received	12/4/99
Revised	9/7/99
Accepted	29/7/99

1 Introduction

TNF- α belongs to a growing family of molecules that have fundamental roles in immune and developmental networks. These molecules occur in trimeric forms and most of them exist and act as soluble and as transmembrane cell surface proteins [1]. TNF- α is expressed by numerous cell types as a 26-kDa type II transmembrane (mTNF- α) and as a 17-kDa soluble form (sTNF- α) which results from the shedding of mTNF- α by metalloproteinases [2, 3]. TNF- α signals through two receptors: TNFR1 and -R2 [1, 4]. In addition to potent immunomodulatory

and pro-inflammatory properties, sTNF- α is involved in the lysis of a wide range of normal, infected, or transformed cells [4–6]. In contrast to the systemic activity of sTNF- α , mTNF- α acts in situations of juxtacrine intercellular signaling by killing tumoral and infected cells in a cell-to-cell contact-dependent manner [7, 8]. Although undetectable on non-activated cells, different stimuli induce mTNF- α expression on T cells, B cells, monocytes and macrophages [2, 9–11].

NK cells are non-B, non-T lymphocytes that participate in the initial stage of the immune defense. They are cytotoxic without prior sensitization for transformed cells or cells infected with some viruses or bacteria [12–14]. NK cells express preformed cytoplasmic granules containing pore-forming perforins and proteolytic granzymes that are released upon contact with target cells [15, 16]. In addition, NK cells produce sTNF- α [12, 17] and express other members of the TNF- α family, Fas ligand (FasL), CD40 ligand (CD40L), and TNF-related apoptosis-

[1 19560]

The first two authors contributed equally to this work.

Abbreviations: m: Membrane FasL: Fas ligand CD40L: CD40 ligand TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand MFI: Mean fluorescence intensity PFA: Paraformaldehyde

inducing ligand (TRAIL) that participate in NK cell cytotoxicity [17–20]. Human NK cells stimulated by anti-CD16 mAb, PMA plus ionomycin, or IL-2 express FasL and kill some target cells in a Fas-dependent manner [21–24]. Human NK cells stimulated by IL-2 express CD40L whose ligation (with CD40 expressed on target cells) results in their activation [19]. Finally, immature CD161⁺/CD56⁻ human NK cells mediate TRAIL-dependent cytotoxicity [20]. Recently, it has been observed that nonactivated human peripheral blood NK cells fixed with paraformaldehyde (PFA) retain cytotoxic properties attributable to the constitutive expression on their surface of cytotoxic molecules [25]. The expression of FasL and CD40L on nonactivated human peripheral blood NK cells has not been demonstrated [19, 23] and the ability of human NK cells to kill targets in a Fas-dependent manner in the absence of prior activation is controversial [21, 22, 24, 26]. Moreover, TRAIL is not involved in mature NK cell-mediated cytotoxicity [20]. Despite its role in cell-to-cell contact-dependent cytotoxicity, the expression and involvement of mTNF- α in NK cell-mediated cell death has been poorly investigated [27]. We report that, in the absence of prior activation or contact with target cells, mature human NK cells constitutively express functional mTNF- α . This is the first evidence of a constitutive expression of a cytotoxic transmembrane molecule on resting human NK cells.

2 Results

2.1 Freshly isolated human NK cells express mTNF- α

As mTNF- α is involved in cell-to-cell contact-dependent cytotoxicity, we have studied its expression on human NK cells. Results from triple (Fig. 1) and single (data not shown) color immunofluorescence analysis of PBMC and freshly purified NK cells, respectively, show that the CD3⁺CD56⁺ NK cells constitutively express mTNF- α [mean fluorescence intensity (MFI) = 25 ± 8 , mean \pm SD, $n = 27$]. In contrast, mTNF- α expression was undetectable on CD3⁺CD56⁻ T cells (Fig. 1) [10, 11], CD3⁺CD56⁺ cytotoxic T cells (Fig. 1), monocytes (data not shown) [2], B cells (data not shown), and on the circulatory subpopulation of CD8⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ T cells that is cytotoxic without prior sensitization (data not shown) [28]. mTNF- α was undetectable on purified resting T cells, B cells and monocytes as well as on *in vitro* generated immature and mature dendritic cells (data not shown). As NK cells express TNFRII [29], we treated NK cells with a low pH acetate buffer in order to dissociate a potential binding of sTNF- α to its receptors [30]. This treatment did not affect TNF- α expression on NK cells (MFI = 26 ± 5 and 24 ± 7 before and after treatment, respectively, mean \pm SD,

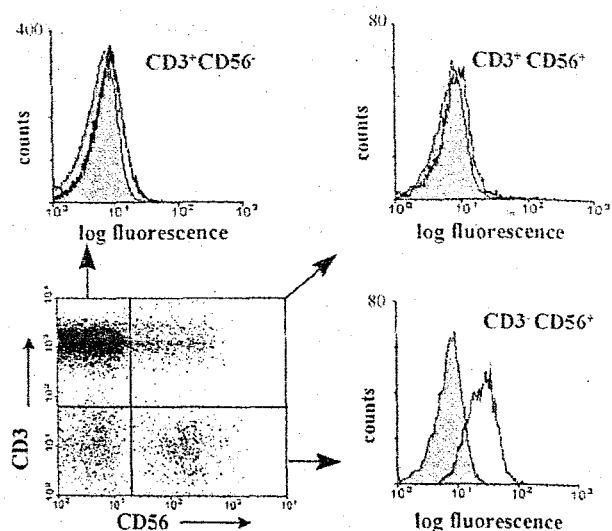


Figure 1. Human peripheral blood CD3⁺CD56⁺ NK cells constitutively express mTNF- α . In triple-color FCM analysis, PBMC were stained simultaneously with PE-labeled anti-CD56 mAb, biotin-labeled anti-CD3 mAb revealed by Cychrome-labeled streptavidin, and rabbit anti-human TNF- α Ab revealed by FITC-labeled goat anti-rabbit Ab. For each sample 2×10^5 cells were recorded and were gated on CD3 and CD56 expression. Three populations were defined: CD3⁺CD56⁻ NK cells, CD3⁺CD56⁺ and CD3⁺CD56⁻ T cells. The binding of control rabbit IgG (grey histogram) and anti-TNF- α Ab (white histogram) on each population is illustrated. For the dot/plot profile, only 20 % of the dots are represented. One representative experiment out of ten is shown.

$n = 3$) (data not shown), thereby suggesting that it is mainly mTNF- α that is detected by FCM analysis on NK cells. Furthermore, results from Western blotting analysis confirmed that freshly purified NK cells constitutively express the 26-kDa membrane-associated form of TNF- α (Fig. 2a) [2] and TNF- α mRNA (Fig. 2b). As controls, PMA plus ionomycin-stimulated but not resting T cells expressed TNF- α mRNA and mTNF- α (Fig. 2a, b) [10].

Thus, among PBMC, the human NK cell is the only cell type that constitutively expresses mTNF- α .

2.2 IL-2, IL-15 and IL-18 up-regulate mTNF- α expression on NK cells

We next analyzed whether some cytokines that modulate NK cell activity [31–35] may affect mTNF- α expression on these cells. Freshly isolated NK cells were incubated overnight either alone, with 10–1000 U/ml IL-2 or with 10 or 50 ng/ml IL-7, -10, -12, -15, -18 or IFN- γ . Surprisingly, mTNF- α expression spontaneously decreased after overnight incubation without cytokine (decrease

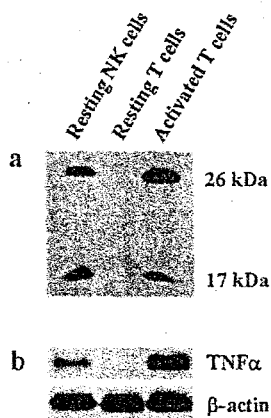


Figure 2. Freshly purified human CD3⁺CD56⁺ NK cells express mTNF- α , sTNF- α and TNF- α mRNA. NK cells purified by FACS sorting and resting and PMA plus ionomycin-stimulated CD3⁺ T cells were examined for the presence of immunoreactive forms of TNF- α by Western blotting (a) and for the expression of TNF- α and β -actin mRNA by PCR (b). One representative experiment out of three is shown.

from 30 to 70 % according to the subject tested, $n = 6$) (Fig. 3a). Metalloproteinase inhibitors that prevent mTNF- α shedding, EDTA [3] and N-acetyl-L-cysteine [36] (used at 1 and 20 mM), did not prevent this decrease (data not shown).

IL-2 up-regulated mTNF- α expression with an effect significant at 200 U/ml (increase of 2 ± 0.8 -fold, mean \pm SD, $n = 6$) (data not shown) and maximal at 1000 U/ml (increase of 12 ± 4 -fold) (Fig. 3a). IL-15 and IL-18 also enhanced mTNF- α expression with a maximum at 10 and 50 ng/ml, respectively (increase of 6 ± 2 and 5.5 ± 2.3 -fold, respectively), while the other cytokines tested were ineffective whatever the concentration tested (Fig. 3a). This effect of IL-2, IL-15 and IL-18 slowly diminished after 48 h (data not shown). Interestingly, IL-2, IL-15 and IL-18 also increased sTNF- α production (increase of 19 ± 3 , 15 ± 4.6 and 8 ± 2 , respectively) (Fig. 3b) [34, 37–39]. IL-7, IL-12 [33, 38], and IFN- γ enhanced sTNF- α production, although to a lower extent (with an effect maximum at 50, 10 and 10 ng/ml, respectively) (Fig. 3b). In contrast, IL-10 was ineffective (Fig. 3b, c).

Thus, these data show that IL-2, IL-15 and IL-18 up-regulate mTNF- α expression on NK cells.

