

Université de Montréal

**L'IL-16 DIMINUE LA PRODUCTION DES IgE PAR
LES LYMPHOCYTES B**

Par

Annick Trudelle

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc
en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2003

© Annick Trudelle, 2003



W

4

U58

2004

V. 091

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'IL-16 DIMINUE LA PRODUCTION DES IgE PAR
LES LYMPHOCYTES B**

Présenté par :
Annick Trudelle

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Ali Ahmad
Président-rapporteur

Dre Sophie Laberge
Directeur de recherche

Dre Marie-Noël Primeau
Membre du jury

RÉSUMÉ

La production excessive d'IgE par les lymphocytes B est une caractéristique de l'asthme atopique et de la rhinite allergique. Les IgE causent l'hypersensibilité des voies respiratoires en provoquant la dégranulation des mastocytes. Plusieurs études animales et humaines montrent une corrélation entre les taux d'IgE chez des patients asthmatiques et les symptômes associés à cette maladie. Donc, la forte association entre la production des IgE et l'asthme atopique, ainsi que le rôle des IgE dans l'hypersensibilité des voies respiratoires sont à la base de nombreuses investigations concernant les interactions cellulaires et moléculaires qui régulent leur production. Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle critique dans la régulation de la synthèse des IgE par l'entremise de la production d'IL-4 et d'IL-13. L'IL-16 agit spécifiquement sur les cellules CD4⁺, induisant leur migration, l'expression du CD25 ainsi que la régulation de la production de cytokines. De plus, l'expression d'IL-16 est augmentée aux sites d'inflammation allergique et aux sites de production des IgE. Il a été démontré que l'IL-16 induit l'expression de l'IFN- γ et inhibe la production de l'IL-5. Le rôle potentiel de l'IL-16 dans la régulation de la production des IgE par les lymphocytes B est inconnu. Notre projet vise principalement à démontrer si l'IL-16 détient un rôle dans la production des IgE chez des sujets atopiques.

Nos résultats démontrent que l'IL-16 diminue la production polyclonale d'IgE chez des sujets atopiques, ainsi que l'expression du transcript C ϵ . De plus l'IL-16 semble agir sur la production d'IgE par une voie indépendante de l'IFN- γ .

En conclusion, cette étude identifie le rôle potentiel de l'IL-16 dans les interactions entre lymphocytes T et lymphocytes B et suggère un rôle immunomodulateur de cette cytokine dans les réponses allergiques. L'IL-16 diminue la production d'IgE par les lymphocytes B et peut ainsi jouer un rôle protecteur dans la pathophysiologie de l'asthme et autres allergies.

Mots clés : IgE, lymphocytes B/T, CD4, atopie, asthme, allergies, IL-16

SUMMARY

Increased production of IgE is a hallmark of atopic asthma and allergic rhinitis. IgE mediates the pathogenesis of allergic asthma through a number of pathways. IgE initiates immediate hypersensitivity by triggering mast cell degranulation via FcεRI. Several animal and human studies show a correlation between the levels of IgE in asthmatic patients and the symptoms associated with this disease. The strong association between IgE and atopic asthma as well as the role of IgE in the hypersensitivity of the respiratory tract have driven efforts to define the cellular and molecular interactions that regulate its production. The production of IgE by B cells is highly regulated, requiring signals provided by CD4⁺ T cells to drive isotype switching to IgE. As such, CD4⁺ T cells synthesize IL-4 and IL-13, which stimulate germline Cε transcription. IL-16 acts specifically on CD4⁺ cells, causing such events as migration, induction of CD25 and regulation of the production of cytokines. Moreover, IL-16 is expressed at the sites of allergic inflammation and also at sites of IgE production. It was shown that IL-16 induces the expression of IFN-γ and decreases the expression of IL-5. The potential role of IL-16 in the regulation of IgE production by B lymphocytes is still unknown. Our project mainly aims at determining if IL-16 is involved in IgE production in atopic subjects.

Our results show that IL-16 decreases polyclonal IgE production by PBMC, in atopic patients. IL-16 also decreases the expression of the Cε transcript of the mRNA. Our study shows that the reduction of IgE production by IL-16 seems to be mediated by a pathway independent of IFN-γ.

This project provides novel information on the potential role of IL-16 in the interactions between B and T lymphocytes and points to the identification of mechanisms by which IL-16 modulates the development of allergic responses.

Key words : IgE, B/T lymphocytes, CD4, atopy, asthma, allergies, IL-16

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
RÉSUMÉ FRANÇAIS.....	iii
RÉSUMÉ ANGLAIS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiii

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. Allergies	1
2. Réponse immunitaire de type allergique	3
2.1. <i>Cellules T_H</i>	3
2.2. <i>Phase de sensibilisation</i>	5
2.3. <i>Phase effectrice</i>	6
3. IgE	10
3.1. <i>Caractéristiques générales</i>	10
3.2. <i>Récepteurs et induction de la réponse inflammatoire</i>	11
3.3. <i>Rôle des IgE dans l'inflammation allergique et l'asthme atopique</i>	13

4. Immunoglobuline	15
4.1. <i>Répertoire d'anticorps</i>	15
4.2. <i>Recombinaison</i>	17
4.3. <i>Commutation isotypique</i>	18
5. Régulation de la production des IgE	19
5.1. <i>Activation du lymphocyte B</i>	19
5.2. <i>Premier signal; IL-4/IL-13</i>	20
5.3. <i>Deuxième signal; CD40/CD40 ligand</i>	21
6. IL-16	23
6.1. <i>Caractéristiques générales</i>	23
6.2. <i>Cellules sécrétrices</i>	24
6.3. <i>Fonctions biologiques</i>	25
6.4. <i>IL-16 et inflammation</i>	28
6.5. <i>Rôle de l'IL-16 dans les interactions entre lymphocytes B et T</i>	32
7. Hypothèse	33
CHAPITRE II : RÉSULTATS	34
Article : « IL-16 INHIBITS IGE PRODUCTION BY B LYMPHOCYTES » ..	34
1. Abstract	35
2. Introduction	36
3. Materials and methods	38

4. Results.....	43
5. Discussion.....	45
6. References.....	49
7. Figure legend	54
CHAPITRE III : DISCUSSION	61
CHAPITRE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	66
BIBLIOGRAPHIE.....	67

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE :

Table 1 : Effects of rIL-16 and β -galactosidase on IgE production by anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC.....	56
---	----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION :

Figure 1 : Structure d'une IgE	10
Figure 2 : Activation d'un mastocyte par IgE et libération de médiateurs inflammatoires	12
Figure 3 : Organisation génomique des segments de gènes de la chaîne lourde et de la chaîne légère des immunoglobulines	16
Figure 4 : Évènements moléculaires impliqués lors du premier signal induisant la commutation isotypique vers IgE; IL-4/IL-13	20
Figure 5 : Évènements moléculaires impliqués lors du deuxième signal induisant la commutation isotypique vers IgE; ligation du CD40	22
Figure 6 : Structure de la molécule IL-16	24
Figure 7 : Signalisation intracellulaire induite suite à la liaison de l'IL-16 à son récepteur, le CD4, chez les lymphocytes T	26

ARTICLE :

Figure 1 : Effect of IL-16 on IgE production by PBMC of atopic donors stimulated with IL-4 and anti-CD40 mAb	57
Figure 2 : Time-course of IL-16-mediated inhibition of IgE production	58
Figure 3 : Effect of IL-16 on the expression of the Cε mRNA transcript	59

Figure 4 A: Effect of IL-16 on the expression of the IFN- γ mRNA transcript.....	60
4 B: Effect of anti-IFN- γ mAb on IL-16-mediated IgE production by stimulated PBMC.....	60

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APC	Cellule présentatrice d'antigène
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSAP	<i>B-lineage-specific activator protein</i>
CCR-	Récepteur de chimiokines de la famille CC
CD	Classe de différenciation
CD40L	Ligand du CD40
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
DC	Cellule dendritique
DH	Domaine diversité de la chaîne lourde des immunoglobulines
DR	Sous-classe DR du CMH de classe II
Fab	Fraction se liant à l'antigène (<i>Fragment antigen binding</i>)
Fc	Fraction cristallisable
FcεR	Récepteur de la région Fc de l'immunoglobuline E
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating facteur</i>
HLA	Antigène humain leucocytaire
IFN-	Interféron
Ig	Immunoglobuline

JAK	<i>Janus kinase</i>
JH	Domaine de jonction de la chaîne lourde des immunoglobulines
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
IL-	Interleukine
IL-4R	Récepteur de l'IL-4
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PKC	Protein kinase C
RAG-	<i>Recombination activating genes-</i>
RSS	<i>Recombination signal sequence</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction</i>
SCID	Déficit immunitaire combiné sévère
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCR	Récepteur antigénique des lymphocytes T
T _H	Lymphocytes T auxiliaires
TNF	Facteur de nécrose tumorale
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VH	Domaine variable de la chaîne lourde des immunoglobulines

REMERCIEMENTS

Merci à ma directrice de recherche, Dr Sophie Laberge, pour m'avoir permis de réaliser ce projet de maîtrise. Je la remercie pour son soutien et ses encouragements ainsi que pour la formation qui m'a permis d'écrire ces lignes.

Un grand merci au Dr José Menezes pour ses conseils et son soutien tout au long de mon travail.

Je remercie tous les donneurs atopiques du centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine, sans qui il m'aurait été impossible de réaliser mon projet de recherche. Merci énormément pour votre participation et votre collaboration.

Merci à mes collègues et amis, Stéphane Pinsonneault, Souad El Bassam, Roxanne Gendron et Jamila Ennaciri, pour leur aide technique précieuse ainsi que leur soutien moral, leur patience et leurs encouragements. Un grand merci à Oanh Lê pour son aide indispensable avec le PCR.

Enfin, je tiens à remercier mes amis qui m'ont soutenue et m'ont permis d'accomplir ce travail. Merci à Anne-Julie, Myriam, Isabelle, Geneviève, Nat, Julie, Marie-Julie et Émilie pour vos encouragements et votre confiance en moi. Un très grand merci à mes parents ainsi qu'à ma sœur Karine pour leur présence, leurs encouragements et leur soutien ainsi que pour leur continuelle confiance en moi qui m'a permis d'écrire ce mémoire. Merci infiniment !

CHAPITRE I: INTRODUCTION

L'IL-16 est une cytokine libérée par les PBMC suite à une stimulation antigénique et elle est fortement exprimée aux sites d'inflammation allergique. L'asthme et les maladies allergiques sont caractérisées par une inflammation allergique importante ainsi que par une production excessive d'IgE. Toutefois, la fonction de l'IL-16 sur la production d'IgE est encore inconnue. L'étude qui suit permet donc d'évaluer le rôle potentiel de l'IL-16 sur la production des IgE par les lymphocytes B.

1. Allergies

La réaction allergique à certains antigènes communs affecte une grande partie de la population mondiale et la prévalence des maladies allergiques ne cesse d'augmenter. Les allergies correspondent à une défaillance du système immunitaire qui peuvent dépendre de facteurs environnementaux autant que génétiques. Le terme *allergie* fut introduit par Von Pirquet en 1906 comme étant une réaction altérée suite à une stimulation antigénique qui peut causer soit une réponse protectrice (immunité), soit une réponse défavorable (hypersensibilité) ¹. Le terme *allergie* est maintenant défini comme une réaction défavorable d'hypersensibilité du système immunitaire dirigée contre des antigènes normalement inoffensifs. Il existe quatre types de réactions d'hypersensibilité médiées par le système immunitaire. Les types I–III impliquent l'action d'anticorps et se distinguent par les différentes classes d'anticorps impliquées. Les allergies sont définies comme réaction immédiate d'hypersensibilité

de type I, impliquant l'immunoglobuline E (IgE), tandis que les IgG génèrent des réactions de type II et III. La réaction de type IV est médiée par les cellules T et se divise en trois sous-groupes, selon le type de cellules effectrices impliquées (cellules T_{H1} , T_{H2} ou CTL) ¹.

L'IgE est reconnue comme étant un facteur important dans la génération de maladies et réactions allergiques ². Donc, dans une réaction de type I, la première rencontre entre la muqueuse et l'antigène génère des IgE spécifiques à l'antigène et cause ainsi une sensibilisation de l'individu ³. Par la suite, une nouvelle exposition à l'antigène cause une agrégation des IgE à la surface de leurs cellules cibles, les mastocytes, libérant ainsi une panoplie de médiateurs inflammatoires qui génèrent la réponse allergique. Certains individus sont plus susceptibles de développer des allergies. Le terme atopie réfère justement à cette prédisposition aux réactions d'hypersensibilité à certains allergènes communs, caractérisée par une synthèse élevée d'IgE spécifiques à l'allergène ³.

Les allergies associées aux IgE sont souvent causées par des protéines appelées allergènes. Les plus communes sont des protéines dérivées de parasites, des protéines alimentaires (caséine, arachide) ou des protéines provenant de végétaux (herbe à poux, pollen) et d'animaux (acariens). Il existe plusieurs manifestations cliniques des allergies, telles que l'asthme, la rhinite allergique et la dermatite atopique. Cette dernière manifestation cutanée de l'atopie est une maladie inflammatoire chronique de la peau provoquant des démangeaisons et des plaques. Aussi appelé eczéma, cette

maladie est de plus en plus répandue depuis la deuxième guerre mondiale et affecte maintenant près de 11 % des enfants mondialement ⁴. La plus fréquente manifestation clinique d'allergie est la rhinite allergique. Cette maladie est une inflammation de la muqueuse nasale causée par un allergène qui provoque des éternuements, de la congestion nasale et de la rhinorrhée. La rhinite allergique saisonnière, mieux connue sous le nom de rhume des foins, affecte environ 20 % de la population américaine ⁵. Finalement, l'asthme est un syndrome clinique affectant environ 155 millions d'individus mondialement. Des études épidémiologiques démontrent une augmentation de la morbidité et de la mortalité reliées à cette maladie dans les dernières décennies. Il s'agit d'une maladie respiratoire caractérisée par une obstruction aérienne variable, une inflammation chronique des voies aériennes ainsi qu'une hyperréactivité bronchique ^{5;6}. L'étiologie de cette maladie est très complexe et implique plusieurs facteurs génétiques ainsi qu'environnementaux ^{5;7}

2. Réponse immunitaire de type allergique

2.1 Cellules T_H

La réponse immunitaire de type allergique est orchestrée par des cellules effectrices nommées lymphocytes T auxillaires (T_H), exprimant les marqueurs de surface CD3 et CD4 ⁸. Il existe deux sous-types de cellules effectrices impliquées dans l'inflammation, soit les T_{H1} et les T_{H2}. Possédant des effets antagonistes, une réponse inflammatoire a tendance à être dominée par l'effet d'un des deux sous-types de

cellules. Les cellules T_{H1} et T_{H2} sont dérivées d'un même précurseur (T_{H0}) à la suite de différents stimuli et génèrent des profils de cytokines distincts⁹. Les cellules T_{H1} sécrètent de l'IL-2, de l'IFN- γ , du TNF- α et des lymphotoxines, induisant ainsi une réponse immunitaire contre les pathogènes intracellulaires. La réponse T_{H1} bloque la réponse IgE, l'IL-2 et l'IFN- γ agissant directement sur les lymphocytes B pour inhiber la synthèse d'IgE^{9;10}. À l'opposé, une réponse T_{H2} est induite suite à une infection par des pathogènes extracellulaires et possède un profil de cytokines distinct. En effet, les principales cytokines de type T_{H2} sont IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 et IL-13.⁹ Ce profil de type T_{H2} est également caractéristique de l'atopie ainsi que des maladies de type allergique, telles que l'asthme et la rhinite allergique, maladies associées à une augmentation de la production d'IgE. Ces cellules T_H effectrices agissent donc comme une boucle immunorégulatrice, les effets T_{H1} inhibant les T_{H2} et vice versa¹¹. Il semble qu'un déséquilibre entre les T_{H1} et T_{H2} soit à l'origine de l'inflammation allergique, les T_{H2} prédominant la réponse immune lors d'une diminution de l'effet inhibiteur de l'IFN- γ ¹¹. Les raisons de ce déséquilibre dans les maladies allergiques comme l'asthme ne sont pas très bien connues. Plusieurs études démontrent une augmentation du nombre de lymphocytes T_{H2} aux sites d'inflammation allergique chez des sujets atopiques^{12;13}. La participation des cellules T_{H2} dans l'inflammation allergique a également été démontré dans plusieurs modèles animaux. Par exemple, le transfert de cellules T_{H2} chez des souris naïves induit une infiltration d'éosinophiles dans les voies aériennes, une hypersécrétion de mucus et une hyperréactivité des voies respiratoires suite à une stimulation antigénique^{14;15}. Ce sont donc les cellules T_{H2} qui prédominent dans la pathophysiologie de l'asthme et les

cytokines libérées induisent l'inflammation allergique et la libération d'IgE. Les cellules CD4⁺ T_{H2} sont présentes dans les muqueuses respiratoires et tissus lymphoïdes des individus asthmatiques. Ces cellules étaient autrefois identifiées par leur profil de sécrétion de cytokines, notamment IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 et GM-CSF¹⁶. La preuve est désormais faite que ces cellules peuvent se distinguer par l'expression de molécules de surface qui pourrait contrôler leur migration aux sites inflammatoires lors de réactions allergiques. Par exemple, ces cellules expriment des récepteurs de chimiokines tel CCR3, CCR4, CRTH2 et CCR8, ainsi qu'un récepteur de la famille d'IL-1, T1/ST2¹⁷⁻²⁰. Les personnes allergiques ou asthmatiques montrent donc une tendance T_{H2} prédominante sur la réponse T_{H1}, en partie due aux facteurs génétiques et environnementaux mais aussi aux cytokines présentes dans le milieu. En effet, dans les muqueuses et les bronches de sujets asthmatiques se retrouvent plusieurs cellules sécrétrices d'IL-4, les mastocytes, les cellules NK 1.1⁺T et les cellules NK 1.1⁺ non-T, créant un environnement de cytokines favorable au développement d'un profil T_{H2}²¹. Ceci combiné à un haut taux d'IL-4 donne aux personnes allergiques ce phénotype T_{H2}.

2.2 Phase de sensibilisation

Tout d'abord, le développement d'une réaction allergique de type IgE nécessite un premier contact avec l'allergène, ce qui représente la phase de sensibilisation de l'individu. Cette sensibilisation des cellules T peut avoir lieu tôt dans la vie et peut même survenir *in utero*, lors d'un transport transplacentaire des allergènes auxquels la mère est exposée durant la grossesse²². La protéine traverse la barrière épithéliale et

est capturée par une cellule présentatrice d'antigène (APC) telle un macrophage ou une cellule dendritique (DC). Cette APC dégrade la protéine, achemine un peptide antigénique à sa surface via le CHM II et présente ce peptide aux cellules T CD4+ naïves, les T_{H0} ^{2;23}. Ce sont les cytokines présentes au moment de la présentation antigénique qui dirigent la différenciation des T_{H0} . En présence d'IL-4 dans l'environnement, ces dernières se différencient en cellules effectrices T_{H2} ²³. Cependant, la provenance de l'IL-4 *in vivo* au moment de la différenciation n'est pas très bien connue²⁴. Certaines études récentes semblent démontrer que les DC auraient un rôle primordial dans la différenciation des cellules T_H ^{25;26}. Dans un modèle *in vivo* de souris, les cellules dendritiques CD11c+/CD8 α + de la rate et des plaques de Peyer dans l'intestin, semblent induire un phénotype T_{H1} alors que les CD11c+/CD8 α - favorisent plutôt un profil T_{H2} ^{24;25}. Le même phénomène est observé chez les DC immatures des voies respiratoires de rat, qui induisent préférentiellement une réponse T_{H2} ²⁷. Donc, l'IL-4 présent dans le milieu semble suffisant, suivant l'activation du TCR par l'APC-peptide sur les lymphocytes T_{H0} , pour initier une réponse T_{H2} . Ces T_{H2} activées libèrent ensuite une quantité de cytokines, dont l'IL-4 et l'IL-13, qui agissent à leur tour sur les lymphocytes B, permettant leur différenciation en plasmocytes et la production d'IgE²⁴. Ces IgE se fixent ensuite aux cellules effectrices dans les tissus et en circulation, grâce à leur région Fc. Les cellules possédant le récepteur IgE de haute affinité Fc ϵ RI sont les mastocytes, les basophiles, les monocytes / macrophage, les éosinophiles ainsi que les cellules dendritiques^{2;28-30}. Ces IgE sont donc spécifiques à cet allergène et l'individu est sensibilisé, ce qui permet une réaction allergique rapide lors de la phase effectrice, suivant une

deuxième rencontre avec l'allergène ²³.

