

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Étude de l'activation des basophiles par le système tachykinergique

par
Nadia Ouaked

Département de microbiologie et d'immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie
option immunologie

Mai 2005

© Nadia Ouaked, 2005



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de l'activation des basophiles par le système tachykinergique

présenté par:
Nadia Ouaked

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Sophie Laberge, chercheure associée à l'Université de Montréal

Président-rapporteur

Karim Maghni, chercheur associé à l'Université de Montréal

Directeur de recherche

Jamila' Chakir, chercheure associée à l'Université Laval

Membre du jury

Résumé

Plusieurs études supportent l'existence d'interactions de type neuro-immunologiques. Ainsi, une communication bi-directionnelle régulant les fonctions cellulaires a été montrée entre les neurones et les mastocytes. La tachykinine substance P (SP) a été identifiée comme le médiateur principal de cette interaction en agissant via le récepteur neurokinine-1 (NK-1). Plusieurs études ont montré que la SP active les basophiles. Les basophiles étant des cellules circulantes du sang, il est peu probable que des interactions de type neuro-immunologiques se produisent. Ceci suggère l'existence d'une source non-neuronale de SP. Dans notre étude, nous avons montré que la lignée basophilique de rat RBL-2H3 exprime à la fois le récepteur NK-1 et la SP, ce qui suggère l'existence d'une régulation autocrine de la fonction des basophiles par le système tachykinergique. Le rôle du récepteur NK-1 sur la dégranulation antigénique et non-antigénique des basophiles, ainsi que les cascades intracellulaires activées suite à ces deux types d'activations ont été examinés. Nos résultats indiquent que le récepteur NK-1 participe dans l'activation antigénique et non-antigénique des basophiles. En conclusion, les antagonistes du récepteur NK-1 pourraient constituer une thérapie intéressante pour le traitement des allergies et de l'asthme.

Mots clés :

Allergie, Antagonistes du récepteur NK-1, Asthme, Basophiles, Dégranulation, Protéine kinase mitogène activée p 38 (p38 MAPK), Protéine kinase régulatrice extracellulaire (ERK), Neurokinine-1 (NK-1), Substance P, Tachykinines.

Summary

Among evidences of neuroimmune interaction, it has been shown that a bi-directional nerve-mast cell communication regulates cell function. The tachykinin substance P (SP), by operating *via* the neurokinin-1 receptor (NK-1), was identified as an important mediator of the nerve-mast cell interaction. SP was also found to activate basophils, which are firstly circulating leukocytes. Thus, the existence of cross-talk between basophils and nerves cannot occur in blood. This suggests that in blood the production of SP has to derive from a non-neuronal source. In our study, we have shown that the basophilic cell line RBL-2H3 expresses both the NK-1 receptor and SP, which finding suggests the existence of an autocrine tachykinergic system regulating basophil function. We have then examined the role of the NK-1 receptor in the antigenic and non-antigenic degranulation of RBL-2H3 cells, and have investigated the intracellular pathways related to these activations. Our results indicate that the NK-1 receptor participates in both the antigenic and non-antigenic activation of basophils. We conclude that NK-1 receptor antagonists may represent an interesting alternative for the treatment of allergic diseases such asthma.

Key words:

Allergy, Asthma, Basophils, Degranulation, Extracellular Regulated protein Kinase (ERK), Neurokinin-1 (NK-1) receptor, NK-1 receptor antagonist, p 38 mitogen-activated protein kinase (p38,MAPK), Substance P, Tachykinins.

Table des matières

Résumé	iii
Summary	iv
La liste des Tableaux et Figures	vii
La liste des sigles et abréviations en français	viii
La liste des abréviations et sigles en anglais	x
Les remerciements	xii
Section 1: Introduction	1
1.1 L'allergie et l'asthme	2
1.2 Le Basophile	3
1.2.1 Le basophile et la physiopathologie de l'asthme	3
1.2.2 Le récepteur à haute affinité pour les IgE : le FcεRI	4
1.2.3 Les voies d'activation intracellulaires du récepteur FcεRI	5
1.2.4 La régulation négative de la cascade d'activation du récepteur FcεRI	8
1.3 Les Tachykinines	10
1.3.1 Les récepteurs des tachykinines	12
1.3.2 Les antagonistes du récepteur NK-1	15
1.3.4 Rôle des tachykinines dans la neuro-immunomodulation	18
1.3.5 Interactions entre les cellules métachromatiques et les tachykinines	19
1.4 Hypothèse et objectifs	21
Section 2: Article 1	22
2.1 Summary	23
2.2 Introduction	23
2.3 Materials and methods	24
2.3.1 Cell culture	24
2.3.2 Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	24
2.3.3 Western blotting analysis	24
2.3.4 Immunocytofluorescence detection	24
2.3.5 Competitive Enzyme Immunoassay (EIA)	25
2.4 Results	25
2.4.1 Expression of NK-1R in RBL-2H3 cells	25
2.4.2 RBL-2H3 cells produce tachykinins	25
2.5 Conclusion	26
2.6 Acknowledgements	26
2.7 References	26
Section 3: Article 2	28
3.1 Abstract	29
3.2 Introduction	30
3.3 Methods	32
3.3.1 Cell culture	32
3.3.2 Cell sensitization, antigenic activation and β-hexosaminidase determination	32
3.3.3 Determination of SP release in response to basophils activation	32
3.3.4 Effects of NK-1 receptor antagonists on IgE-driven basophils degranulation	33
3.3.5 Detection and quantification of intracellular pools of histamine	33
3.3.6 IgE-independent degranulation of basophils	33

3.3.7	Western blotting analysis of ERK and p38 activation	34
3.3.8	Statistical analysis	34
3.4	Results	36
3.4.1	Evidence of SP release by basophils in response to FcεRI complex activation	36
3.4.2	The NK-1 receptor antagonist L-703,606 inhibits IgE-dependent degranulation of basophils	38
3.4.3	Further evidence for the involvement of the NK-1 receptor in IgE-dependent degranulation of basophils.	40
3.4.4	The NK-1 receptor antagonist L-703,606 inhibits IgE-independent degranulation of basophils	42
3.4.5	Does blocking NK-1 receptors make basophils unresponsiveness to further degranulation?.....	42
3.4.6	Involvement of ERK1/2 and p38 activation in NK-1 receptor regulation of IgE-independent but not IgE-dependent degranulation of basophils.	45
3.5	Discussion.....	47
3.6	Acknowledgements.....	52
3.7	References	53
Section 4 : Discussion.....		58
Section 5 : Références.....		67
Annexe 1.....		xiii
Introduction		xiv
Matériels et méthodes		xv
Sujets et taille d'échantillon		xvi
Critères d'inclusion.....		xvi
Critères d'exclusion.....		xvi
Prélèvements sanguins activation des basophiles.....		xvi
Préparation des conjugué d'isocyanates.....		xvii
Résultats		xviii
Patient ML-70 :Diagnostic d'une sensibilisation au HDI.....		xviii
Patient A-B :Diagnostic d'une sensibilisation au TDI.....		xix
Conclusions et perspectives		xx
Références		xxi

La liste des Tableaux et Figures

Figure 1. Schéma du récepteur FcεRI sous sa forme tétramérique αβγ ₂	4
Figure 2. Signalisation intracellulaire du récepteur FcεRI menant à la dégranulation... 6	6
Figure 3. Schéma de l'épissage alternatif des gènes PPT-A, PPT-B et PPT-C menant à la synthèse peptidique des différentes tachykinines chez l'humain. 12	12
Figure 5. Hypothèses sur les sites de liaison des tachykinines sur le récepteur NK-1. 14	14
Tableau I. Résumé des effets de la SP, la NKA et l'HK sur les cellules immunitaires. 20	20
Figure 6. NK-1 receptor (NK-1R) expression in RBL-2H3 cells. 25	25
Figure 7. Immunocytofluorescence analysis of NK-1 receptor expression in RBL-2H3 cells..... 25	25
Figure 8. PPT-A gene expression in RBL-2H3 cells as determined by multiplex RT-PCR 26	26
Figure 9. SP quantification.....37	37
Figure 10. RBL-2H3 cells degranulation.....39	39
Figure 11. Effect of NK-1 receptor antagonists on β-hexosaminidase release in RBL-2H3 cells.....41	41
Figure 12. Calcium ionophore -induced RBL-2H3 degranulation43	43
Figure 13. Further RBL-2H3 degranulation following L-703,606 treatment44	44
Figure 14. Effect of L-703,606 treatment on ERK-1/2 and p38 phosphorylation.....46	46
Figure 15. Mécanismes intracellulaires hypothétiques de la régulation tachykinergique de l'activation antigénique des basophiles. 64	64
Figure 16. Schéma de l'analyse du pourcentage d'activation des basophiles sanguins par cytométrie en flux.....xvii	xvii
Figure 17. Activation des basophiles d'un patient sensibilisé au MDI-ASH.....xix	xix
Figure 18. Activation des basophiles d'un patient sensibilisé au TDI par le conjugué TDI C61.....xx	xx

La liste des sigles et abréviations en français

Ag: Antigène
 AP : Asthme professionnel
 ASH : Albumine sérique humaine
 BTK: Tyrosine kinase de Bruton
 CCR3: Récepteur des chimiokines à motifs C-C 3
 CD: Antigène CD
 CHO: Lignée de cellules d'ovaire de hamster chinois
 COS: Lignée dérivant des cellules CV-1 de rein de singe vert africains
 CSK: C-Src tyrosine Kinase
 D1/D2 : Domaines extracellulaires de la sous-unité α du Fc ϵ RI
 DAG: Diacylglycerol
 DNP-BSA : Dinitrophényl couplé à l'albumine sérique bovine
 EC50: Concentration molaire d'un agoniste produisant 50% de l'effet maximal de cet agoniste
 ED50: Dose qui induit 50% de la réponse dans un système biologique
 EIA : Essai immuno-enzymatique
 EK: Endokinine
 ERK: Protéine kinase de regulation extracellulaire
 Fc ϵ RI: Récepteur à haute affinité pour les IgE
 Fc γ RIIB : un récepteur à faible affinité pour les IgG
 FITC : fluorescéine isothiocyanate
 fMLP : formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
 Gab2: Protéine associée à Grb2
 GADs : Protéine adaptatrice "Grb2-like" en amont de Shc
 HDI : Hexaméthylène diisocyanate
 hHK: Hémokinine humaine
 HK: Hémokinine
 IC50: Concentration du 50% d'inhibition
 ICRAC: Courant activé lors de relâche calcique
 IgE: Immunoglobuline de Type E
 IgG : Immunoglobuline de type G
 IL- : Interleukines
 IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate
 ITAM : Motif activateur basé sur les immunorécepteurs à tyrosine
 ITIM: Motif inhibiteur basé sur les immunorécepteurs à tyrosine
 Ka: Constante d'association
 Kd: Constante de dissociation
 Ki: Constante d'inhibition
 KNRK : Lignée cellulaire de cellules de rein de rat
 LAT: Protéine de liaison pour les cellules T activées
 LBA: Lavage broncho-alvéolaire
 LTC₄: Cystéinyl leukotriène C4
 M: Concentration molaire (mole/litre)
 MAFA : Antigène associé aux fonctions mastocytaires
 MDI : Méthylène diphényl diisocyanate

MEK: MAPK du signal extracellulaire de régulation
 MKKK: Protéine kinase kinase kinase mitogène activatrice
 NK-1R ou NK-1: Récepteur neurokinine-1
 NK-2 : Récepteur neurokinine-2
 NK-3 : Récepteur neurokine-3
 NKA: Neurokinine A
 NKB: Neurokinine B
 NPK Neuropeptide K
 NPy: Neuropeptide γ
 O₂ : Oxygène
 P38 MAPK: Protéine kinase mitogène active p 38
 pA2: Activité antagoniste
 PBS : Tampon phosphate
 PDG₂: Prostaglandine D₂
 PDK1: Protéine kinase 1 dépendante de PI3K
 PE : Phycoérythrine
 PH: Domaine d'homologie pleckstrine
 PI: Phosphatidylinositol
 PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH kinase
 PIP2: Phosphatidylinositol-bisphosphate
 PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
 PIPES: Piperazine-N,N'-bis-2-éthanesulfonique acide
 PIRB: Récepteur semblable aux récepteur des immunoglobulines contenant des ITIMs
 PKC: Protéine kinase C
 PLC: Phospholipase C
 PMA: 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate
 PPT-: Préprotachykinine-
 PTK: Protéine tyrosine kinase
 RBL: Lignée basophilique de rat
 RE: Réticulum endoplasmique
 RT-PCR : Transcription inverse – réaction de polymérase en chaîne
 SDS : Sodium docécy sulfate
 SDS-PAGE : Gel de polyacrilamide contenant du SDS
 SH2: Domaines d'homologie des Src kinases
 SHIP: Domaine SH2 contenant inositol polyphosphate 5' phosphatase
 SIRP: Protéine de signal régulateur
 SLP76: Domaine SH2contenant protéine des leucocytes de 76 kDa
 SNC: Système nerveux central
 SOCC: Canaux calciques opérant les réserves
 SOS: Protéine Son of sevenless
 SP: Substance P
 TBST: Tampon contenant tampon Tris, NaCl et Tween-20
 TDI : Toluène diisocyanate
 Th1/Th2: Cellules T auxiliaries de type 1 et 2
 TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

La liste des abréviations et sigles en anglais

Ag: Antigen
 BAL: Broncho-alveolar lavage
 BTK: Bruton's tyrosine kinase
 CCR3: C-C subgroup chemokine receptor 3
 CD: Cluster of differentiation
 CHO: Ovary cells of Chinese hamster
 COS: Cell line derived from CV-1 cell line (kidney cells of African green monkey)
 CSK: C-Src tyrosine Kinase
 DAG: Diacylglycerol
 EC50: Molar concentration of an agonist, which produces 50% of the maximum possible response for that agonist
 ED50: The dose of a drug inducing 50% response in a biological system that is exposed to the drug.
 EIA: Enzyme Immuno Assay
 EK: Endokinin
 ERK: Extracellular Regulated protein Kinase
 FcεRI: High affinity IgE receptor
 Gab2: Grb2-associated binder-like protein 2
 GADS : Grb2-like adapter downstream of Shc
 hHK: Human Hemokinin
 HK: Hemokinin
 IAU: Intensity arbitrary unit
 IC50: Concentration of an antagonist, which produces 50% of inhibition
 ICRAC: Calcium release activated current
 IgE: Type E immunoglobulin
 IL- : Interleukines
 IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate
 ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
 ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
 Ka: Association constant
 Kd: Dissociation constant
 Ki: Inhibition constant
 KRNK: Kidney rat cell line
 LAT: Linker for activation of T cells
 LTC₄: Cystenyl leukotriene C4
 M: molar concentration (mole/litre)
 MAFA: Mast-cell function-associated antigen
 MEK: MAPK/extracellular signal-regulated kinase
 MKKK: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
 NK-1R or NK-1: Neurokinin 1 receptor
 NK-2: Neurokinin 2 receptor
 NK-3: Neurokinin 3 receptor
 NKA: Neurokinin A
 NKB: Neurokinin B
 NPK Neuropeptide K
 NPy: Neuropeptide γ

O₂: Oxygen
P38 MAPK: p 38 mitogen-activated protein kinase
pA₂: Antagonist activity
PBS: Phosphate buffered saline
PDG₂: Prostaglandin D₂
PDK1: PI3K-dependent kinase 1
PH: Pleckstrin Homology
PI: Phosphatidylinositol
PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH kinase
PIP₂: Phosphatidylinositol-bisphosphate
PIP₃: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PIPES: Piperazine-N,N'-bis-2-ethanesulfonic acid
PIRB: Paired immunoglobulin-like receptor
PKC: Protein kinase C
PLC: Phospholipase C
PMA: 4b-phorbol 12-myristate 13-acetate
PPT-: Preprotachykinin-
PTK: Proteins tyrosine kinases
RBL: Rat basophil leukemia
RT-PCR: Reverse Transcription- Polymerase chain reaction
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SH2: Src kinase homology domain
SHIP: SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5'phosphatase
SIRP : Signal regulatory protein
SLP76: SH2-domain containing leucocyte protein of 76 kDa
SNC: Central nervous system
SOCC: store-operated calcium channels
SOS: Son of Sevenless protein
SP: Substance P
TBST: Buffer containing Tris buffer, NaCl, and Tween-20
Th1/Th2: T cell helper type 1 and 2
TNF α : Tumor necrosis factor α
VCAM-1: vascular cellular adhesion molecule-1
VLA-4: very late antigen 4

Les remerciements

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de recherche, le Dr Karim Maghni. Je le remercie de m'avoir acceptée dans son laboratoire, de m'avoir transmis son savoir avec un dévouement exceptionnel, de m'avoir formée et surtout de m'avoir enseigné le souci du travail méticuleusement bien fait. Merci pour toutes vos disponibilités et tout le temps que vous avez consacré à m'apprendre la recherche.