2.3 mTNF- α expressed on freshly isolated NK cells is involved in NK cell-mediated cytotoxicity

We then tested whether mTNF- α expressed on resting NK cells is functional in *in vitro* cytotoxicity assays. In

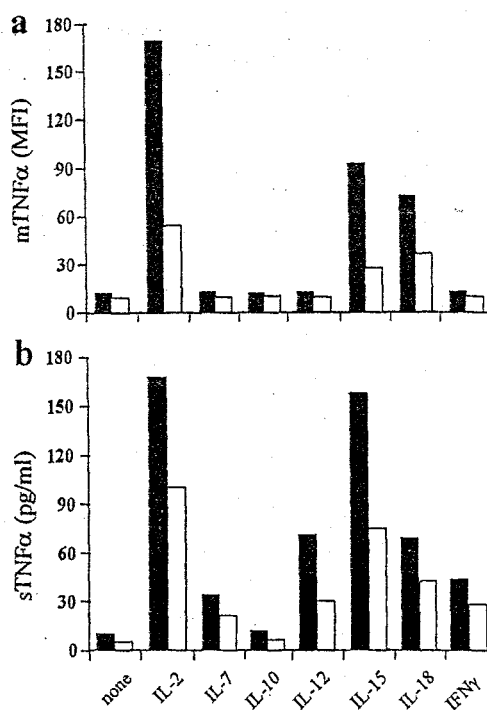


Figure 3. Effect of different cytokines on TNF- α expression by NK cells. Human NK cells from two subjects (\square and \blacksquare) were isolated by negative depletion from PBMC. MFI values of mTNF- α expression on NK cells were 29 and 20, respectively. NK cells were either unstimulated or stimulated with 1000 U/ml IL-2, 50 ng/ml IL-7, IL-10 or IL-18, or 10 ng/ml IL-12, IL-15 or IFN- γ . (a) After overnight incubation, mTNF- α expression was evaluated by FCM analysis. Results are expressed as MFI values after subtraction of the values obtained with control rabbit IgG. (b) After overnight incubation, sTNF- α was quantified in the cell-free supernatants by ELISA. Results are expressed in pg/ml. The data (a, b) are representative of the results obtained with six subjects.

agreement with others, we observed that CD3⁺CD56⁺ NK cells from adult blood express FasL [21, 24, 26] and TRAIL [20] mRNA (data not shown). To avoid a potential involvement of these molecules in our assay, we used the KYM-1-D4 rhabdomyosarcoma cell line as target. This cell line expresses TNFR1 and -R11 (data not shown), is sensitive to sTNF- α -induced cell death, and is resistant to anti-Fas mAb- [40, 41] and sTRAIL-induced death (Fig. 4a). As controls, the Jurkat cell line, sensitive to sTRAIL and anti-Fas mAb and the rhabdomyosarcoma cell line, 37B8R-KYM-1 [40], resistant to sTNF- α , anti-Fas mAb, and sTRAIL were used (Fig. 4a). Furthermore, in order to avoid the participation of other soluble mediators produced by NK cells (such as sTNF- α , perforins, and granzymes), NK cells were fixed with PFA. The levels of mTNF- α expressed on NK cells before and after fixation with PFA remained unchanged [9] (data not shown).

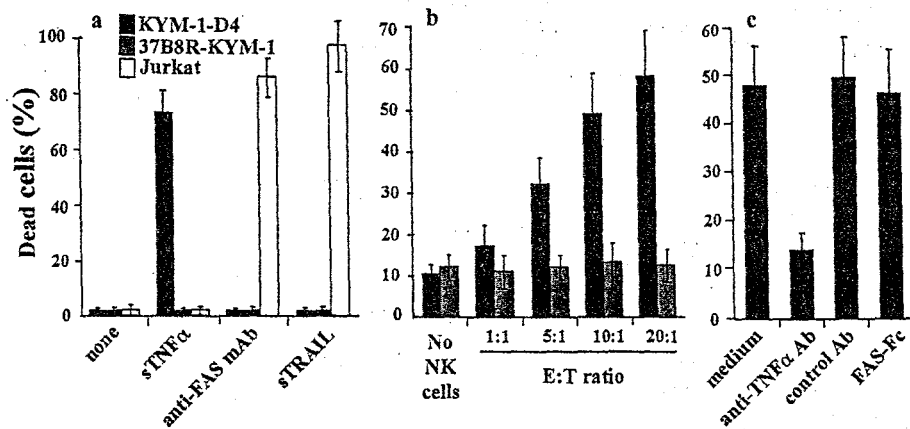


Figure 4. Freshly isolated NK cells fixed with PFA kill the KYM-1 cell line in a mTNF- α -dependent manner. (a) The rhabdomyosarcoma cell line KYM-1-D4 is sensitive to TNF- α and resistant to anti-Fas mAb- and sTRAIL-induced cell death. The rhabdomyosarcoma cell lines, KYM-1-D4 (■) and 37B8R-KYM-1 (◐), and the human Jurkat T lymphoma cell line (□) were incubated either alone, with 1 μ g/ml anti-Fas mAb (CH11), 200 ng/ml sTRAIL plus enhancer, or 10 ng/ml TNF- α . After overnight incubation, cells were labeled with annexin V and the percentage of dead cells was measured by FCM analysis. Results are expressed as percentage of dead cells (mean \pm SD) of three separate experiments. (b) PFA-fixed NK cells kill the KYM-1-D4 cell line. Resting NK cells were fixed with PFA and incubated at different E/T ratios with the KYM-1-D4 (■) and 37B8R-KYM-1 (◐) target cell lines. The percentage of dead target cells (mean% \pm SD, $n = 5$) was measured at 24 h. (c) NK cells kill the KYM-1-D4 cell line in a mTNF- α -dependent manner. KYM-1-D4 cells were cultured with fixed NK cells at an E/T ratio of 10:1 without or with a neutralizing rabbit anti-TNF- α Ab, control rabbit IgG or human Fas-Fc. Results are expressed as percentage of dead cells (mean% \pm SD, $n = 3$) determined after 24 h incubation.

The results show that PFA-fixed NK cells kill the KYM-1-D4 cells: after 24 h with an E/T ratio of 20:1, 59% \pm 11 of cells died (mean \pm SD, $n = 5$) (Fig. 4b). The death of the target cells was partly prevented by a neutralizing anti-TNF- α Ab (decrease of 69% \pm 15, mean \pm SD, $n = 3$) but not by human Fas-Fc (Fig. 4c). Moreover, treatment of NK cells with a low pH buffer before fixation did not affect their ability to kill the KYM-1-D4 cells (52% \pm 10 and 49% \pm 13 of death with an E/T ratio of 20:1, without and with treatment, respectively, mean \pm SD, $n = 3$) (data not shown). As expected, the 37B8R-KYM-1 cells line is resistant to PFA-fixed NK cells (Fig. 4b).

These data suggest that mTNF- α expressed on freshly isolated NK cells is functional and confers to these cells the capability to kill TNF- α -sensitive targets.

3 Discussion

Our results show that, prior to stimulation or contact with target cells, mature peripheral blood NK cells constitutively express functional mTNF- α .

Upon contact with target cells, NK cells secrete cytotoxic molecules. In addition to perforin/granzymes, NK cells also produce sTNF- α that kill TNF- α -susceptible

targets in 24-h assays [12, 17]. Recently, the involvement of membrane-associated cytotoxic molecules in NK cell-dependent cytotoxicity has been shown [25]. Although mTNF- α is involved in cell-to-cell contact-dependent cytotoxicity, to the best of our knowledge, its expression on NK cells and its involvement in NK cell-mediated cytotoxicity has not been reported. In contrast, a previous study showed that mTNF- α is undetectable on human peripheral blood NK cells [27]. Our observation that mTNF- α expression disappears rapidly when NK cells are cultured may explain this discrepancy: others have used NK cells maintained in culture for 3 days in the absence of cytokine. Metalloproteinase inhibitors that prevent mTNF- α shedding on activated T cells and other protease inhibitors that we have tested (data not shown) failed to prevent this decrease. Until now, the mechanism responsible for this spontaneous decrease of mTNF- α remains unclear.

In agreement with studies showing that human monocytes, macrophages and T cells have to be stimulated to express mTNF- α , we failed to detect mTNF- α on freshly isolated peripheral blood T lymphocytes [10, 11, 36], B cells and monocytes [2]. Recently, a discrete subpopulation of primed T cells that are spontaneously cytotoxic and express CD45RA but not CD27 and CD28 has been found within the circulatory human CD8⁺ T cell popula-

tion [28]. We also failed to detect mTNF- α on these killer cells. Thus, NK cells appear to be the only cell type within the circulatory PBMC that constitutively express mTNF- α .

The cell surface expression of the members of the TNF- α family, FasL, CD40L and TNF- β has been reported on human NK cells stimulated with IL-2, PMA plus ionomycin, or anti-Fc γ R mAb [19, 23, 24, 27]. Moreover, activated NK cells kill Jurkat cells in a FasL-dependent manner [21, 22, 24] and, after contact with CD40⁺ target cells, receive an activatory signal through CD40L [19]. In the absence of prior activation or contact with target cells, FasL, CD40L, and TNF- β expression is undetectable on resting human NK cells [19, 23, 27]. Moreover, the ability of these cells to kill target cells in a FasL-dependent manner is still debated [21, 22, 24, 26]. Recently, it has been reported that immature CD161⁺/CD56⁻ NK cells, but not mature CD56⁺ NK cells, mediate TRAIL-dependent cytotoxicity [20]. Thus, mTNF- α appears to be the first molecule that is constitutively expressed on resting NK cell surface in the absence of prior contact with the target cells or exposition to stimulus.

Although different data suggest that FasL and TRAIL are not involved in the cytotoxic properties of mature resting human NK cells [20–22, 24], these cells constitutively express the mRNA encoding FasL [21, 24, 26] and TRAIL [20]. Thus, we have used the TNF- α -sensitive, FasL- and TRAIL-resistant human rhabdomyosarcoma cell line KYM-1-D4 as target cell in order to evaluate the functional role of mTNF- α . We report that PFA-fixed NK cells kill the KYM-1-D4 cell line in a TNF- α -dependent manner. Thus, our results suggest that mTNF- α expressed on resting NK cells is functional. A previous report demonstrated that freshly isolated, highly purified nonactivated human NK cells fixed with PFA still present cell membrane-mediated cytotoxicity [25]. Our data suggest that this property might be mediated at least in part by mTNF- α .