2.3 Phase effectrice

Les modèles expérimentaux ont permis d'identifier deux étapes lors de la réponse immunitaire allergique, soit la phase précoce, dans les minutes suivant la rencontre avec l'allergène, et la phase tardive, dans les heures qui suivent. La phase tardive peut se poursuivre quelques jours et même persister plusieurs années, causant ainsi une inflammation chronique ². Dans le cas de l'asthme allergique plus précisément, l'allergène pénètre dans les voies respiratoires et traverse la barrière épithéliale pour atteindre les mastocytes précédemment sensibilisés. L'antigène se fixe sur les IgE qui y sont spécifiques et induit ainsi l'activation des mastocytes résidant dans les voies respiratoires. Cette réticulation des IgE induit la libération immédiate de médiateurs préformés comme l'histamine, des protéases et des leukotriènes, ainsi que la synthèse de molécules proinflammatoires tels le PAF et plusieurs cytokines (IL-3, IL-4, IL-5, TNF- α , GM-CSF) ²³. Les médiateurs préformés sont directement responsables des effets immédiats de la phase précoce, soit une augmentation de la perméabilité vasculaire, de la vasodilatation, une augmentation de la production de mucus et la constriction des bronches. Les leukotriènes agissent comme facteurs chimiotactiques pour les cellules éosinophiles, lesquelles sont d'importantes cellules effectrices lors de la phase tardive ³¹. Dans la rhinite allergique, l'œdème de la muqueuse nasale est aussi attribué aux leukotriènes, et se traduit par des symptômes de congestion et de rhinorrhée ²³. Cette phase précoce est déclenchée dans les secondes suivant la réticulation des IgE fixées aux mastocytes et l'effet est observable

dans les minutes qui suivent. Les mastocytes expriment environ 300 000 récepteurs de hautes affinités pour IgE, mais l'agrégation de seulement 100 récepteurs est suffisante afin d'amorcer une réponse ³².

Dans les heures qui suivent, on observe une infiltration de cellules immunitaires inflammatoires qui représente la phase tardive. Les éosinophiles, basophiles et lymphocytes s'accumulent dans les voies respiratoires, y compris dans les sous-muqueuses, dans l'épithélium ainsi que dans la lumière des voies aériennes ^{28;33-35}. Cette phase tardive semble se produire lors de l'atténuation de la phase précoce, prolongeant ainsi l'action des médiateurs des mastocytes. Cliniquement, cette phase tardive est caractérisée par une deuxième vague d'obstruction aérienne causée par la congestion, l'œdème et la surproduction de mucus, la présence d'une infiltration éosinophilique et le développement d'une hyperréactivité bronchique ^{23;31}. L'accumulation d'éosinophiles semble responsable de ces manifestations, par la libération, de leukotriènes, de cytokines et de plusieurs polypeptides basiques, tel que des *major basic protein* (MBP), *eosinophil cationic protein* (ECP), *eosinophil-derived neurotoxines* (EDN) et *eosinophil peroxidase* (EPO) ^{34;36}. Ces médiateurs inflammatoires sont également responsables des changements structuraux de la paroi bronchique (remodelage) causés par les éosinophiles ⁸. L'accumulation et l'activation des éosinophiles dans les voies aériennes sont contrôlées par l'expression des molécules d'adhésions spécifiques à la surface des cellules endothéliales bronchiques ainsi que par la production de cytokines et de facteurs de chimiotactisme ⁸. Parmi ces cytokines, l'IL-5 est particulièrement importante, car elle est essentielle à

l'accumulation d'éosinophiles ainsi qu'au développement de l'hyperréactivité bronchique. En effet, l'infiltration éosinophilique est réduite de façon importante chez un modèle de souris IL-5^{-/-} ³⁷. De plus, des études démontrent que les mastocytes activés par les IgE dans la phase précoce participent au développement de la phase tardive. Il semble que les cytokines et chimiokines libérées par les mastocytes lors de la phase précoce soient impliquées dans l'élaboration de la phase tardive ¹³. En effet, l'infiltration éosinophilique durant la phase tardive en réponse à l'allergène est réduite chez les souris mastocytes^{-/-}, en comparaison avec les souris de type sauvage ³⁸⁻⁴⁰. De plus, chez l'humain, des études immunohistochimiques de biopsies endobronchiques de patients asthmatiques suggèrent que les mastocytes peuvent maintenir ou accentuer l'infiltration d'éosinophiles par une expression accrue d'IL-4, contribuant ainsi à accentuer le profil T_{H2} de la réponse inflammatoire ⁴¹.

La persistance de la phase tardive sous forme d'inflammation chronique cause des changements importants à long terme dans les tissus sous-jacents ². Cette inflammation chronique est persistante dans les pathologies allergiques telles l'asthme allergique, la rhinite allergique et la dermatite atopique. Ce phénomène se produit aux sites en contact répétitif avec un allergène pouvant durer de quelques semaines à plusieurs années. Ces sites inflammatoires sont caractérisés par une grande quantité de cellules effectrices, ainsi qu'une infiltration d'éosinophiles et de cellules T, la plupart de phénotype T_{H2} ². On observe également des changements structuraux persistants des tissus ainsi qu'une modification de leur fonction. Par exemple, dans l'asthme allergique, on observe une inflammation bronchoalvéolaire,

ainsi qu'une inflammation des tissus périphériques⁴². Toutes les cellules des voies respiratoires deviennent activées, mais ce sont les éosinophiles qui sont principalement responsables de l'inflammation des voies aériennes. Les médiateurs inflammatoires ainsi que les cytokines libérées par les éosinophiles contribuent à la perméabilité vasculaire, la sécrétion de mucus, la contraction du muscle lisse bronchique, la desquamation de l'épithélium ainsi que l'hyperréactivité bronchique observés chez les asthmatiques⁴³⁻⁴⁷. L'infiltration de cellules inflammatoires observée lors de l'inflammation chronique correspond aux cellules responsables de la phase tardive de la réponse inflammatoire de type allergique. Il est donc possible que l'inflammation chronique soit le résultat de plusieurs phases tardives qui se chevauchent, causées par une provocation allergénique persistante ou répétitive².

3. IgE

3.1 Caractéristiques générales

L'immunoglobuline E (IgE) possède une masse moléculaire de 190 kDa et représente l'anticorps responsable de la réponse immunitaire allergique. Elle possède 2 chaînes légères et deux chaînes lourdes (Fig. 1), tout comme les autres isotypes d'immunoglobulines, mais elle est caractérisée par l'expression de la chaîne lourde ϵ , composée de 4 domaines C ϵ . Comparativement aux autres isotypes, les IgE se retrouvent en faible concentration dans le sang (0-0,0001g/L), équivalent à 0,004 % des Ig totaux dans le sérum. Les IgE possèdent une très courte demi-vie dans le sang périphérique, environ 1-5 jours, et ne peuvent pas traverser la barrière placentaire⁴⁸.

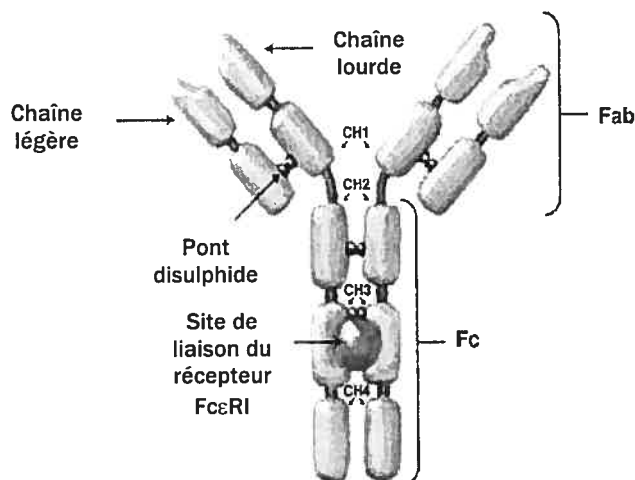


Fig. 1 : Structure d'une IgE. Fab : Fraction se liant à l'antigène; Fc : Fraction cristallisable. IgE possède 2 chaînes légères et deux chaînes lourdes et est caractérisée par l'expression de la chaîne lourde ϵ , composée de 4 domaines $C\epsilon$ (CH). Figure modifiée de Schulman, E.S. 2001. *Development of a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders. Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164;8(Pt2):S6-11.

3.2 Récepteurs et induction de la réponse inflammatoire

Il existe deux récepteurs de différentes affinités pour les IgE. Le CD23 (Fc ϵ RII), récepteur de basse affinité, se retrouve principalement sur les cellules B⁴⁸, mais aussi sur les plaquettes, les macrophages, les monocytes, les éosinophiles et les cellules de Langerhans⁴⁹. Le CD23 est une protéine membranaire intégrale de type II, possédant un domaine carboxy-terminal extracellulaire, homologue à la famille des lectines animales de type C. Il s'agit du seul récepteur Fc qui n'appartient pas à la superfamille des immunoglobulines⁵⁰. Le récepteur spécifique de haute affinité pour l'IgE, le Fc ϵ RI, est exprimé à la surface des mastocytes, des basophiles, des monocytes, des cellules dendritiques et des éosinophiles⁴⁸. Lors d'une réaction d'hypersensibilité de type I, l'allergène polyvalent vient se fixer aux IgE, provoquant

ainsi la réticulation des IgE à la surface des mastocytes et l'activation subséquente de ces cellules. Les mastocytes libèrent alors des médiateurs vasoactifs préformés qui induisent la transcription de cytokines et amorcent la synthèse de prostaglandines et leucotriènes *de novo* (Fig. 2).

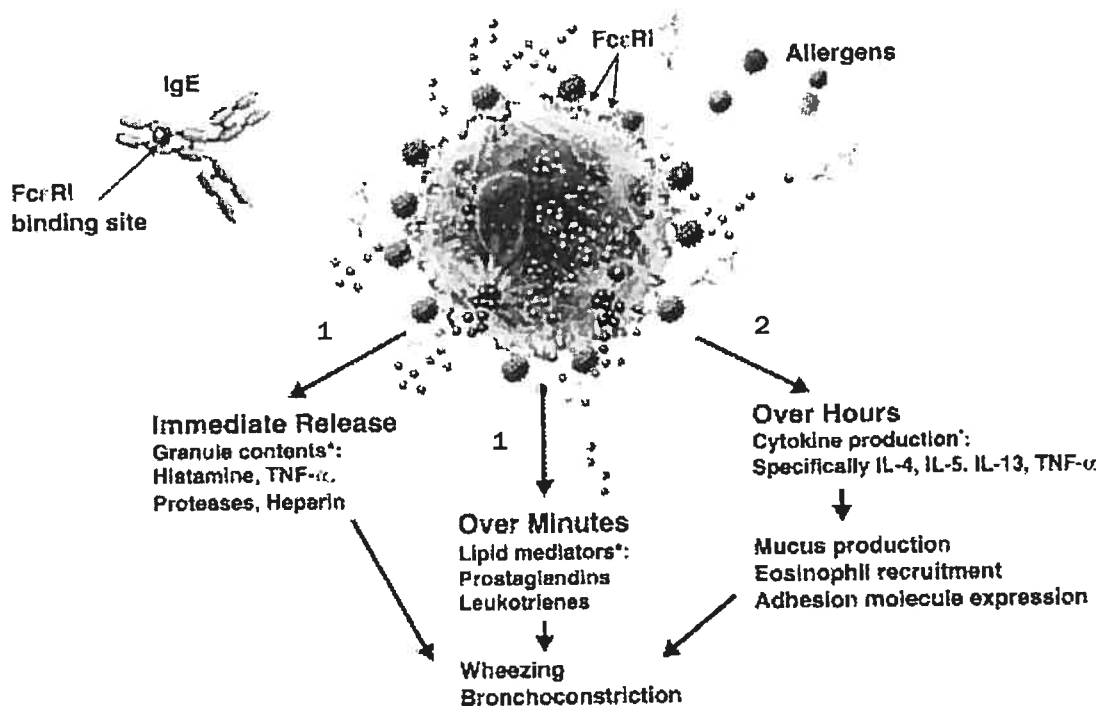


Fig. 2 : Activation d'un mastocyte par IgE et libération de médiateurs inflammatoires. Suite à la réticulation des IgE à surface des mastocytes, ces derniers libèrent différents médiateurs vasoactifs et induisent la formation de prostaglandins, leucotriènes ainsi que plusieurs cytokines. 1 : Phase précoce de la réaction allergique; 2 : Phase tardive de la réaction allergique. Figure modifiée de Schulman, E.S. 2001. *Development of a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders. Am.J.Respir. Crit Care Med.* 164;8(Pt2):S6-11.

Ceci constitue la phase précoce de la réaction allergique et est la cause des symptômes cliniques immédiats suite à l'exposition à l'allergène des sujets sensibilisés ²¹. Lorsque les niveaux d'IgE deviennent assez élevés, ces derniers peuvent se fixer au CD23, le récepteur de faible affinité, facilitant ainsi la liaison des allergènes aux cellules B. Il en résulte, d'une part, une augmentation de la maturation

cellulaire et, d'autre part, une augmentation de la présentation antigénique aux cellules T. Ceci a pour conséquence d'augmenter la production d'IL-4 et IL-13 par les cellules T et d'amplifier la réponse IgE^{9;51}. Cependant, à un stade plus avancé dans le développement de la réponse allergique, l'augmentation d'IL-4 induit l'expression du CD23. La sur-expression du CD23 combinée à un excès d'IgE et d'antigènes provoque l'hyperstimulation du récepteur, suscitant un signal inhibiteur qui bloque alors l'effet de la surproduction d'IgE observé durant la phase effectrice⁵².

Les IgE ont donc un rôle important à jouer dans l'induction de la réponse inflammatoire allergique. En effet, les IgE causent l'activation des mastocytes (FcεRI) et facilitent la capture des allergènes (CD23). De plus, les IgE sont des régulateurs positifs pour l'expression de leurs 2 récepteurs. Des souris IgE^{-/-} montrent une baisse marquée du CD23 et du FcεRI à la surface des cellules^{53;54}. Dans ce modèle, l'ajout d'IgE *in vivo* et *in vitro* induit une augmentation de l'expression des deux récepteurs d'IgE, confirmant le rôle important des IgE dans l'expression de ces deux récepteurs. Cette rétroaction positive est donc un moyen d'amplification de la réponse allergique.

3.3 Rôle des IgE dans l'inflammation allergique et l'asthme atopique

Plusieurs études animales et humaines ont exploré le rôle des IgE dans la physiopathologie de l'asthme et le développement de la réponse inflammatoire allergique. Chez l'humain, diverses études génétiques ont démontré une proximité des gènes impliqués dans la production des IgE et de l'hyperréactivité bronchique qui est

associée à une transmission commune chez des sujets asthmatiques ⁵⁵. Par ailleurs, des études épidémiologiques ont démontré une association entre les taux d'IgE sériques chez des enfants en bas âge et le risque de développer de l'asthme ou d'autres types d'allergies. En effet, les enfants possédant de hauts niveaux d'IgE circulants durant leur première année de vie, conservent un taux élevé d'IgE à un âge ultérieur (évalué à 6 et 11 ans) et développent une sensibilisation précoce à des allergènes communs associée à de l'obstruction aérienne récurrente ⁵⁶. Le groupe de M. Sears et al. a démontré une association entre des taux élevés d'IgE et la prévalence d'asthme, d'une part, et le degré d'hyperréactivité bronchique chez des enfants avec ou sans symptômes d'asthme ou d'autres manifestations allergiques, d'autre part ^{57,58}. Finalement, certains groupes ont évalué l'effet d'un traitement anti-IgE chez des patients asthmatiques, utilisant un anticorps monoclonal (recombinant humain) anti-IgE développé dans un but thérapeutique ⁵⁹⁻⁶³. L'anticorps s'attache aux IgE libres dans le sérum, au site de liaison du récepteur FcεRI, bloquant ainsi la réticulation du récepteur et la libération subséquente de médiateurs inflammatoires. Ce traitement induit une baisse des taux sériques d'IgE, une diminution des symptômes d'asthme ainsi qu'une diminution du nombre d'exacerbations d'asthme. Les IgE semblent donc jouer un rôle crucial dans la physiopathologie de l'asthme et des allergies.

Le développement de modèles murins d'asthme a facilité l'investigation du rôle des IgE dans l'asthme, évaluant la contribution des IgE dans la réponse inflammatoire des voies respiratoires ainsi que dans l'hyperréactivité bronchique. Oshiba et al. ont démontré qu'une sensibilisation passive par le transfert d'IgE anti-ovalbumine chez

des souris BALB/c induit une inflammation des voies respiratoires de type éosinophilique et une hyperréactivité bronchique suite à une provocation avec de l'ovalbumine en aérosol ⁶⁴. D'autre part, l'administration d'anti-IgE chez des souris sensibilisées inhibe l'infiltration des éosinophiles dans les voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique en réponse à l'allergène ⁶⁵. Toutefois, il est possible que l'infiltration éosinophilique ainsi que le développement de l'hyperréactivité bronchique dans certains modèles murins soient induites par des mécanismes indépendants des IgE. En effet, la sensibilisation à l'ovalbumine de souris déficientes en cellules B ($\mu\text{Mt}^{-/-}$ B10.BR) induit une infiltration d'éosinophiles et l'expression d'IL-5 dans les voies aériennes comparables à celles observées chez les souris de type sauvage, sans toutefois entraîner une hyperréactivité bronchique subséquente ⁶⁶. Le transfert passif d'IgE anti-ovalbumine lors de la sensibilisation chez ces souris déficientes en lymphocytes B rétablit l'hyperréactivité bronchique, suggérant que les IgE soient essentiels au développement d'une hyperréactivité bronchique dans ce modèle. Toutefois, MacLean et al. ont démontré que les cellules B ne sont pas essentielles au développement de l'hyperréactivité bronchique dans un autre modèle murin d'asthme ⁶⁷. De plus, il est possible d'induire une hyperréactivité bronchique et une éosinophilie pulmonaire suite à une exposition répétée à l'allergène chez des souris $\text{IgE}^{-/-}$ sensibilisées à *Aspergillus fumigatus* ⁶⁸. Les résultats de ces différentes études n'excluent pas la contribution des IgE dans le développement de la réponse inflammatoire de type allergique dans l'asthme. Toutefois, ces études suggèrent l'existence de mécanismes parallèles indépendants de la voie classique des IgE dans la génération d'une réponse des voies aériennes suivant l'exposition à un allergène.

La production d'IgE est hautement régulée et nécessite plusieurs évènements moléculaires.

4. Immunoglobuline

4.1 Répertoire d'anticorps

Les anticorps forment une famille de protéines plasmatiques appelées immunoglobulines. Il y a 5 isotypes d'Ig, les IgM, IgD, IgG, IgA et IgE, ayant chacun une fonction spécifique. Chaque Ig possède deux chaînes légères et deux chaînes lourdes, encodées par différents groupes de gènes. Le groupe de gènes de la chaîne légère lambda (λ) se retrouve sur le chromosome humain 22 et la chaîne légère kappa (κ), sur le chromosome humain 2. Le locus de la chaîne lourde se retrouve sur le chromosome humain 14⁶⁹ (Fig. 3).