Je remercie également tous les membres du laboratoire que j'ai cotôyé durant mon séjour. Merci à Annie, Bertrand, Catherine, Josée, Kathia, Marie-Pascale, Maude et Philippe pour toutes les techniques transmises, les conseils ainsi que les discussions que nous avons eues. Un merci particulier à Bertrand pour son aide extrêmement appréciée lors des manipulations ainsi que pour ses idées scientifiques.

Merci également à ma famille et amis qui ont contribué, chacun à leur façon, à l'aboutissement de mes études de maîtrise, que ce soit par leur encouragement, leur soutien moral ou simplement pour leur présence en temps opportun.

Je voudrais finalement remercier tous les organismes subventionnaires qui m'ont soutenue financièrement durant mon programme de maîtrise. Je remercie la fondation J.A deSève, le département de Microbiologie et d'Immunologie de l'Université de Montréal, les Instituts de Recherche en Santé du Canada, l'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et Sécurité au Travail ainsi que le Centre Asthme au Travail.

Section 1: Introduction

1.1 L'allergie et l'asthme

Le terme allergie, introduit en 1906 par von Pirquet, implique l'induction par un antigène d'un changement de réactivité dans l'immunité protectrice et les réactions d'hypersensibilité [1]. L'atopie, souvent associée à l'allergie, est utilisée pour décrire les maladies impliquant les immunoglobulines de type E (IgE). Une personne atopique possède une susceptibilité génétique qui est responsable de la production d'une grande quantité d'IgE en réponse à un allergène commun. Plusieurs observations cliniques et épidémiologiques ont montré une corrélation entre les IgE et la sévérité de l'asthme [2]. Il existe aussi plusieurs évidences supportant l'hypothèse que l'étiologie de l'asthme serait attribuable à l'interaction entre des facteurs environnementaux et l'expression de différents gènes [3]. L'asthme est un syndrome respiratoire comprenant une réponse immédiate et une réponse semi-retardée suite à l'exposition du sujet asthmatique à un allergène donné. La réponse immédiate, caractérisée par un bronchospasme, de l'œdème et une obstruction des voies respiratoires, se produit dans la première demi-heure suivant l'exposition à l'allergène. La réponse semi-retardée, qui se produit de six à douze heures plus tard, est caractérisée par une inflammation des voies respiratoires, principalement de type éosinophilique, par une obstruction bronchique réversible, ainsi que par une hyperréactivité bronchique [4]. Cette pathologie complexe fait intervenir différents types cellulaires, et médiateurs de l'inflammation. Les cellules T de type Th2 et leur cytokines pro-allergiques, les interleukines (IL) -4 et -13, jouent un rôle dans l'asthme atopique, non-atopique, ainsi que dans l'asthme dit professionnel [5]. La libération de ces cytokines par les cellules T CD4+ permet l'interaction avec les lymphocytes B. Une fois les cellules B activées, le mécanisme de commutation de classe des immunoglobulines vers la synthèse d'IgE s'enclenche. Les IgE produits se lient à leurs récepteurs de haute affinité, le récepteur FcεRI, présents à la surface des cellules effectrices telles que les mastocytes et les basophiles. L'étape initiale de l'induction d'une réaction allergique est l'interaction spécifique entre les IgE et leur récepteur menant à l'activation du récepteur FcεRI suite au complexe formé de deux IgE et un antigène (Figure 1). Le signalisation intracellulaire découlant de l'activation du récepteur FcεRI conduit à trois événements majeurs qui sont : 1) la libération de granules de sécrétion contenant des médiateurs de l'inflammation, 2) la

synthèse et la relâche de cytokines pro-inflammatoires et 3) la génération de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires, les leucotriènes. Les événements de la réponse immédiate semblent attribuables aux mastocytes, tandis que plusieurs évidences supportent un rôle plus important des basophiles dans la réponse semi-retardée [6].

1.2 Le Basophile

Les basophiles ont été décrit par Paul Ehrlich en 1879, et comme les mastocytes, ces cellules expriment le récepteur FcεRI et elles contiennent des granules de sécrétion [7]. Ces granulocytes circulants représentent entre 0,5 à 1,0% des leucocytes sanguins chez l'humain. Des colorants cationiques basiques, tel le bleu de toluidine, colorent les glyco-aminoglycans contenu dans leur granules d'où leur nom de basophiles. La microscopie électronique a permis de montrer que ces cellules possèdent un noyau multilobé, peu de mitochondries, plusieurs granules de glycogène, ainsi que des granules denses au microscope contenant plusieurs médiateurs de l'inflammation [7, 8].

1.2.1 Le basophile et la physiopathologie de l'asthme

Les basophiles sanguins ont la capacité, suite à un stimulus antigénique, d'être recrutés au site d'inflammation dans divers tissus. Les basophiles expriment la molécule d'adhésion « *very-late-antigen-4* » (VLA-4) ce qui permet leur adhésion via la molécule « *vascular cellular adhesion molecule-1* » (VCAM-1) sur les cellules endothéliales [9, 10]. La migration dans les tissus est induite par plusieurs récepteurs des chimiokines dont les récepteurs à motifs C-C 3 (CCR3) qui sont activés en présence de la chimiokine éotaxine [11-13]. Une fois recruté au site d'inflammation, le basophile peut être activé et peut libérer divers médiateurs de l'inflammation. Ces cellules expriment également le ligand du « *cluster of differentiation 40* » (CD40). Ainsi les basophiles possèdent la même capacité que les cellules T à interagir avec les cellules B pour leur fournir les deux signaux nécessaires à leur activation, le ligand de CD40 et l'IL-4 [14, 15]. De récentes études ont montré que les basophiles sont recrutés dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques durant la réponse semi-retardée, et que ces cellules représentent la source majeure d'IL-4 [16]. D'autres études ont montré que sept heures suivant l'exposition à l'allergène, le nombre de

basophiles retrouvé dans l'expectoration des sujets asthmatiques présentant à la fois une réponse immédiate et semi-retardée, était de 70 fois supérieur au nombre de mastocytes [17]. Depuis quelques années, la recherche sur les basophiles suggère un rôle important de ces cellules dans la pathogenèse de l'asthme, particulièrement lors de la réponse semi-retardée [18].

1.2.2 Le récepteur à haute affinité pour les IgE : le FcεRI

Chez l'humain, le FcεRI est présent à la surface des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles, des plaquettes, des cellules de Langerhans, ainsi que des cellules dendritiques [19]. Ce récepteur possède une affinité de 10^{-10} M pour les IgE [20]. Selon le sujet, les basophiles expriment entre 5000 et 1 million de FcεRI à leur surface [21]. Il est intéressant de noter qu'il existe une corrélation positive entre le niveau d'IgE sérique et l'expression du récepteur à la surface des basophiles [22].

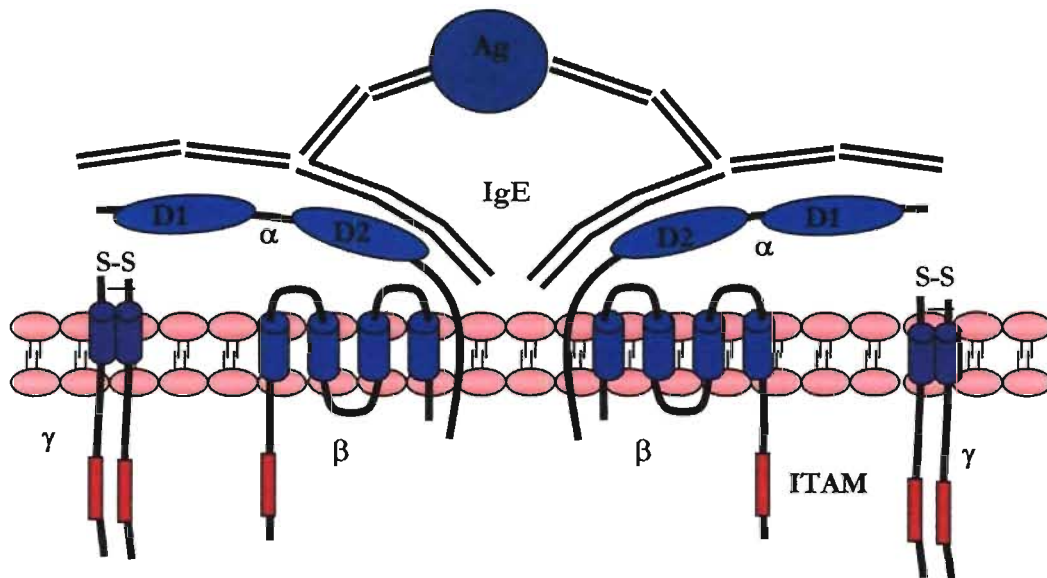


Figure 1. Schéma du récepteur FcεRI sous sa forme tétramérique αβγ₂. Ag: antigène ; D : domaine des Ig ; IgE : immunoglobuline de type E ; ITAM: motif activateur basé sur les immunorécepteurs à tyrosine ; S-S : pont disulfure.

Le récepteur FcεRI se compose de trois chaînes polypeptidiques nommées sous-unités α, β et γ (Figure 1). Chez l'humain, le récepteur peut se présenter sous une forme trimérique (αγ₂) ou tétramérique (αβγ₂) [23]. La sous-unité α contient deux domaines extracellulaires de 90 acides aminés (D1 et D2) qui interagissent avec

les domaines 3 et 4 des chaînes lourdes de la molécule d'IgE. La sous-unité β contient quatre passages transmembranaires et relie la sous-unité α et l'homodimère γ . Les sous-unités γ , reliées entre elles par un pont disulfure, contiennent chacune une séquence conservée contenant un motif activateur basé sur les immunorécepteurs à tyrosine « *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* » ITAM [24]. Des expériences de transfections du récepteur Fc ϵ RI murin, humain ou du rat ont montré que les chaînes α et γ suffisent pour l'obtention d'un récepteur fonctionnel [25]. Cependant, la présence de la chaîne β amplifie de cinq à sept fois la signalisation intracellulaire suite à l'activation du récepteur [26,27]. De plus, la chaîne β augmente l'expression de la chaîne α et par conséquent, favorise l'expression du récepteur Fc ϵ RI à la surface de la cellule [28,29].

1.2.3 Les voies d'activation intracellulaires du récepteur Fc ϵ RI

L'agrégation de deux récepteurs Fc ϵ RI par deux IgE et un antigène induit l'activation des protéines tyrosine-kinases (PTK) incluant les PTKs de la famille de Src, Syk et Tec (Figure 2). Dans le modèle « classique » menant à l'activation, Lyn, une PTK de la famille Src, est associée de façon constitutive à la chaîne β [30, 31]. Dans son état inactif, Lyn est phosphorylé dans sa partie régulatrice en c-terminale par une kinase de la famille des Src, la c-src tyrosine kinase (CSK) [32]. Suite à l'activation du récepteur Fc ϵ RI, l'information est transmise, d'une façon encore inconnue, aux sous-unités β et γ . La phosphatase CD45 vient dé-phosphoryler les résidus tyrosine inhibiteurs sur Lyn, permettant ainsi l'activation de Lyn [33]. L'autophosphorylation de Lyn est ensuite essentielle pour sa pleine activation. Lyn activée phosphoryle les résidus tyrosine sur les motifs ITAMs des domaines cytoplasmiques des sous-unités β , ce qui permet le recrutement additionnel d'autres molécules Lyn sur la sous-unité β , ainsi que de Syk sur la sous-unité γ . La kinase Lyn active Syk qui est liée à la sous-unité γ , via une interaction avec ses domaines d'homologie des Src (SH2). La kinase Syk activée, qui subit un changement conformationnel, phosphoryle ensuite plusieurs substrats menant à l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires [24].

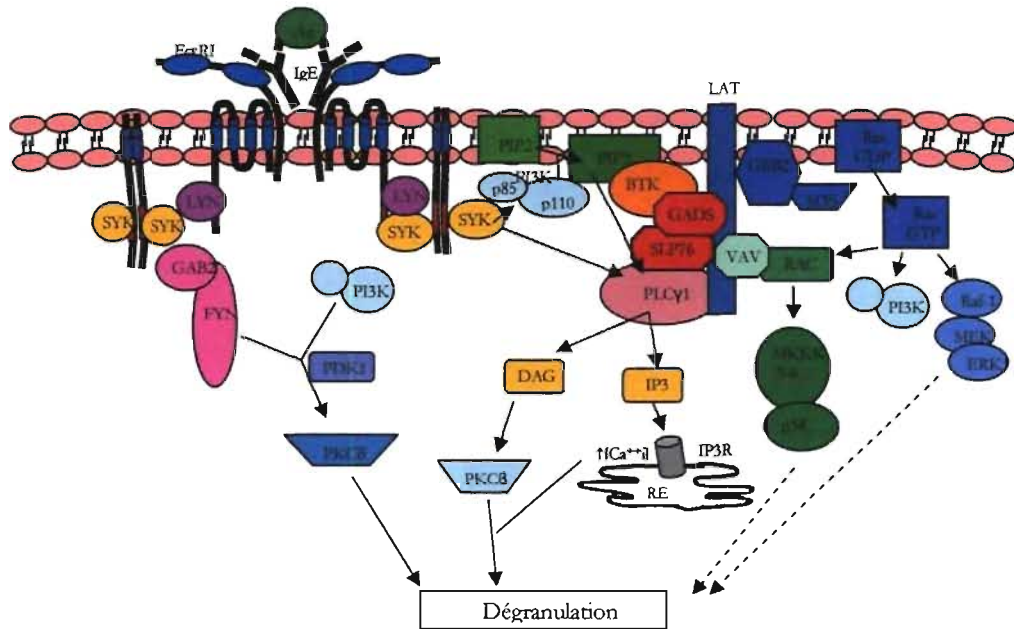


Figure 2. Signalisation intracellulaire du récepteur FcεRI menant à la dégranulation. BTK: Bruton's tyrosine kinase; DAG: diacylglycerol; ERK: Extracellular Regulated protein Kinase; GADs: Grb2-like adapter downstream of Shc; IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate; MEK: MAPK/extracellular signal-regulated kinase; MKKK: mitogen-activated protein kinase kinase kinase; PDK1: PI3K-dependent kinase 1; PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH kinase; PIP2: Phosphatidylinositol-bisphosphate; PIP3: Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate; PKC: Protein kinase C; PLC: Phospholipase C; RE: Réticulum endoplasmique; SLP76: SH2-domain containing leucocyte protein of 76 kDa.

La phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) se compose d'une sous-unité régulatrice, la p85 et d'une sous-unité catalytique, la p110. La p85 est un substrat de Syk et sa phosphorylation permet le recrutement de la p110. La PI3K activée catalyse la synthèse du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PIP2). En interagissant avec ses domaines d'homologie pleckstrine (PH), PIP3 recrute la tyrosine kinase de Bruton (BTK) à la membrane [34-36]. BTK devient ensuite un substrat pour Lyn. Après son autophosphorylation, la BTK activée phosphoryle et active la PLCγ1. Cette dernière permet la formation des seconds messagers inositol 3-phosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG) à partir du PIP2 [24]. Cependant, pour son activation, PLCγ1 doit être recrutée à la membrane et être phosphorylée sur ses résidus tyrosine. C'est la protéine « *linker for activation of T cells* » (LAT) qui recrute la PLCγ1 à la membrane [37]. Une fois à la membrane, la PLCγ1 est activée via la phosphorylation de ses résidus tyrosine par Syk ou BTK. La participation de la protéine « *SH2-*

domain containing leucocyte protein of 76 kDa » (SLP76) est nécessaire à BTK pour l'activation de la PLC γ 1. SLP76 interagit avec LAT via Grb-2 ou « *Grb2-like adapter downstream of Shc* » GADS [38].

Grb-2 est une protéine adaptatrice qui ne se lie pas directement à Syk, mais qui interagit avec cette dernière via LAT [39]. Grb-2 contribue au recrutement et à l'orientation de SOS par rapport à ses substrats: les GTPases. SOS est un facteur d'échange de guanine pour les GTPases, un processus qui augmente leur activité. Il rend Ras GTP plus actif et enclenche ses multiples cascades effectrices incluant l'activation de la PI3K, de la cascade Raf-1/MEK/ERK ou d'autres GTPases, tel que Rac. VAV est un autre facteur d'échange de nucléotides contenant de la guanine pour Rac GTPase [40]. Suite à son recrutement par SLP76, il active Rac GTPase et enclenche d'autres cascades effectrices dont celle des « *mitogen-activated protein kinase* » (MAPK) [41]. Plusieurs études ont montré l'implication des MAPK et de « *extracellular regulated protein kinase* » (ERK) dans la synthèse de l'acide arachidonique. Cependant, l'implication de ERK dans la dégranulation est controversée. Certaines études supporte un rôle de ERK dans la dégranulation [42-44] tandis que d'autres études n'ont démontré aucun rôle de ERK dans ce processus [45, 46]. ERK semblent jouer un rôle plus important dans la sécrétion de LTC₄ [47]. Un autre candidat qui joue potentiellement un rôle majeur dans la régulation des derniers événements de la cascade du récepteur Fc ϵ RI est la MAPK p38 [47, 48]. Des études ont montré que dix minutes post-stimulation antigénique et non-antigénique, une phosphorylation de ERK et de p38 est observée [44].

Une cascade de signalisation alternative et non redondante à celle de Lyn a été identifiée à la suite d'études utilisant des souris déficientes pour le gène de Lyn (Lyn^{-/-}). Ainsi, suite à l'activation du récepteur Fc ϵ RI, la kinase Fyn serait activée de façon indirecte via Gab2 [49, 50]. PI3K activée agit ensuite comme co-facteur sur la « *PI3K-dependent kinase 1* » (PDK1). Les deux kinases phosphorylent et activent la protéine kinase C (PKC) δ . Ainsi cette cascade, qui est indépendante et agit en synergie avec la casacade de Lyn kinase, est critique pour la réponse effectrice des cellules métachromatiques, via l'activation de PKC δ . La cascade de Lyn semble plus

impliquée au niveau du signal calcique puisque les mastocytes ($Lyn^{-/-}$) sont dépourvus de mobilisation calcique [51, 52]. Ainsi, ces deux cascades fournissent les deux signaux essentiels à la dégranulation des cellules métachromatiques, l'activation des PKCs et la mobilisation calcique [24].

L'agrégation du FcεRI cause une modulation biphasique du calcium libre intracellulaire. L'IP3 qui est généré par PLCγ1 se lie sur ses récepteurs qui sont des canaux calciques présents à la surface du réticulum endoplasmique (RE). Cette liaison provoque leur ouverture et permet au calcium d'entrer dans le cytosol [24]. Suite à la déplétion des réserves calciques il se produit un influx de calcium provenant de l'environnement extracellulaire, via les « *store-operated calcium channels* » (SOCC) [53], qui provoque le « *calcium release activated current* » (ICRAC). Ce processus est défini comme étant le mécanisme primaire de l'entrée calcique et de rechargement des réserves calciques [54, 55]. Le calcium ionophore, qui détourne (ou by-pass) tous les événements précoces de la cascade de signalisation induite par l'activation du récepteur FcεRI, permet également une élévation de la concentration calcique intracellulaire. Suite à cette mobilisation calcique, les canaux CRAC sont activés, et leur ouverture produit une élévation calcique [44].

1.2.4 La régulation négative de la cascade d'activation du récepteur FcεRI

La régulation négative du récepteur FcεRI requière un signal de terminaison [24]. L'activation des récepteurs contenant des motifs ITAMs est contre-réglée par la co-agrégation de récepteurs contenant des motifs inhibiteurs basés sur les immunorécepteurs à tyrosine « *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* » (ITIM) [56-58]. La phosphorylation des motifs ITIMs permet alors de recruter des phosphatases spécifiques qui dé-phosphorylent les résidus phosphoaccepteurs des motifs ITAMs sur les sous-unité β et γ et par conséquent, inactive le récepteur FcεRI [59]. Les cellules métachromatiques expriment plusieurs protéines contenant des motifs ITIMs qui sont impliquées dans la régulation négative du récepteur FcεRI . Les principales protéines sont le récepteur FcγRIIB, la protéine gp49BI, le récepteur

« *paired immunoglobulin-like receptor* » (PIRB), la protéine « *signal regulatory protein* » (SIRP) ainsi que le « *mast-cell function-associated antigen* » (MAFA).

Le récepteur Fc γ RIIB, un récepteur à faible affinité pour les IgG, contient une séquence ITIM dans son domaine cytoplasmique. Suite à l'agrégation du récepteur Fc ϵ RI, Fc γ RIIB est phosphorylé au niveau de ses résidus tyrosine dans les ITIMs par Lyn associée à la sous-unité β du Fc ϵ RI [60]. Les ITIMs phosphorylés recrutent ensuite la phosphatase « *SH2-domain-containing inositol polyphosphate 52 phosphatase* » (SHIP). La SHIP catalyse l'hydrolyse de PIP3 ce qui inhibe son recrutement à la membrane, et par conséquent, empêche l'activation de BTK et PLC γ .

La gp49B1 contient deux domaines ITIMs dans sa région cytoplasmique. La co-agrégation de cette protéine avec le Fc ϵ RI induit la phosphorylation des ITIMs et le recrutement de « *SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 1* » (SHP1) qui inhibe l'activation du récepteur Fc ϵ RI [61, 62].

Le PIRB, dont le ligand n'a pas été identifié, possède quatre motifs ITIMs dans sa région cytoplasmique. Une fois phosphorylés, ses motifs ITIMs lient SHP1 et SHP2 et inhibent l'activation du Fc ϵ RI [63, 64]. Cependant, des mécanismes SHP-indépendants semblent également impliqués puisque l'activité inhibitrice de PIRB n'est pas affectée chez des mastocytes déficients en SHP1 [65].

La SIRP est une protéine associée aux phosphatases SHP-1 et SHP-2 [66]. Lorsque SIRP est exprimé en tant que récepteur chimérique avec le Fc γ RIIB et qu'une co-agrégation se produit avec le Fc ϵ RI, SIRP bloque la relâche de sérotonine et du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) chez les cellules de la lignée RBL-2H3 [67].

La MAFA est une protéine transmembranaire qui peut interagir avec le FcεRI [68]. Cette protéine contient des motifs semblables aux motifs ITIMs dans sa queue cytoplasmique, et ainsi interagit avec les phosphatases SHP2 et SHIP [69].

Ainsi, selon la tyrosine qui est phosphorylé sur les motifs ITIMs, différentes phosphatases sont activées pour inhiber l'activation du FcεRI.

1.3 Les Tachykinines

Il existe plusieurs évidences suggérant l'existence d'interactions de type neuro-immunologiques [70]. La création d'une structure synaptique entre les neurones et les mastocytes, menant à une communication et une régulation des fonctions de ces cellules, a été démontrée [71]. Le neuropeptide substance P (SP) est le médiateur principal de cette communication [72, 73]. La SP est un décapeptide aminé appartenant à la famille des tachykinines, également nommées neurokinines. Cette famille inclut plusieurs peptides dont les membres les plus connus sont la SP, la neurokinine-A (NKA) et la neurokinine B (NKB) [74]. Durant plusieurs années les tachykinines ont été considérées comme étant des peptides d'origine exclusivement neuronale, d'où le terme de neurokinine. Les tachykinines sont présentes dans le système nerveux central (SNC), dans les fibres nerveuses C-sensitives, et dans la partie terminale des axones co-latéraux [75]. La SP et la NKA sont retrouvées en périphérie dans les neurones sensitifs afférents qui innervent quantité de tissus périphériques. Leur libération des terminaisons nerveuses leur confère un rôle de neurotransmetteurs excitateurs [76]. Bien que dans le système périphérique les nerfs sensitifs sensibles à la capsaïne étaient considérés comme la source principale de tachykinines, de récentes études montrent que des sources non-neuronales existent aussi dans les tissus et certains organes de la périphérie. Ainsi, la présence de SP a été montrée dans les cellules endothéliales humaines [77], les cellules de Leydig chez l'homme et la souris [78], ainsi que dans différents types de cellules immunitaires et inflammatoires chez l'humain, le rat et la souris [79]. La SP et la NKA sont également exprimées dans les cellules entérochromaffines [80], les cellules épithéliales [81], les fibroblastes [82], les cellules de muscles lisses intestinales et des

voies respiratoires [83, 84], et dans différents types d'organes reproducteurs féminins [85, 86]. De récentes avancées dans le domaine des tachykinines ont mené à la découverte de nouveaux peptides qui possèdent une homologie de séquence dans la région conservée en carboxy-terminale du peptide. Cette homologie de séquence est une caractéristique commune à tous les membres de la famille des tachykinines [87]. Parmi ces nouveaux peptides, l'hémokinine (HK) et les endokinines (EK) ont été identifiées, comme des peptides principalement exprimés par les cellules non-neuronales [88]. L'HK-1 est retrouvée chez la souris et le rat, et leur orthologue hHK-1, chez l'humain [89]. L'EK-1 a été retrouvée chez le lapin, et les endokinines EK-A, -B, -C et -D sont exprimés chez l'humain [90]. Les tachykinines SP, NKA, neuropeptide K (NPK) et neuropeptide γ (NP γ) sont encodées par le gène préprotachykinine (PPT)-A, alors que la NKB est encodée uniquement par le gène PPT-B. Les tachykinines HK-1, EK-A, -B, -C et -D sont encodées par le gène PPT-C (Figure 3) [74].

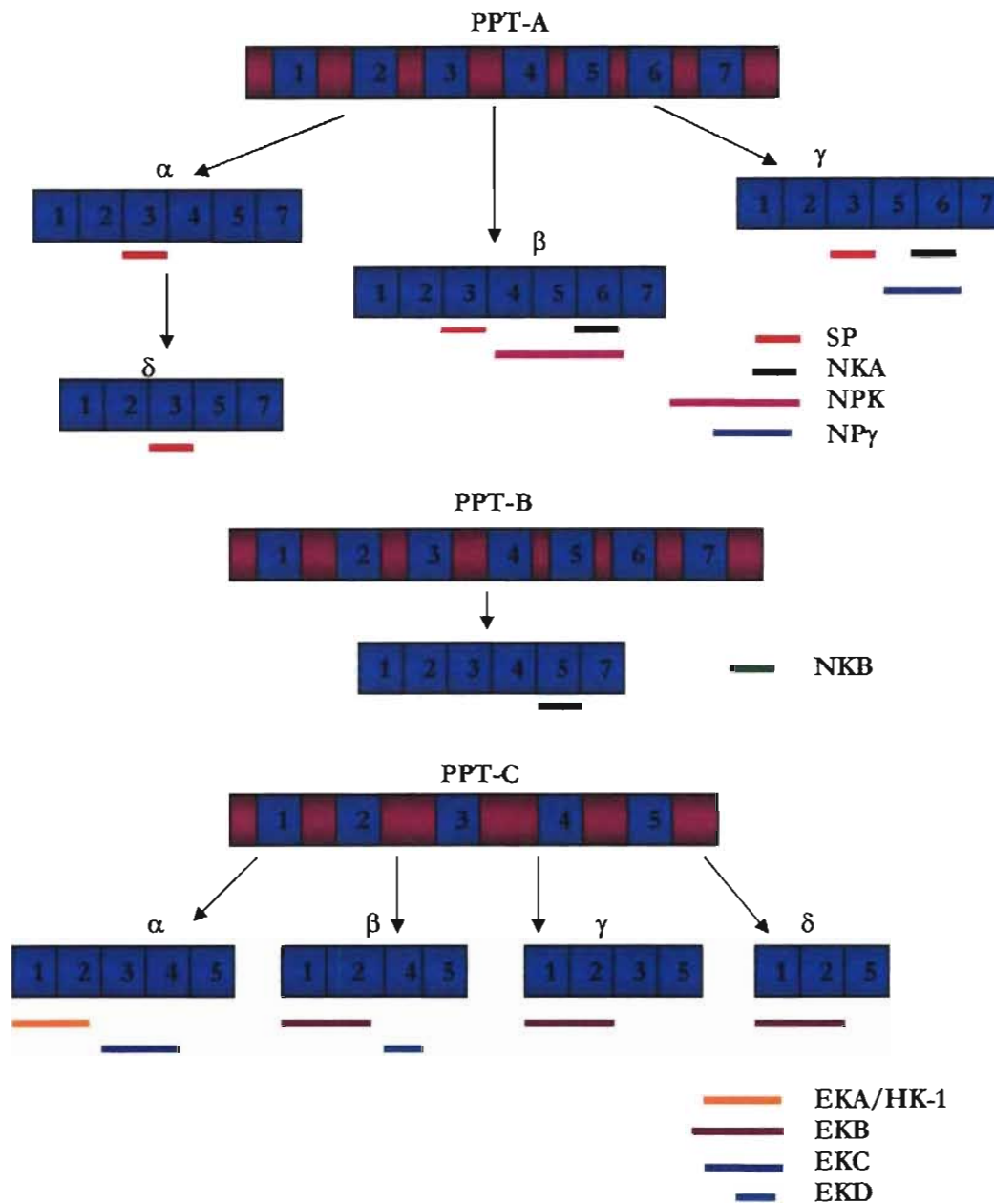


Figure 3. Schéma de l'épissage alternatif des gènes PPT-A, PPT-B et PPT-C menant à la synthèse peptidique des différentes tachykinines chez l'humain [90,91 74, 89].