The cytokines IL-2, IL-15 and IL-18 enhance NK cell cytotoxicity. IL-15 and IL-18 enhance perforin/granzyme expression and IL-18 up-regulated FasL-mediated cytotoxicity activity of NK cells [42–44]. In agreement with others, we also report that IL-2, IL-15 and IL-18 enhance sTNF- α production by human NK cells [34, 37–39]. These cytokines also up-regulate mTNF- α expression on NK cells. Thus, by up-regulating mTNF- α expression on NK cells, these cytokines may contribute to increase the cytotoxic properties of NK cells and then their ability to kill tumoral or infected target cells.

In conclusion, we show here that resting NK cells constitutively express functional TNF- α on their surface. The

cytotoxic machinery of NK cells is regulated by positive signals initiating their effector function, and inhibitory signals preventing them from proceeding to cytotoxicity [45]. Our observation raises the question of the nature of the “off” mechanisms that will prevent the death of autologous cells expressing normal levels of self-MHC class I molecules by these “already armed” cells. Moreover, as during differentiation NK cells sequentially and differentially use distinct cytotoxic pathways to mediate target cell death, it will be of interest to determine whether mTNF- α is a marker of mature NK cells or is also expressed on immature NK cells.

4 Materials and methods

4.1 Isolation and culture of human NK cells

PBMC were isolated from freshly collected blood from healthy volunteers by centrifugation on Ficoll/Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). NK cells were isolated from PBMC either by (1) negative selection using the StemSep methodology (StemCell Technologies, Vancouver, Canada); the purity, determined after staining with a PE-labeled anti-CD56 mAb (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) using a FACSVantage cytofluorometer (Becton Dickinson) was > 95 %; or (2) by FACS sorting the CD3⁺CD56⁺ cells, after labeling with FITC-labeled anti-CD3 and PE-labeled anti-CD56 mAb (both from Becton Dickinson); the purity was > 98 %. NK cells were either used immediately in *in vitro* assays or cultured in culture medium (CM) consisting of RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 10 mM HEPES, and 0.1 mM nonessential amino acids (all from Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and stimulated with 10–1000 U/ml IL-2 or with 10 and 50 ng/ml IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 or IFN- γ (all from R&D Systems, Abingdon, GB). As control, CD3⁺ T cells were purified from PBMC by positive selection using a magnetic cell separator (MACS; Miltenyi Biotex, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purity as assessed by FCM analysis using a FITC-labeled anti-CD2 mAb (Becton Dickinson) was > 97 %. T cells (2×10^6 /ml in CM) were stimulated or not using 10 ng/ml PMA (Sigma, St. Louis, MO) plus 1 μ g/ml ionomycin (Calbiochem, San Diego, CA).

4.2 Cell surface labeling

mTNF- α expression was evaluated by FCM using anti-human TNF- α rabbit polyclonal Ab (Serotec, Kildington, GB) or control rabbit IgG (Sigma) revealed by a FITC-labeled goat anti-rabbit IgG Ab (Silenus, Hawthorn, Australia). To prevent nonspecific binding of rabbit IgG on human Fc γ R, NK cells were preincubated with a mouse anti-human CD16 mAb (Peliccluster, Amsterdam, The Netherlands). In triple

color FCM analysis, PE-labeled anti-CD56 and biotin-labeled anti-CD3 mAb (both from Becton Dickinson) revealed by Cychrome-labeled streptavidin (Pharmingen, San Diego, CA) was also added. Results are expressed either as MFI after subtraction of the MFI obtained with the control Ab or as fold of increase defined as follows: A/B where A and B were the MFI values (determined after subtraction of the MFI obtained with the control Ab) obtained with cells stimulated or not stimulated with the cytokine tested, respectively.

4.3 Western blotting analysis

FACS-sorted NK cells, resting T cells and PMA plus ionomycin-stimulated T cells were washed in ice-cold PBS before lysis in 10 mM phosphate buffer pH 7.4 containing 0.5% NP40 (Sigma) and protease inhibitors (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Proteins from 5×10^6 cells were electrophoretically separated on a 10% polyacrylamide gel under reducing conditions and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Ivry sur Seine, France). After saturation, membranes were incubated with goat IgG anti-human TNF- α Ab (R&D Systems). After washing, membranes were incubated with peroxidase-labeled affinity-purified rabbit anti-goat IgG Ab (Dako, Glostrup, Denmark). Bound Ab were detected by chemiluminescence using ECL system (Amersham, Amersham, GB).

4.4 Analysis of TNF- α mRNA expression by PCR

TNF- α mRNA expression was evaluated by PCR in FACS-sorted NK cells and in T cells either unstimulated or stimulated for 6 h with PMA plus ionomycin. Briefly, cells were resuspended in 1 ml Trizol reagent (Life Technologies). After extraction with chloroform, total RNA was precipitated by isopropyl alcohol. The single-strand cDNA were synthesized using 2 μ g total RNA by reverse transcription using oligo-dT primer and reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). PCR amplification was performed with an amount of cDNA corresponding to 25 ng of starting total RNA [2 min at 94°C followed by 30 cycles (30 s at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C) followed by a final extension of 4 min at 72°C]. The sequences of the specific oligonucleotides were 5'-GTCAGATCATCTTCTCGAACC-3' and 5'-TCACAGGGCAATGATCCCAAAG-3' for TNF- α , and 5'-CATGGATGATGATATCGCCG-3' and 5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGAG-3' for β -actin. The PCR products were analyzed on a 1% agarose gel by electrophoresis in the presence of ethidium bromide.

4.5 Quantification of sTNF- α

Purified NK cells were incubated for 16 h with various stimuli, as described above, and sTNF- α was measured in cell-free culture supernatants by ELISA using a commercial kit (R&D Systems) according to the manufacturer's recommendations (sensitivity = 4 pg/ml). Results are expressed as pg/ml.

4.6 Determination of target cell sensitivity to FasL, TRAIL and TNF- α

The human rhabdomyosarcoma cell lines KYM-1-D4 and 37B8R-KYM-1 [40, 41] and the Jurkat human T cell line (American Type Culture Collection, Manassas, VA) in a resting state were centrifuged on FCS to remove dead cells. Then, cells (10^6 /ml) were incubated in CM in the absence or presence of 1 μ g/ml anti-Fas mAb (CH11) (Immunotech, Marseille, France), 200 ng/ml sTRAIL plus 40 μ g/ml enhancer (Alexis, Bayport, MN) or 10 ng/ml TNF- α (R&D Systems). After overnight incubation, cells were labeled with FITC-labeled annexin V and propidium iodide using an annexin V labeling kit according to the manufacturer's recommendations (Immunotech) before analysis on a FACSvantage (Becton Dickinson). Results are expressed as percentage annexin V-positive cells.

4.7 *In vitro* cytotoxicity assays

The involvement of mTNF- α in NK cell-mediated cytotoxicity was evaluated in *in vitro* cytotoxicity assays against the KYM-1-D4 and 37B8R-KYM-1 cell lines. Freshly isolated NK cells were labeled with PKH-26 (Sigma) according to manufacturer's instructions, washed three times in CM and then fixed with 1% PFA for 10 min, quenched with 0.2 M L-lysine, washed three times in CM and resuspended at 1×10^7 cells/ml. Target cells in a resting state were centrifuged on FCS to remove dead cells and mixed (at 2×10^5 cells/ml, 50 μ l/well) with fixed NK cells at different E/T ratios in 96-well round-bottom culture plates (Nunc, Roskilde, Denmark). In some experiments, 20 μ g/ml of neutralizing rabbit anti-human TNF- α Ab (Genzyme, Cambridge, MA), 20 μ g/ml control rabbit IgG (Sigma) or 20 μ g/ml human Fas-Fc (R&D Systems) was added. After overnight incubation, cells were labeled with FITC-labeled annexin V and propidium iodide and analyzed by FCM. A gate was set on forward scatter (FSC) vs. PKH-26 labeling in order to exclude effector cells (Aubry, J. P., Blaecke, A., Lecoanet-Henchoz, S. et al., Annexin V is a useful tool for the measurement of apoptosis involved in the early events of cellular cytotoxicity; manuscript submitted). Results are expressed as a percentage annexin V-positive target cells.

4.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the *t*-test.

5 References

- 1 Bazzoni, F. and Beutler, B., The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 1996. **334**: 1717–1725.
- 2 Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. and Lu, S. D., A novel form of TNF/cachectin is a cell surface

- cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988. **53**: 45–53.
- 3 Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S. S., Torrance, D. S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., Kronheim, S. R., Petersen, M., Gerhart, M., Kozlosky, C. J., March, C. J. and Black, R. A., Protection against lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumor necrosis factor processing. *Nature* 1984. **370**: 218–220.
 - 4 Adolf, G. A., Grell, M. and Scheurich, P., Tumor necrosis factor. In Luger, T. A. and Schwarz, T. (Eds.) *Epidermal Growth Factors and Cytokines*. Marcel Dekker Inc., New York 1993. p 63.
 - 5 Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H. and Lenardo, M. J., Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 1995. **377**: 348–351.
 - 6 Braun, M. Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H. and Tschopp, J., Cytotoxic T cells deficient in both functional Fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 1996. **183**: 657–661.
 - 7 Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L. and Kriegler, M., A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kill by cell-to-cell contact. *Cell* 1990. **63**: 251–258.
 - 8 Grell, M., Douani, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, B., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P., The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995. **83**: 793–802.
 - 9 Decker, T., Lohmann-Matthes, M. L. and Gifford, G. E., Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic macrophages. *J. Immunol.* 1987. **138**: 957–962.
 - 10 Kinkhabwala, M., Sehajpal, P., Skolnik, E., Smith, D., Sharma, V. K., Vlassara, H., Cerami, A. and Suthanthiran, M., A novel addition to the T cell repertoire. Cell surface expression of tumor necrosis factor/cachexin by activated normal human T cells. *J. Exp. Med.* 1990. **171**: 941–946.
 - 11 Ratner, A. and Clark, W. R., Role of TNF α in CD8+ cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis. *J. Immunol.* 1993. **150**: 4303–4314.
 - 12 Trinchieri, G., Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989. **47**: 187–376.
 - 13 Scott, P. and Trinchieri, G., The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 1995. **7**: 34–40.
 - 14 Biron, C. A., Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Biol.* 1997. **9**: 24–34.
 - 15 Berke, G., Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 1997. **4**: 32–40.
 - 16 Moretta, A., Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1997. **90**: 13–18.
 - 17 Paya, C. V., Kenmotsu, N., Schoon, R. A. and Leibson, P. J., Tumor necrosis factor and lymphotoxin-secretion by human natural killer cells leads to antiviral cytotoxicity. *J. Immunol.* 1988. **141**: 1989–1995.
 - 18 Arase, H., Arase, N. and Saito, T., Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 1235–1238.
 - 19 Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palombe, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K. and Zappacosta, S., A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J. Exp. Med.* 1997. **185**: 2053–2060.
 - 20 Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Ainemri, E. S. and Perussia, B., Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* 1998. **188**: 2375–2380.
 - 21 Montel, A. H., Bocham, M. R., Hobbs, J. A., Lynch, D. H. and Brahmi, Z., Fas involvement in cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Cell. Immunol.* 1995. **166**: 236–246.
 - 22 Eischen, C. M., Schilling, J. D., Lynch, D. H., Krammer, P. H. and Leibson, P. J., Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J. Immunol.* 1996. **156**: 2693–2699.
 - 23 Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A. H. and Nagata, S., Fas ligand in human serum. *Nat. Med.* 1996. **2**: 317–322.
 - 24 Medvedev, A. E., Johnsen, A. C., Haux, J., Steinkjer, B., Egeberg, K., Lynch, D., Sundan, A. and Epevik, T., Regulation of Fas and Fas ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* 1997. **9**: 394–404.
 - 25 Vujanovic, N. L., Nagashima, S., Herberman, R. B. and Whiteside, T. L., Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J. Immunol.* 1996. **157**: 1117–1126.
 - 26 Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S. and Miyazaki, S., Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1996. **157**: 2909–2915.

- 27 Ware, C. F., Crowe, P. D., Grayson, M. H., Androlewicz, M. J. and Browning, J. L., Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J. Immunol.* 1992. **149**: 3881–3888.
- 28 Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S. R., Klein, M. R. and van Lier, R. A., Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1997. **186**: 1407–1418.
- 29 Mason, A. T., Mc Vicar, D. W., Smith, C. A., Young, H. A., Ware, C. F. and Ortaldo, J. R., Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J. Leukoc. Biol.* 1995. **58**: 249–255.
- 30 Kumagai, K., Abo, T., Sekizawa, T. and Sasaki, M., Studies of surface immunoglobulins on human B lymphocytes. I. Dissociation of cell-bound immunoglobulins with acid pH or at 37°C. *J. Immunol.* 1975. **115**: 982–987.
- 31 Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E. and Gillis, S., Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981. **291**: 335–338.
- 32 Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G., Identification and purification of natural killer cells stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989. **170**: 827–845.
- 33 Naume, B., Gately, M. and Espevik, T., A comparative study of IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)-, IL-2, and IL-7-induced effects of immunomagnetically purified CD56⁺ NK cells. *J. Immunol.* 1992. **148**: 2429–2436.
- 34 Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenman, J., Grabstein, K. and Galigiuri, M. A., Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.* 1994. **180**: 1395–1403.
- 35 Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K. and Akira, S., Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 1998. **8**: 383–390.
- 36 Delneste, Y., Jeannin, P., Potier, L., Romero, P. and Bonnefoy, J. Y., N-Acetyl-L-Cysteine exhibits antitumoral activity by increasing tumor necrosis factor α -dependent T-cell cytotoxicity. *Blood* 1997. **90**: 1124–1132.
- 37 Jewett, A., Gan, X.-H., Lebow, L. T. and Bonavida, B., Differential secretion of TNF α and IFN γ by human peripheral blood-derived NK subsets and association with functional maturation. *J. Clin. Immunol.* 1996. **16**: 46–54.
- 38 Salvucci, O., Mami-Chouabi, F., Moreau, J. L., Thèze, J., Chehimi, J. and Chouaib, S., Differential regulation of interleukin-2 and interleukin-15-induced natural killer cell activation by interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* 1996. **26**: 2736–2741.
- 39 Puren, A. J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. S. and Dinarello, C. A., Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-18 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14⁺ human blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* 1998. **101**: 711–721.
- 40 Meager, A., Sampson, L. E., Grell, M. and Sheurich, P., Development of resistance to tumor necrosis factor (TNF α) in KYM-1 cells involves both TNF receptors. *Cytokine* 1993. **5**: 556–563.
- 41 Grell, M., Krammer, P. H. and Sheurich, P., Segregation of APO-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 2563–2566.
- 42 Dao, T., Mahal, W. Z. and Crispe, I. N., IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* 1998. **161**: 2217–2222.
- 43 Allen, M. P. and Nilsen-Hamilton, M., Granzymes D, E, F, and G are regulated through pregnancy and by IL-2 and IL-15 in granulated metrial gland cells. *J. Immunol.* 1998. **161**: 2772–2779.
- 44 Tsutsui, H., Nakanishi, K., Matsui, K., Higashino, K., Okamura, H., Miyazawa, Y. and Kaneda, K., IFN γ -inducing factor up-regulated Fas-ligand mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.* 1996. **157**: 3967–3973.
- 45 Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Poggi, A., Mingari, M. C. and Moretta, L., Major histocompatibility complex class-I specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 1997. **155**: 105–117.

Correspondence: Pascale Jeannin, Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5, Avenue Napoléon III, BP 97, F-74164 Saint-Julien en Genevois, France
 Fax: +33 4 50 35 35 90
 e-mail: pascale.jeannin@pierre-fabre.com

Annexin V Used for Measuring Apoptosis in the Early Events of Cellular Cytotoxicity

Jean-Pierre Aubry,* Aline Blaecke, Sybille Lecoanet-Henchoz, Pascale Jeannin, Nathalie Herbault, Gersende Caron, Valéry Moine, and Jean-Yves Bonnefoy

Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France

Received 11 September 1998; Revision Received 8 July 1999; Accepted 29 July 1999

Background: Current cytotoxic assays, including Cr release and fluorescent assays, do not directly measure the proportion of target cells which are killed by apoptosis. Cell-mediated cytotoxicity induced by CTLs and NK cells is mainly regulated by the perforin-granzyme, the Fas ligand (Fas L), and the Tumor Necrosis Factor (TNF)- α pathways. Perforin generates pores in the membrane of target cells, allowing granzyme B to enter and initiate apoptosis. The other effectors, Fas L and TNF- α act by an apoptosis mechanism, leading to DNA fragmentation. A three color flow cytometric method to measure cell-mediated cytotoxicity induced by CTLs or NK cells is described.

Methods: The fluorochromes used are: PKH-26, a stable membrane dye for the labeling of the effector cells, annexin V-FITC which allows the direct evaluation of early

apoptotic cells and propidium iodide which distinguishes membrane permeabilized and late apoptotic cells.

Results: By eliminating through gating PKH-26 positive effector cells, we obtain a direct estimation of the percentage of target cells in the early stages of apoptosis as well as the percentage of target cells dying after late apoptosis and membrane permeabilization. The cytotoxic activity of IL-2 stimulated PBL against K562, Jurkat and KYM-1 was evaluated.

Conclusions: This rapid and novel assay permits the discrimination of the cell death mechanisms occurring during a cytotoxic response and to precisely evaluate the contribution of apoptosis in the early phases of cell-mediated cytotoxicity. *Cytometry* 37: 197-204, 1999. © 1999 Wiley-Liss, Inc.

Key terms: cytotoxicity; apoptosis; annexin V; PKH-26; flow cytometry; TUNEL

Cell-mediated cytotoxicity is mainly dependent on granule release (perforin and granzyme B) by cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer (NK) cells (1, 2, for a review 3). However, granule-independent killing has also been described (4) and induce an apoptotic type of death. In the case of CTLs (5, 6) and NK cells (7, 8, 9 and for a review 10) it has been demonstrated that Fas ligand (Fas L) expressed on effector cells as well as on lymphokine activated killer cells (LAK) is involved in the killing by apoptosis of Fas-positive target cells, in a granule independent manner. In addition, a second non granule-dependent mechanism involving Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) is also active in the mechanisms of cellular cytotoxicity, where TNF- α being expressed by effector cells binds to a TNF-R present at the surface of target cells (11, 12).

Current assays used for the analysis of cellular cytotoxicity are based on the measurement of radioactive ^{51}Cr release by target cells (13). Nevertheless, the ^{51}Cr release assay has numerous drawbacks, including the use of radioisotopes, high cost, the need for specific laboratory equipment, and the relatively high spontaneous release of ^{51}Cr (14, 15). Other non radioactive methods have been developed and numerous approaches have been devised using fluorescent dyes and flow cytometry (16). Most of these assays are based on the staining of

target cells by fluorochromes (14, 17, 18) or the staining of both effector and target cell populations by two different dyes (15, 19), followed by the identification of dead cells by measurement of propidium iodide incorporation. However, these classical fluorimetric methods measure both membrane permeabilization and late apoptotic cells but do not quantify the proportion of apoptotic target cells which can be identified in the early stages of cytotoxicity without plasma membrane permeabilization, suggesting that the number of dead cells is generally underestimated in the first hours of cytotoxicity.