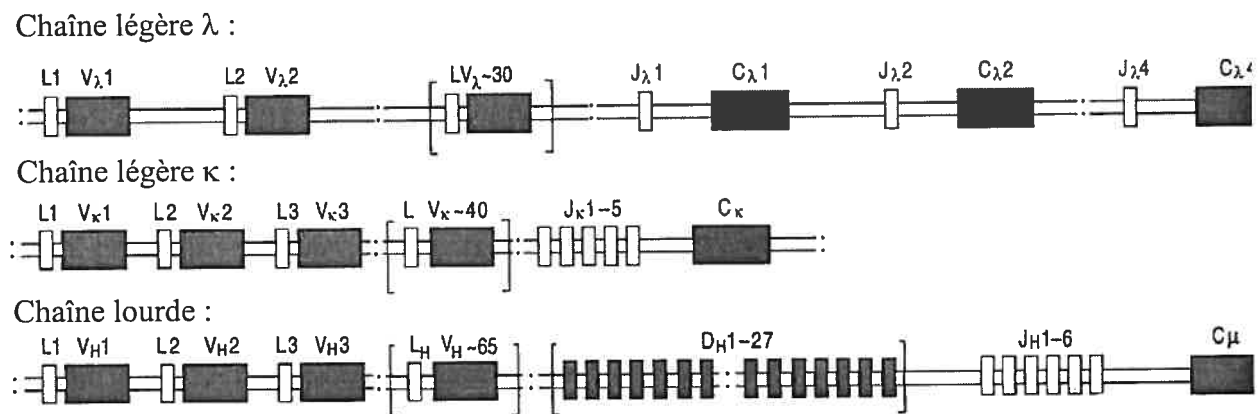


Fig. 3 : Organisation génomique des segments de gènes de la chaîne lourde et de la chaîne légère des immunoglobulines. Chaque Ig est composé d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde. Le groupe de gènes de la chaîne légère lambda (λ) se retrouve sur le chromosome humain 22 et la chaîne légère kappa (κ), sur le chromosome humain 2. Le locus de la chaîne lourde se retrouve sur le chromosome humain 14. La diversité des Ig est possible suite à la recombinaison entre les différents groupes de gènes de chaque chaîne. Figure modifiée de Janeway, CA Jr and Travers, P. *Immunobiology: The immune system in health and disease. Chapter 3. 1997. New York, Garland.*

Il existe un vaste répertoire de spécificités possibles lors de la formation d'immunoglobulines. Chaque chaîne comprend différents domaines qui peuvent s'assembler selon diverses combinaisons afin de créer une spécificité unique chez cette Ig. Chaque chaîne est composée d'une région variable, qui donne la spécificité à l'anticorps, et d'une région constante. C'est la région constante de la chaîne lourde qui détermine quel isotype est formé ⁷⁰. Les chaînes λ et κ sont deux familles de chaînes légères et peuvent se retrouver de façon aléatoire dans n'importe quel anticorps. Elles contiennent deux sortes de segments de gènes, un domaine variable ($V\lambda$ ou $V\kappa$) et un domaine J (*joining*) ($J\lambda$ ou $J\kappa$). Cette région variable est générée par recombinaison somatique entre un segment de chaque partie de gènes. La région variable de la chaîne lourde, abrégé H, comprend trois parties de gène, VH, JH et un troisième segment appelé diversité (DH). Il existe environ 51 VH, 27 DH et 6 JH, mais un seul segment de chaque partie de gène s'assemblent pour former une séquence VH-DH-JH qui compose la région variable de cette chaîne lourde (H) en particulier ^{1;70}. La diversité des chaînes des immunoglobulines est produite par un phénomène appelé recombinaison.

4.2 Recombinaison

Le mécanisme de recombinaison est le même pour les deux chaînes, mais nécessite une étapes supplémentaire dans le cas de la chaîne lourde. Cette recombinaison VDJ s'effectue à l'aide de deux enzymes, *RAG-1* et *RAG-2*, qui reconnaissent des séquences conservées sur l'ADN bordant les segments de gènes V, D et J, appelées séquence signal de recombinaison (*recombination signal sequence, RSS*). Ces

séquences non-codantes consistent en une séquence de 7 nucléotides (heptamère) et une séquence de 9 nucléotides (nonamère) séparées par une séquence d'espacement de 12 ou 23 nucléotides. La recombinaison entre deux régions d'ADN s'effectue uniquement selon la règle 12/23. Un segment $V\lambda$ par exemple, possédant une séquence d'espacement de 12 nucléotides peut seulement se joindre à un $J\kappa$ ayant une séquence d'espacement de 23 nucléotides, formant ainsi une boucle d'ADN qui doit être éliminée. À la suite de ce rapprochement, les enzymes *RAG-1* et *RAG-2* coupent l'ADN à ce niveau et libèrent un intron d'ADN circulaire. Les deux segments sont liés par un complexe enzymatique, formant ainsi l'exon $V\lambda$ (VJ)^{1;70}. L'étape *RAG-1/RAG-2* est essentielle au processus de recombinaison. En effet, des souris modifiées génétiquement pour induire une déficience en *RAG-1/RAG-2* sont incapables d'initier la recombinaison VDJ et d'amorcer le réarrangement de leurs gènes d'Ig^{71;72}. Pour le réarrangement de la chaîne lourde, il y a un premier événement de recombinaison aléatoire entre les segments DH et JH, complexe qui s'uni par la suite avec le segment VH dans un deuxième événement de recombinaison, formant l'exon complet VH (VDJ). L'exon V de chaque cellule B est réarrangé lors de sa différenciation précoce dans la moelle osseuse. Par la suite, aucun réarrangement n'est possible et toutes les cellules dérivées de cette cellule B exprimeront la même région variable et posséderont la même spécificité antigénique. Cependant, l'expression de différentes régions constantes dans une cellule B peut changer chez ses cellules descendantes, lors de leur maturation et de leur prolifération dans le contexte d'une réponse immunitaire¹. Ce phénomène de changement d'expression de chaînes constantes se nomme commutation isotypique.

4.3 Commutation isotypique

Chaque immunoglobuline possède son propre domaine constant, désigné selon l'alphabet grec. Les domaines constants $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma$, $C\epsilon$ et $C\alpha$ vont former les IgM, IgD, IgGs, IgE et IgAs respectivement. En 3' de la région JH du gène de la chaîne lourde se trouve l'ensemble des domaines constants ci-haut mentionné. Chaque région C est séparée en différents exons, le premier rencontré étant $C\mu$. IgM sera donc la première Ig à être exprimée et les IgM sont les premières immunoglobulines libérées lors d'une réponse immunitaire. En absence de signal et de commutation isotypique, la transcription complète de la chaîne lourde μ est exprimée, la région comprise entre JH et $C\mu$ étant éliminée lors de la maturation de l'ARN. L'ARN est ensuite traduit et il y a expression du polypeptide. Chaque domaine constant possède, en 5' de la région codante, une série de répétitions des séquences GAGCT et GGGGT nommé région S, à l'exception de $C\delta$ ⁷³. C'est cette séquence qui est responsable de la transition d'expression vers un autre isotype d'Ig. Le domaine constant de IgD ($C\delta$) se situe immédiatement après $C\mu$, et est donc co-exprimé avec IgM, en absence de signal. À la suite de l'activation des cellules B par un antigène, les cytokines libérées par les cellules T dirigent la commutation isotypique et induisent ainsi la production des autres classes d'anticorps. Dans le cas d'IgE, et en présence du bon signal, il y a recombinaison entre $S\mu$ et la $S\epsilon$, avec délétion de la séquence d'ADN entre les deux. Par la suite, la transcription de la séquence réarrangée d'ADN est suivie de l'épissage des introns et de la translation des ARNm en polypeptides constituant la chaîne lourde IgE^{1;69}. La production d'IgE par les lymphocytes B nécessite deux signaux et sera décrite dans la prochaine section.

5. Régulation de la production des IgE

5.1 *Activation du lymphocyte B*

La production d'IgE amorcée suite à l'activation des lymphocytes B par un antigène nécessite deux signaux. Tout d'abord, le lymphocyte B rencontre un allergène qui s'attache à un IgM à la surface de la cellule B, et l'allergène est internalisé. Par la suite, le lymphocyte B présente le peptide antigénique par le CMH de classe II (HLA) au TCR, sur le lymphocyte T, activant ainsi le lymphocyte T. Cette activation induit l'expression du CD40L à sa surface se lie à son récepteur CD40 à la surface du lymphocyte B. Conséquemment, il y a une augmentation de l'expression de CD80 (B7) à la surface du lymphocyte B et l'engagement de son ligand CD28 sur le lymphocyte T. Ce signal de co-stimulation combiné à la liaison du TCR induit la prolifération du lymphocyte T ainsi que la libération de cytokines, notamment IL-4 et IL-13. L'IL-4 sécrétée induit l'activation du lymphocyte B et la production subséquente d'IgE^{69;74}. La cellule B nécessite donc deux signaux pour induire la production d'IgE, soit l'IL-4/IL-13 ainsi que la liaison CD40/ CD40 ligand.

5.2 *Premier signal : IL-4/IL-13*

La libération d'IL-4 représente le premier signal induisant la commutation isotypique permettant la production des IgE. L'interaction IL-4/IL-4R induit la transcription de l'ARN C ϵ , produisant le transcrite germinale ϵ de 1,8 kb⁷⁵ (Fig. 4).

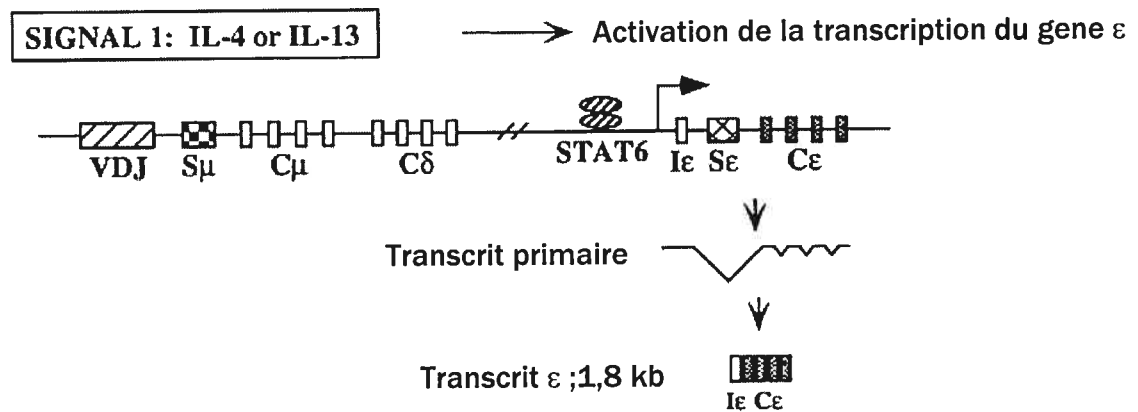


Fig. 4 : Évènements moléculaires impliqués lors du premier signal induisant la commutation isotypique vers IgE; IL-4/IL-13. L'interaction IL-4/IL-4R induit la transcription de l'ARN $C\epsilon$, produisant le transcrit germinale ϵ de 1,8 kb. Modifiée de Bacharier, L. B. and R. S. Geha. 2000. *Molecular mechanisms of IgE regulation. J.Allergy Clin.Immunol 105:S547-S558.*

Cette production d'IgE est dépendante d'IL-4, comme l'a observé Del Prete et al., et elle est inhibée par l'IFN- γ ⁷⁶. L'IL-13 est aussi une cytokine pouvant induire la production d'IgE, l'IL-4 et l'IL-13 recombinantes étant les deux seules cytokines pouvant induire la synthèse d'IgE in vitro⁷⁷. Cependant, l'IL-13 semble être moins efficace que l'IL-4⁷⁸. Le rôle primordial de l'IL-4 est illustré par l'absence d'IgE détectable chez des souris possédant une mutation inactivant le gène de l'IL-4⁷⁹ ainsi que par l'inhibition de la production d'IgE en présence d'anti-IL-4^{76;80}. L'IL-4 et l'IL-13 induisent la production d'IgE en ciblant le promoteur I ϵ pour induire la transcription de l'ARNm C ϵ ⁷⁵. Le promoteur ϵ possède plusieurs séquences activatrices pour des facteurs de transcription, par exemple STAT6^{81;82}, NF κ B^{83;84} et la protéine d'activation spécifique des cellules B, BSAP⁸⁵. IL-4 et IL-13 induisent l'activation de JAK1 alors que seule IL-4 active JAK3. Les protéines JAK1 et JAK3 semblent être essentielles à la transcription du gène C ϵ puisque cette transcription est

inhibée en présence d'inhibiteurs de protéine kinases chez des cellules B activées par IL-4/CD40^{86;87}. JAK1 et JAK3 activent les dimères STAT6, qui induisent à leur tour la transcription de C ϵ ⁸⁸. Il a été démontré que les souris STAT6^{-/-} ne répondent pas à l'IL-4 et possèdent de bas niveaux sériques d'IgE^{89;90}.

5.3 Deuxième signal : CD40/CD40 ligand

Le deuxième signal induisant la production d'IgE est donné par l'interaction CD40/CD40L. Le CD40L est une glycoprotéine membranaire de 39 kd qui est exprimée à la surface des cellules T activées⁹¹. Son récepteur, le CD40, est une glycoprotéine intégrale membranaire de 50 kd, membre de la famille des récepteurs TNF. Le CD40 est exprimé de façon constitutive à la surface des cellules B, des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules endothéliales^{91;92}. L'engagement du CD40 et de son ligand induit la recombinaison entre S μ et S ϵ , avec la délétion de la boucle d'ADN entre les deux. La transcription suivie de l'épissage produit l'ARNm qui code pour la molécule d'IgE, exprimée par cette cellule B⁶⁹ (Fig. 5). L'importance de cette interaction CD40/CD40L a été démontrée par plusieurs études. Par exemple, la stimulation du CD40 par l'ajout d'anticorps monoclonaux anti-CD40 *in vitro* permet une commutation vers la production d'IgE par la cellule B en absence de cellule T⁹³. L'utilisation de CD40 humain soluble *in vitro* inhibe la production IL-4-dépendante d'IgE dans un système cellule T-dépendant⁹⁴. De plus, les patients atteints du syndrome hyper-IgM lié au chromosome X (X-HIM) ont une absence d'IgE, IgA et IgG. Ces patients ont une déficience marquée du processus de commutation isotypique *in vivo*, causée par une

anomalie du gène codant pour le CD40 ligand ⁹⁵.

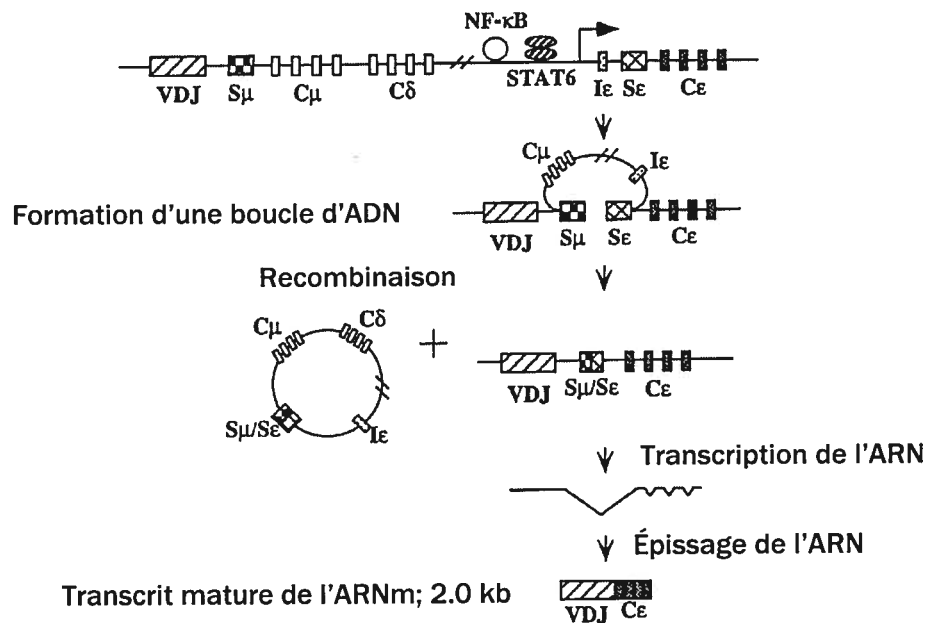


Fig. 5 : Évènements moléculaires impliqués lors du deuxième signal induisant la commutation isotypique vers IgE; ligation du CD40. L'engagement du CD40 et de son ligand induit la recombinaison entre S μ et S ϵ , avec la délétion de la boucle d'ADN entre les deux. La transcription suivie de l'épissage produit l'ARNm qui code pour la molécule d'IgE, exprimée par cette cellule B. Modifiée de Bacharier, L. B. and R. S. Geha. 2000. *Molecular mechanisms of IgE regulation. J. Allergy Clin. Immunol* 105:S547-S558.

6. IL-16

6.1 Caractéristiques générales

L'interleukine 16 (IL-16) est une cytokine qui a été identifiée et caractérisée pour la première fois en 1982 par l'équipe de D.M. Center ^{109;110}. Cette cytokine, libérée par les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à la suite d'une stimulation antigénique ou à l'aide d'un mitogène fut l'une des premières cytokines caractérisée

par sa capacité d'induire le chimiotactisme des lymphocytes T CD4⁺. Pour cette raison, l'IL-16 fût initialement nommée *lymphocyte chemoattractant factor* (LCF)^{96;97}. Depuis que la protéine a été clonée en 1994, la structure et les fonctions biologiques de cette molécule dans les réponses immunes normales et pathologiques ont fait l'objet de plusieurs études⁹⁸. Des études ont démontré que l'IL-16 agit comme une cytokine immunomodulatrice, impliquée dans plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes, ainsi que dans le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA)⁹⁹⁻¹⁰¹.

L'interleukine 16 ne possède aucune homologie avec les membres des différentes familles de cytokines déjà caractérisées¹⁰². Le gène de l'IL-16 se retrouve sur le chromosome 15q26.1 chez l'humain¹⁰³ et correspond à un seul ARNm de 2,6 kb, identifié suite à un buvardage par Northern¹⁰⁴. L'IL-16 est synthétisée sous forme d'une molécule précurseur, pro-IL-16, composée de 631 acides aminés et migre autour de 80 kDa sur un gel SDS-PAGE¹⁰⁴. La molécule pro-IL-16 subit un clivage post-translational par la caspase 3 au niveau du résidu d'acide aspartique 510, libérant la partie carboxy-terminale de la protéine^{104;105}. Ce peptide d'environ 130 acides aminés représente la forme monomère sécrétée et migre autour de 14-17 kDa¹⁰⁶ (Fig. 6). Les monomères d'IL-16 se regroupent en homotétramère (56 kDa) pour former la forme biologiquement active de la cytokine^{96;97}.

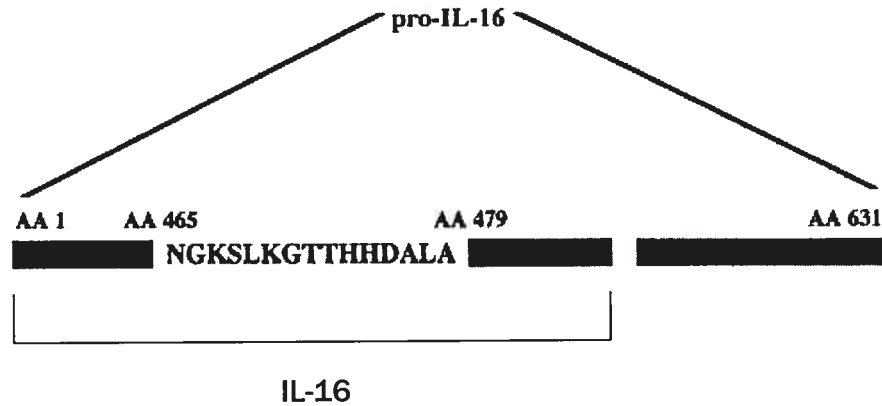


Fig. 6 : Structure de la molécule IL-16. La molécule pro-IL-16 subit un clivage à l'acide aspartique 510 pour former une molécule de 130 acides aminés, qui représente la forme active de la cytokine. Figure modifiée de Chupp, G. L., E. A. Wright, D. Wu, M. Vallen-Mashikian, W. W. Cruikshank, D. M. Center, H. Kornfeld, and J. S. Berman. 1998. *Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. J.Immunol* 161:3114-3119.