1.3.1 Les récepteurs des tachykinines

Les tachykinines interagissent avec des récepteurs spécifiques appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux

protéines G [92]. À ce jour, trois récepteurs pour les tachykinines ont été identifiés, les récepteurs neurokinine-1 (NK-1), NK-2 et NK-3. La SP est le ligand endogène du récepteur NK-1, la NKA du récepteur NK-2, et la NKB du récepteur NK-3. Cependant, il existe des interactions croisées entre les différents récepteurs et les tachykinines (Figure 4). Des études de liaison de l'HK-1 et des endokinines sur les récepteurs des tachykinines ont montré que ces tachykinines ont le même profil pharmacologique que la SP bien que des différences existent entre ces peptides dans leur séquence en N-terminale [90, 93, 94].

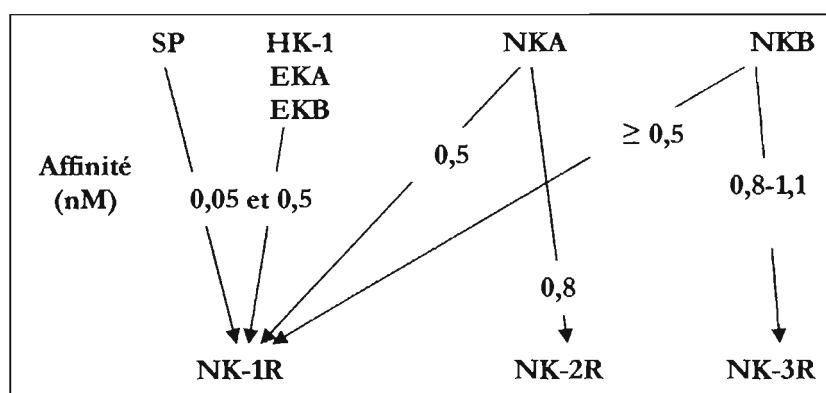


Figure 4. Affinité des tachykinines pour les récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 [90,91,95,96].

Le récepteur NK-1 est largement exprimé au niveau du SNC ainsi qu'en périphérie de manière constitutive au niveau des neurones, des cellules endothéliales, des cellules musculaires, et différents types de cellules immunitaires [79, 92]. Ce récepteur peut être induit au niveau des cellules de la moëlle osseuse par des cytokines (IL-1) et des facteurs neurotropiques [97, 98]. La découverte d'un agoniste synthétique de la SP nommé septide, le [Glp6,Pro9] SP 6-11, a fortement suggéré que l'activation du récepteur NK-1 pouvait être plus complexe que prévu [99]. L'absence de compétition dans les essais pharmacologiques entre la SP radio marquée et le septide, ou tout autre agoniste « septide-like », a mené à deux hypothèses concernant les caractéristiques de liaison du récepteur NK-1. La première hypothèse suggère la présence de deux sites de liaison sur un même récepteur [99], tandis que la deuxième hypothèse suggère un changement de conformation du

récepteur, chaque conformation ayant un site de liaison préférentiel pour l'une ou l'autre des tachykinines [100] (Figure 5).

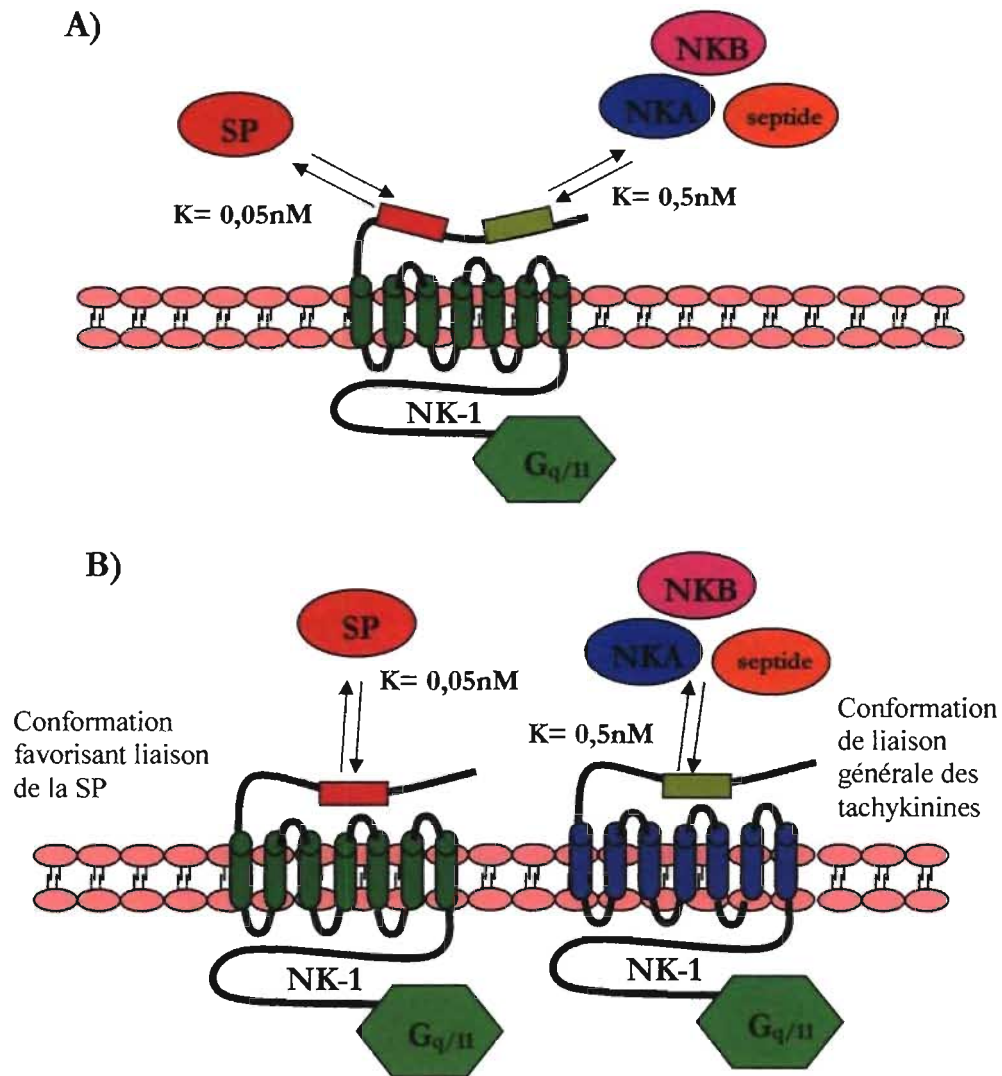


Figure 5. Hypothèses sur les sites de liaison des tachykinines sur le récepteur NK-1. **A)** Le récepteur NK-1 posséderait deux sites de liaison, **B)** Le récepteur NK-1 changerait de conformation.

L'étude des récepteurs couplé au protéines G suggère que ces récepteurs existent sous différents conformations. Chaque conformation possède ses caractéristiques de reconnaissance du ligand, de désensibilisation, et possède son propre système effecteur d'activation [101-103]. L'existence de différentes conformations actives du récepteur NK-1 a été démontrée dans plusieurs études [95, 104-106]. L'activation du récepteur NK-1 par le site de liaison du récepteur NK-1 dit

« classique » peut activer une adénylate cyclase ou une PLC, tandis que le site nommé « septide » est seulement couplé à une PLC [107, 108]. La SP est la seule tachykinine endogène connue qui possède une haute affinité pour le site dit « classique ». Les agonistes du site dit « classique » du récepteur NK-1 agissent comme agonistes partiels sur le site « septide » [73]. Cependant, la présence de deux conformères n'exclut pas l'existence de deux sites distincts sur le récepteur NK-1. Récemment, il a été montré que la NKA se lie sur le site « septide » [108], et de ce fait que le site « septide » est le site de liaison de la NKA sur le récepteur NK-1 [109]. En fait, des mutations ponctuelles dans les régions 193-197 de la séquence du récepteur NK-1 empêche l'interaction de la NKA et du « septide », mais pas celle de la SP avec le récepteur NK-1. Ces résultats suggèrent que le site de liaison de la SP, et celui du « septide » et de la NKA sont deux sites distincts sur le récepteur NK-1 [110]. Ainsi, le récepteur NK-1 existe sous deux conformations différentes et possède deux sites de liaison différents pour les tachykinines. Il a été suggéré que EKA et EKB pourraient être les ligands principaux du récepteur NK-1 en périphérie, particulièrement dans les tissus non-innervés ne contenant pas la SP [91]. Le site de liaison des endokinines sur le récepteur NK-1 est actuellement inconnu. Cette question fera l'objet d'un prochain projet de recherche dans notre laboratoire.

1.3.2 Les antagonistes du récepteur NK-1

Les connaissances que nous avons concernant les récepteurs des tachykinines proviennent initialement des études pharmacologiques utilisant les antagonistes de ces récepteurs. Plusieurs antagonistes dérivant de la SP ont été développés depuis les années 1980. La recherche d'un antagoniste non-peptidique de la SP a débuté en 1991. Il existe aujourd'hui une grande compétition dans ce domaine de recherche qui représente un potentiel thérapeutique important, particulièrement dans le traitement de l'asthme (section 1.3.3).

Parmi ces antagonistes, le WIN 51078 (17- β -Hydroxy-17- α -éthynyl-5- α -androstandro[3,2-b]pyrimido[1,2- α]benzimidazole) est un antagoniste non-peptidique faisant partie des composés possédant un squelette chimique des hétérostéroïdes et ayant un IC₅₀ de 50 nM sur des membranes de cerveau de rat [111]. Plusieurs dérivés

structuraux ont été synthétisés afin de déterminer les pré-requis d'une interaction de haute affinité avec le récepteur NK-1. WIN 51078 a servi d'outil pour définir le site de liaison de la série d'antagonistes hétérosteroides en comparaison avec des ligands de haute-affinité.

Une série d'antagonistes pipéridine benzyléther a également été développée. Parmi ces antagonistes on retrouve l'antagoniste L-733,060 hydrochloride ((2S,3S)-3-[[3,5-bis (Trifluorométhyl)phényl] méthoxy]-2-phénylpiperidine hydrochloride) qui a été développé par la compagnie MerckFrosst. Cet antagoniste montre un IC_{50} de 1,0 nM pour le récepteur NK-1 humain exprimé sur les cellules CHO [112]. Un autre antagoniste, le L-703,606 « oxalate salt » (*cis*-2-(Diphénylméthyl)-N-([2-iodophényl] méthyl)-1-azabicyclo (2.2.2) octan-3-amine) inhibe la liaison de la SP avec récepteur NK-1 humain avec un IC_{50} de 2nM. La SP inhibe la liaison de cet antagoniste avec un K_d de 0.04 +/- 0.03nM sur 65% des sites du récepteur, et avec un K_d de 1.5 +/- 0.7nM sur 35% des sites du récepteur [113]. Son affinité est de l'ordre de 10^{-9} M et il fonctionne comme un antagoniste compétitif pour la production d'inositol phosphate induite par la SP.

Une série d'antagoniste consistant en des perhydroisoindolones a été développée par les chercheurs de « Rhone-Poulenc » en 1991 [114]. Ils ont ainsi décrit les caractéristiques pharmacologiques de l'antagoniste du récepteur NK-1. Le RP 67580 ((3*aR*,7*aR*)- Octahydro- 2- [1- imino-2-(2- méthoxyphényl) éthyl]-7,7-diphényl-4*H*-isoindol), est un composé possédant une haute affinité et sélectivité pour le récepteur NK-1 chez le rat ($K_i = 4.2$ nM ; membranes de cerveau) et une très bonne activité antagoniste *in vitro* ($pA_2 = 7.16$ sur l'iléum du cobaye), et *in vivo* ($ED_{50} = 0.04$ mg/kg) sur l'augmentation de l'extravasation des protéines plasmatiques induite par la SP au niveau de la vessie urinaire de rat.

Un analogue de la substance P, le [D-Arg¹, D-Phe⁵, D-Trp^{7,9}, Leu¹¹] substance P ou antagoniste D, a également été développé. Le traitement avec l'antagoniste D a montré une inhibition de la croissance des petites cellules

cancéreuses du poumon *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une induction de l'apoptose de ces cellules [115].

Le MDL 105,212, un antagoniste avec une structure de pipéridine, a été identifié comme un antagoniste non peptidique potentiel pour les récepteurs NK-1 et NK-2 qui inhibe à la fois les effets de la SP et de la NKA *in vivo* et *in vitro* [116]. Ce composé montre une très bonne affinité pour le récepteur NK-1 ($IC_{50} = 3.11$ nM) et NK-2 ($IC_{50} = 8.40$ nM).

Le développement des antagonistes sélectifs pour les récepteurs des tachykinines a ainsi permis d'étudier la contribution de chaque type de récepteur des tachykinines et leurs effets biologiques au niveau des voies respiratoires.

1.3.3 Rôle des tachykinines dans la physiopathologie de l'asthme

La relâche de neuropeptides, incluant les tachykinines, par les fibres nerveuses C-sensitives provoque une inflammation dans les voies respiratoires, nommée inflammation neurogénique [117]. Bien que ces fibres soient peu abondantes dans les voies respiratoires chez l'humain comparativement aux petits mammifères [118], la quantité de SP retrouvée dans les segments bronchiques (3 pmol/g de tissus) est comparable à celle du cobaye [119]. Chez l'humain, les tachykinines ont été mesurées dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA), dans l'expectoration induite ainsi que dans le plasma [120]. Nieber *et al.* ont trouvé une quantité significativement plus importante de SP dans le LBA des sujets atopiques comparativement aux sujets non-allergiques après une provocation endobronchique avec un allergène [121]. La libération des tachykinines est une indication de leur rôle potentiel dans la pathologie étudiée. Fait intéressant à noter, la SP et la NKA n'induisent une bronchoconstriction que chez les sujets asthmatiques, indiquant qu'une hyperréactivité bronchique à ces neuropeptides est une caractéristique de l'asthme [122]. En fait, la SP et la NKA provoquent plusieurs effets contribuant aux changements observés dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques. Parmi

ceux-ci, nous retrouvons la contraction des muscles lisses, la sécrétion par des glandes submucosales, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la stimulation des nerfs cholinergiques ainsi que la stimulation des cellules du système immunitaire [92, 117, 120, 123]. Ainsi, l'activation du récepteur NK-2 est responsable majoritairement de la contraction des muscles lisses tandis que l'activation du récepteur NK-1 est principalement responsable de la vasodilatation, l'augmentation de l'extravasation des protéines plasmatiques, la sécrétion de mucus [124].