In this manuscript, we report a three color fluorescent method for measuring by flow cytometry the cytotoxic activity of IL-2-stimulated PBL on K562, Jurkat and KYM-1 cell lines. In this assay, the effector cells are labeled with a dye (PKH-26) and cell death is measured by the combination of propidium iodide (PI) and annexin V. Annexin V is a 35 kDa Ca^{2+} -dependent phospholipid-binding protein that binds to phosphatidyl serine (PS) (20, 21). PS, normally found at the inner surface of the plasma

*Correspondence to: Jean-Pierre Aubry, Centre d'Immunologie Pierre Fabre, 5 Av Napoléon III, 74160 St Julien en Genevois, France.
E-mail: jean.pierre.aubry@pierre-fabre.com

membrane of viable nucleated cells (22), is exposed at the surface of cells undergoing apoptosis (23 and for a review 24) and serves as a recognition signal for elimination of apoptotic cells by macrophages (23).

The PKH-26 cell linker dye, used for the identification of the effector cells, is combined with PI, which incorporates into cells with a perturbed plasma membrane, and annexin V FITC to measure early apoptosis occurring during cytotoxicity. In a variation of the proposed assay, PKH-26 was replaced by the UV dye, Indo-1 AM. These methods permit not only the enumeration of target cells which are killed during the cytotoxicity assay but also the observation of apoptosis during the early events of target cell killing.

MATERIALS AND METHODS

Target Cells

The myeloid leukemia cell line K562, the T cell leukemia Jurkat cell line and the rhabdomyosarcoma KYM-1 cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cell lines were grown in RPMI 1640 complete cell culture medium (CM) supplemented with 10% fetal calf serum and were diluted three fold the day before the cytotoxic assays.

Purification of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and NK Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated after centrifugation on Ficoll/Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) from fresh blood collected from healthy donors.

NK cells were isolated by negative selection on the StemSep columns (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada), after staining PBMC with anti-CD3, -CD4, -CD14, -CD19, -CD66b and -glycophorin A monoclonal antibodies and labeling with magnetic beads. Negative NK cells were not retained on the column and their purity determined by flow cytometry using an anti-CD56 monoclonal antibody (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) was > 85 %.

Activation of Effector Cells With IL-2

Total PBL or purified NK cells were cultured overnight at a concentration of 1×10^6 /ml in the presence or absence of IL-2 (10ng/ml) (R & D systems, Abingdon, UK).

Labeling of Effector Cells With PKH-26

Resting or IL-2 activated PBL or purified NK cells, were labeled with the lipophilic dye PKH-26 (Sigma, St Louis, MO) according to manufacturer's instructions. Briefly, cells at 1×10^7 /ml in 1 ml of diluent C, were mixed with an equal volume of 4×10^{-6} M PKH-26 dye and incubated at RT for 5 minutes. The reaction was stopped by addition of 2 ml of medium with 1% BSA (Sigma) and 1 min incubation at RT. Cells were then washed three times with RPMI 1640 complete cell culture medium (CM) and resuspended at a final concentration of 1×10^7 cells/ml.

Labeling of Effector Cells With Indo-1 AM

Effector cells at 1×10^7 /ml (PBL or NK), were labeled with 1 μ g/ml Indo-1 AM dye ((1-[2-amino-5-(6-carboxyindol-2-yl)-phenoxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane- N,N,N,N' -tetraacetic acid pentaacetoxymethyl ester) (Molecular Probes, Eugene, OR) for 40 min at 37°C, washed three times with CM and resuspended at a final concentration of 1×10^7 cells/ml.

51 Chromium Release Cytotoxic Assay

Target cells (1×10^6 /ml) were incubated for 1h30 at 37°C in 5% CO₂ with 100 μ Ci 51 Chromium (Amersham, Uppsala, Sweden) /ml PBS. After the incubation period, target cells were then washed twice with RPMI 1640 CM and resuspended at 1×10^5 /ml. The cytotoxicity assay was done in round bottom 96 well plates. The target cell population was kept constant (100 μ l) and was mixed with 100 μ l of effector cells with E:T ratios ranging from 1.5 :1 to 50 :1. Control wells for spontaneous chromium release consisted of 100 μ l target cells mixed with 100 μ l CM, and positive control wells for maximum chromium release contained 100 μ l of target cells mixed with 100 μ l CM containing 1% triton (Sigma).

The plate was then centrifuged for 5 min at 50 g and incubated for 4 h at 37°C in 5% CO₂. After the incubation period, the plate was centrifuged and 100 μ l of the supernatant from each well was harvested and chromium release was measured using a Packard autogamma counter (Packard, Warrenville, IL). The percentage of cytotoxicity was calculated by the equation:

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{cpm}^{\text{exp}} - \text{cpm}^{\text{spont}}}{\text{cpm}^{\text{max}} - \text{cpm}^{\text{spont}}} \times 100$$

Flow Cytometry Cytotoxicity Assay

50 μ l of target cells at 2×10^5 /ml were dispensed in the appropriate wells of a 96 well round bottom plate. Using serial dilution from the effector population (1×10^7 cells/ml), the E:T ratio obtained were 50 :1, 25 :1, 12 :1, 6 :1, 3 :1 and 1.5 :1, with added volumes of effector cells varying from 100 to 1 μ l. Plates were centrifuged at 50g for 5 min and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 4h or the desired assay time.

After the desired period of incubation, cells were transferred to a V bottom 96 well plate, centrifuged and resuspended in 50 μ l of annexin V buffer provided with the annexin V FITC kit (Immunotech, Luminy, France). Fifty μ l of 1/50 diluted annexin V was added to each well and the cells were incubated at 4° for 10 min. For the identification of dead cells, a final concentration of 2.5 μ g/ml of propidium iodide (PI), provided in the annexin V kit, was added to each well. Cells were then transferred to tubes and samples were analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

After excitation with an argon laser (Enterprise II, Coherent, Santa Clara, CA) emitting 60 mW at 488 nm, the emission of the three fluorochromes was recorded through specific band pass filters : 530 ± 30 nm for FITC (FL1),

585 ± 42 nm for PKH-26 (FL2) and 675 ± 22 nm for PI (FL3) and appropriate electronic compensations were adjusted between each fluorochrome. Approximate values were: FL1 - 1% FL2; FL2 - 65% FL1; FL2 - 26% FL3; FL3 - 14% FL2 with PMT being tuned at 480 volts for FL1, 500 volts for FL2 and 600 volts for FL3.

A gate was set on Forward Scatter (FSC) versus PKH-26 in order to exclude effector cells and measure cell death and apoptosis on target cells.

When Indo-1-AM was used to replace the PKH-26 dye, FITC and PI emissions were recorded with the same sets of filters as described above. Indo-1 was excited with an argon laser (Enterprise II) emitting 50 mW at 351-364 nm, and its emission was recorded through a specific band pass filter at 405 nm. In that configuration, no or little electronic compensation was necessary between the three fluorochromes.

Induction of Apoptosis on K562, Jurkat and KYM-1 Cell Lines

Cell lines at 1×10^6 / ml in CM were incubated for 4h with 500 ng/ml anti-CD95 (anti-Fas) monoclonal antibody (Immunotech) or with 100 ng/ml soluble TNF- α (R&D systems, Minneapolis, MN). Apoptosis was measured by flow cytometry using the annexin V FITC kit (Immunotech) as recommended by the manufacturer.

In Situ Detection of Apoptotic Cells (TUNEL Method)

The three major populations of target cells observed in the cytotoxicity assay (i.e. annexin V^{negative}/PI^{negative}, annexin V^{positive}/PI^{negative} and annexin V^{positive}/PI^{positive}) were sorted by flow cytometry and then labeled with the Mebstain II apoptosis kit (Immunotech), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 5×10^5 cells of each sorted population were fixed with 200 μ l of 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma) at 4°C for 30 min. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 200 μ l of 70% ethanol and incubated for 30 min at -20°C for permeabilization. Cells were then washed twice with PBS-0.2% BSA and the pellet was resuspended in 60 μ l of TdT reagent, containing biotin-dUTP and TdT at previously determined optimal concentrations. After 1.5 h incubation at 37°C, cells were centrifuged and 100 μ l of TdT blocking solution were added. After 10 min incubation at RT, cells were washed twice with PBS-0.2% BSA and then incubated for 30 min at RT with 100 μ l streptavidin Allophycocyanin (APC, Molecular Probes) at a final concentration of 2 μ g/ml. Cells were then washed twice and analyzed on a FACSVantage. Streptavidin APC was excited with a Helium Neon laser (Spectra Physics, Mountain View, CA) emitting 25 mW at 633 nm, and the emission was recorded at 660 nm using a 660 ± 20 band pass filter.

RESULTS

Cytotoxicity Assay by Flow Cytometry Using PKH-26 for Labeling Effector Cells

In order to set up the experimental conditions for measuring cellular cytotoxicity by flow cytometry, we carried out a test of cytotoxicity against K562 and Jurkat

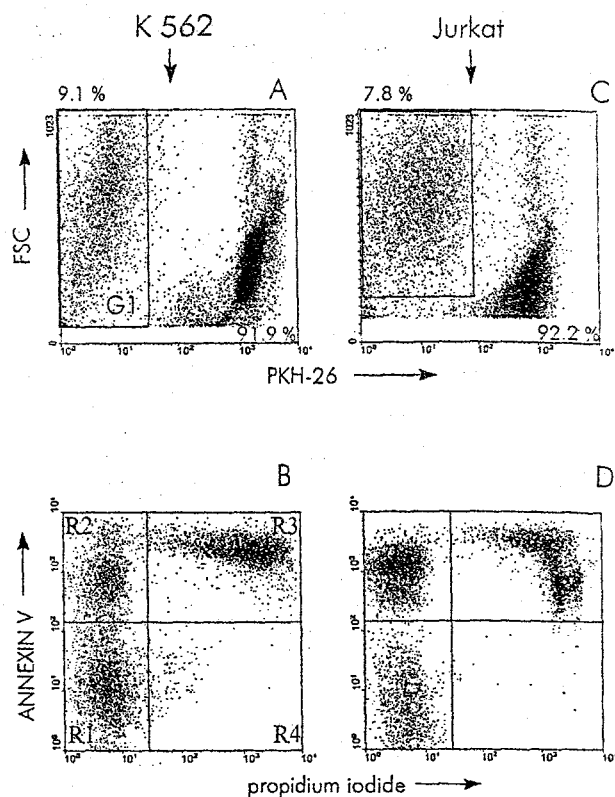


Fig. 1. Cellular cytotoxicity assay by flow cytometry. Discrimination between K562 (A) or Jurkat target cells (C) and PKH-26-labeled effector cells mixed for 4 hours. Target cells, negative for PKH-26 were selected (G1 gate). Measurement of cell death of K562 (B) and Jurkat (D) target cells selected inside the G1 gate: annexin V versus propidium iodide staining. Cells in region R1 (annexin V^{pos}-PI^{neg}) represent living cells, cells in R2 (annexin V^{pos}-PI^{neg}), early apoptotic cells, cells in R3 (annexin V^{pos}-PI^{pos}), late apoptotic cells and cells in R4 (annexin V^{neg}-PI^{pos}), those with a damaged membrane only. The data are taken from one representative experiment.

cells, using IL-2-stimulated peripheral blood lymphocytes (PBL) as effector cells.