6.2 Cellules sécrétrices

Plusieurs types cellulaires représentent une source potentielle d'IL-16. L'IL-16 est synthétisée de façon constitutive par les cellules CD8⁺ et CD4⁺, ce qui représente un pool important de pro-IL-16 inactive^{107;108}. Cependant, seules les cellules T CD8⁺ peuvent emmagasiner la cytokine sous sa forme active. Les CD4⁺ sécrètent la forme active de l'IL-16 suite à leur activation par un anticorps anti-CD3¹⁰⁷. Les CD8⁺ libèrent l'IL-16 à la suite d'une stimulation par l'histamine et la sérotonine^{106;108;109}. Les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sécrètent également l'IL-16 suite à une stimulation par un antigène ou un mitogène. L'IL-16 est aussi produite par les cellules B, les éosinophiles, les mastocytes, les cellules épithéliales bronchiques, les kératinocytes, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, les fibroblastes ainsi que les cellules synoviales^{101;106;110-115}. Au niveau tissulaire, la distribution de l'ARNm de l'IL-16 a été évaluée par buvardage par Northern. En absence de maladie, l'ARNm

est exprimée principalement dans les organes lymphoïdes, tels que la rate, le thymus ainsi que les leukocytes du sang périphérique ¹⁰⁷. L'identification de la protéine au niveau des tissus lymphoïdes périphériques par immunohistochimie a démontré que L'IL-16 est détectée dans la majorité des lymphocytes de la zone riche en cellules T des ganglions lymphatiques. Très peu de cellules IL-16 immuno-réactives sont observées dans les follicules, zone où prédominent les cellules B ^{107;116}. L'IL-16 est aussi fortement exprimée dans les follicules amygdaliens ¹¹⁶.

6.3 Fonctions biologiques

Chez les lymphocytes T, l'IL-16 exerce ses fonctions biologiques suite à une interaction avec le récepteur CD4. En fait, l'IL-16 est le ligand naturel pour l'antigène de surface CD4. L'évidence la plus convaincante de l'interaction IL-16/CD4 provient d'une étude utilisant des hybridomes de cellule T murins, transfectés avec du cDNA pour le CD4 humain. L'expression du CD4 dans ces hybridomes confère une réponse médiée par l'IL-16 dans ces cellules normalement non réceptives à l'IL-16. Cet effet se traduit par l'induction de signalisation par des messagers secondaires ainsi que par de la migration cellulaire ^{117;118}. De plus, Cruikshank et al. ont démontré l'interaction physique entre IL-16 et le CD4, la cytokine étant purifiée de liquides biologiques par chromatographie d'affinité, à l'aide de recombinants solubles CD4 (rsCD4) fixés sur une matrice insoluble ⁹⁸. L'interaction se fait au niveau du domaine D4 du CD4, plus spécifiquement par les acides aminés Trp³⁵⁴ et Ser³⁵⁰ à l'extrémité proximale du domaine D4 ¹¹⁹. Mis à part les lymphocytes, l'IL-16 peut interagir avec différents types cellulaires qui expriment le CD4, par exemple les monocytes ¹²⁰, les cellules

dendritiques ^{121;122}, les cellules de Langerhans ¹²³ ainsi que les éosinophiles ¹²⁴. Chez les monocytes, l'effet de l'IL-16 est proportionnel à la quantité de CD4 exprimé à la surface des cellules ¹²⁰.

L'interaction entre l'IL-16 et le CD4 sur les lymphocytes T entraîne la production de messagers secondaires durant les minutes qui suivent la stimulation par l'IL-16. Effectivement, il est possible d'observer une augmentation notable de calcium intracellulaire et d'inositol (1,4,5)-phosphate (IP₃), une translocation de PKC du cytosol à la membrane ¹¹⁸, une phosphorylation du CD4 ¹²⁰ ainsi qu'une autophosphorylation de p56lck ¹¹⁷ (Fig. 7).

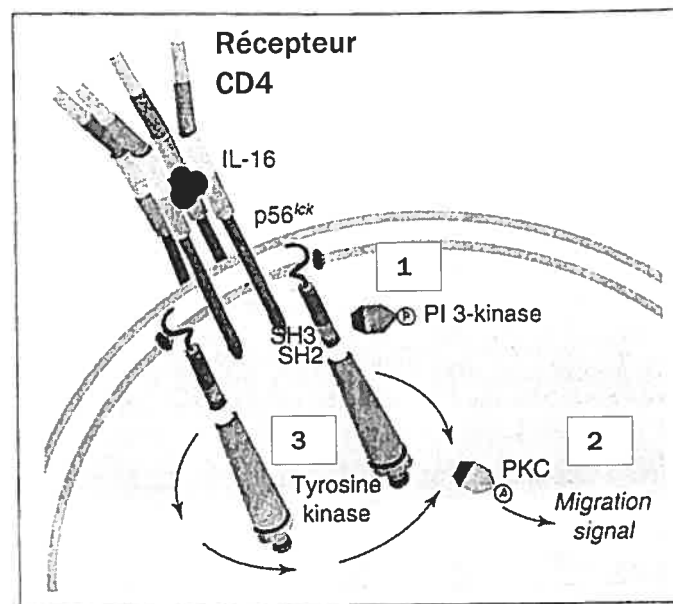


Fig. 7 : Signalisation intracellulaire induite suite à la liaison de l'IL-16 à son récepteur, le CD4, chez les lymphocytes T. L'interaction entre l'IL-16 et le CD4 entraîne rapidement la production de messagers secondaires comme (1) inositol (1,4,5)-phosphate (IP₃); (2) une translocation de PKC du cytosol à la membrane; (3) ainsi qu'une autophosphorylation de p56lck. Figure modifiée de Center, D. M., H. Kornfeld, and W. W. Cruikshank. 1996. *Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. Immunol Today* 17:476-481.

Toutefois, une étude effectuée chez des souris CD4^{-/-} suggère que l'antigène de surface CD4 n'est pas l'unique récepteur de l'IL-16 sur les cellules mononuclées. En effet, les cellules mononuclées isolées de souris CD4^{-/-} montrent le même profil de cytokines que les cellules CD4⁺ suite à une stimulation par l'IL-16. Parallèlement, l'IL-16 induit la migration des cellules mononuclées provenant de souris CD4^{-/-} *in vitro*.¹²⁵ Ceci démontre que le CD4 ne semble pas indispensable à l'action de la cytokine, du moins, chez la souris.

Malgré son identification initiale en tant que facteur de chimiotactisme pour les cellules T, l'IL-16 est maintenant reconnue pour induire la migration de toutes cellules immunitaires périphériques exprimant le CD4, incluant les monocytes¹²⁰, les éosinophiles¹²⁴ les cellules dendritiques¹²⁶ ainsi que les cellules de Langerhans¹²³. De plus, l'IL-16 agit comme facteur de croissance, induisant l'activation du cycle cellulaire chez les cellules T CD4⁺^{98;120;127}. Cet effet se traduit par une induction du CD25 (IL-2 R α) et une augmentation de l'expression du HLA-DR^{98;120}. Cependant, la progression du cycle cellulaire nécessite l'addition d'IL-2 exogène. L'IL-16 peut donc induire une transition G₀ à G₁, sans toutefois induire la production d'IL-2¹²⁸. L'IL-16 peut causer une perte temporaire de réponse par l'entremise du TCR, démontré par la diminution de la réaction lymphocytaire mixte avec des allo-antigènes^{129;130}, causant ainsi une anergie transitoire. Puisque l'IL-16 se lie au CD4 à un site différent du CMH de classe II et qu'elle peut se lier au CD4 en absence d'antigène, l'IL-16 peut ainsi prévenir la liaison au TCR, empêchant la cellule de répondre à un antigène¹³¹. Parallèlement, le pré-traitement des cellules avec l'IL-16

prévient l'expression de CD95 (Fas) à la surface des cellules ¹²⁹. Plus spécifiquement, chez les monocytes, cette cytokine augmente l'expression du HLA-DR et induit l'expression et la production de cytokines pro-inflammatoires de manière dose-dépendante (IL-1 β , TNF- α , IL-15 et IL-6) ^{120;132}. Chez les éosinophiles, l'effet de l'IL-16 se traduit par une augmentation de l'adhésion de ces cellules aux protéines matricielles ¹³³. De plus, l'IL-16 induit, chez ces cellules, la production de leukotriènes C(4) et augmente la libération d'IL-4. Cette activation des éosinophiles est dépendante du récepteur CD4 et est causée par la libération de RANTES et d'eotaxine ¹³⁴. Finalement, une fonction biologique très intrigante de cette cytokine est son activité antivirale envers le virus VIH. Baier et al. ¹³⁵ et par la suite, Mackewicz et al. ¹³⁶ ont démontré qu'à une concentration de 1-5 $\mu\text{g/mL}$, l'IL-16 diminue le taux d'infection des cellules cibles par le VIH de 40 %. L'action inhibitrice de la cytokine semble être au niveau transcriptionnel. Effectivement, une étude ultérieure impliquant la transfection de cellules Jurkat avec de l'IL-16 démontre une réduction importante de l'expression des produits de transcription *tat* et *rev* du VIH-1, suite à une analyse par RT-PCR ¹³⁷. De plus, une interaction IL-16/CD4 stimulerait une prolifération antigène-indépendante des cellules T. Ceci aurait comme effet de maintenir le nombre de cellules CD4+ à un niveau raisonnable, tout en supprimant la transcription virale du VIH ¹³¹.

6.4 IL-16 et inflammation

L'expression tissulaire de l'IL-16 est augmentée dans plusieurs maladies inflammatoires, tel que l'arthrite rhumatoïde ^{101;138}, la maladie inflammatoire de

l'intestin ^{139;140;141}, la dermatite atopique ¹⁴², la rhinite allergique ¹⁴³ et l'asthme atopique ¹¹⁰. Cependant, le rôle précis de l'IL-16 dans ces pathologies est encore peu connu. ¹⁴⁴. L'association entre l'IL-16 et l'asthme a été décrite pour la première fois par Bellini et al., lesquels identifièrent l'activité biologique de l'IL-16 dans des surnageants de cultures de cellules primaires épithéliales provenant de sujets asthmatiques suite à une stimulation par l'histamine ¹⁰⁰. Par la suite, plusieurs études ont démontré l'association entre la cytokine et ces différentes pathologies caractérisées par une inflammation de type allergique. Ainsi, une étude a démontré que l'expression de l'IL-16 est augmentée dans des biopsies endobronchiques de patients souffrant d'asthme atopique, en comparaison avec des sujets normaux ¹¹⁰. Il existe une corrélation entre l'expression d'IL-16 et le nombre de cellules CD4+ infiltrant la muqueuse bronchique et le degré d'hyperréactivité bronchique, chez ces sujets avec asthme atopique ¹¹⁰. Une étude ultérieure démontre une augmentation de l'expression de l'IL-16 dans les biopsies endobronchiques de sujets asthmatiques à la suite d'une provocation allergénique locale ^{145;146}. Parallèlement, l'IL-16 biologiquement active est détectée dans le lavage bronchoalvéolaire 4 à 24 heures après la provocation allergénique ^{145;146}. De plus, le traitement de patients atteints de rhinite allergique à l'aide de glucocorticostéroïdes topiques entraîne une diminution importante de l'expression d'IL-16 induite par l'exposition à l'allergène dans la muqueuse nasale ¹⁴³. Des études de coloration par double immunohistochimie ont démontré que la source principale d'IL-16 dans les voies respiratoires de sujets asthmatiques sont les lymphocytes T ainsi que les cellules épithéliales bronchiques. Outre ces cellules, les macrophages, les éosinophiles et les mastocytes sont des

sources cellulaires d'IL-16 dans la muqueuse bronchique ¹⁴⁷.

Malgré l'identification d'une production accrue d'IL-16 aux sites d'inflammation, le rôle précis de cette cytokine dans le développement de la réponse inflammatoire est encore inconnu. Certaines études *in vivo* et *in vitro* prônent un rôle pro-inflammatoire de l'IL-16 dans certaines pathologies. La corrélation entre l'expression d'IL-16 et l'intensité de l'infiltration tissulaire des cellules CD4⁺ chez les sujets asthmatiques et les sujets avec dermatite atopique suggère que cette cytokine peut être impliquée dans la migration des lymphocytes T CD4⁺ aux sites d'inflammation ^{110;142}. Il existe une corrélation entre l'expression d'IL-16 dans les voies aériennes de sujets asthmatiques et le degré d'hyperréactivité bronchique ¹¹⁰. De plus, il existe une relation entre les taux sériques d'IL-16 et l'intensité de l'atteinte cutanée, dans la dermatite atopique ¹⁴⁸. Dans un modèle murin d'asthme allergique, l'administration d'anticorps monoclonaux anti-IL-16 réduit les IgE spécifiques ainsi que l'hyperréactivité bronchique sans toutefois affecter la nature et l'intensité de l'infiltrat inflammatoire ⁹⁹. Utilisant le même modèle animal, le groupe de De Bie et al. a démontré que l'administration intra-nasale d'un peptide inhibant l'interaction entre l'IL-16 et le CD4 réduit de façon significative le degré d'hyperréactivité bronchique induite par l'exposition à un antigène sans toutefois réduire l'infiltration éosinophilique ¹⁴⁹. Par ailleurs, d'autres études suggèrent également un rôle pro-inflammatoire de l'IL-16 dans plusieurs pathologies inflammatoires de type non-allergique. En effet, les niveaux sériques d'IL-16 chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé (SLE) augmentent avec l'intensité de la maladie ¹⁵⁰. Chez des patients ayant subi

une greffe rénale, on observe une augmentation significative de la production de l'IL-16 *ex vivo* par les greffons atteints de phénomène de rejet ¹⁵¹. La neutralisation de l'IL-16 dans un modèle murin de colite induite par l'acide trinitrobenzène sulfonique ou d'affection abdominale inflammatoire démontre une baisse importante des symptômes de la maladie ¹⁴⁰.

Cependant, la fonction pro-inflammatoire de cette cytokine est controversée. En effet, plusieurs études proposent un rôle plutôt immunomodulateur de l'IL-16. *In vitro*, l'IL-16 peut causer une inhibition de la stimulation par le TCR ¹²⁹ et diminuer la réaction lymphocytaire mixte avec des allo-antigènes ¹³⁰. Cette cytokine pourrait avoir un rôle anti-inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde; l'administration *in vivo* d'IL-16 diminue la production tissulaire d'IFN- γ , d'IL-1 β et de TNF- α chez des souris SCID dans lesquelles de la synovie a été implantée ¹⁰¹. Dans un modèle *in vitro* d'allogreffe de peau tolérogénique, des cellules de nature épithéliale transfectées avec IL-16 inhibent l'activation des cellules T, prévenant ainsi le rejet ¹⁵². Dans le cas de l'inflammation de type allergique, l'IL-16 augmente la libération d'IFN- γ et diminue la production d'IL-5 *in vitro*, par les lymphocytes CD4+ circulants, suite à une stimulation antigénique chez des sujets atopiques, inhibant ainsi un profil T_{H2} ¹⁵³. En accord avec ces données, l'administration d'IL-16 exogène inhibe l'infiltration d'éosinophiles et l'hyperréactivité bronchique causées par une stimulation antigénique, chez des souris sensibilisées à l'ovalbumine et ultérieurement provoquée par l'allergène ¹⁵⁴. Les cellules isolées des ganglions lymphatiques thoraciques de ces souris libèrent moins de cytokines T_{H2}, notamment IL-4 et IL-5, suite à une re-

stimulation antigénique *in vitro*¹⁵⁴. Il est possible que les effets immunomodulateurs de l'IL-16 exogène diffèrent des propriétés observées de la cytokine endogène. Par conséquent, malgré la présence marquée d'IL-16 aux sites d'inflammation dans plusieurs maladies, le rôle spécifique de cette cytokine semble dépendre des cellules et cytokines présentes dans l'environnement ainsi que des niveaux d'IL-16 endogène.

6.5 Rôle de l'IL-16 dans les interactions entre lymphocytes B et T

Plusieurs évidences suggèrent donc que l'IL-16 module l'immunité à médiation cellulaire. Cependant, son rôle potentiel dans la régulation des réponses immunitaires humorales ainsi que dans l'interaction cellulaire entre les lymphocytes B et les lymphocytes T reste peu connu. L'IL-16 est exprimée aux sites d'interaction entre les lymphocytes B et T^{107;116}. De plus, Kaser et al. ont démontré que les cellules B libèrent de l'IL-16, ce qui induit la migration des cellules T *in vitro*¹²⁶. Il est donc possible que l'IL-16 libérée par les cellules B contribue à la migration des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes riches en cellules B, favorisant ainsi les interactions entre cellules B et T lors des réponses humorales. Puisque l'IL-16 agit spécifiquement sur les cellules CD4⁺ et que ces cellules jouent un rôle primordial dans l'activation des lymphocytes B ainsi que dans la régulation de la production des IgE, il est possible que l'IL-16 soit impliquée dans la régulation de la production des IgE par les lymphocytes B.

7. HYPOTHÈSE

Lors de cette étude, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle IL-16 module la production des IgE par les lymphocytes B chez des donneurs atopiques. Notre objectif principal est de déterminer l'effet de l'interleukine 16 sur la production polyclonale d'IgE par les lymphocytes B, dans un système cellule T-dépendant.


CHAPITRE II : RÉSULTATS

IL-16 INHIBITS IgE PRODUCTION BY B LYMPHOCYTES

Annick Trudelle, B.Sc.,* Souad El Bassam, M.Sc.,* Stéphane Pinsonneault, B.Sc.,*
Bruce Mazer, M.D.,** Sophie Laberge, M.D.*

* Laboratory of immunology, Research Center, Ste-Justine Hospital, Departments of Pediatrics and Microbiology & Immunology, University of Montreal, Montreal, Canada, and the ** Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Montreal, Canada.

Corresponding address: Dr. Sophie Laberge
Sainte-Justine Hospital Room 6734
3175 Cote Sainte-Catherine Street
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5
Telephone: (514) 345-4931 ext: 3258
Fax: (514) 345-4804



Funding sources: supported by the Canadian Institutes for Health Research and the Association Pulmonaire du Québec.

Total word count: 2730

ABSTRACT

Background: Increased production of IgE is a hallmark of atopic disorders. CD4⁺ T cells regulate the production of IgE by B cells. IL-16, a CD4⁺ specific cytokine, is highly expressed at sites of allergic inflammation. **Objective:** Our aim was to determine the effect of IL-16 on IgE production in atopic subjects. **Methods:** Freshly isolated PBMC from atopic subjects were stimulated with rIL-4 and anti-CD40 antibody to promote IgE production. To evaluate the effects of IL-16 on IgE production, PBMC were incubated with rIL-16 added at different time intervals prior to stimulation. Levels of IgE in cell culture supernatants collected at day 14 were measured by ELISA. The effect of IL-16 on the expression of the C ϵ transcript was evaluated by RT-PCR. To evaluate whether the modulatory effects of IL-16 on IgE production were mediated by IFN- γ , anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC were cultured in the presence of rIL-16 and neutralizing concentrations of anti-IFN- γ antibody. **Results:** PBMC stimulated with rIL-4 (400 U/ml) and anti-CD40 monoclonal antibody (0.5 μ g/ml) produced significant amounts of IgE (range:1.3–46.0 ng/ml). The addition of rIL-16 24 h before stimulation significantly reduced the levels of IgE released by anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC (0.5-29.6 ng/ml, $p < 0.05$). IL-16 reduced the expression of the C ϵ transcript in stimulated PBMC. IL-16 induced the expression of IFN- γ mRNA. However, the use of anti-IFN- γ antibody did not alter the effect of IL-16 on IgE production. **Conclusion:** These data show that IL-16 inhibits IgE production. These data suggest that IL-16 may play an important regulatory role in atopic disorders such as asthma.