L'analyse des tissus pulmonaires obtenus lors d'autopsie, de lobectomies ou de bronchoscopies chez les sujets asthmatiques a montré que le nombre et la longueur des fibres nerveuses immuno-réactives pour la SP étaient augmentées comparativement aux sujets non-asthmatiques [125]. Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé une augmentation des fibres nerveuses C-sensitives contenant de la SP dans les spécimens de biopsies pulmonaires provenant de sujets asthmatiques [126]. Ces résultats questionnent la source de tachykinines au niveau pulmonaire chez l'humain. Récemment, Heaney *et al.* ont reporté que les concentrations de NKA retrouvées dans le LBA des sujets sains ou des sujets asthmatiques ne peut être attribuées exclusivement à une source neuronale de ce peptide [127]. De plus en plus de travaux de recherche indiquent que les cellules du système immunitaire sont une source importante de tachykinines. Ainsi, la SP est synthétisée par les éosinophiles (souris et humain) [128, 129], les monocytes et les macrophages (souris et humain) [130, 131], les lymphocytes (humain) [132] et par les cellules dendritiques (souris) [133-135]. Le recrutement de cellules immunitaires dans les voies respiratoires lors d'une inflammation, pourrait expliquer l'augmentation de la quantité de SP retrouvée chez les sujets asthmatiques. De plus, la faible quantité de fibres C-sensitives serait compensée dans les voies respiratoires humaines par la production non-neuronale de ces peptides.

1.3.4 Rôle des tachykinines dans la neuro-immunomodulation

Plusieurs études indiquent un rôle important des tachykinines dans la régulation du système immunitaire. Ainsi, la présence de fibres nerveuses immuno-

réactives pour la SP dans les organes du système immunitaire tel les ganglions lymphatiques, le thymus ainsi que la moelle osseuse sont des évidences de l'existence d'une interaction entre ces deux systèmes [136]. De plus, les récepteurs des tachykinines sont exprimés par plusieurs types de cellules immunitaires [133]. Les effets des tachykinines SP, NKA et HK-1 sur les différents types de cellules immunitaires sont résumés dans le Tableau I.

1.3.5 Interactions entre les cellules métachromatiques et les tachykinines

L'existence d'une communication bi-directionnelle régulant les fonctions cellulaires a été montrée entre les neurones et les mastocytes. La SP a été identifiée comme le médiateur principal de cette interaction [70, 72, 137]. Plusieurs autres études ont également montré l'existence d'interactions entre les basophiles et les tachykinines. Ainsi, la SP induit la libération d'histamine par les basophiles sanguins [138], et elle augmente la libération d'histamine chez les cellules métachromatiques de sujets normaux et asthmatiques [139]. Il a été également démontré que la libération d'histamine par les cellules métachromatiques était significativement augmentée chez les asthmatiques en comparaison avec des sujets normaux [140]. L'ensemble de ces études indiquent que la SP participe dans l'activation des basophiles, bien que le type de récepteur des tachykinines impliqué dans l'activation des cellules métachromatiques soit inconnu. De plus, la possibilité que le système tachykinergique interagisse avec le récepteur FcεRI lors de l'activation antigénique des basophiles n'a également jamais été étudié.

Type cellulaire	Effet
Précurseurs	Favorise le développement et prolifération de la lignée lymphoïde (HK-1) [89, 141] Stimule l'hématopoïèse des lignées érythrocytes et myéloïdes (SP-NKA) [142] Induit la production de facteurs favorisant l'hématopoïèse par cellules stromales (SP) [97, 143]
Lymphocytes	Chémoattractant (SP) [144-147] Cofacteur de la différenciation des lymphocytes B (SP-HK-1) [89, 148-150] Augmente la sécrétion d'immunoglobulines (SP-NKA) [151, 152] Stimule la relâche de cytokines pro-inflammatoires (SP) [153-155] Stimule l'activité natural killer des cellules T (SP) [156, 157] Stimule la prolifération des lymphocytes T (SP, HK-1) [141, 158]
Monocytes/ Macrophages	Chémoattractant (SP) [146, 147, 159] Stimule la relâche de cytokines pro-inflammatoires (SP-NKA) [160, 161] Induit l'activité oxydative (SP-NKA) [162, 163] Stimule la synthèse et la relâche des métabolites de l'acide arachidonique (SP) [162] Augmente la phagocytose (SP) [164]
Neutrophiles	Chémoattractant (SP) [147, 165-167] Stimule la dégranulation (SP) [165] Augmente l'adhérence aux cellules épithéliales (augmentation de l'expression des molécules d'adhésion) (SP) [168-170] Stimule la relâche de cytokines pro-inflammatoires (SP) [168]
Éosinophiles	Chémoattractant (SP) [147, 171] Stimule l'activation, la dégranulation, et la relâche d'O ₂ et de thromboxane (SP) [170]
Mastocytes/ Basophiles	Contact entre les mastocytes et les fibres nerveuses (SP) [70, 72, 137, 172, 173] Induit la relâche d'histamine et de sérotonine (SP) [174-181] Stimule la relâche de cytokines pro-inflammatoires (SP) [182]

Tableau I. Résumé des effets de la SP, la NKA et l'HK sur les cellules immunitaires. La tachykinine impliquée est indiquée entre parenthèse.

1.4 Hypothèse et objectifs

Nous postulons que les tachykinines sont impliquées dans la modulation des fonctions des basophiles, et que leur mécanisme d'action est associé à l'activation du récepteur NK-1. Le modèle cellulaire utilisé dans cette étude est les cellules RBL-2H3 car cette lignée basophilique de rat a servi de modèle pour la majorité des études portant sur le récepteur FcεRI [183].

Les objectifs sont:

1. De confirmer l'expression du récepteur NK-1 chez les RBL-2H3 [184].
2. De déterminer l'expression du gène PPT-A chez les RBL-2H3.
3. De déterminer le rôle du récepteur NK-1 dans l'activation antigénique et non-antigénique de ces cellules, ainsi que son mécanisme d'action.

Dans un deuxième temps, nous avons développé, en collaboration avec le Dr Guillaume Monneret (Université Lyon-Sud, France) un test de détection de l'activation des basophiles en sang total (Annexe 1). Ce test pourrait être un outil intéressant dans la détermination d'un diagnostic d'asthme dit professionnel aux agents de bas poids moléculaires tels les isocyanates. Le dernier objectif présenté dans ce mémoire était de déterminer la faisabilité de la mesure de l'activation des basophiles sanguins pour la détection de la sensibilisation aux agents de bas poids moléculaire chez les sujets sensibilisés à ces agents. Nous avons aussi développé ce test dans le but de pouvoir étudier dans le futur la modulation de l'activation des basophiles humains par les tachykinines sans avoir à purifier ces cellules.

Section 2: Article 1

Evidence of autocrine tachykinergic regulation of basophil function
N. Ouaked, B. Lefort, A. Poirier and K. Maghni

2.1 Summary

Bi-directional nerve-mast cell communications regulate cell function. Substance P (SP), by operating *via* the neurokinin-1 receptor (NK-1), was identified as an important mediator of the nerve-mast cell interaction. SP was also found to activate basophils. Basophils are firstly circulating leukocytes. Thus, the existence of cross-talk between basophils and nerves cannot occur in blood. This suggests that SP derives from a non-neuronal source in blood. In this study, we showed that the basophilic cell line RBL-2H3 express both NK-1 receptor and SP. These findings strongly suggest the existence of a tachykinergic regulation of basophil function independently of interactions with nerve cells.

2.2 Introduction

There is growing evidence of functional bi-directional nerve-mast cell interactions regulating cell function.¹ Nerve-derived substance P (SP) by operating *via* the neurokinin-1 receptor (NK-1) was identified as an important mediator of the nerve-mast cell cross-talk.¹ SP is a member of the tachykinins family, and derived from the translation of the four mRNA transcripts α , β , γ and δ of the preprotachykinin-A (PPT-A) gene². Although basophils were found to migrate into inflamed tissues³, these metachromatic cells are firstly circulating leukocytes. Thus, nerve-basophil communications cannot occur in blood. However, SP activates basophils⁴ which strongly suggests the presence of NK-1 receptor on human basophils, and probably non-neuronal source of SP in blood. Recently, we showed that non-neuronal cells, such as airway smooth muscle cells, produce SP and express the NK-1 receptor.⁵ These findings indicate the existence of tachykinergic regulation of cell function independently of interactions with nerve cells.

The aim of the study was to determine whether basophil function may be regulated in an autocrine fashion by tachykinins. To address this issue, we used the rat RBL-2H3 cells, and determined the expression of both NK-1 receptor and SP in this basophilic cell line.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Cell culture

RBL-2H3, KNRK and Jurkat cells were purchased and cultured as recommended by the American Type Culture Collection.

2.3.2 Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from cells, and gene expression was determined using RT-PCR technique as previously described.⁵ Specific set of primers for the rat NK-1 receptor and PPT-A gene (isoforms α , β , δ and γ) were used for gene amplification.⁵ The housekeeping gene cyclophilin was co-amplified (multiplex PCR) with the gene of interest. Rat brain tissue was used as positive control.

2.3.3 Western blotting analysis

RBL-2H3, Jurkat and KNRK cells were lysed in TEX buffer and samples were resolved by SDS-PAGE on polyacrylamide gels. Nitrocellulose membranes were sequentially probed with goat anti-NK-1R antibody (1:1000; Novus) and peroxidase-linked rabbit-anti-goat (1:15 000; Jackson ImmunoResearch). Immunoreactive protein bands were revealed using the Supersignal Chemiluminescent (Pierce) as a substrate. Rat KNRK cells and human Jurkat cells were used as negative and positive controls for NK-1 receptor expression, respectively.

2.3.4 Immunocytofluorescence detection

RBL-2H3 cells were fixed in Intraprep solution (Beckman Coulter), and then incubated with a goat anti-NK-1 receptor (1:400; Santa Cruz) followed by incubation with the Alexa 488-conjugated donkey anti-goat IgG antibody (1:1000; Molecular Probes). Nuclei were stained with DAPI and slides were mounted in ProLong gold antifade (Molecular Probe). Slides were examined by epifluorescence with the Olympus IX-81 and Image-Pro Plus software (Media Cybernetics).

2.3.5 Competitive Enzyme Immunoassay (ELA)

Cell pellets (3×10^6 cells) were lysed in 2N glacial acetic acid. SP levels in cell lysates were measured using a sensitive enzyme immunoassay (ELA) kit based on competitive binding (Cayman) as previously described.⁵

2.4 Results

2.4.1 Expression of NK-1R in RBL-2H3 cells

In the present study, we confirmed that basophilic cell line RBL-2H3 express mRNA transcript for NK-1 receptor⁶ (Figure 6a). Western blot analysis of three different RBL-2H3 cell lysates indicated that the NK-1 receptor is transcribed as a mature protein (Figure 6b). Furthermore, determination of NK-1 receptor expression by immunocytofluorescence indicated that the majority of RBL-2H3 cells express this receptor (Figure 7a-d).

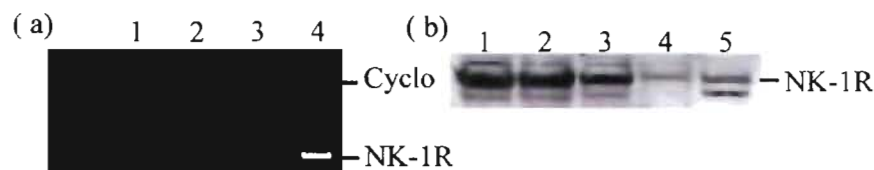


Figure 6. NK-1 receptor (NK-1R) expression in RBL-2H3 cells. (a) Multiplex RT-PCR analysis: 1-3: RBL-2H3 cells. 4: rat brain. Cyclo: cyclophilin. (b) Western Blot: 1-3: RBL-2H3 cells. 4: KNRK. 5: Jurkat.



Figure 7. Immunocytofluorescence analysis of NK-1 receptor expression in RBL-2H3 cells. (a) NK-1 receptor staining and (b) nuclei staining in the same cell preparation. (c) absence of NK-1 receptor staining in the isotypic control and (d) nuclei staining in the same cell preparation. (Magnification 40X).

2.4.2 RBL-2H3 cells produce tachykinins

The expression of the four PPT-A mRNA transcripts in RBL-2H3 cells was determined by multiplex RT-PCR. As shown in figure 8, the β -isoform is the predominant PPT-A gene isoform detected in four different preparations of RBL-2H3 cells. This finding suggests that the major PPT-A gene-derived neuropeptide should be

SP. Using a competitive EIA for the specific quantification of SP in biological samples, we showed that this neuropeptide is contained in RBL-2H3 cells at the levels of $368.3 \pm 86.2 \text{ pg}/3 \times 10^6 \text{ cells}$ ($n=4$).

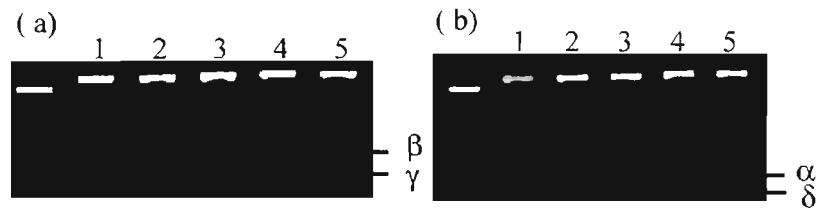


Figure 8. PPT-A gene expression in RBL-2H3 cells as determined by multiplex RT-PCR: (a) β and γ isoform and (b) α and δ isoforms. 1-4: RBL-2H3 cells. 5: rat brain. Cyclo: cyclophilin.

2.5 Conclusion

We showed that the NK-1 receptor is expressed on the majority of RBL-2H3 cells. Furthermore, we demonstrated that RBL-2H3 express mainly the β -isoform of the PPT-A gene, and have the capacity to produce SP. These findings strongly suggest that tachykinins regulate basophils function in an autocrine manner. Crosslinking of immunoglobulin E (IgE) by binding to the high affinity receptor $Fc\epsilon RI$ with specific allergens is a major mechanism in basophils activation. However, the factors that regulate antigen-driven IgE-mediated basophils activation are not fully elucidated. Work is in progress to examine whether tachykinins are involved, in an autocrine fashion, in the mechanisms leading to basophils degranulation in response to $Fc\epsilon RI$ activation.

2.6 Acknowledgements

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research MOP-57742. KM is a scholar of the 'Fonds de la Recherche en Santé du Québec'. NO has a studentship from the 'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail'.

2.7 References

1. Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M, Bienenstock J. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P. *J Immunol.* 163: 2410-5, 1999.

2. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev.* 46: 551-99, 1994.
3. Gauvreau GM, Lee JM, Watson RM, Irani AM, Schwartz LB, O'byrne PM. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 1473-8, 2000.
4. Heaney, LG, Cross LJ, Ennis M. Histamine release from bronchoalveolar lavage cells from asthmatics subjects after allergen challenge and relationship to the late asthmatic response. *Clin Exp Allergy.* 28: 196-204, 1998.
5. Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, Martin JG. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28: 103-10, 2003.
6. Cooke HJ, Fox P, Alferes L, Fox CC, Wolfe SA JR. Presence of NK1 receptors on a mucosal-like mast cell line, RBL-2H3 cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 76: 188-93, 1998.