As the emission spectra of the three different dyes utilized in this bioassay (FITC, PKH-26 and PI) interfere with each other, appropriate electronic compensations were adjusted by running consecutively through the FACS the individual cell populations stained by each dye (see Materials and Methods section). Once the compensations had been set, a gating was done on FSC versus log fluorescence of PKH-26-labeled effector cells (Fig. 1A,C). Large target cells (K 562 and Jurkat) that are not labeled with PKH-26 were selected (G1 gate) and the analysis of log green fluorescence (annexin V-FITC) versus log red fluorescence (Propidium Iodide) revealed four populations (Fig. 1B,D): negative cells for both fluorochromes (R1) which represent living target cells; annexin V^{pos}-PI^{neg} cells (R2) which characterize early apoptotic cells; annexin V^{pos}-PI^{pos} cells (R3) which identify late stage apoptotic cells (called secondary necrotic cells by some authors) and annexin V^{neg}-PI^{pos} cells (R4) which represent cells with permeabilized membranes only. The sum of the cells within regions R2, R3 and R4 divided by

the total of cells R1+R2+R3+R4 gives the percentage of killed cells in each sample. In addition, the % of spontaneous death, i.e. the number of cells in the regions R2, R3 and R4 obtained when target cells are cultured in the absence of effector cells, should be subtracted from the number of dead and apoptotic cells obtained in the cytotoxicity assay in order to determine the real number of cells killed by the effector cells.

The equation for calculating cytotoxicity is:

$$\% \text{ specific cell death} = \frac{(R2 + R3 + R4)^{\text{exp}}}{(R1 + R2 + R3 + R4)} - \frac{(R2 + R3 + R4)^{\text{spont}}}{(R1 + R2 + R3 + R4)} \times 100$$

Comparison Between T Cell and NK Cell Cytotoxicity Activity

Our results were then validated by comparing the ability of various cytotoxic cell types to kill K562 target cells. Four different effector cell populations have been prepared:

total PBL, resting or cultured overnight in the presence of IL-2.

NK cells, from the same donor, either unstimulated or cultured overnight in the presence of IL-2.

The correlation between the E:T ratio and the percentage of killing (early + late apoptosis) was studied for the four populations previously described. Results presented in Figure 2 show that the effector:target cell ratio correlates with the percentage of cell death. In addition, NK cells are more potent than PBL in killing K562 cells, and IL-2 greatly enhances the ability of both PBL and NK cells to kill K562 target cells. Similar results were found when using Jurkat cells as targets (data not shown).

The major interest in our methodology is that we are able to directly visualize the percentage of target cells in the early and late stages of apoptosis as well as the percentage of target cells dying by direct membrane permeabilization. It follows that the total number of dead cells measured by flow cytometry should be larger than that obtained with a classical ^{51}Cr release assay, where ^{51}Cr is released when the plasma membrane is perturbed and not in the early phases of apoptosis, characterized by an intact plasma membrane. The direct comparison between the two methods (Fig. 3A), using K562 as target cells, revealed that although the curve from the flow cytometric assay (annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$ + annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{pos}}$) gave a higher percentage of dead cells than the chromium release assay, the correlation coefficient, shown to be 0.972, indicated that there is a good correlation between the two techniques. On the other hand, when the percentage of PI^+ cells only was compared to the chromium release assay (Fig. 3B), the correlation coefficient 0.994 indicates a strong correlation between the two methods. The x intercept of 3.9 presumably represents a greater sensitivity of the cytometric assay after 4 h of incubation or that a

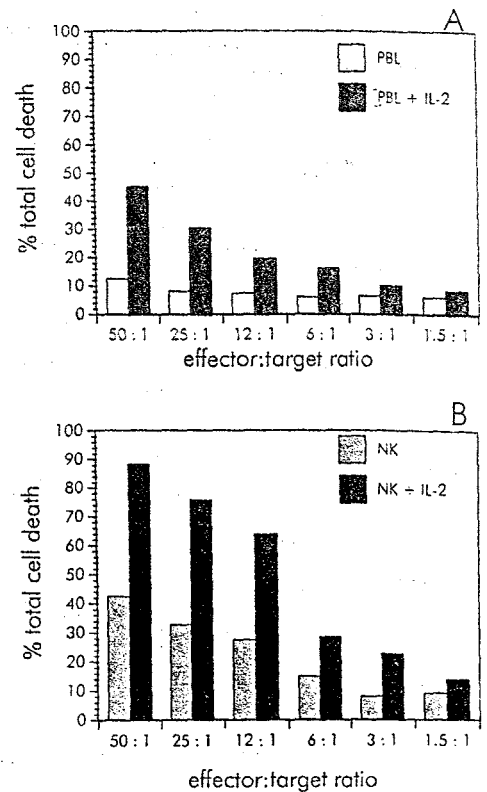


FIG. 2. Cytotoxic activity of CTL and NK cells. A: Resting or IL-2-stimulated PKH-26-labeled PBL were mixed for 4h with K562 cells plated in a U bottom 96 well plate. Cytotoxicity was measured by flow cytometry, as described in Fig. 1, and represents the total cell death (early + late apoptosis). B: Resting or IL-2-stimulated purified NK cells labeled with PKH-26 were mixed for 4h with K562 cells. Cytotoxicity was measured by flow cytometry, as described in Figure 1. Results are taken from one experiment representative of five.

fraction of K562 cells, that is positive for PI is unable to uptake ^{51}Cr .

In order to ascertain whether the presence of PKH-26 in the membrane of effector cells influences their interaction with target cells, we replaced PKH-26 with the intracytoplasmic dye Indo-1-AM in a series of cytotoxicity assays using IL-2 activated PBL as effector cells. We found a good correlation between the two assays (0.997), indicating that the type of stain used to label effector cells does not affect the results of the assay (Fig 3C).

In addition in order to verify the stability of the membrane stable PKH-26 dye in the cytotoxicity assay we followed the variation of the E:T ratio during a 6 hour kinetics cytotoxicity assay, using K562 as targets (data not shown). Results demonstrated that the E:T ratio stays constant during the kinetics and that there is no leakage of the PKH-26 dye that could contaminate the target population.

Differential Sensitivity of Cell Lines to Apoptosis

The K562 cell line is normally used as the reference cell line in cytotoxicity studies. However as shown in Table I,

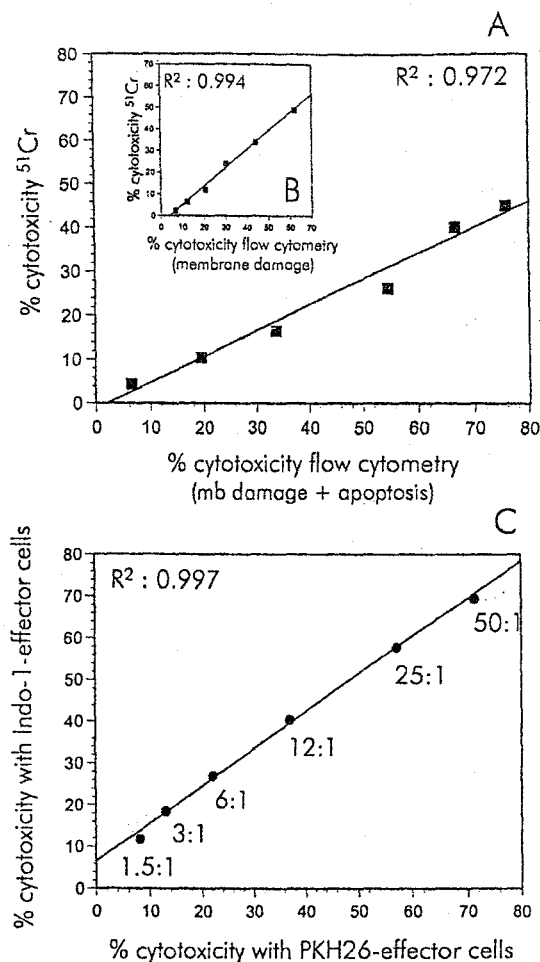


FIG. 3. Specific cytotoxicity of IL-2-stimulated PBL against K562 cells measured by the annexin-PI flow cytometric assay as compared with classical ^{51}Cr release assay. Effector cells were incubated for 4h with target cells. E:T ratios were 1.5:1, 3:1, 6:1, 12:1, 25:1, 50:1 and cytotoxicity was determined. The percentages of cytotoxicity obtained with ^{51}Cr release assay (y-axis) have been plotted against the corresponding percentages determined by FACS analysis (x-axis). One representative experiment is shown. A: The x-values represent the total cytotoxicity measured by flow cytometry (early + late apoptosis and membrane permeabilized cells). B: The x-values represent only the PI^+ cells, that include both late apoptotic cells and membrane permeabilized cells. C: The lipophilic PKH-26 dye does not modify the effector-target cell interaction. The percentages of cytotoxicity obtained using PKH-26-labeled effector cells (x-axis) have been plotted against the corresponding values obtained with Indo-1-AM-labeled effector cells (y-axis).

incubation of K562 cells with either a monoclonal antibody directed against Fas (CD95) or with soluble TNF- α (sTNF- α) does not induce apoptosis. We can therefore conclude that the early apoptosis (17% with a 30:1 E:T ratio) found in our cytotoxicity assay (Fig. 4) appears to be mainly due to a granule (perforin-granzyme)-dependent mechanism since K562 cells are not sensitive to Fas-L and TNF- α . In contrast, when we analyzed the cytotoxic activity of IL-2-activated PBL against Jurkat cells which are sensitive to anti-Fas and KYM-1, sensitive to sTNF- α (Table D), we observed a larger proportion of cells present in the annexin $^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$ quadrant (respectively 39% and 48%) suggesting that this annexin $^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$ subset reflects in

Table 1
Induction of Early Apoptosis (Annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$) in K562, Jurkat and KYM1 Cells After a 4 h Incubation With an Anti-Fas Monoclonal Antibody or s-TNF- α

	Control	Anti-Fas (500 ng/ml)	s-TNF- α (100 ng/ml)
K 562	3.5%	4.8%	4.6%
Jurkat	19.7%	46.0%	18.5%
KYM1	8.5%	10.5%	34.4%

addition to the granule-dependent apoptotic population, a cell population which has been killed by apoptosis induced with Fas-L or sTNF- α , respectively (Fig. 4). The same results are observed when a E:T ratio of 10:1 has been taken (Fig. 4).