Keywords: IL-16, IgE, allergic inflammation, human, T lymphocytes.

INTRODUCTION

Atopic asthma and allergic rhinitis represent a major worldwide health issue. A hallmark of these disorders is increased production of both total and allergen-specific IgE. IgE may mediate the pathogenesis of allergic airway diseases through a number of pathways¹. Firstly, the interaction of FcεRI-bound IgE on mast cells and basophils in sensitized individuals with the relevant antigen triggers the release of preformed mediators, synthesis of prostaglandins and leukotrienes, and the transcription of cytokines. In the bronchial mucosa, these mediators of immediate hypersensitivity reactions rapidly induce mucosal edema, mucous production and smooth muscle contraction and eventually elicit an inflammatory infiltrate. Furthermore, IgE interacts with CD23 (FcεRII) on B cells, enhancing the ability of B cells to present antigen and induce immune responses by specific T cells. Genetic analysis of families have shown that bronchial hyperresponsiveness and total serum IgE levels are linked². Treatment of subjects with atopic asthma with anti-IgE monoclonal antibodies reduces asthma symptoms and acute asthma exacerbations³⁻⁷. Although parallel pathways of airway responses to antigen exist, the contribution of IgE to the development of allergic airway inflammation has also been demonstrated in animal studies⁸⁻¹¹. The production of IgE by B cells is highly regulated and involves a complex network of cellular and molecular signals. CD4⁺ T cells are critically involved in IgE production through the production of IL-4 and IL-13, which stimulate germline Cε transcription, a key feature of the genetic switch of immunoglobulin

genes from IgM to IgE and by providing required signals to B cells mainly through the CD40/CD40L interaction ¹².

IL-16 is a cytokine with profound immunoregulatory effects on CD4+ T cells. As such, IL-16 induces the migration of CD4+ T cells ^{13;14} and activates CD4+ T cells as demonstrated by the activation of p56lck, rise in intracellular calcium concentrations, the induction of IL-2 receptor and the up-regulation of the HLA-DR ¹⁵⁻¹⁷. Apart from its activation properties, IL-16 exerts certain inhibitory effects, including the inhibition of the mixed lymphocyte reaction and the induction of reversible anergy in CD4+ cells following their activation ^{18;19}. We and others have investigated the potential role of this cytokine in T cell-dependent processes, such as those observed in allergic inflammation ²⁰⁻²⁷. Expression of IL-16 is increased in the nasal mucosa of subjects with allergic rhinitis and in endobronchial biopsies of subjects with atopic asthma ^{22;23;27}. Endobronchial segmental challenge with allergen in asthmatic subjects induces upregulation of airway expression of IL-16, which correlates with the numbers of CD4+ T cells ²⁵. Allergen challenge is also associated with the release of bioactive IL-16 in the airways ^{25;26}. Furthermore, IL-16 is highly expressed in lymphoid tissues, sites of IgE production ^{28;29}. Since IL-16 acts on CD4+ T cells and that those cells regulate the production of IgE, we speculated that IL-16 could modulate the production of IgE. In this study, we investigated the effects of IL-16 on T cell-dependent IgE production by B cells in atopic subjects.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

The recombinant (r) human IL-16 was generously provided by W.W. Cruikshank and H. Kornfeld (Boston University School of Medicine, Boston, MA). The rIL-16 was synthesized as previously described³⁰. Briefly, the biologically active IL-16 corresponds to the 121 C-terminal amino acid segment, cleaved from the precursor pro-IL-16. It was produced in *Escherichia coli* as a polyhistidine fusion protein using the expression vector pET-30 LIC (Novagen, Madison, WI) and was purified by metal chelation chromatography, cleaved by factor Xa to remove the polyhistidine tag, and passed over a polymyxine B column to remove endotoxin. IL-16 was further purified from the contaminating polyhistidine tag and factor Xa by means of anti-IL-16 affinity chromatography. The bioactivity of rIL-16 was confirmed by means of chemotaxis of human T cells, as previously described¹⁵. Typical preparation demonstrated a maximal chemotactic response at concentrations of 10-200 ng/mL. rIL-16 preparations have been demonstrated to contain less than 1.0 endotoxin units/mL of endotoxin, using a limulus amoebocyte lysate assay (BioWhittaker QCL 1000, Walkerville, MD). The rIL-4, the anti-IFN- γ monoclonal antibody and the mouse IgG_{2A} isotype control were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). The anti-CD40 monoclonal antibody was purchased from PharMingen International (Mississauga, ON, Canada).

Subject population and preparation of cells

Venous blood was collected from atopic subjects (n=17). Atopic subjects had a history of symptomatic allergies (atopic rhinitis or atopic asthma) with positive skin prick test responses to one or more common aeroallergens. These donors were not using any systemic or topical glucocorticoid therapy and none had undergone previous immunotherapy. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples by centrifugation on Ficoll-Paque. The study was approved by the institutional Ethics Committee and all participants gave prior informed consent to participation.

Cell stimulation for IgE synthesis

PBMC were cultured at 37°C with 5% CO₂ in flat-bottomed 48-well culture plates (1 mL/well) or curved-bottomed 96-well culture plates (0.2 mL/well), at a final concentration of 1.5×10^6 cells/mL, in the presence of anti-CD40 monoclonal antibody (0.5 µg/mL) and rIL-4 (400 U/mL). To assess the effect of IL-16 on IgE production, cells were incubated for 14 days in the presence of rIL-16 (100 ng/mL) or an equivalent concentration of β-galactosidase produced in an identical fashion in *E. coli*, added at different time intervals prior to stimulation. At day 7, cell cultures were supplemented with new medium, for half the volume of the well. Supernatants and cells were collected on day 14 for measurement of IgE levels and Cε mRNA analysis.

ELISA for IgE production

The IgE protein levels in cell culture supernatants were measured in duplicate using a non-commercial ELISA kit. Ninety-six-well MaxiSorp Nunc plates (Nalge Nunc International, Rochester, NY) were coated with 100 μ L rat monoclonal anti-human IgE antibody (BioSource International, Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada), diluted in PBS 1X at a final concentration of 5 μ g/mL and incubated overnight at 4°C. Wells were washed with a solution of PBS 1X containing 0.1% Tween 20. The wells were blocked for 2h at room temperature with a blocking solution of 0.5% gelatin in PBS 1X. After washing off the blocking solution, wells were filled with 100 μ L of culture supernatant and were incubated at room temperature for 2 hours. A standard curve was run simultaneously with normal human polyclonal IgE (Cedarlane Laboratories, Hornby, ON, Canada), at concentrations ranging from 0 ng/mL to 50 ng/mL. Wells were washed and then incubated at room temperature for 2 hours with affinity-purified biotinylated goat anti-human IgE (BioSource International, Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada), diluted in blocking solution at a final concentration of 0.04 μ g/mL. The plates were washed and then incubated for 1 hour at room temperature with 0.15 μ g/mL streptavidin-horseradish peroxidase conjugated enzyme (BioSource International, Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada), diluted in blocking solution. The plates were washed and developed with tetramethyl benzidine (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) and the optical density was read at 450 nm with an absorbance microplate reader (Spectra Rainbow, Tecan, Austria).

RT-PCR detection of Cε mRNA and IFN-γ mRNA

Total RNA was isolated from PBMC using a GenElute Mammalian Total RNA kit (Sigma Chemical Co, Oakville, ON, Canada). The RNA suspension was digested with DNase I to remove any DNA contamination. RT-PCR determination for IFN-γ mRNA was performed using commercially available primers (Biosource International, Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada) and the Qiagen one-step RT-PCR kit (Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. For Cε mRNA detection, total RNA was reverse transcribed to cDNA using hexanucleotides 10X concentration (Roche, Laval, QC, Canada), with an Omniscript RT kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Cε primers were designed and then purchased from Alpha DNA (Montreal, Canada). The sense primer corresponds to a sequence found in the first exon of the Cε mRNA coding sequence (CH1 domain) and consisted of 5'-CTCCCTCAACGGGACA ACTA-3'. The antisense primer was 5'-TCTGACAGCCAGTGCTTCTG-3' and attached itself to a sequence in the second exon of the coding sequence (CH2 domain) of the Cε cDNA. The Cε probe corresponded to a 426 nucleotides fragment of the cDNA. The PCR reaction was performed with a HotStar Taq DNA Polymerase kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), as recommended by the manufacturer. All PCR assays were run in a 25 μL reaction, with 25 ng of RNA, 2.5% MgCL₂, 2.5 mM dNTP, 0.5 μM primers and 1 U HotStar Taq polymerase. First, HotStar Taq DNA Polymerase was activated by a 15-minute incubation at 95°C. To detect the Cε transcripts, the PCR reactions were conducted at 94°C for 45 seconds, 62°C for 45 seconds and then 72°C for 45 seconds,

for 45 cycles. The β -actin house-keeping gene was used as a control band (Biosource International, Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada).

Statistical analysis

Results are expressed as means and standard deviation values. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA for repeated measurements followed by the Newman-Keuls test for multiple comparisons. Statistical significance was established at a 5% level of confidence.

RESULTS

Effect of IL-16 on *in vitro* IgE production

Initial experiments (n=3) were conducted to determine the optimal culture conditions for IgE production. PBMC were put in culture for 14 days in the presence of different concentrations of anti-CD40 antibody (0.1-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and rIL-4 (50-400 U/mL). After 14 days, cell culture supernatants were collected and the levels of IgE protein were measured by ELISA. During this time interval, highest IgE levels were measured when cells were incubated with anti-CD40 antibody at a concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and rIL-4 at a concentration of 400 U/mL. Therefore, all subsequent experiments were performed using these concentrations. To evaluate the effect of rIL-16 on IgE production, PBMC were incubated with rIL-16 (100 ng/mL) added 24 hours before stimulation with anti-CD40 antibody and rIL-4 (n=17). IL-16 significantly reduced IgE levels in anti-CD40/IL-4-stimulated cell culture, as evaluated by ELISA (fig. 1). Recombinant IL-16 alone, in the absence of stimulation with anti-CD40 antibody and rIL-4, did not significantly alter IgE production. As control, stimulated PBMC were cultured with an equivalent concentration of β -galactosidase produced in an identical fashion in *E. coli* (n=9). The production of IgE was not altered in the presence of β -galactosidase (table 1). To determine the time course of IL-16 mediated inhibition of IgE production, PBMC were incubated with rIL-16 added 2 to 24h prior to stimulation by anti-CD40 antibody and rIL-4 (n=6). As shown in figure 2, significant inhibition of IgE production was observed when rIL-16 was added to cell cultures 24 hours prior to stimulation.

Effect of IL-16 on the expression of the C ϵ mRNA transcript

Having determined that IL-16 reduced IgE production, we next investigated whether the inhibitory effect of IL-16 reflected an inhibition of the expression of the C ϵ transcript of the mRNA using RT-PCR. Under the same culture conditions, C ϵ mRNA expression was upregulated in anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC as compared to unstimulated cells. As shown in figure 3, IL-16 reduced the expression of the ϵ germline transcript, consistent with the results observed at the protein level.

Role of IFN- γ in mediating the effect of IL-16 on IgE production

IFN- γ is a strong inhibitor of IgE production. We therefore investigated whether IL-16 induced IFN- γ production and found that IL-16 upregulated IFN- γ mRNA expression using RT-PCR (fig. 4A). To further assess whether the inhibition of IgE production may be mediated by IFN- γ , anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC were incubated with IL-16 and neutralizing concentrations of anti-IFN- γ monoclonal antibody or IgG2a isotype control (n=12). As shown in figure 4B, the addition of anti-IFN- γ did not alter the inhibitory effect of IL-16 on IgE production. Thus, the effects of IL-16 on IgE production did not appear to be mediated by IFN- γ .

DISCUSSION

IL-16 may have a role in diverse immunologic responses and participate in various forms of T-cell driven inflammation, including inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus³¹⁻³⁵. In allergic disorders, including atopic asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis, tissue expression of IL-16 has been found to be prominent^{22-24;36}. Despite its association with various forms of allergic inflammation, the function of IL-16 in allergic immune responses is presently unclear and may be complex. For instance, IL-16 is a chemoattractant for CD4+ T cells and eosinophils³⁷, can participate in dendritic-T cell interactions^{38;39}, can inhibit anti-CD3-activated lymphocyte responses¹⁹, and can modulate the pattern of cytokine produced by antigen-stimulated T cells³⁰. We have previously demonstrated that IL-16 abrogates the production of IL-5 and promotes IFN- γ release by antigen-specific T cells in atopic subjects, suggesting that IL-16 may exert important immunoregulatory effects on T cells in atopic disorders³⁰. In this study, we further investigated the potential role of IL-16 in allergic immune responses by evaluating the effect of IL-16 on IgE production. Our current results indicate that IL-16 inhibits T cell-dependant IgE production.

Despite increasing body of evidence suggesting a regulatory role of IL-16 in cellular-mediated immune responses, little is known about the implication of IL-16 in humoral immune responses and the cellular cross-talk between B and T cells. IL-16 mRNA is expressed in abundance in lymph nodes and IL-16 immunoreactivity is

prominent in human tonsils at sites of T-B cell interactions^{28;40}. Kaser et al reported that B lymphocytes themselves produce IL-16 which induces the migration of T lymphocytes *in vitro*⁴⁰. These data suggest a role for B cell-derived IL-16 as a potential regulator of B and T cell interactions in humoral immune responses, by allowing CD4⁺ T cell migration to B cell-rich follicles in lymphoid organs. The results of the current study suggest that IL-16 may also mediate T cell-dependant B cell responses by regulating IgE production. The potential contribution of IL-16 in B cell activation and IgE production has not been fully investigated. Previous animal studies have shown that administration of anti-human IL-16 antibody partially decreased upregulation of ovalbumin-specific IgE during repeated ovalbumin inhalation in sensitized mice, suggesting that IL-16 may be involved in the process of IgE production⁴¹. Allergen-induced airway hyperresponsiveness was also inhibited in animals treated with anti-IL-16 antibodies. These latter data would initially appear at variance with our findings showing an inhibition of IgE production by human PBMC *in vitro* in the presence of IL-16. However, it has been lately shown that systemic administration of exogenous IL-16 inhibits allergen-induced airway hyperresponsiveness, airway eosinophilia and T_{H2}-type cytokine production in sensitized mice, suggesting that IL-16 may also have potent immunosuppressive effects on T_{H2} dominated allergic airway responses *in vivo*⁴². IL-16 has been shown to inhibit inflammatory responses in non-allergic immune responses, which is consistent with a immunoregulatory role of IL-16 under some conditions^{31;43}. Furthermore, the divergent results from these studies also reveal the complexity of the potential regulatory role of endogenous and exogenous IL-16 on allergen-induced T

cell responses *in vivo* and call for further clarification. In particular, it is unclear whether endogenous levels of IL-16 reach concentrations required for induction of immunosuppression.

The precise mechanisms by which IL-16 downregulates IgE production are unclear at present. IFN- γ is a strong inhibitor of IgE production. We therefore investigated whether IL-16 mediated inhibition of IgE production may be related to induction of IFN- γ . Despite induction of IFN- γ by IL-16, neutralizing anti-IFN- γ antibody did not alter the effects of IL-16 on IgE production suggesting that the inhibitory effect of IL-16 on IgE production is unlikely to be attributed to its enhancing effect on IFN- γ production. Cross-talk between B and T cells involved interactions through costimulatory molecules expressed on the cell surface of B and T cells. Of particular importance for IgE production is the CD40/CD40L interaction. Since IL-16 acts on CD4⁺ T cells, it is possible that IL-16 modulates surface expression of CD40L. Alternatively, since costimulatory pathways between T cells and B cells are positively linked, it is also possible that IL-16 indirectly modulates the expression of other costimulatory molecules on B cells. Whether IL-16 regulates B and T cell interactions by modulating the expression of ligands and receptors involved in costimulatory pathways critical for B cell IgE responses remains to be established. CD4 is the recognized receptor for IL-16 in T cells although studies in CD4-knockout mice indicate that IL-16 may act on monocytes via as yet unidentified CD4-independent mechanisms⁴⁴. We therefore conducted these experiments using a T cell-dependent

system for IgE production. We cannot exclude, however, a direct effect of IL-16 on B cells through CD4 or another undefined receptor.

In conclusion, these experiments show that IL-16 decreases IgE production by PBMC. These findings suggest that IL-16 may regulate the initial events involved in the development of an allergic response through its ability to downregulate IgE production.

REFERENCES

1. Oettgen, H. C. and R. S. Geha. 2001. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J.Allergy Clin.Immunol* 107:429-440.
2. Postma, D. S., E. R. Bleecker, P. J. Amelung, K. J. Holroyd, J. Xu, C. I. Panhuysen, D. A. Meyers, and R. C. Levitt. 1995. Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N.Engl.J.Med.* 333:894-900.
3. Busse, W., J. Corren, B. Q. Lanier, M. McAlary, A. Fowler-Taylor, G. D. Cioppa, A. van As, and N. Gupta. 2001. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol* 108:184-190.
4. Milgrom, H., W. Berger, A. Nayak, N. Gupta, S. Pollard, M. McAlary, A. F. Taylor, and P. Rohane. 2001. Treatment of childhood asthma with anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab). *Pediatrics* 108:E36.
5. Corren, J., T. Casale, Y. Deniz, and M. Ashby. 2003. Omalizumab, a recombinant humanized anti-IgE antibody, reduces asthma-related emergency room visits and hospitalizations in patients with allergic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111:87-90.
6. Buhl, R., G. Hanf, M. Soler, G. Bensch, J. Wolfe, F. Everhard, K. Champain, H. Fox, and J. Thirlwell. 2002. The anti-IgE antibody omalizumab improves asthma-related quality of life in patients with allergic asthma. *Eur.Respir.J.* 20:1088-1094.
7. Soler, M., J. Matz, R. Townley, R. Buhl, J. O'Brien, H. Fox, J. Thirlwell, N. Gupta, and C. G. Della. 2001. The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur.Respir.J.* 18:254-261.
8. Oshiba, A., E. Hamelmann, K. Takeda, K. L. Bradley, J. E. Loader, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. *J.Clin.Invest* 97:1398-1408.
9. Coyle, A. J., K. Wagner, C. Bertrand, S. Tsuyuki, J. Bews, and C. Heusser. 1996. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J.Exp.Med.* 183:1303-1310.
10. Hamelmann, E., A. T. Vella, A. Oshiba, J. W. Kappler, P. Marrack, and E. W. Gelfand. 1997. Allergic airway sensitization induces T cell activation but not

airway hyperresponsiveness in B cell-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1350-1355.