Section 3: Article 2

Role of neurokinin-1 receptor antagonists on basophils degranulation

N. Ouaked, B. Lefort and K. Maghni

3.1 Abstract

Background: Among evidences of neuroimmune interactions, it has been shown that a direct nerve-mast cell cross talk regulating cells functions can occur, and that the neuropeptide substance P is an important mediator of this communication. Recently we have shown that the rat basophilic cell line RBL-2H3 expresses both substance P and its receptor, the neurokinin-1 receptor. However, the existence of an autocrine tachykinergic system regulating high affinity IgE receptor FcεRI-induced basophil activation is unknown. **Objective:** We sought to examine the involvement of neurokinin-1 receptor in IgE-FcεRI-induced basophil activation. **Methods:** To address this question the basophilic cell line RBL-2H3 was used as cell model. Neurokinin-1 receptors antagonists were used to examine the role and mechanisms of action of neurokinin-1 receptors in IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils. **Results:** Our data strongly suggest that substance P is released from IgE-sensitized RBL-2H3 cells in response to antigen stimulation. We have then selected the strategy of blocking autocrine activation of the neurokinin-1 receptor in response to FcεRI clustering by the use of selective tachykinin receptor antagonists. Our results indicated that neurokinin-1 receptor antagonists L-703,606, WIN-51,708, L-733,060 and RP67580 inhibited antigen-induced basophils degranulation whereas [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-Substance P and MDL-125,212 had no effect. L-703,606 also inhibited IgE-independent degranulation of basophils. To determine the mechanisms by which the autocrine tachykinergic system interact with FcεRI clustering-induced basophil degranulation, we have examined the activation of two kinases ERK-1/2 and p38 MAPK potentially involved in this process. Our data indicated that blocking neurokinin-1 receptors reduced ERK-1/2 and p38 kinases activation in IgE-independent, but not in IgE-dependent degranulation of basophils. **Conclusion:** The neurokinin-1 receptor regulates in an autocrine manner IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils. Therefore, the neurokinin-1 receptor constitutes an interesting target for the treatment of allergic and non-allergic diseases related to metachromatic cells activation. **Key words:** Tachykinins, Substance P, Neurokinin-1 receptor, RBL-2H3 cells, Basophils, FcεRI, IgE.

3.2 Introduction

Metachromatic cells namely mast cells and basophils express the high-affinity IgE receptor FcεRI together with membrane-bound surface IgE. Antigens binding to the IgE- FcεRI complex induces the release of preformed granules mediators (e.g. histamine), the generation of lipid mediators (e.g. cysteinyl-leukotriene C₄; LTC₄), and the production of inflammatory cytokines (interleukin-4 (IL-4) and IL-13) and chemokines [1, 2]. FcεRI aggregation initiates the rapid activation of several proteins tyrosine kinases (PTKs) and other signalling proteins, which trigger the secretion of preformed and neo-synthesized mediators [3]. Amongst the complex downstream signalling pathways that regulates FcεRI activation [4-6], the phosphorylation of the Extracellular Regulated protein Kinase (ERK)-1/2 seems to play an important role in the degranulation process [7, 8], and LTC₄ production [9-10]. The protein kinase p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is activated in basophils by various secretagogues, and also plays a major role in the production and release of proallergic mediators, particularly in regard to IgE-receptor activation [11-12]. In fact, IgE-mediated FcεRI-triggered metachromatic cells activation is tightly controlled positively and negatively by the interactions of several signaling molecules [4-6]. However, the molecular mechanisms of this complex regulation remains to be clarified [4-6].

There are compelling evidences of the existence of neuroimmune interactions in the regulation of bone marrow cells and thymic cells differentiation and function [13-15]. In metachromatic cells, direct nerve-mast cell cross-talk was found to regulate cells function, and substance P (SP) one member of the tachykinin family, was identified as an important mediator of this communication [16-17]. SP is an aminated undecapeptide derived from the translation of the four mRNA transcripts α , β , δ and γ of the preprotachykinin-A (PPT-A) gene [18]. SP acts mainly through the neurokinin-1 (NK-1) receptor, which is a member of the transmembrane G-protein-coupled receptor superfamily [19]. The immunomodulatory properties of SP are several, and include for instance the regulation of haematopoiesis [15, 20], the modulation of T-helper (Th)-1 and Th2 cytokines expression [21], and the regulation of immune responses in the lungs [14, 22]. As regards to the effects of tachykinins on

metachromatic cells function, SP was found to induce histamine release by human blood basophils [23], and by metachromatic cells from bronchoalveolar lavage (BAL) of normal and asthmatic subjects [24]. Interestingly, histamine released in responses to SP stimulation was higher in metachromatic cells from asthmatic subjects as compared to normal subjects [25]. However, whether SP is also involved in the regulation of FcεRI clustering-induced metachromatic cells activation is unknown. The rat basophilic cells RBL-2H3 is a major model for studying the activation of metachromatic cells through FcεRI. Recently, we have confirmed that RBL-2H3 cells express NK-1 receptors [26]. We have expanded on this finding by providing the first evidence that basophils also express mRNA transcripts for SP and contain immunoreactivity for SP [26]. In the present study, we have examined whether IgE-dependent and IgE-independent activation of basophils are modulated by an autocrine tachykinergic system involving SP and its receptor.

3.3 Methods

3.3.1 Cell culture

RBL-2H3 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were maintained in culture in MEM Eagle Media (Sigma, St. Louis, MO) supplemented with 1mM of MEM sodium pyruvate (Invitrogen, Carlsbad, CA) 2mM of L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO) 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), 15% Fetal Bovin Serum (Sigma, St. Louis, MO). Cells were cultured in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C in 25 cm² culture flasks [26].

3.3.2 Cell sensitization, antigenic activation and β -hexosaminidase determination

The release of β -hexosaminidase was measured as a marker of basophil degranulation. Briefly, cells were sensitized with mouse IgE anti-dinitrophenyl conjugated to bovine serum albumin (DNP-BSA) monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO) at 0.05 μ g/ml, for 22 hr. After washing with PIPES buffer (NaCl 140 mM; KCl 5 mM; Glucose 5.5 mM; MgCl₂ 0.6 mM; PIPES 10 mM pH 7.4; CaCl₂ 1 mM; BSA 0,1% (w/v)), cells were stimulated in PIPES buffer with various concentrations of DNP-BSA (Sigma) for 10 min at 37 °C. Supernatants were collected and cells were lysed in 500 μ l of 0.5% (v/v) triton X-100. β -hexosaminidase substrate (1.3 mg/ml p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamide in 0.04 M sodium citrate pH 4.5) was added and incubated for 1 hr at 37 °C. Reactions were stopped by adding glycine 0.2 M pH 10. β -hexosaminidase activity were determined using the Bio-Tek ELx808 microplate reader and data analyzed using the KC4 software (Bio-Tek, Winooski, Vermont). Basophils degranulation was calculated as followed: [β hexo supernatant (S) / (β hexo S + β hexo in cells) x100%].

3.3.3 Determination of SP release in response to basophils activation

SP is rapidly enzymatically degraded upon cell released. To determine whether antigenic activation induces SP production from sensitized basophils, levels of SP were determined in cell extracts as previously described [26]. Briefly, IgE-sensitized RBL-2H3 were stimulated or not with DNP-BSA (40 ng/ml) as described

above. In some experiments, sensitized cells were incubated with the NK-1 receptor antagonist L-703,606 10 μ M prior to antigenic activation. Cells were lysed in 200 μ l of 2N glacial acetic acid. SP levels in cell lysates were measured using a sensitive competitive EIA kit (Cayman, Ann Arbor, MI). Strong cross-reactivity of endokinins and hemokinins with SP was recently reported using SP EIA detection kit from Bachem [27]. This kit uses biotinylated SP as a competitor peptide instead of SP linked to acetylcholinesterase (Cayman). Whether the SP EIA detection kit from Cayman displays cross-reactivity for endokinins EKA/EKB and γ -TAC4 (32-50)-NH₂ peptide, the endokinin precursor sequence, as well as hemokinins HK-1 and its truncation version HK-1(4-11) (Phoenix Peptides, Belmont, CA) was determined.

3.3.4 Effects of NK-1 receptor antagonists on IgE-driven basophils degranulation

To determine whether NK-1 receptor is involved in the IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils, cells were incubated for 15 min with various concentrations of a selective neurokinin-1 antagonist prior to cell activation. The NK1 antagonists used were L-703,606 oxalate salt, WIN 51,708, [D-Arg¹,D-Phe⁵,D-Trp^{7,9}, Leu¹¹]-Substance P (antagonist D) (Sigma), L-733,060 hydrochloride and RP 67580 (Tocris, Ellisville, MO). The effect of the dual NK-1 and NK-2 receptor antagonist MDL 125,212 (A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA) was also examined. The effect of blocking NK-1 receptors on basophils prior to the induction of cell degranulation was assessed by measuring β -hexosaminidase activity as described above.

3.3.5 Detection and quantification of intracellular pools of histamine

Depletion of intracellular pools of histamine was assessed as a second marker of basophils degranulation. RBL-2H3 cells grown to confluence on sterile glass coverslips were IgE-sensitized and stimulated or not with DNP-BSA as described above. In some experiments, sensitized cells were incubated with the NK-1 receptor antagonist L-703,606 10 μ M for 15 min prior to antigenic activation. RBL-2H3 cells were then fixed in Intraprep solution (Beckman Coulter, Fullerton, CA), and intracellular histamine was detected using a rabbit purified IgG anti-histamine

polyclonal antibodies (1:400) (Sigma) followed by incubation with the Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000) (MolecularProbes, Eugene, OR). Sides were mounted in ProLong gold antifade (MolecularProbes), and examined by epifluorescence microscopy with the Olympus IX-81, and analysed using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Springs, MD). We have created a new analytic tool for relative quantification of intracellular levels of histamine which consists on a macro built under the Image-Pro Plus platform that allows to quantify histamine immunoreactivity into individual cells, and to present data as the frequency distribution of the maximal fluorescence intensity into the cells. We make this macro available for free to other researchers upon request.

3.3.6 *IgE-independent degranulation of basophils*

To determine whether the NK-1 receptor is involved in IgE-independent degranulation of basophils, cells were stimulated with the calcium ionophore (Sigma) [28]. Briefly, RBL-2H3 cells were pre-treated with various concentrations of the NK-1 receptor antagonist L-703,606 for 15 min, and then stimulated with various concentrations of calcium ionophore A23187 for 60 min at 37 °C. The consequence of blocking NK-1 receptors on calcium ionophore-induced basophils degranulation was assessed by measuring β -hexosaminidase activity.

3.3.7 *Western blotting analysis of ERK and p38 activation*

To determine the mechanisms by which the autocrine tachykinergic system interacts with Fc ϵ RI clustering-induced basophil degranulation, we have examined the activation of two kinases ERK-1/2 and p38 MAPK potentially involved in this process. Briefly, cells were lysed in CellLytic (Sigma) containing a cocktail of protein inhibitors (Sigma) according to manufacturer's instructions. Samples were resolved by SDS-PAGE on 12% (w/v) polyacrylamide gels and transferred on nitrocellulose membranes, and blocked overnight. ERK-1/2 phosphorylation was determined using mouse anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) monoclonal antibody (Cell Signaling, Beverly, MA, 1:2000). Signals were detected using the appropriate secondary peroxidase-conjugated antibody and Supersignal Chemiluminescent (Pierce, Rockford, IL) as substrate. Membranes were then stripped once (Restore Western Blot Stripping Buffer; Pierce, Rockford, IL) to

determine total ERK levels (rabbit anti-rat ERK, 1:500; Santa Cruz, Santa Cruz, CA). A second membrane stripping has allowed to determine the levels of the housekeeping protein GAPDH (rabbit anti-GAPDH antibodies, 1:2500; Abcam, Cambridge, MA,) used as a reference for protein amounts loaded on the gels. The same procedure was used to determine the levels of phosphorylated p38 (rabbit anti-phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182) polyclonal antibodies, 1:1000; Cell Signaling), and total p38 (rabbit anti-rat p38 polyclonal antibodies, 1:500; Santa Cruz), and GAPDH. Western blots visualization and densitometric analysis were performed using the MultiGenius Bio Imaging System (Syngen, London, UK). Results are reported as mean \pm SEM of the ratios: total phosphorylated kinase/total kinase, and phosphorylated kinase/GAPDH.

3.3.8 *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using the Student *t* test for paired values, and statistical significance was assumed at a P value of less than 0.05.

3.4 Results

3.4.1 Evidence of SP release by basophils in response to IgE-Fc ϵ R1 complex activation

The release of SP in response to antigenic activation of IgE-sensitized RBL-2H3 cells was examined with a competitive SP EIA detection kit. There is no statistical difference in the levels of SP detected in cell extracts of IgE-sensitized cells, and of IgE-sensitized cells stimulated with 40 ng/ml DNP-BSA (Fig. 9A). DNP-BSA at the concentration of 40 ng/ml was selected because it produces a maximal degranulation of RBL-2H3 cells (Fig. 10A). The absence of statistical significance may be attributed to the spreading distribution of SP contents in cultured RBL-2H3 cells (145 to 361 pg/ml) (Fig. 9A). Although statistical significance was not reached to support the concept that endogenous SP is released upon antigenic activation of basophils, it is interesting to note that in DNP-BSA-stimulated cells, the levels of SP showed less variability (201 to 297 pg/ml) (Fig. 9A). In the same set of experiments, we have simultaneously addressed the issue on whether SP released may further increase the secretion of SP because self-amplification mechanisms for mediator released have been reported for several inflammatory mediators [29]. Our data indicate that the intracellular levels of SP is statistically lower in IgE-sensitized basophils pre-treated with the NK-1 receptor antagonist L-703,606 (10 μ M) prior to antigenic activation, in comparison to DNP-BSA-stimulated cells (Fig. 9A). Interestingly, data were nearly to reach statistical significance when compared to IgE-sensitized cells (Fig. 9A). All together, these data strongly suggest that endogenous SP is released from IgE-sensitized basophils following antigenic activation.

The discovery of a third mammalian tachykinin gene, the preprotachykinin-C (PPT-C) gene or Tac4 gene [27, 30, 31] encoding for endokinins (EKA/B) and hemokinins (HK-1 and HK-1(4-11)), peptides that contain the tachykinin signature motif (FXGLM-NH₂) has questioned whether assays are specific to SP detection and quantification [27]. Our data indicate that similarly to the Bachem SP EIA detection kit [27], Cayman SP EIA detection kit displays strong cross-reactivity for EKA/B, HK-1 and its truncation version HK-1 (4-11). No cross-reactivity was found for γ -

TAC4 (32-50)-NH₂ (Fig. 9B), which finding is consistent with the absence of tachykinin signature motif in its peptidic sequence [27]. Whether HK-1 is also produced and released by RBL-2H3 cells is unknown although our preliminary data indicate that these cells contain mRNA transcripts for the PPT-C gene (unpublished data). However, whatever is the nature of the tachykinins produced by RBL-3H3 cells, both SP and HK-1 are equally potent agonists for the activation of the NK-1 receptor, and share commune signalling pathways [27].