We have then followed the kinetics of the onset of annexin V as well as PI during the cytotoxicity of IL-2-stimulated PBL against Jurkat cells. Results presented in Figure 5 show that Jurkat target cells start to die as early as 30 min after effector and target mixing by an apoptosis-related mechanism. The maximum of apoptosis (annexin V^{pos} cells) is obtained after 2h of co-incubation with effector cells and then decreases. Membrane permeabilization, revealed by PI uptake (annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{pos}}$) is delayed and starts between 1 to 2h and reaches a plateau at 3h. This population becomes major at 4 h. In order to study the content of this subpopulation and to validate our results with a different measurement of apoptosis, we have sorted by flow cytometry the three main populations of Jurkat cells observed in our cytotoxicity assay: annexin $\text{V}^{\text{neg}}/\text{PI}^{\text{neg}}$, annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$ and annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{pos}}$ and we have performed a TUNEL assay on these subsets. Results (Fig. 6) show that living cells (annexin $\text{V}^{\text{neg}}/\text{PI}^{\text{neg}}$) (Fig. 6A) are negative for dUTP binding as well as most of the annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{neg}}$ cells (90%) (Fig. 6B), confirming that membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation. The analysis of the annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{pos}}$ population of Jurkat cells (Fig. 6C) and K562 (Fig. 6D) reveals a majority of dUTP positive cells (85% and 76%, respectively) indicating that most of these cells died by apoptosis and passed in the late apoptotic compartment. Nevertheless, a small proportion of these cells is not labeled by dUTP; this could be explained by the fact that this annexin $\text{V}^{\text{pos}}/\text{PI}^{\text{pos}}$ population is heterogeneous and contains morphologically intact dead cells but also lysed cells which lost their integrity and were not correctly stained by dUTP.

DISCUSSION

In the present study, we describe an original and rapid method for measuring cellular cytotoxicity by flow cytometry, which permits the fine analysis of the different types and stages of cell death (early apoptosis, late apoptosis and membrane damage) occurring during cellular cytotoxicity.

The classical ^{51}Cr chromium release assay is the most commonly used assay to analyze CTL activity, but this method has a number of important drawbacks, including the lack of qualitative information and the use of radioactive compounds. In the past decade, numerous flow

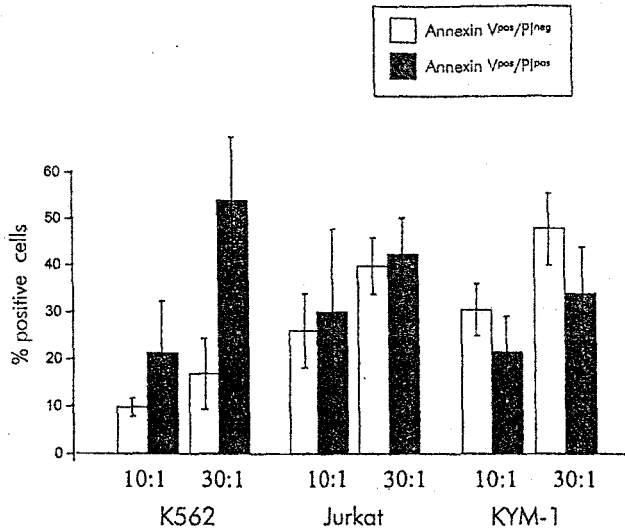


FIG. 4. Differential sensitivities of K562, Jurkat and KYM-1 cell lines to cell mediated cytotoxicity. IL-2-stimulated PBL were incubated for 4h with target cells at E:T ratios of 10:1 and 30:1. The percentage of target cells in the annexin V^{pos}/PI^{neg} (open bars) and annexin V^{pos}/PI^{pos} (grey bars) quadrants was calculated for each cell line, using samples in triplicate and SD bars are presented.

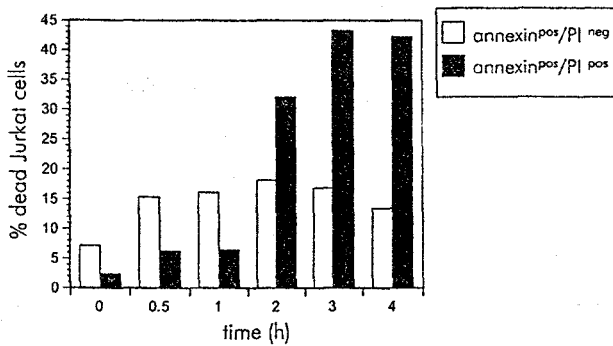


FIG. 5. Kinetics of cell death during a cytotoxicity assay. A 25:1 E:T ratio was chosen and the extent of cell death was determined after 30 min, 1h, 2h, 3h and 4h incubation of Jurkat cells with IL-2-stimulated PBL. Cells in early apoptosis (annexin^{pos}/PI^{neg}) are represented with open bars and late apoptotic cells (annexin^{pos}/PI^{pos}) are represented with grey bars. Results are taken from one experiment representative of three.

cytometric cytotoxic assays have been developed that are mainly based on the staining of target cells with a fluorochrome together with the identification of dead target cells by incorporation of propidium iodide (14, 15, 25). PKH dyes (18) which uniformly label the plasma membrane of cells have also been largely used in the cytotoxicity assays developed for flow cytometry (17, 19, 26). However, all these techniques, using propidium iodide as a marker of dead cells, identify those which have a permeabilized membrane but do not directly measure the early phenomenon by which cells have been killed by an apoptotic mechanism.

The method we describe here is based on the identification of cells dying by apoptosis, using annexin V-FITC, together with the visualization of cells dying by membrane

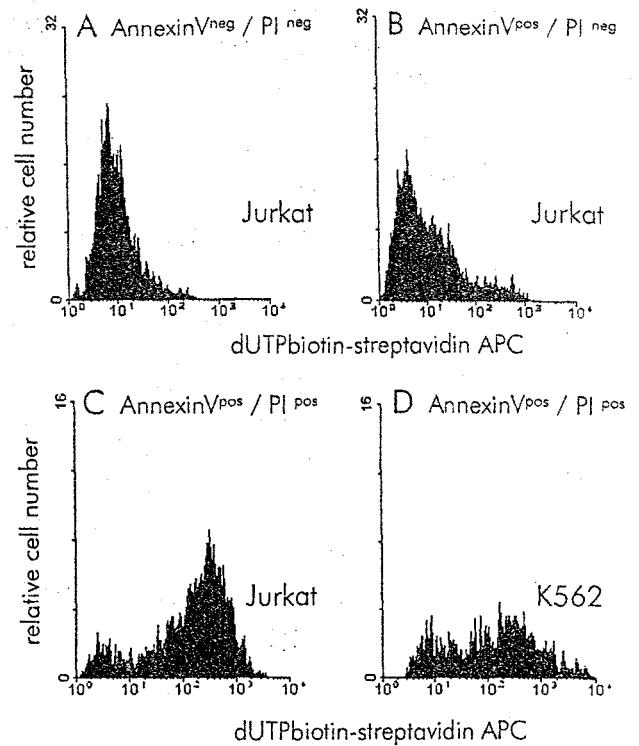


FIG. 6. Analysis of target cell subpopulation contents by TUNEL assay. Jurkat and K562 cells were incubated for 4h with IL-2-stimulated effector cells (E:T ratio = 25:1) and cells in every compartment were sorted out by FACS and stained with biot-dUTP (TUNEL assay). The results of the TUNEL assay for the Jurkat annexin V^{neg}/PI^{neg} population are shown in A, the annexin V^{pos}/PI^{neg} population in B, the annexin V^{pos}/PI^{pos} population in C and the K562 annexin V^{pos}/PI^{pos} population in D.

damage and lysis which are identified by propidium iodide incorporation. Annexin V is a sensitive probe used for the identification of cells that undergo apoptosis (24) and has been extensively utilized for the quantification of apoptotic cells by flow cytometry (27, 28).

We have used the fluorescent dye PKH-26 to label the surface of effector cells. This stain is stably incorporated in the plasma membrane and does not transfer to non-labeled cells in the same culture. After mixing labeled effector cells (CTLs or NK cells) with non labeled target cells and an incubation for 4h at 37°C, annexin V-FITC and propidium iodide were added to the wells. The number of target cells was kept constant (10,000 cells / well) and various E:T ratio from 50:1 to 1.5:1 were tested. The elimination of PKH-26 fluorescent cells removes the majority of the effector cells, and any further contamination of the non-fluorescent cell population by leaking of PKH-26 from effector cells is reduced by gating on forward scatter since the target cells are usually bigger than the effector cells. In addition, we have followed the effector:target ratio during a 6 h kinetics study in order to check a possible leakage of the PKH-26 which could stain the target population. In our hands, PKH-26 is shown to be stable.