11. Maclean, J. A., A. Sauty, A. D. Luster, J. M. Drazen, and G. T. De Sanctis. 1999. Antigen-induced airway hyperresponsiveness, pulmonary eosinophilia, and chemokine expression in B cell-deficient mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:379-387.
12. Bacharier, L. B. and R. S. Geha. 2000. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J.Allergy Clin.Immunol* 105:S547-S558.
13. Cruikshank, W. and D. M. Center. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J.Immunol* 128:2569-2574.
14. Center, D. M. and W. Cruikshank. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J.Immunol* 128:2563-2568.
15. Parada, N. A., D. M. Center, H. Kornfeld, W. L. Rodriguez, J. Cook, M. Vallen, and W. W. Cruikshank. 1998. Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J.Immunol* 160:2115-2120.
16. Cruikshank, W. W., D. M. Center, N. Nisar, M. Wu, B. Natke, A. C. Theodore, and H. Kornfeld. 1994. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A* 91:5109-5113.
17. Cruikshank, W. W., J. S. Berman, A. C. Theodore, J. Bernardo, and D. M. Center. 1987. Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J.Immunol* 138:3817-3823.
18. Cruikshank, W. W., K. Lim, A. C. Theodore, J. Cook, G. Fine, P. F. Weller, and D. M. Center. 1996. IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J.Immunol* 157:5240-5248.
19. Theodore, A. C., D. M. Center, J. Nicoll, G. Fine, H. Kornfeld, and W. W. Cruikshank. 1996. CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J.Immunol* 157:1958-1964.
20. Bellini, A., H. Yoshimura, E. Vittori, M. Marini, and S. Mattoli. 1993. Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J.Allergy Clin.Immunol* 92:412-424.
21. Cruikshank, W. W., A. Long, R. E. Tarpy, H. Kornfeld, M. P. Carroll, L. Teran, S. T. Holgate, and D. M. Center. 1995. Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1

- alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13:738-747.
22. Laberge, S., S. R. Durham, O. Ghaffar, S. Rak, D. M. Center, M. Jacobson, and Q. Hamid. 1997. Expression of IL-16 in allergen-induced late-phase nasal responses and relation to topical glucocorticosteroid treatment. *J.Allergy Clin.Immunol* 100:569-574.
 23. Laberge, S., P. Ernst, O. Ghaffar, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and Q. Hamid. 1997. Increased expression of interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 17:193-202.
 24. Laberge, S., O. Ghaffar, M. Boguniewicz, D. M. Center, D. Y. Leung, and Q. Hamid. 1998. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol* 102:645-650.
 25. Laberge, S., S. Pinsonneault, E. M. Varga, S. J. Till, K. Nouri-Aria, M. Jacobson, W. W. Cruikshank, D. M. Center, Q. Hamid, and S. R. Durham. 2000. Increased expression of IL-16 immunoreactivity in bronchial mucosa after segmental allergen challenge in patients with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol* 106:293-301.
 26. Krug, N., W. W. Cruikshank, T. Tschernig, V. J. Erpenbeck, K. Balke, J. M. Hohlfeld, D. M. Center, and H. Fabel. 2000. Interleukin 16 and T-cell chemoattractant activity in bronchoalveolar lavage 24 hours after allergen challenge in asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 162:105-111.
 27. Pullerits, T., A. Linden, C. Malmhall, and J. Lotvall. 2001. Effect of seasonal allergen exposure on mucosal IL-16 and CD4+ cells in patients with allergic rhinitis. *Allergy* 56:871-877.
 28. Chupp, G. L., E. A. Wright, D. Wu, M. Vallen-Mashikian, W. W. Cruikshank, D. M. Center, H. Kornfeld, and J. S. Berman. 1998. Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J.Immunol* 161:3114-3119.
 29. Kramer, M. F., B. Mack, and G. Rasp. 2001. Immunohistological expression of interleukin 16 in human tonsils. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 127:1120-1125.
 30. Pinsonneault, S., S. El Bassam, B. Mazer, W. W. Cruikshank, and S. Laberge. 2001. IL-16 inhibits IL-5 production by antigen-stimulated T cells in atopic subjects. *J.Allergy Clin.Immunol* 107:477-482.
 31. Klimiuk, P. A., J. J. Goronzy, and C. M. Weyand. 1999. IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. *J.Immunol* 162:4293-4299.

32. Keates, A. C., I. Castagliuolo, W. W. Cruickshank, B. Qiu, K. O. Arseneau, W. Brazer, and C. P. Kelly. 2000. Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology* 119:972-982.
33. Blaschke, S., H. Schulz, G. Schwarz, V. Blaschke, G. A. Muller, and M. Reuss-Borst. 2001. Interleukin 16 expression in relation to disease activity in rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 28:12-21.
34. Lard, L. R., B. O. Roep, C. A. Verburgh, A. H. Zwinderman, and T. W. Huizinga. 2002. Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus* 11:181-185.
35. Lee, S., H. Kaneko, I. Sekigawa, Y. Tokano, Y. Takasaki, and H. Hashimoto. 1998. Circulating interleukin-16 in systemic lupus erythematosus. *Br.J.Rheumatol.* 37:1334-1337.
36. Reich, K., S. Hugo, P. Middel, V. Blaschke, A. Heine, C. Gutgesell, R. Williams, and C. Neumann. 2002. Evidence for a role of Langerhans cell-derived IL-16 in atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 109:681-687.
37. Cruikshank, W. W., J. L. Greenstein, A. C. Theodore, and D. M. Center. 1991. Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes. *J.Immunol* 146:2928-2934.
38. O'Doherty, U., R. M. Steinman, M. Peng, P. U. Cameron, S. Gezelter, I. Kopeloff, W. J. Swiggard, M. Pope, and N. Bhardwaj. 1993. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J.Exp.Med.* 178:1067-1076.
39. Ferbas, J. J., J. F. Toso, A. J. Logar, J. S. Navratil, and C. R. Rinaldo, Jr. 1994. CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN-alpha in response to in vitro HIV-1 infection. *J.Immunol* 152:4649-4662.
40. Kaser, A., S. Dunzendorfer, F. A. Offner, T. Ryan, A. Schwabegger, W. W. Cruikshank, C. J. Wiedermann, and H. Tilg. 1999. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J.Immunol* 163:3232-3238.
41. Hessel, E. M., W. W. Cruikshank, A. Van, I, J. J. De Bie, B. Van Esch, G. Hofman, F. P. Nijkamp, D. M. Center, and A. J. Van Oosterhout. 1998. Involvement of IL-16 in the induction of airway hyper-responsiveness and up-regulation of IgE in a murine model of allergic asthma. *J.Immunol* 160:2998-3005.
42. De Bie, J. J., E. H. Jonker, P. A. Henricks, J. Hoevenaars, F. F. Little, W. W. Cruikshank, F. P. Nijkamp, and A. J. Van Oosterhout. 2002. Exogenous

interleukin-16 inhibits antigen-induced airway hyper-reactivity, eosinophilia and Th2-type cytokine production in mice. *Clin.Exp.Allergy* 32:1651-1658.

43. Fujita, T., Y. Matsumoto, I. Hirai, K. Ezoe, T. Saito, A. Yagihashi, T. Torigoe, K. Homma, S. Takahashi, W. W. Cruikshank, K. Jimbow, and N. Sato. 2000. Immunosuppressive effect on T cell activation by interleukin- 16-cDNA-transfected human squamous cell line. *Cell Immunol.* 202:54-60.
44. Mathy, N. L., N. Bannert, S. G. Norley, and R. Kurth. 2000. Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16. *J.Immunol* 164:4429-4432.

FIGURE LEGEND

Figure 1: Effect of IL-16 on IgE production. PBMC were stimulated with rIL-4 (400 U/mL) and anti-CD40 monoclonal antibody (0.5 μ g/mL) in the presence or absence of rIL-16 (100 ng/mL) added 24h prior to stimulation. The levels of IgE in the culture supernatants were assessed by ELISA. Individual data are shown (n = 17). * $P < 0.05$ compared to anti-CD40/IL-4-stimulated cells (ANOVA).

Figure 2: Time-course of IL-16 mediated inhibition of IgE production. PBMC were incubated with rIL-16 (100 ng/mL) added at different time points prior to anti-CD40/IL-4 stimulation. IgE levels in the supernatants were measured by ELISA. Results are expressed as means \pm SD (n = 6). * $P < 0.05$ compared to anti-CD40/IL-4-stimulated cells (ANOVA).

Figure 3: Effect of IL-16 on the expression of the C ϵ mRNA transcript. Anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC were incubated for 14 days in the presence or absence of rIL-16 (100 ng/mL) added 24h prior to stimulation. C ϵ mRNA expression was assessed by RT-PCR. *Lane 1*: unstimulated cells; *lane 2*: anti-CD40/IL-4 stimulated cells; *lane 3*: anti-CD40/IL-4 stimulated cells in presence of IL-16. The amplified cDNA fragments have the expected lengths of 426 bp for C ϵ and 417 bp for β -actin. One representative experiment of 6 independent experiments is shown.

Figure 4: Role of IFN- γ in mediating the effects of IL-16 on IgE production. A: PBMC were incubated with rIL-16 alone for 8 hours. The expression of IFN- γ mRNA

was assessed by RT-PCR. The amplified cDNA fragments have the expected lengths of 424 bp for IFN- γ and 417 bp for β -actin. *Lane 1*: unstimulated cells; *lane 2*: cells in presence of IL-16. B: Anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC were incubated with rIL-16 in the presence or absence of anti-IFN- γ monoclonal antibody (10 μ g/mL). IgE levels in the supernatants were measured by ELISA. Results are expressed as means \pm SD (n=12).

TABLE 1: Effects of rIL-16 and β -galactosidase on IgE production by anti-CD40/IL-4-stimulated PBMC

Experimental conditions	IgE (ng/mL)
Control	2.34 \pm 2.86
Anti-CD40/IL-4	20.72 \pm 6.25 *
Anti-CD40/IL-4 + IL-16	9.72 \pm 8.36 **
Anti-CD40/IL-4 + β -galactosidase	19.94 \pm 5.46*

* $P < 0.001$ compared to control

** $P < 0.01$ compared to anti-CD40/IL-4 stimulated cells

Figure 1

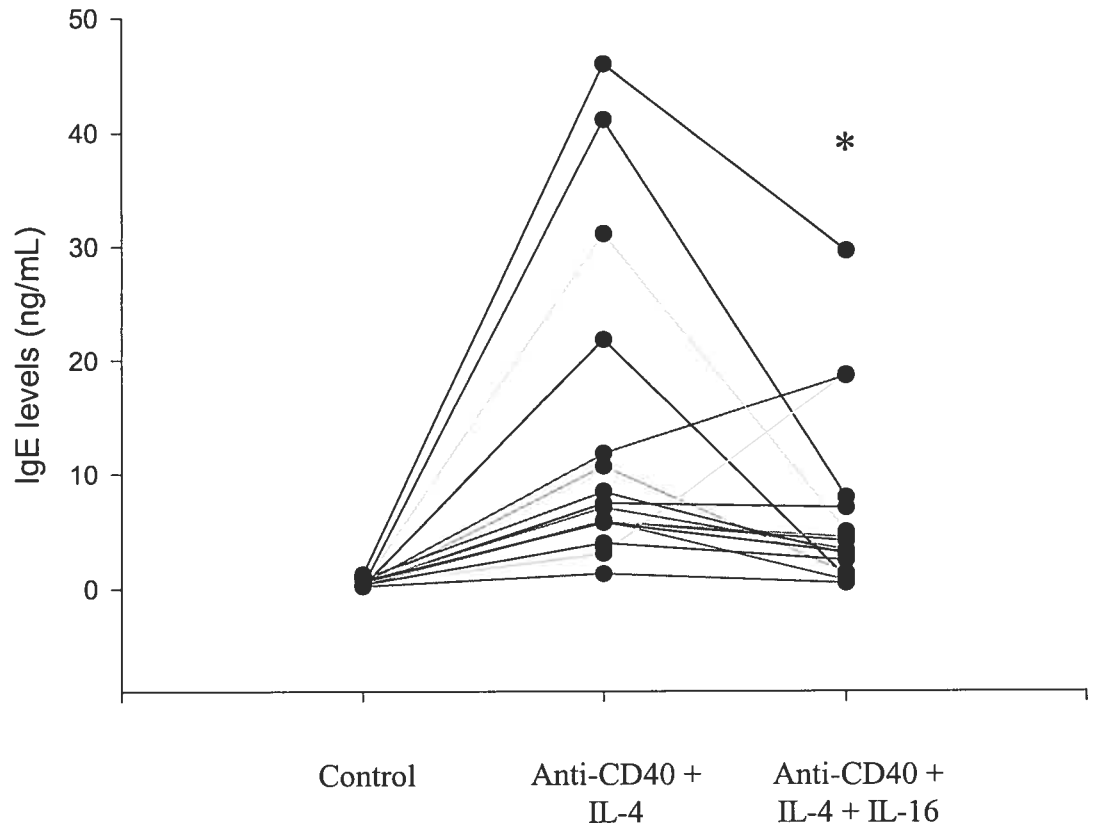


Figure 2

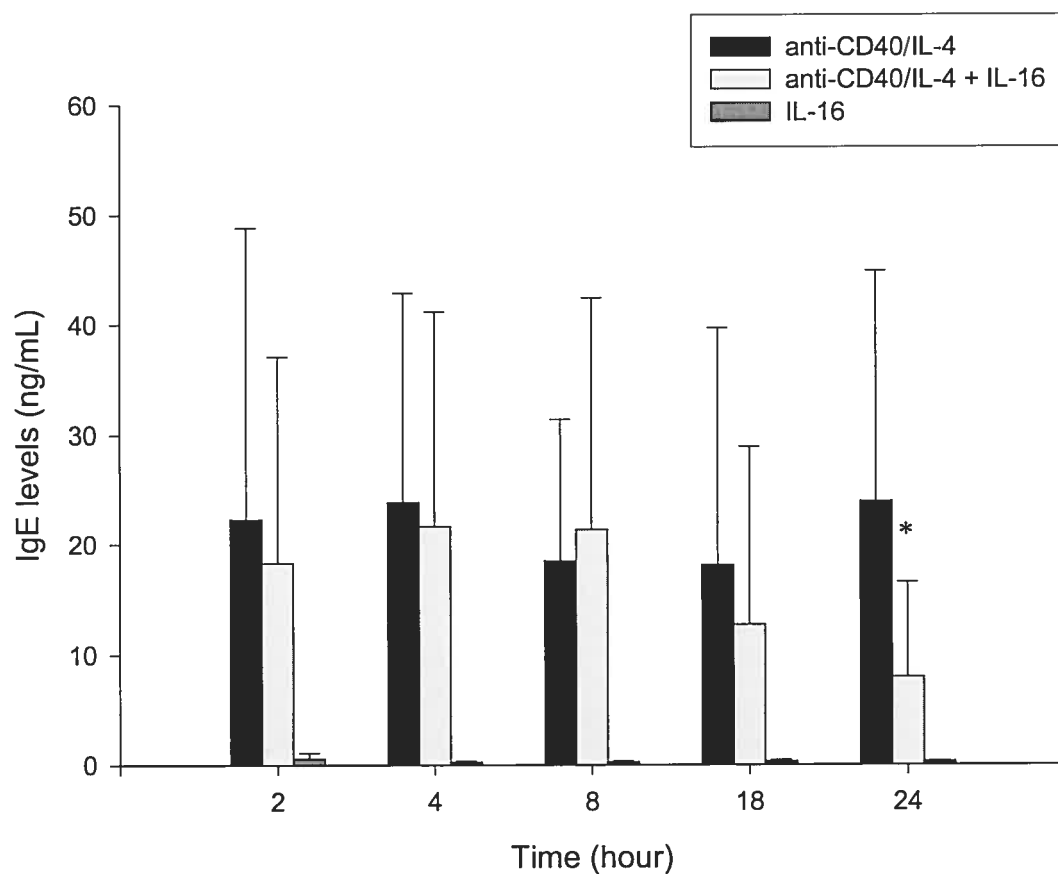


Figure 3

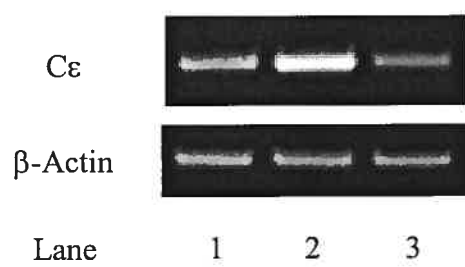
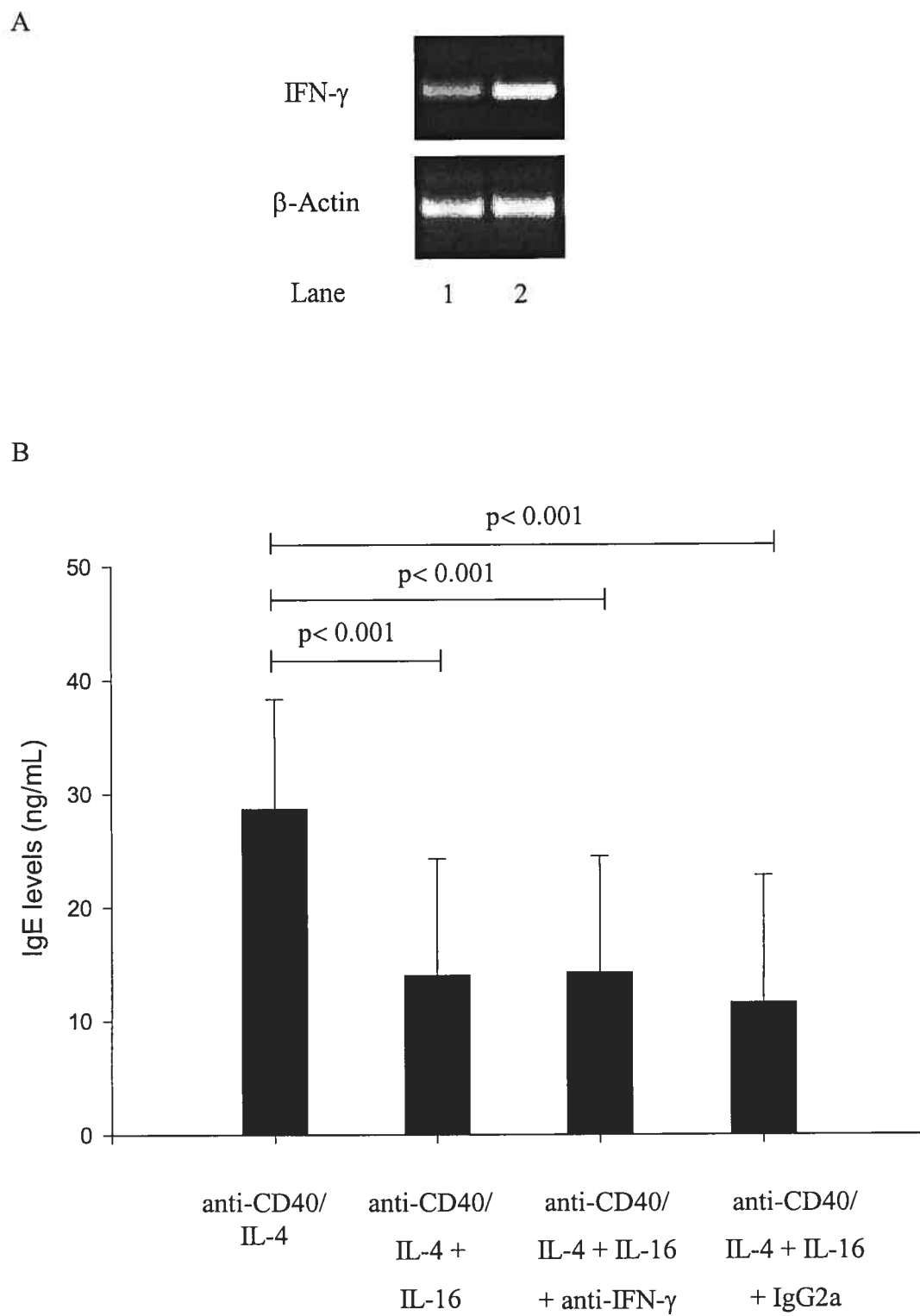


Figure 4



Chapitre III - DISCUSSION

L'IL-16 a un rôle potentiellement important dans le développement de certaines réponses immunitaires. L'IL-16 semble contribuer à la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires impliquant les lymphocytes T, tel que la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé et les maladies allergiques ^{101;138;140;150;155}. Plus particulièrement, l'IL-16 est exprimé de façon marquée dans diverses pathologies allergiques, telles l'asthme atopique, la rhinite allergique et la dermatite atopique ^{110;115;142;143;153}. On observe également la sécrétion d'IL-16 dans les voies aériennes et une augmentation de son expression tissulaire par rapport au niveau basal chez les sujets souffrant de rhinite allergique ou d'asthme atopique suite à une exposition expérimentale à un allergène *in vivo* ^{143;145;146}. Malgré la démonstration d'une production accrue de l'IL-16 aux sites d'inflammation allergique, le rôle potentiel de cette cytokine dans le développement des réponses immunitaires allergiques est présentement inconnu et semble être complexe. Ainsi, l'IL-16 induit le chimiotactisme des lymphocytes T CD4⁺ et des éosinophiles ¹¹⁸, participe aux interactions entre lymphocytes T et cellules dendritiques ^{121;122}, peut inhiber l'activation lymphocytaire par l'anti-CD3 ¹³⁰ et module le profil de cytokines produites par les lymphocytes T suite à une stimulation antigénique ¹⁵³. Des travaux récents ont démontré que L'IL-16 diminue la production d'IL-5 et augmente la production d'IFN- γ par les cellules T spécifiques chez des sujets atopiques suite à une stimulation antigénique *in vitro*. L'IL-16 semble donc diminuer le profil de cytokines T_{H2}, profil caractéristique de l'inflammation allergique. Ces données suggèrent donc

que l'IL-16 puisse avoir un rôle immunorégulateur important impliquant les lymphocytes T, dans les pathologies atopiques. Ce projet de recherche vise à explorer ce nouveau champ d'investigation. Dans la présente étude, nous avons évalué le rôle de l'IL-16 dans les réponses allergiques en déterminant l'effet de l'IL-16 sur la production polyclonale d'IgE. Nos résultats démontrent que l'IL-16 diminue la production des IgE tel que déterminée par ELISA et par l'expression de l'ARN messenger Cε.