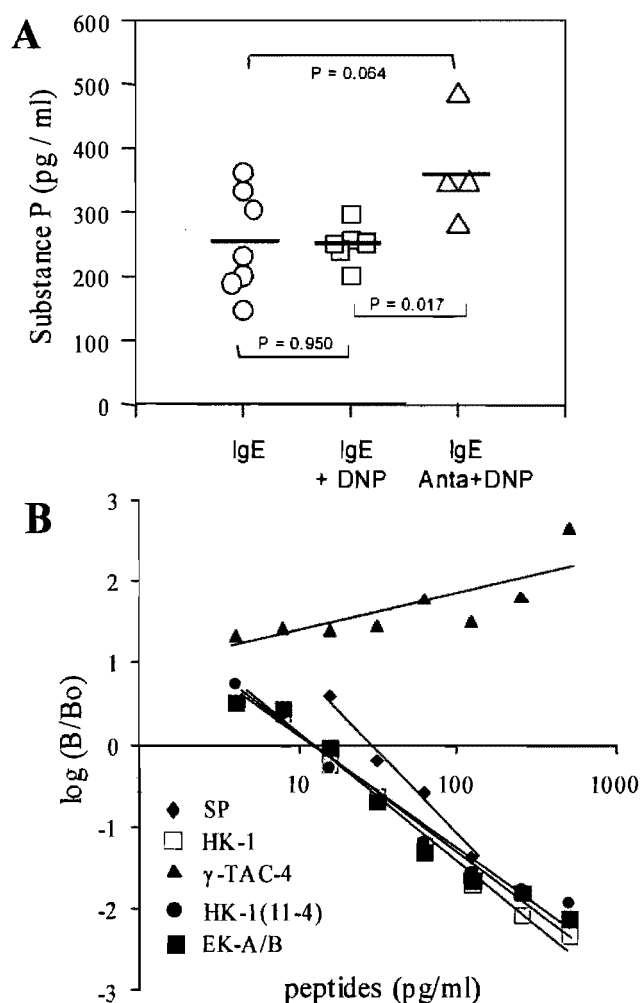


Figure 9. SP quantification. **A**, Levels of SP in RBL-2H3 cells following antigen stimulation, and after L-703,606 treatment. Mean values are represented as bold lines. **B**, Competitive EIA standard curves for SP and other tachykinin-related peptides using the Cayman EIA SP detection kit.

3.4.2 *The NK-1 receptor antagonist L-703,606 inhibits IgE-dependent degranulation of basophils*

Because our data strongly suggest that tachykinins are released in response to antigenic activation of basophils, we have next addressed whether the NK-1 receptor is involved in the regulation of IgE-dependent cell degranulation. To do this, IgE-sensitized basophils were pre-treated with the selective NK-1 receptor antagonist L-703,606 prior to antigen stimulation. The potency of L-703,606 (1 to 10 μ M) to modulate antigen-induced β -hexosaminidase release was examined at concentrations of DNP-BSA that induce 50 % of the maximal cells degranulation (5 ng/ml) or the maximal cells degranulation (40 ng/ml) (Fig. 10A). Our data indicate that L-703,606 causes a concentration-dependent inhibition of β -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells, 10 μ M being the most efficient inhibitory concentration (Fig. 10B). Interestingly, antigen-induced 50 % of cells degranulation was completely abolished by L-703,606 (10 μ M), and the maximal antigenic degranulation response was reduced by nearly 50 % (Fig. 10B). L-703,606 did not change the basal release of β -hexosaminidase (data not shown), and did not alter cell viability as assessed by the trypan blue exclusion test (data not shown).

To further demonstrate that NK-1 receptors are involved in Fc ϵ RI clustering-induced basophils degranulation, changes in the intracellular pools of histamine were quantified. As shown in Fig. 10C (*upper left panel*), histamine immunoreactivity was detected in IgE-sensitized RBL-2H3 cells, and the stimulation with DNP-BSA (40 ng/ml) depleted most basophils of their histamine contents (Fig. 10C, *upper center panel*). The depletion of histamine intracellular pools was mostly abolished following cells pretreatment with 10 μ M of L-703,606 (Fig. 10C, *upper right panel*). Data analysis using the macro built under the Image-Pro Plus platform has allowed to represent the frequency distribution of the maximal intensity for histamine immunoreactivity into RBL-2H3 cells. We have arbitrary divided basophils in six subgroups according to the range of maximal fluorescence intensity detected into the cells, e.g. 300 to 499 IAU (intensity arbitrary unit) or 900-1100 IAU (Fig. 10C, *lower left and center panels*). Frequency distribution analyses have confirmed

β -hexosaminidase data by showing that blocking NK-1 receptors inhibits Fc ϵ RI activation-induced basophils degranulation (Fig. 10C, *lower right panel*).

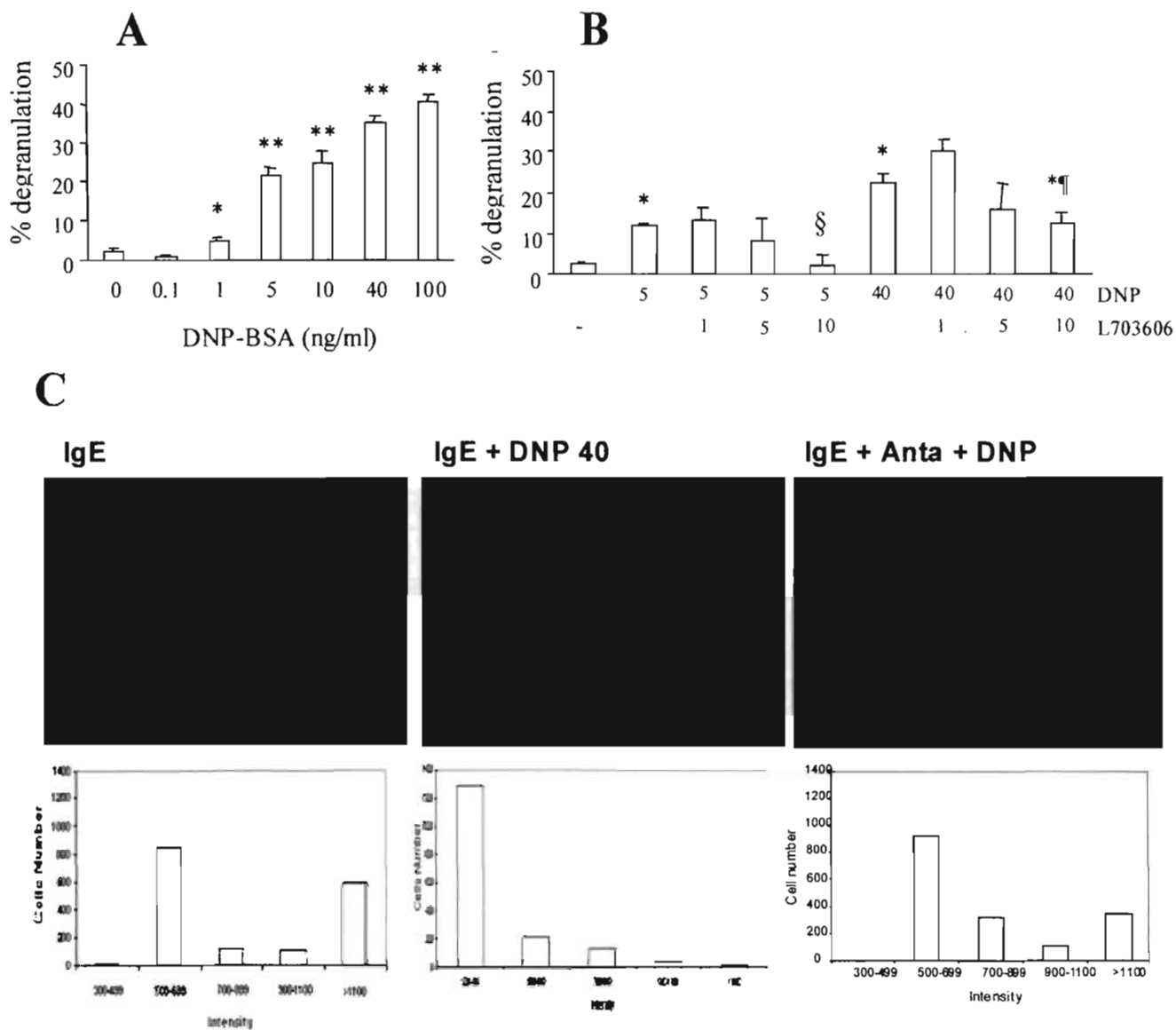


Figure 10. RBL-2H3 cells degranulation. **A**, Induction by DNP-BSA. Data are presented as means \pm SEM $n=10$. **B**, inhibition by L-703,606 treatment. Data are presented as means \pm SEM, $n=6$. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ versus control, § = $p \leq 0.05$ versus DNP5, ¶ = $p \leq 0.05$ versus DNP40. Histamine detection, left : IgE-sensitized cell, Center: DNP-BSA (40 ng/ml) stimulated, right: L-703,606 treated.

3.4.3 *Further evidence for the involvement of NK-1 receptors in IgE-independent degranulation of basophils.*

The role of the NK-1 receptor in antigen-induced degranulation was further examined using three specific NK-1 receptor antagonists, and one dual tachykinin receptors antagonist (Fig 11). Antigen-induced 50 % of cells degranulation was completely abolished by L-733,060 (10 μ M), and the maximal degranulation response was reduced by nearly 55 % (Fig. 11A). Similar levels of inhibition of antigen-induced basophils degranulation were found with the NK-1 receptor antagonist WIN-51,708 (10 μ M) whereas the RP67580 (10 μ M) decreased by nearly 50 % the degranulation of basophils induced by 5 ng/ml, but had no significant effect on the maximal antigenic degranulation of the cells (Fig 11C). Interestingly, the antagonist D, a peptidic NK-1 receptor antagonist that induces small lung cancer cells death by apoptosis [32], did not alter the antigenic degranulation of basophils (Fig 11D). RBL-2H3 cells were also pre-treated with the dual NK-1/NK-2 receptors antagonist, MDL-105,212. Surprisingly, MDL-105,212 at both 1 μ M and 10 μ M had no effect on the antigen concentration leading to 50 % of maximal basophils degranulation (data not shown). However, at the concentration of 1 μ M, but not 10 μ M, MDL-105,212 increased significantly cells degranulation induced by 40 ng/ml DNP-BSA (data not shown). None of these antagonists showed an effect on the basal release of β -hexosaminidase (data not shown).

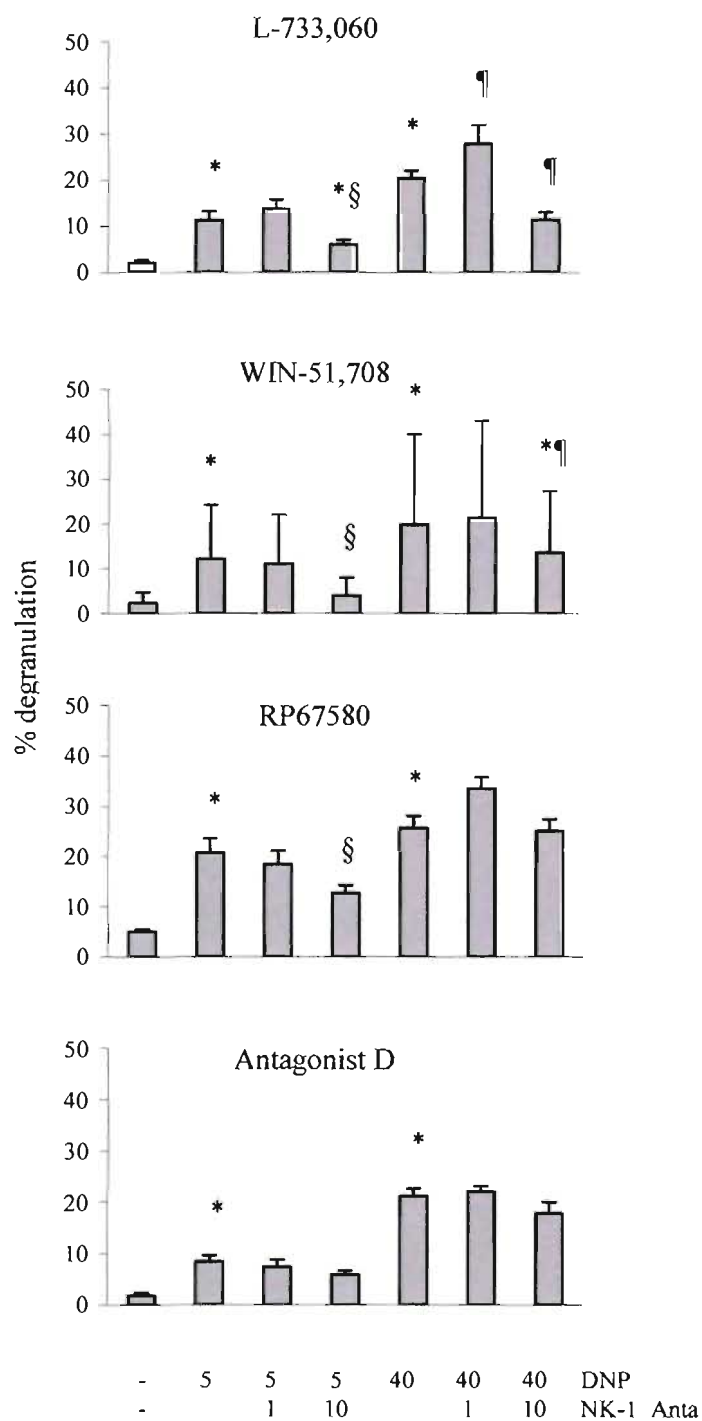


Figure 11. Effect of NK-1 receptor antagonist on β -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells. Data are presented as means \pm SEM. (WIN 51780; n=6, MDL 125,212; n=8, L-733,060; n=7, L-703,606; n=8, Antagonist D; n=6 and RP 67580; n=20) * = $p \leq 0,05$ vs control, § = $p \leq 0,05$ vs DNP5, ¶ = $p \leq 0,05$ vs DNP40.

3.4.4 *The NK-1 receptor antagonist L-703,606 inhibits IgE-independent degranulation of basophils*

To determine whether the regulation of basophil degranulation by the NK-1 receptor is restricted to IgE-FcεRI activation, RBL-2H3 cells were stimulated with the calcium ionophore as a non-antigenic stimulus of basophils degranulation [28]. As shown in Fig 12A, calcium ionophore induced a concentration-dependent release of β-hexosaminidase from basophils. Interestingly, L-703,606 inhibited in a concentration-dependent manner calcium ionophore-induced basophils degranulation, the maximal inhibition being obtained at the concentration of 10 μM (Fig 12B).

3.4.5 *Does blocking NK-1 receptors make basophils unresponsiveness to further degranulation?*

To determine whether blocking the NK-1 receptor would make the cells unresponsiveness to further stimuli inducing cells degranulation, basophils were stimulated according to the following protocol. IgE-sensitized cells pre-treated with L-703,606 10 μM for 15 min, and stimulated with DNP-BSA (40 ng/ml) during 10 min, were stimulated or not with calcium ionophore 1 μM for 60 min. Our data indicate that despite antigen-induced basophils degranulation was inhibited by L-703,606, RBL-2H3 cells have the capacity to further degranulate in response to calcium ionophore stimulation (Fig. 13). The levels of degranulation in antigenic-stimulated cells further activated with calcium ionophore corresponded to the sum of the levels of degranulation provoked by each independent stimulus (Fig. 13). Interestingly, the potency of the concentration of calcium ionophore to induce basophils degranulation in the absence of prior antigenic stimulation was previously shown to be blocked by L-703,606 (Fig. 12B).