The analysis of the gated cells by annexin V FITC versus PI, revealed four populations: live cells (annexin^{neg} - PI^{neg}); apoptotic cells (annexin^{pos} - PI^{neg}) and cells with a per-

turbed membrane which includes both late apoptotic cells (annexin^{pos} - PI^{pos}) and permeabilized cells (annexin^{neg} - PI^{pos}) (Fig. 1). In all experiments, we observed a certain percentage of target cells in the annexin^{pos} - PI^{neg} and annexin^{pos} - PI^{pos} quadrants when they were incubated alone in the absence of effector cells. This reflects the spontaneous percentage of death when target cells are in culture. As the total number of cells in each well varies with the E:T ratio and in order to keep the mean fluorescence intensity of annexin V unchanged, a ratio of annexin V to total number of cells is held constant and has previously been optimized. The results obtained with our flow cytometric assay give a higher percentage of cell death as compared to the classical chromium release assays. This has been already observed in previous publications using either PKH dyes in conjunction with PI uptake (18) or other dyes in addition to PI (29) where the flow cytometric assay was described to be more sensitive than the Cr release assay.

In order to evaluate a possible influence of the membrane dye PKH-26 in the cytotoxicity assay, we have used a stable intracytoplasmic dye, Indo-1 AM to label effector cells and replace PKH-26. Indo-1-AM was generally described as a stable probe for studies on free cytoplasmic calcium (30). This stain has already been used to label a cell population for measuring conjugate formation by flow cytometry and was found to not contaminate the other cell population (31). Here, the results obtained with Indo-1 completely correlate with those obtained with PKH-26, showing that PKH-26 does not modify cell surface interactions occurring during cytotoxicity. In addition, as the spectra of FITC, PI and Indo-1 do not overlap and because the electronic compensations applied to eliminate the cross reactivity between the three dyes used previously were not insignificant, Indo-1 is a good alternative to PKH-26 for those with a UV laser on their cytofluorimeter.

Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and natural killer cells (NK) play an important role in the cellular defense mechanism against virus-infected cells and tumor cells, by recognition and killing of target cells. In numerous studies, IL-2-activated total PBL or IL-2-activated NK cells have been shown to lyse the NK-susceptible K562 and it has been demonstrated that IL-2 increases the cytotoxic activity of both CTLs (32) and NK cells (33). T cell mediated cytotoxicity has been shown to be dependent on the perforin-granzyme pathways, as well as on another pathway which is dependent on Fas activation (5, 6, 34).

In our kinetics experiments, we have observed that target cells start to die by apoptosis within the first hour of co incubation with effector cells. The analysis of the annexin^{pos}/PI^{neg} population by labeling DNA fragments with biotin dUTP, confirms the fact that membrane phospholipid rearrangement is an early event that precedes DNA fragmentation (35). This annexin^{pos}/PI^{pos} population is mainly constituted of late apoptotic cells, due to the conversion of apoptotic cells which become permeable for PI.

Most of the classical cytotoxicity assays use K562 cells as target cells. Even though we and others have found that

K562 are not sensitive to Fas-L and sTNF- α (36), we were still able to observe a significant proportion of K562 cells which have been killed by apoptosis. This death probably reflects the apoptotic pathway induced by the concomitant action of perforin and granzyme B (1, 2, 37) since Fas-L and TNF- α which normally induce apoptosis, are not active on this cell line (38). We have consequently compared our results obtained with K562 cells with those obtained with Jurkat cells which are sensitive to Fas-L but not to TNF- α (39) and the KYM-1 cell line, sensitive to TNF- α but not to Fas-L (40). We found, in these two cell lines, a larger proportion of cells dying by apoptosis, confirming that CTL and NK cells utilize the two cytolytic mechanisms involving perforin-granzyme and Fas-L or TNF- α pathways (3).

The utilization of annexin V to detect and monitor apoptosis in cellular cytotoxicity is a sensitive qualitative assay which has been recently described to quantify xenogenic cell mediated cytotoxicity (21). However, to our knowledge, the method we are reporting here, conjugating annexin V with PI staining, is the only one which allows a fine distinction between the two major events, early apoptosis and membrane perturbed cells (late apoptosis + membrane permeabilization), which occur in cellular cytotoxicity. This detection of apoptosis is particularly important and reflects the early phenomenon that occur during the first two hours of cytotoxicity. We hope that this new assay will allow a more profound understanding of the mechanisms of cell death induced during cellular cytotoxicity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Holzwarth, Dr. Elson and Dr. Renno for critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

1. Trapani JA, Smyth MJ. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunol Cell Biol* 1993;71:201-208.
2. Trapani JA, Browne KA, Smyth MJ, Jans DA. Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:4127-4133.
3. Trapani JA. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. *Int Rev Cytol* 1998;182:111-192.
4. Moretta A. Molecular mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Cell* 1997;90:13-18.
5. Kagi D, Vignaux F, Lederman B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell mediated cytotoxicity. *Science* 1994;265:528-530.
6. Lowin B, Mattman C, Hahne M, Tschopp J. Comparison of Fas (Apo-1/CD95) and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. *Int Immunol* 1996;8:57-63.
7. Lee RK, Spielman J, Zhao DY, Olsen KJ, Podack ER. Perforin, Fas ligand and tumor necrosis factor are the major cytotoxic molecules used by lymphokine-activated killer cells. *J Immunol* 1996;157:1919-1925.
8. Medvedev AE, Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Egeberg K, Lynch DH, Sundan A, Espevik T. Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine* 1997;9:394-404.
9. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 1996;157:2909-2915.
10. Eischen CM, Leibson PJ. Role of NK-cell-associated Fas ligand in cell-mediated cytotoxicity and apoptosis. *Res Immunol* 1997;148:164-169.

11. Dennert G. Molecular mechanism of target lysis by cytotoxic T cells. *Intern Rev Immunol* 1997;14:133-152.
12. Monastra G, Cabrelli A, Zamboni A, Rosato A, Macino B, Collavo D, Zanovello P. Membrane form of TNF alpha induces both cell lysis and apoptosis in susceptible target cells. *Cell Immunol* 1996;171:102-110.
13. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968;14:181-196.
14. Mattis AE, Bernhardt G, Lipp M, Förster R. Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay. *J Immunol Methods* 1997;204:135-142.
15. Radosevic K, Garritsen HSP, Van Graft M, De Grooth BG, Greeve J. A simple and sensitive flow cytometric assay for the determination of the cytotoxic activity of human natural killer cells. *J Immunol Methods* 1990;135:81-89.
16. Papa S, Vitale M, Mariani AR, Facchini A, Manzoli FA. Natural killer function in flow cytometry. I. Evaluation of NK lytic activity on K562 cell line. *J Immunol Methods* 1988;107:73-78.
17. Johann S, Blumel JS, Lipp M, Förster R. A versatile flow cytometry-based assay for the determination of short- and long-term natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1995;185:209-216.
18. Slezak SE, Horan PK. Cell mediated cytotoxicity. A highly sensitive and informative flow cytometric assay. *J Immunol Methods* 1989;117:205-214.
19. Flieger D, Gruber R, Schlimok G, Reiter C, Pantel K, Riethmüller G. A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods* 1995;180:1-13.
20. Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923-4928.
21. Shouhan Y, Feng X, O'Connell PJ. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1998;217:61-70.
22. Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 1991;30:1163-1173.
23. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidyl serine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
24. van Engeland M, Nieland LJW, Frans CS, Schutte B, Reutelingsperger PM. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.
25. Chang L, Gusewitch GA, Chritton DB, Folz JC, Lebeck LK, Nehlsen-Cannarella SL. Rapid flow cytometric assay for the assessment of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 1993;166:45-54.
26. Hatam L, Schuval S, Bonagura VR. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry* 1994;116:59-68.
27. Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997;27:1-20.
28. Vermees I, Haanen C, Steffen-Naeken H, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis-flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
29. Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevas CN, Papamichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;177:101-111.
30. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3340-3350.
31. Aubry J-P, Shields JG, Jansen KU, Bonnefoy J-Y. A multiparameter flow cytometric method to study surface molecules involved in interactions between subpopulations of cells. *J Immunol Methods* 1993;159:161-171.
32. Konjevic G, Schlesinger B, Cheng L, Olsen KJ, Podack ER, Spuzic I. Analysis of perforin expression in human peripheral blood lymphocytes, CD56+ natural killer cell subsets and its induction by interleukin-2. *Immunol Invest* 1995;24:499-507.
33. Mori S, Jewett A, Murakami Mori K, Cavalcanti M, Bonavida B. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44:282-290.
34. Garner R, Helgason CD, Atkinson EA, Pinkoski MJ, Ostergaard HL, Sorensen O, Fu A, Lapchak PH, Rabinovitch A, McHelhaney JE. Characterization of a granule-independent lytic mechanism used by CTL hybridomas. *J Immunol* 1994;153:5413-5421.
35. Chan A, Reiter R, Wiese S, Fertig G, Gold R. Plasma membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation in different apoptotic models. *Histochem Cell Biol* 1998;110:553-558.
36. Munker R, Marini F, Jiang S, Savary C, Owen Schaub L, Andreeff M. Expression of CD95 (FAS) gene transfer does not sensitize K562 to Fas-killing. *Hematol Cell Ther* 1997;39:75-78.
37. Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, Ley TJ. Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity* 1999;10:595-605.
38. Smyth MJ, Trapani JA. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 1995;16:202-206.
39. Martinez-Lorenzo MJ, Gamen S, Etxeberria J, Lasierra P, Larrad L, Pineiro A, Anel A, Naval J, Alvala MA. Resistance to apoptosis correlates with a highly proliferative phenotype and loss of Fas and CPP32 (caspase-3) expression in human leukemia cells. *Int J Cancer* 1998;75:473-481.
40. Grell M, Krammer PH, Scheurich P. Segregation of APO-1/Fas antigen and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* 1994;24:2563-2566.