Malgré une abondance d'études suggérant un rôle immunorégulateur d'IL-16 dans les réponses immunitaires à médiation cellulaire, l'implication de cette cytokine dans les réponses immunitaires humorales et dans l'interaction cellules T-B est encore très peu connue. L'ARN messenger d'IL-16 est exprimée de façon importante dans les ganglions lymphatiques et on observe une immunoréactivité proéminente d'IL-16 dans les amygdales chez l'humain, aux sites d'interaction entre lymphocytes T et B^{107;126}. Kaser et al. ont démontré que les lymphocytes B produisent de l'IL-16, qui elle-même induit la migration cellulaire des lymphocytes T, *in vitro*¹²⁶. Ces données suggèrent donc que l'IL-16 produite par les lymphocytes B puisse agir comme régulateur lors des interactions lymphocytes T-B lors des réponses immunitaires humorales, en permettant aux cellules T CD4⁺ de migrer vers les follicules riches en cellules B des organes lymphoïdes. Les résultats de la présente étude suggèrent que l'IL-16 puisse également contribuer aux réponses immunes de type humorales en modulant la fonction des lymphocytes B et plus particulièrement la production des IgE. La contribution potentielle de l'IL-16 dans l'activation des cellules B et la production

subséquente d'IgE n'est pas encore tout à précise. Il n'existe, à ce jour, aucune étude chez l'humain. Chez la souris, l'administration d'anticorps monoclonaux anti-IL-16 diminue partiellement les taux sériques d'IgE spécifiques à l'ovalbumine suite à l'exposition répétée d'ovalbumine en aérosol ⁹⁹. Dans ce modèle, la réduction des taux sériques d'IgE spécifiques s'accompagne d'une diminution de l'hyperréactivité bronchique sans modification toutefois de la nature de l'infiltrat inflammatoire dans les voies aériennes. Les résultats de cette dernière étude semblent en contradiction avec nos résultats actuels démontrant une inhibition de la production d'IgE par des PMBC humains *in vitro*, en présence d'IL-16. Les raisons de ces divergences apparentes ne sont pas claires. L'administration chez la souris de plusieurs doses d'un anticorps murin dirigé contre l'IL-16 humain n'est pas un système optimal. De plus, une étude récente a démontré que l'administration systémique d'IL-16 recombinante chez des souris préalablement sensibilisées à l'ovalbumine diminue l'hyperréactivité bronchique induite par l'allergène, l'éosinophilie des voies aériennes ainsi que la production de cytokines de type T_{H2} ¹⁵⁴. Les résultats de cette dernière étude sont plutôt compatibles avec un rôle inhibiteur de l'IL-16 sur les réponses immunes de type T_{H2} *in vivo*, à l'instar de nos résultats sur la production des IgE. Un effet immunosuppresseur de l'IL-16 a également été décrit dans certains modèles expérimentaux d'arthrite rhumatoïde et de greffe ^{101;152}. Finalement, l'apparente divergence des résultats des études précédentes nous indique la complexité de l'implication de l'IL-16 endogène et exogène dans les réponses immunes cellules T-dépendantes *in vivo*. Ainsi, on ne peut exclure la possibilité que les niveaux d'IL-16 endogènes au niveau tissulaire ne soit pas suffisant pour induire une

immunosuppression chez des patients atopiques *in vivo*, tel qu'observée dans un système *in vitro*.

Les mécanismes par lesquels l'IL-16 diminue la production des IgE par les lymphocytes B sont encore inconnus. L'IFN- γ est un inhibiteur important de la production d'IgE. Nous avons démontré que l'IL-16 induit la production d'IFN- γ . Nous avons donc déterminé si l'effet inhibiteur de l'IL-16 sur la production d'IgE est relié à l'induction de l'IFN- γ . Malgré l'induction de la production d'IFN- γ par l'IL-16, la neutralisation de l'IFN- γ par un anticorps monoclonal anti-IFN- γ ne modifie pas la production d'IgE. Ces données suggèrent que l'effet inhibiteur de l'IL-16 n'est pas relié à son effet sur l'IFN- γ , mais qu'il s'exerce possiblement par une voie indépendante de l'IFN- γ . L'IL-4 et l'IL-13 activent les kinases JAK1 et JAK3, qui sont essentielles à la production des IgE^{86;87}. JAK1/3 activent STAT6 qui amorce la transcription de C ϵ ⁸⁸. En effet, les souris STAT6^{-/-} ne répondent pas à l'IL-4 et possèdent de bas niveaux sériques d'IgE^{89;90}. Comme l'IL-4 et l'IL-13 induisent la production d'IgE par l'activation de STAT6, il est possible que l'IL-16 interagisse sur les événements cellulaires conduisant à l'activation de STAT6 chez les lymphocytes B. Des études ultérieures sont nécessaires afin d'évaluer si l'effet inhibiteur de l'IL-16 sur la production des IgE implique STAT6. D'un autre côté, l'interaction entre les lymphocytes B et les lymphocytes T implique plusieurs molécules de costimulation exprimées à la surface de ces cellules. Plus spécifiquement, l'interaction CD40/CD40L est nécessaire à la production d'IgE. Puisque l'IL-16 agit sur les lymphocytes T CD4+, il est possible que l'IL-16 modifie l'expression du CD40L à la

surface des lymphocytes T. Parallèlement, puisque les voies de costimulation impliquant les lymphocytes B et T sont interreliées, il est possible que l'IL-16 modifie indirectement l'expression d'autres molécules de costimulation à la surface des lymphocytes B. L'effet de l'IL-16 sur l'expression des ligands et des récepteurs impliqués dans les voies de costimulation nécessaires à la production des IgE est inconnue. Des études ultérieures sont requises. Finalement, le CD4 est le récepteur identifié d'IL-16, du moins sur les lymphocytes T. Le CD4 est exprimé chez une faible proportion de lymphocytes B ¹⁵⁶. On ne peut exclure l'existence d'autres récepteurs de l'IL-16 sur d'autres types cellulaires. Ainsi, une étude effectuée chez des souris CD4^{-/-} a démontré que l'IL-16 agit sur les monocytes en absence de CD4, suggérant ainsi l'existence d'un autre récepteur non encore identifié ¹²⁵. On ne peut donc exclure la possibilité que l'IL-16 puisse agir directement sur les lymphocytes B via le CD4 ou un autre récepteur non identifié à ce jour, du moins chez la souris. Il serait donc intéressant d'évaluer les effets d'IL-16 dans un système indépendant des cellules T en utilisant des cultures de cellules B purifiées.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'IL-16 a un rôle immunorégulateur dans les réponses immunes humorales associées aux pathologies allergiques.

CHAPITRE IV – CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats démontrent que l'IL-16 diminue la production des IgE par les lymphocytes B, probablement par une voie indépendante de l'IFN- γ . Ces données suggèrent que l'IL-16 joue un rôle immunomodulateur dans l'asthme et autres maladies allergiques. Le mécanisme d'action exact de l'IL-16 n'est pas encore connu. Les lymphocytes T sont importants dans le développement des pathologies allergiques et l'IL-16 agit directement sur les lymphocytes T. Des études ultérieures sont requises afin d'élucider les événements cellulaires et moléculaires conduisant à la réduction de la production des IgE par les lymphocytes B en présence d'IL-16. L'étude de l'implication de l'IL-16 dans la réponse immune de type allergique a le potentiel d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'asthme et les maladies allergiques en général.

BIBLIOGRAPHIE

1. Janeway, CA Jr and Travers, P. Immunobiology: the immune system in health and disease. Chapter 3. 1997. New York, Garland.
Ref Type: Generic
2. Paul, William E. Fundamental Immunology. 1999. Philadelphia, PA, Lippincott-Raven.
Ref Type: Generic
3. Holgate, S. T. 1999. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* 402:B2-B4.
4. Leung, D. Y. 1999. Pathogenesis of atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol* 104:S99-108.
5. Skoner, D. P. 2001. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J.Allergy Clin.Immunol* 108:S2-S8.
6. Cookson, W. 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402:B5-11.
7. Maddox, L. and D. A. Schwartz. 2002. The pathophysiology of asthma. *Annu.Rev.Med.* 53:477-498.
8. Renauld, J. C. 2001. New insights into the role of cytokines in asthma. *J.Clin.Pathol.* 54:577-589.
9. Corry, D. B. and F. Kheradmand. 1999. Induction and regulation of the IgE response. *Nature* 402:B18-B23.
10. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, C. C. Chu, H. Matsumoto, K. Hase, N. Nagai, T. Tanaka, M. Miyasaka, W. E. Paul, and S. Shinka. 1995. IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG1 production in vitro and in vivo. *Int.Immunol.* 7:259-268.
11. Schwartz, R. S. 2002. A new element in the mechanism of asthma. *N.Engl.J.Med.* 346:857-858.
12. Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N.Engl.J.Med.* 326:298-304.
13. Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu.Rev.Immunol* 17:255-281.

14. Cohn, L., J. S. Tepper, and K. Bottomly. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J.Immunol.* 161:3813-3816.
15. Cohn, L., R. J. Homer, A. Marinov, J. Rankin, and K. Bottomly. 1997. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J.Exp.Med.* 186:1737-1747.
16. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136:2348-2357.
17. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 18:593-620.
18. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005-2007.
19. Annunziato, F., G. Galli, L. Cosmi, P. Romagnani, R. Manetti, E. Maggi, and S. Romagnani. 1998. Molecules associated with human Th1 or Th2 cells. *Eur.Cytokine Netw.* 9:12-16.
20. Coyle, A. J., C. Lloyd, J. Tian, T. Nguyen, C. Eriksson, L. Wang, P. Ottoson, P. Persson, T. Delaney, S. Lehar, S. Lin, L. Poisson, C. Meisel, T. Kamradt, T. Bjerke, D. Levinson, and J. C. Gutierrez-Ramos. 1999. Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J.Exp.Med.* 190:895-902.
21. Oettgen, H. C. and R. S. Geha. 2001. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J.Allergy Clin.Immunol* 107:429-440.
22. Prescott, S. L., C. Macaubas, B. J. Holt, T. B. Smallacombe, R. Loh, P. D. Sly, and P. G. Holt. 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.* 160:4730-4737.
23. Pearlman, D. S. 1999. Pathophysiology of the inflammatory response. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:S132-S137.
24. Pulendran, B., J. Banchereau, E. Maraskovsky, and C. Maliszewski. 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 22:41-47.
25. Moser, M. and K. M. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* 1:199-205.

26. Iwasaki, A. and B. L. Kelsall. 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.* 190:229-239.
27. Stumbles, P. A., J. A. Thomas, C. L. Pimm, P. T. Lee, T. J. Venaille, S. Proksch, and P. G. Holt. 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.* 188:2019-2031.
28. Bachert, C., P. Prohaska, and U. Pipkorn. 1990. IgE-positive mast cells on the human nasal mucosal surface in response to allergen exposure. *Rhinology* 28:149-158.
29. MacGlashan, D. W., Jr., B. S. Bochner, D. C. Adelman, P. M. Jardieu, A. Togias, J. McKenzie-White, S. A. Sterbinsky, R. G. Hamilton, and L. M. Lichtenstein. 1997. Down-regulation of Fc(epsilon)RI expression on human basophils during in vivo treatment of atopic patients with anti-IgE antibody. *J.Immunol.* 158:1438-1445.
30. Tunon-De-Lara, J. M., A. E. Redington, P. Bradding, M. K. Church, J. A. Hartley, A. E. Semper, and S. T. Holgate. 1996. Dendritic cells in normal and asthmatic airways: expression of the alpha subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI -alpha). *Clin.Exp.Allergy* 26:648-655.
31. Oettgen, H. C. and R. S. Geha. 1999. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J.Clin.Invest* 104:829-835.
32. Scott T. and Kaliner M. Mast cells in asthma. In: Kaliner MA, Metcalfe DD eds. The mast cell in health and disease. 575-608. 1993. New York, Marcel Dekker. Ref Type: Generic
33. Calderon, M. A., S. Lozewicz, A. Prior, S. Jordan, C. J. Trigg, and R. J. Davies. 1994. Lymphocyte infiltration and thickness of the nasal mucous membrane in perennial and seasonal allergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 93:635-643.
34. Horwitz, R. J. and W. W. Busse. 1995. Inflammation and asthma. *Clin.Chest Med.* 16:583-602.
35. Bascom, R., M. Wachs, R. M. Naclerio, U. Pipkorn, S. J. Galli, and L. M. Lichtenstein. 1988. Basophil influx occurs after nasal antigen challenge: effects of topical corticosteroid pretreatment. *J.Allergy Clin.Immunol.* 81:580-589.
36. Baraniuk, J. N. 1997. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 99:S763-S772.

37. Matsumoto, N., S. Katoh, H. Mukae, T. Matsuo, K. Takatsu, and S. Matsukura. 2003. Critical role of IL-5 in antigen-induced pulmonary eosinophilia, but not in lymphocyte activation. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 130:209-215.
38. Kung, T. T., D. Stelts, J. A. Zurcher, H. Jones, S. P. Umland, W. Kreutner, R. W. Egan, and R. W. Chapman. 1995. Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12:404-409.
39. Ogawa, K., O. Kaminuma, H. Kikkawa, A. Nakata, M. Asahina, R. W. Egan, K. Akiyama, and A. Mori. 2002. Transient contribution of mast cells to pulmonary eosinophilia but not to hyper-responsiveness. *Clin.Exp.Allergy* 32:140-148.
40. Wershil, B. K., Z. S. Wang, J. R. Gordon, and S. J. Galli. 1991. Recruitment of neutrophils during IgE-dependent cutaneous late phase reactions in the mouse is mast cell-dependent. Partial inhibition of the reaction with antiserum against tumor necrosis factor-alpha. *J.Clin.Invest* 87:446-453.
41. Bradding, P., I. H. Feather, P. H. Howarth, R. Mueller, J. A. Roberts, K. Britten, J. P. Bews, T. C. Hunt, Y. Okayama, C. H. Heusser, and . 1992. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J.Exp.Med.* 176:1381-1386.
42. Kraft, M., R. Djukanovic, S. Wilson, S. T. Holgate, and R. J. Martin. 1996. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154:1505-1510.
43. Schwartz, L. B. 1992. Cellular inflammation in asthma: neutral proteases of mast cells. *Am.Rev.Respir.Dis.* 145:S18-S21.
44. Racke, K., G. Brunn, and I. Wessler. 1996. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol.Today* 17:147-148.
45. Gleich, G. J., C. R. Adolphson, and K. M. Leiferman. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu.Rev.Med.* 44:85-101.
46. Holgate, S. 1993. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* 48:103-109.
47. Drazen, J. M., J. P. Arm, and K. F. Austen. 1996. Sorting out the cytokines of asthma. *J.Exp.Med.* 183:1-5.
48. Prussin, C. and D. D. Metcalfe. 2003. 4. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111:486-494.
49. Delespesse, G., U. Suter, D. Mossalayi, B. Bettler, M. Sarfati, H. Hofstetter, E. Kilcherr, P. Debre, and A. Dalloul. 1991. Expression, structure, and function of the CD23 antigen. *Adv.Immunol.* 49:149-191.

50. Gustavsson, S., S. Hjulstrom, T. Liu, and B. Heyman. 1994. CD23/IgE-mediated regulation of the specific antibody response in vivo. *J.Immunol.* 152:4793-4800.
51. van der Heijden, F. L., R. J. Joost van Neerven, M. van Katwijk, J. D. Bos, and M. L. Kapsenberg. 1993. Serum-IgE-facilitated allergen presentation in atopic disease. *J.Immunol.* 150:3643-3650.
52. Yokota, A., H. Kikutani, T. Tanaka, R. Sato, E. L. Barsumian, M. Suemura, and T. Kishimoto. 1988. Two species of human Fc epsilon receptor II (Fc epsilon RII/CD23): tissue-specific and IL-4-specific regulation of gene expression. *Cell* 55:611-618.
53. Yamaguchi, M., C. S. Lantz, H. C. Oettgen, I. M. Katona, T. Fleming, I. Miyajima, J. P. Kinet, and S. J. Galli. 1997. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J.Exp.Med.* 185:663-672.
54. Kisselgof, A. B. and H. C. Oettgen. 1998. The expression of murine B cell CD23, in vivo, is regulated by its ligand, IgE. *Int.Immunol.* 10:1377-1384.
55. Postma, D. S., E. R. Bleecker, P. J. Amelung, K. J. Holroyd, J. Xu, C. I. Panhuysen, D. A. Meyers, and R. C. Levitt. 1995. Genetic susceptibility to asthma--bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N.Engl.J.Med.* 333:894-900.
56. Sherrill, D. L., R. Stein, M. Halonen, C. J. Holberg, A. Wright, and F. D. Martinez. 1999. Total serum IgE and its association with asthma symptoms and allergic sensitization among children. *J.Allergy Clin.Immunol.* 104:28-36.
57. Sears, M. R., B. Burrows, E. M. Flannery, G. P. Herbison, C. J. Hewitt, and M. D. Holdaway. 1991. Relation between airway responsiveness and serum IgE in children with asthma and in apparently normal children. *N.Engl.J.Med.* 325:1067-1071.
58. Burrows, B., F. D. Martinez, M. G. Cline, and M. D. Lebowitz. 1995. The relationship between parental and children's serum IgE and asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 152:1497-1500.
59. Busse, W., J. Corren, B. Q. Lanier, M. McAlary, A. Fowler-Taylor, G. D. Cioppa, A. van As, and N. Gupta. 2001. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol* 108:184-190.
60. Milgrom, H., W. Berger, A. Nayak, N. Gupta, S. Pollard, M. McAlary, A. F. Taylor, and P. Rohane. 2001. Treatment of childhood asthma with anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab). *Pediatrics* 108:E36.

61. Buhl, R., G. Hanf, M. Soler, G. Bensch, J. Wolfe, F. Everhard, K. Champain, H. Fox, and J. Thirlwell. 2002. The anti-IgE antibody omalizumab improves asthma-related quality of life in patients with allergic asthma. *Eur.Respir.J.* 20:1088-1094.
62. Corren, J., T. Casale, Y. Deniz, and M. Ashby. 2003. Omalizumab, a recombinant humanized anti-IgE antibody, reduces asthma-related emergency room visits and hospitalizations in patients with allergic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* 111:87-90.
63. Soler, M., J. Matz, R. Townley, R. Buhl, J. O'Brien, H. Fox, J. Thirlwell, N. Gupta, and C. G. Della. 2001. The anti-IgE antibody omalizumab reduces exacerbations and steroid requirement in allergic asthmatics. *Eur.Respir.J.* 18:254-261.
64. Oshiba, A., E. Hamelmann, K. Takeda, K. L. Bradley, J. E. Loader, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergen-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. *J.Clin.Invest* 97:1398-1408.
65. Coyle, A. J., K. Wagner, C. Bertrand, S. Tsuyuki, J. Bews, and C. Heusser. 1996. Central role of immunoglobulin (Ig) E in the induction of lung eosinophil infiltration and T helper 2 cell cytokine production: inhibition by a non-anaphylactogenic anti-IgE antibody. *J.Exp.Med.* 183:1303-1310.
66. Hamelmann, E., A. T. Vella, A. Oshiba, J. W. Kappler, P. Marrack, and E. W. Gelfand. 1997. Allergic airway sensitization induces T cell activation but not airway hyperresponsiveness in B cell-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1350-1355.
67. Maclean, J. A., A. Sauty, A. D. Luster, J. M. Drazen, and G. T. De Sanctis. 1999. Antigen-induced airway hyperresponsiveness, pulmonary eosinophilia, and chemokine expression in B cell-deficient mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 20:379-387.
68. Mehlhop, P. D., R. M. van de, A. B. Goldberg, J. P. Brewer, V. P. Kurup, T. R. Martin, and H. C. Oettgen. 1997. Allergen-induced bronchial hyperreactivity and eosinophilic inflammation occur in the absence of IgE in a mouse model of asthma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:1344-1349.
69. Bacharier, L. B. and R. S. Geha. 2000. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J.Allergy Clin.Immunol* 105:S547-S558.
70. Schwartz, R. S. 1995. Jumping genes and the immunoglobulin V gene system. *N.Engl.J.Med.* 333:42-44.

71. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68:869-877.
72. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and . 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
73. Nikaido, T., Y. Yamawaki-Kataoka, and T. Honjo. 1982. Nucleotide sequences of switch regions of immunoglobulin C epsilon and C gamma genes and their comparison. *J.Biol.Chem.* 257:7322-7329.
74. Clark, E. A. and J. A. Ledbetter. 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367:425-428.
75. Gauchat, J. F., D. A. Leberman, R. L. Coffman, H. Gascan, and J. E. de Vries. 1990. Structure and expression of germline epsilon transcripts in human B cells induced by interleukin 4 to switch to IgE production. *J.Exp.Med.* 172:463-473.
76. Del Prete, G., E. Maggi, P. Parronchi, I. Chretien, A. Tiri, D. Macchia, M. Ricci, J. Banchereau, J. De Vries, and S. Romagnani. 1988. IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J.Immunol.* 140:4193-4198.
77. Vercelli, D., H. H. Jabara, K. Arai, and R. S. Geha. 1989. Induction of human IgE synthesis requires interleukin 4 and T/B cell interactions involving the T cell receptor/CD3 complex and MHC class II antigens. *J.Exp.Med.* 169:1295-1307.
78. Punnonen, J., G. Aversa, B. G. Cocks, A. N. McKenzie, S. Menon, G. Zurawski, M. R. de Waal, and J. E. de Vries. 1993. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:3730-3734.
79. Kuhn, R., K. Rajewsky, and W. Muller. 1991. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254:707-710.
80. Pene, J., F. Rousset, F. Briere, I. Chretien, X. Paliard, J. Banchereau, H. Spits, and J. E. de Vries. 1988. IgE production by normal human B cells induced by alloreactive T cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *J.Immunol.* 141:1218-1224.
81. Ezernieks, J., B. Schnarr, K. Metz, and A. Duschl. 1996. The human IgE germline promoter is regulated by interleukin-4, interleukin-13, interferon-alpha and interferon-gamma via an interferon-gamma-activated site and its flanking regions. *Eur.J.Biochem.* 240:667-673.

82. Fenghao, X., A. Saxon, A. Nguyen, Z. Ke, D. Diaz-Sanchez, and A. Nel. 1995. Interleukin 4 activates a signal transducer and activator of transcription (Stat) protein which interacts with an interferon-gamma activation site-like sequence upstream of the I epsilon exon in a human B cell line. Evidence for the involvement of Janus kinase 3 and interleukin-4 Stat. *J.Clin.Invest* 96:907-914.
83. Delphin, S. and J. Stavnezer. 1995. Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J.Exp.Med.* 181:181-192.
84. Iciek, L. A., S. A. Delphin, and J. Stavnezer. 1997. CD40 cross-linking induces Ig epsilon germline transcripts in B cells via activation of NF-kappaB: synergy with IL-4 induction. *J.Immunol.* 158:4769-4779.
85. Thienes, C. P., L. De Monte, S. Monticelli, M. Busslinger, H. J. Gould, and D. Vercelli. 1997. The transcription factor B cell-specific activator protein (BSAP) enhances both IL-4- and CD40-mediated activation of the human epsilon germline promoter. *J.Immunol* 158:5874-5882.
86. Loh, R. K., H. H. Jabara, C. L. Ren, S. M. Fu, and R. S. Geha. 1994. Role of protein tyrosine kinases in CD40/interleukin-4-mediated isotype switching to IgE. *J.Allergy Clin.Immunol.* 94:784-792.
87. Yanagihara, Y., K. Ikizawa, K. Kajiwara, T. Koshio, Y. Basaki, and K. Akiyama. 1995. Functional significance of IL-4 receptor on B cells in IL-4-induced human IgE production. *J.Allergy Clin.Immunol.* 96:1145-1151.
88. Hou, J., U. Schindler, W. J. Henzel, T. C. Ho, M. Brasseur, and S. L. McKnight. 1994. An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* 265:1701-1706.
89. Shimoda, K., J. van Deursen, M. Y. Sangster, S. R. Sarawar, R. T. Carson, R. A. Tripp, C. Chu, F. W. Quelle, T. Nosaka, D. A. Vignali, P. C. Doherty, G. Grosveld, W. E. Paul, and J. N. Ihle. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-633.
90. Takeda, K., T. Tanaka, W. Shi, M. Matsumoto, M. Minami, S. Kashiwamura, K. Nakanishi, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-630.
91. Banchereau, J., F. Bazan, D. Blanchard, F. Briere, J. P. Galizzi, C. van Kooten, Y. J. Liu, F. Rousset, and S. Saeland. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu.Rev.Immunol.* 12:881-922.
92. Grewal, I. S. and R. A. Flavell. 1996. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol.Today* 17:410-414.

93. Jabara, H. H., S. M. Fu, R. S. Geha, and D. Vercelli. 1990. CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *J.Exp.Med.* 172:1861-1864.
94. Fanslow, W. C., D. M. Anderson, K. H. Grabstein, E. A. Clark, D. Cosman, and R. J. Armitage. 1992. Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells. *J.Immunol.* 149:655-660.
95. Korthauer, U., D. Graf, H. W. Mages, F. Briere, M. Padayachee, S. Malcolm, A. G. Ugazio, L. D. Notarangelo, R. J. Levinsky, and R. A. Kroczeck. 1993. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361:539-541.
96. Cruikshank, W. and D. M. Center. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of a lymphotactic factor (LCF). *J.Immunol* 128:2569-2574.
97. Center, D. M. and W. Cruikshank. 1982. Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J.Immunol* 128:2563-2568.
98. Cruikshank, W. W., D. M. Center, N. Nisar, M. Wu, B. Natke, A. C. Theodore, and H. Kornfeld. 1994. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl.Acad Sci U.S.A* 91:5109-5113.
99. Hessel, E. M., W. W. Cruikshank, A. Van, I, J. J. De Bie, B. Van Esch, G. Hofman, F. P. Nijkamp, D. M. Center, and A. J. Van Oosterhout. 1998. Involvement of IL-16 in the induction of airway hyper-responsiveness and up-regulation of IgE in a murine model of allergic asthma. *J.Immunol* 160:2998-3005.
100. Bellini, A., H. Yoshimura, E. Vittori, M. Marini, and S. Mattoli. 1993. Bronchial epithelial cells of patients with asthma release chemoattractant factors for T lymphocytes. *J.Allergy Clin.Immunol* 92:412-424.
101. Klimiuk, P. A., J. J. Goronzy, and C. M. Weyand. 1999. IL-16 as an anti-inflammatory cytokine in rheumatoid synovitis. *J.Immunol* 162:4293-4299.
102. Schall T. The chemokines. In: *The Cytokine Handbook* (ed. A. Thompson). 419. 1994. New York, Academic Press.
Ref Type: Generic
103. Kim, H. S. 1999. Assignment of human interleukin 16 (IL16) to chromosome 15q26.3 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet.Cell Genet.* 84:93.

104. Baier, M., N. Bannert, A. Werner, K. Lang, and R. Kurth. 1997. Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl. Acad Sci U.S.A* 94:5273-5277.
105. Zhang, Y., D. M. Center, D. M. Wu, W. W. Cruikshank, J. Yuan, D. W. Andrews, and H. Kornfeld. 1998. Processing and activation of pro-interleukin-16 by caspase-3. *J.Biol.Chem.* 273:1144-1149.
106. Center, D. M., H. Kornfeld, and W. W. Cruikshank. 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 17:476-481.
107. Chupp, G. L., E. A. Wright, D. Wu, M. Vallen-Mashikian, W. W. Cruikshank, D. M. Center, H. Kornfeld, and J. S. Berman. 1998. Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J.Immunol* 161:3114-3119.
108. Laberge, S., W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, and D. M. Center. 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* 155:2902-2910.
109. Laberge, S., W. W. Cruikshank, D. J. Beer, and D. M. Center. 1996. Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells in vitro. *J.Immunol* 156:310-315.
110. Laberge, S., P. Ernst, O. Ghaffar, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and Q. Hamid. 1997. Increased expression of interleukin-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 17:193-202.
111. Kaser, A., S. Dunzendorfer, F. A. Offner, O. Ludwiczek, B. Enrich, R. O. Koch, W. W. Cruikshank, C. J. Wiedermann, and H. Tilg. 2000. B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J.Immunol* 165:2474-2480.
112. Dunzendorfer, S., A. Kaser, C. Meierhofer, H. Tilg, and C. J. Wiedermann. 2000. Dendritic cell migration in different micropore filter assays. *Immunol Lett.* 71:5-11.
113. Sciaky, D., W. Brazer, D. M. Center, W. W. Cruikshank, and T. J. Smith. 2000. Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J.Immunol.* 164:3806-3814.
114. Franz, J. K., S. A. Kolb, K. M. Hummel, F. Lahrtz, M. Neidhart, W. K. Aicher, T. Pap, R. E. Gay, A. Fontana, and S. Gay. 1998. Interleukin-16, produced by synovial fibroblasts, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol.* 28:2661-2671.

115. Reich, K., S. Hugo, P. Middel, V. Blaschke, A. Heine, C. Gutgesell, R. Williams, and C. Neumann. 2002. Evidence for a role of Langerhans cell-derived IL-16 in atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 109:681-687.
116. Kramer, M. F., B. Mack, and G. Rasp. 2001. Immunohistological expression of interleukin 16 in human tonsils. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* 127:1120-1125.
117. Ryan, T. C., W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, T. L. Collins, and D. M. Center. 1995. The CD4-associated tyrosine kinase p56lck is required for lymphocyte chemoattractant factor-induced T lymphocyte migration. *J.Biol.Chem.* 270:17081-17086.
118. Cruikshank, W. W., J. L. Greenstein, A. C. Theodore, and D. M. Center. 1991. Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signaling in lymphocytes. *J.Immunol* 146:2928-2934.
119. Liu, Y., W. W. Cruikshank, T. O'Loughlin, P. O'Reilly, D. M. Center, and H. Kornfeld. 1999. Identification of a CD4 domain required for interleukin-16 binding and lymphocyte activation. *J.Biol.Chem.* 274:23387-23395.
120. Cruikshank, W. W., J. S. Berman, A. C. Theodore, J. Bernardo, and D. M. Center. 1987. Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J.Immunol* 138:3817-3823.
121. O'Doherty, U., R. M. Steinman, M. Peng, P. U. Cameron, S. Gezelter, I. Kopeloff, W. J. Swiggard, M. Pope, and N. Bhardwaj. 1993. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J.Exp.Med.* 178:1067-1076.
122. Ferbas, J. J., J. F. Toso, A. J. Logar, J. S. Navratil, and C. R. Rinaldo, Jr. 1994. CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN-alpha in response to in vitro HIV-1 infection. *J.Immunol* 152:4649-4662.
123. Stoitzner, P., G. Ratzinger, F. Koch, K. Janke, T. Scholler, A. Kaser, H. Tilg, W. W. Cruikshank, P. Fritsch, and N. Romani. 2001. Interleukin-16 supports the migration of Langerhans cells, partly in a CD4-independent way. *J.Invest Dermatol.* 116:641-649.
124. Rand, T. H., W. W. Cruikshank, D. M. Center, and P. F. Weller. 1991. CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J.Exp.Med.* 173:1521-1528.
125. Mathy, N. L., N. Bannert, S. G. Norley, and R. Kurth. 2000. Cutting edge: CD4 is not required for the functional activity of IL-16. *J.Immunol* 164:4429-4432.

126. Kaser, A., S. Dunzendorfer, F. A. Offner, T. Ryan, A. Schwabegger, W. W. Cruikshank, C. J. Wiedermann, and H. Tilg. 1999. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *J.Immunol* 163:3232-3238.
127. Parada, N. A., D. M. Center, H. Kornfeld, W. L. Rodriguez, J. Cook, M. Vallen, and W. W. Cruikshank. 1998. Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J.Immunol* 160:2115-2120.
128. Cruikshank, W. W., H. Kornfeld, and D. M. Center. 1998. Signaling and functional properties of interleukin-16. *Int.Rev.Immunol* 16:523-540.
129. Cruikshank, W. W., K. Lim, A. C. Theodore, J. Cook, G. Fine, P. F. Weller, and D. M. Center. 1996. IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J.Immunol* 157:5240-5248.
130. Theodore, A. C., D. M. Center, J. Nicoll, G. Fine, H. Kornfeld, and W. W. Cruikshank. 1996. CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J.Immunol* 157:1958-1964.
131. Center, D. M., H. Kornfeld, T. C. Ryan, and W. W. Cruikshank. 2000. Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol Today* 21:273-280.
132. Mathy, N. L., W. Scheuer, M. Lanzendorfer, K. Honold, D. Ambrosius, S. Norley, and R. Kurth. 2000. Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology* 100:63-69.
133. Wan, H. C., A. I. Lazarovits, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and P. F. Weller. 1995. Expression of alpha 4 beta 7 integrin on eosinophils and modulation of alpha 4-integrin-mediated eosinophil adhesion via CD4. *Int.Arch.Allergy Immunol* 107:343-344.
134. Bandeira-Melo, C., K. Sugiyama, L. J. Woods, M. Phoofolo, D. M. Center, W. W. Cruikshank, and P. F. Weller. 2002. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J.Immunol.* 168:4756-4763.
135. Baier, M., A. Werner, N. Bannert, K. Metzner, and R. Kurth. 1995. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 378:563.
136. Mackewicz, C. E., J. A. Levy, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, and D. M. Center. 1996. Role of IL-16 in HIV replication. *Nature* 383:488-489.
137. Zhou, P., S. Goldstein, K. Devadas, D. Tewari, and A. L. Notkins. 1997. Human CD4+ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nat.Med.* 3:659-664.

138. Blaschke, S., H. Schulz, G. Schwarz, V. Blaschke, G. A. Muller, and M. Reuss-Borst. 2001. Interleukin 16 expression in relation to disease activity in rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 28:12-21.
139. Seegert, D., P. Rosenstiel, H. Pfahler, P. Pfefferkorn, S. Nikolaus, and S. Schreiber. 2001. Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* 48:326-332.
140. Keates, A. C., I. Castagliuolo, W. W. Cruickshank, B. Qiu, K. O. Arseneau, W. Brazer, and C. P. Kelly. 2000. Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. *Gastroenterology* 119:972-982.
141. Middel, P., K. Reich, F. Polzien, V. Blaschke, B. Hemmerlein, J. Herms, M. Korabiowska, and H. J. Radzun. 2001. Interleukin 16 expression and phenotype of interleukin 16 producing cells in Crohn's disease. *Gut* 49:795-803.
142. Laberge, S., O. Ghaffar, M. Boguniewicz, D. M. Center, D. Y. Leung, and Q. Hamid. 1998. Association of increased CD4+ T-cell infiltration with increased IL-16 gene expression in atopic dermatitis. *J.Allergy Clin.Immunol* 102:645-650.
143. Laberge, S., S. R. Durham, O. Ghaffar, S. Rak, D. M. Center, M. Jacobson, and Q. Hamid. 1997. Expression of IL-16 in allergen-induced late-phase nasal responses and relation to topical glucocorticosteroid treatment. *J.Allergy Clin.Immunol* 100:569-574.
144. Cruikshank, W. W., H. Kornfeld, and D. M. Center. 2000. Interleukin-16. *J.Leukoc.Biol.* 67:757-766.
145. Laberge, S., S. Pinsonneault, E. M. Varga, S. J. Till, K. Nouri-Aria, M. Jacobson, W. W. Cruikshank, D. M. Center, Q. Hamid, and S. R. Durham. 2000. Increased expression of IL-16 immunoreactivity in bronchial mucosa after segmental allergen challenge in patients with asthma. *J.Allergy Clin.Immunol* 106:293-301.
146. Cruikshank, W. W., A. Long, R. E. Tarpy, H. Kornfeld, M. P. Carroll, L. Teran, S. T. Holgate, and D. M. Center. 1995. Early identification of interleukin-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP1 alpha) in bronchoalveolar lavage fluid of antigen-challenged asthmatics. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13:738-747.
147. Laberge, S., S. Pinsonneault, P. Ernst, R. Olivenstein, O. Ghaffar, D. M. Center, and Q. Hamid. 1999. Phenotype of IL-16-producing cells in bronchial mucosa: evidence for the human eosinophil and mast cell as cellular sources of IL-16 in asthma. *Int.Arch.Allergy Immunol* 119:120-125.
148. Frezzolini, A., M. Paradisi, A. Zaffiro, A. Provini, S. Cadoni, M. Ruffelli, and O. De Pita. 2002. Circulating interleukin 16 (IL-16) in children with

atopic/eczema dermatitis syndrome (AEDS): a novel serological marker of disease activity. *Allergy* 57:815-820.

149. De Bie, J. J., P. A. Henricks, W. W. Cruikshank, G. Hofman, F. P. Nijkamp, and A. J. Van Oosterhout. 1999. Effect of interleukin-16-blocking peptide on parameters of allergic asthma in a murine model. *Eur.J.Pharmacol.* 383:189-196.
150. Lee, S., H. Kaneko, I. Sekigawa, Y. Tokano, Y. Takasaki, and H. Hashimoto. 1998. Circulating interleukin-16 in systemic lupus erythematosus. *Br.J.Rheumatol.* 37:1334-1337.
151. de Oliveira, J. G., P. D. Xavier, S. M. Sampaio, I. S. Tavares, and A. A. Mendes. 2002. The synthesis by fine-needle aspiration biopsy cultures of IL-7, IL-16 and IL-18 is significantly associated with acute rejection in kidney transplants. *Nephron* 92:622-628.
152. Fujita, T., Y. Matsumoto, I. Hirai, K. Ezoe, T. Saito, A. Yagihashi, T. Torigoe, K. Homma, S. Takahashi, W. W. Cruikshank, K. Jimbow, and N. Sato. 2000. Immunosuppressive effect on T cell activation by interleukin-16-cDNA-transfected human squamous cell line. *Cell Immunol.* 202:54-60.
153. Pinsonneault, S., S. El Bassam, B. Mazer, W. W. Cruikshank, and S. Laberge. 2001. IL-16 inhibits IL-5 production by antigen-stimulated T cells in atopic subjects. *J.Allergy Clin.Immunol* 107:477-482.
154. De Bie, J. J., E. H. Jonker, P. A. Henricks, J. Hoevenaars, F. F. Little, W. W. Cruikshank, F. P. Nijkamp, and A. J. Van Oosterhout. 2002. Exogenous interleukin-16 inhibits antigen-induced airway hyper-reactivity, eosinophilia and Th2-type cytokine production in mice. *Clin.Exp.Allergy* 32:1651-1658.
155. Lard, L. R., B. O. Roep, C. A. Verburgh, A. H. Zwinderman, and T. W. Huizinga. 2002. Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus* 11:181-185.
156. Yu, Y., R. Rabinowitz, M. Steinitz, and M. Schlesinger. 2002. Correlation between the expression of CD4 and the level of CD4 mRNA in human B-cell lines. *Cell Immunol* 215:78-86.