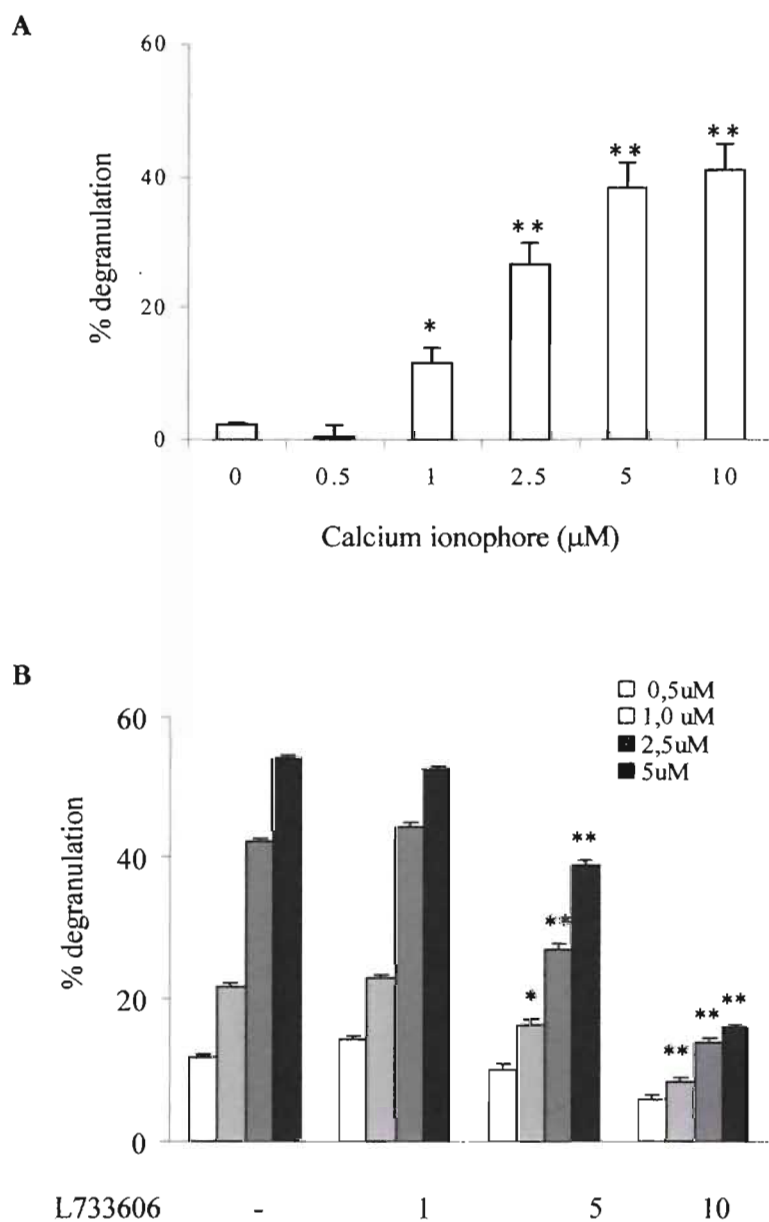


Figure 12. Ionophore-induced RBL-2H3 degranulation A, Calcium ionophore concentration-response curve. Data are presented as means \pm SEM n=4. B, L-703,606 concentration-response inhibition of calcium ionophore-induced degranulation. Data are presented as means \pm SEM; n=4. * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$ versus calcium ionophore-stimulated cells.

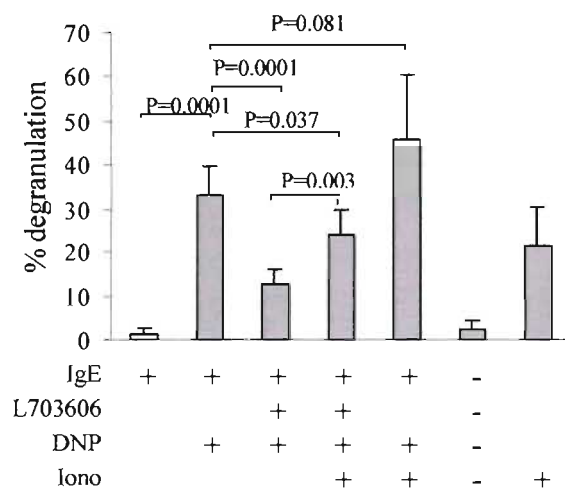


Figure 13. Further RBL-2H3 degranulation following L-703,606 treatment. Cells were treated with L-703,606 prior to antigenic stimulation and further stimulated with calcium ionophore for degranulation analysis. Data are presented as means \pm SEM, $n=4$.

3.4.6 Involvement of ERK1/2 and p38 activation in NK-1 receptor regulation of IgE-independent but not IgE-dependent degranulation of basophils.

The signalling pathway involved in tachykinergic regulation of basophils activation is unknown. Researches on FcεRI signaling have focussed on the receptor proximal events. Some studies had highlight intracellular molecules implicated downstream calcium influx. Among critical kinases leading to basophils degranulation ERK-1/2 [7, 8, 28] and p38MAPK [11, 12] were identified. Several lines of evidence indicate that MAPK/ERK isoforms are activated by SP in several cell types [33-35]. In order to elucidate how the tachykinergic system regulates IgE-dependent degranulation of basophils, the role of ERK-1/2 and p38 MAPK in this process was examined. PP1, a src family kinase inhibitor was found to block calcium ionophore-induced ERK-1/2, and partially p38 MAPK, phosphorylation [28]. Therefore, PP1 (23.7 μM) was used as a positive control for the inhibition of ERK-1/2 and p38 MAPK phosphorylation. As shown in Fig 14, our data confirmed that PP1 inhibits ERK-1/2 and p38MAPK phosphorylation in basophils following antigenic stimulation [28]. Although L-703,606 treatment prior to cell stimulation inhibited basophils degranulation (Fig. 10B), this antagonist did not affect IgE-FcεRI activation-induced ERK-1/2 and p38MAPK phosphorylation. As previously reported, our data confirmed that calcium ionophore induces the phosphorylation of both ERK-1/2 and p38MAPK in RBL-2H3 cells [28]. PP1 treatment blocked ERK-1/2 phosphorylation, but surprisingly not p38MAPK phosphorylation [28]. When cells were treated with L-703,606 prior to calcium ionophore stimulation, both ERK1/2 and p38MAPK activation were inhibited (Fig 13. C-D). PP1 was found to block FcεRI and calcium ionophore mediated granules release from RBL-2H3 cells [28, 36].

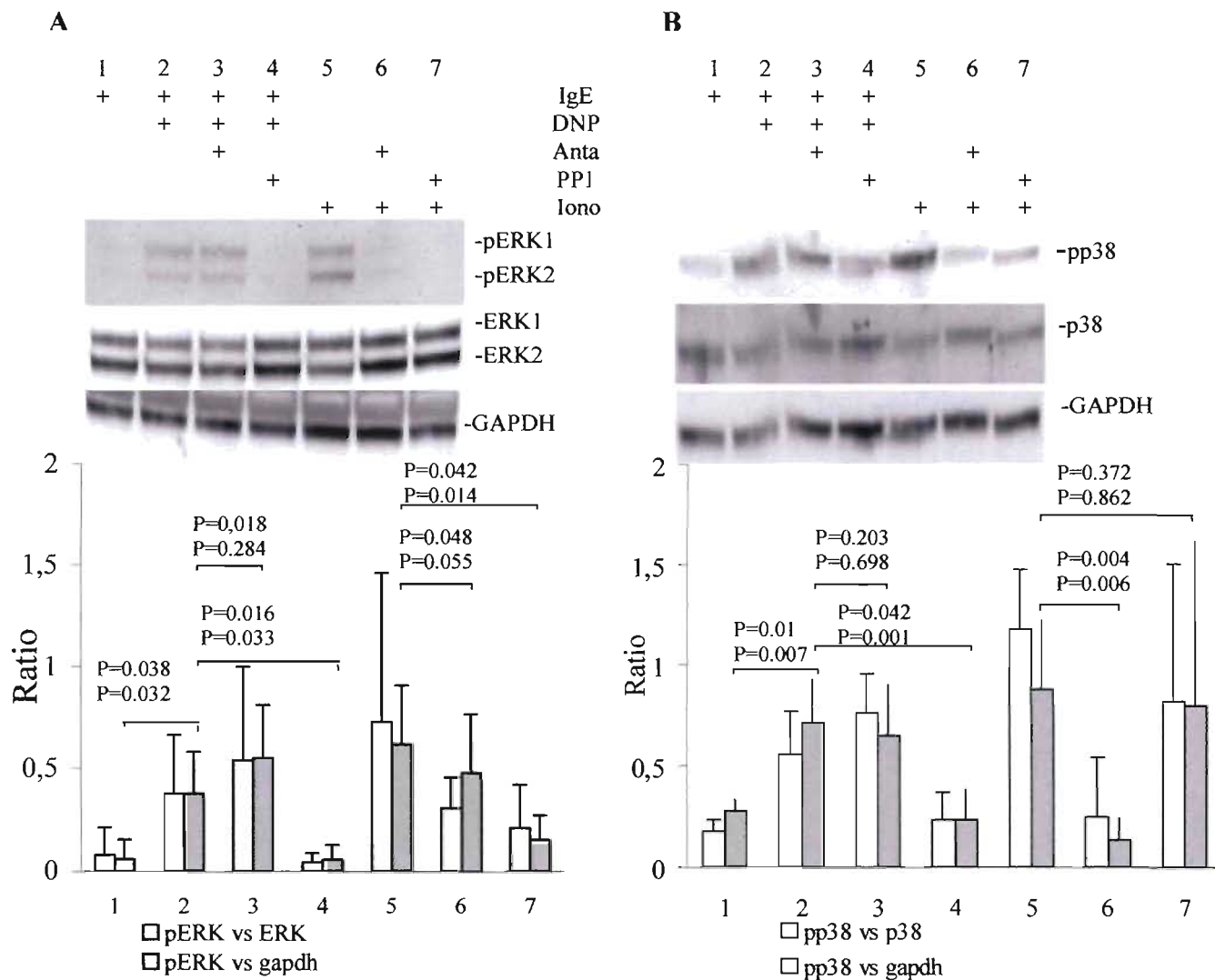


Figure 14. Effect of L-703,606 treatment on ERK-1/2 and p38 phosphorylation. **A** and **B**, Immunoblot analysis of ERK, and p38 expression, and their phosphorylated forms. GAPDH was used as a housekeeping protein. Scan densitometry was used to determine ratios. These data are presented in graphs, as data represent ratio of densitometry analysis as means \pm SEM n=4.

3.5 Discussion

The examination of post-mortem lung sections from individuals who died in status asthmaticus revealed an increase number of basophils in the airway submucosa [37]. However, the role of basophils in the pathogenesis of status asthmaticus is unknown. Direct nerve-mast cell cross-talk regulating cells function involving SP as an important mediator of this communication has been proposed as the mechanism for tachykinins secretagogue activity on tissue mast cells for granules release. However, whether such neuroimmune interactions exist and would be responsible for basophils activation in asthmatic airways remains to be demonstrated. There are compelling evidences that NK-1 receptors are expressed or may be induced in human mast cells and basophils [38]. Extensive studies with human mast cells or basophils are limited by the number of cells to be purified for large investigations. The rat basophilic cells RBL-2H3 are the major model for studying the activation of basophils/mast cells through the high affinity IgE receptor FcεRI [39]. Recently, we have confirmed that RBL-2H3 cells express NK-1 receptors [26]. We expanded on this finding by providing the first evidence that basophils also express mRNA transcripts for SP and contain subsequent amounts of immunoreactive-like SP [26]. Whether the expression of SP is specific to rat basophils is unknown. However, our current investigations using the undifferentiated pre-basophilic cell line KU-812F to examine the role of tachykinins in the differentiation of human basophil progenitors revealed that these cells contains mRNA transcripts for the PPT-A gene, and NK-1 receptors as well (unpublished data). The expression of both SP and its receptor on basophils strongly suggest that autocrine tachykinergic regulation of cell function may occur. In the present study, we have examined whether the tachykinergic system is directly involved in IgE-dependent and IgE-independent activation of basophils.

As a first approach to demonstrate the existence of an autocrine tachykinergic system regulating FcεRI clustering-triggered basophil activation, the release of SP from cells upon antigenic activation was determined. Our data do not indicate any significant difference in the levels of SP between IgE-sensitized cells and sensitized and antigen-activated basophils. The spreading distribution of the levels of SP in IgE-sensitized cells versus DNP-BSA stimulated cells may explain the lack of

statistical significance. Interestingly, the levels of SP in sensitized cells treated with the NK-1 receptor antagonist L-703,606 prior to antigenic activation were statically different compared to sensitized cells stimulated with the antigen, and were nearly to reach statistical significance in comparison to IgE-sensitized cells. Our data showing that several specific NK-1 receptor antagonists reduced the antigenic degranulation of basophils further support the concept that tachykinins are released upon activation of the IgE-FcεRI complex. Recently, Moriarty et al., have shown that αIgE stimulation-induced short-circuit currents in human colonic mucosa and epithelial cells is blocked by NK-1 receptor antagonists [40]. Although in the latter study, nor the nature of the cells activated in response to αIgE stimulation nor the cell source of tachykinins were identified, this study also strongly supports the concept that tachykinins are released in response to IgE-FcεRI complex activation.

Because the levels of SP were determined 10 min after antigenic degranulation of sensitized cells, it is unlikely that SP derives from *de novo* synthesis in response to cell stimulation but rather from intracellular pools of pre-formed SP. However, it is still unknown whether the mechanism of SP released is directly coupled to IgE-FcεRI complex activation or secondary to IgE-FcεRI activation. Since endokinins (EKA/B) and hemokinins (HK-1 and HK-1(4-11)) contain the tachykinin signature motif, it has been questioned whether assays are specific to SP detection and quantification [27]. We have confirmed that the SP detection EIA kit used also displays strong cross-reactivity for endokinins and hemokinins. Thus, whether the tachykinins released upon antigenic activation of basophils derive from the PPT-A or the PPT-C gene, or both, remains to be defined.

Showing evidence that tachykinins are released upon antigenic activation of basophils will then address the issue of the role of the tachykinergic system, e.g. SP-NK-1 receptors, in the regulation of IgE-FcεRI complex activation. To the exception of the antagonist D, all NK-1 receptor antagonists examined have reduced antigenic degranulation of basophils. Among the NK-1 receptor antagonists examined, L-703,606 was the most potent antagonists since it has completely

abolished antigen-induced half-maximal cell degranulation, and has reduced by half the antigen concentration that leads to the maximal basophils granules secretion. Quantification of intracellular pools of histamine confirmed the potency of NK-1 receptor antagonist to block antigen-induced basophil degranulation, and further supports a role for endogenous tachykinins in this process. Our findings also indicate that the role of endogenous tachykinins and the NK-1 receptor in basophils degranulation is not limited to antigenic mechanisms because IgE-independent activation of basophils was also blocked by NK-1 receptor antagonists.

The maximal inhibition of IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils was obtained at a concentration of 10 μM of the respective potent NK-1 receptor antagonists. Interestingly, the antagonist D failed to repress IgE-dependent degranulation of basophils. Treatment of small lung cancer cells with this antagonist causes a concentration-dependent loss of cell viability which is followed by the onset of apoptosis [32]. Since basophils apoptosis would induce granules release, it is interesting to note that RBL-2H3 cells, a leukaemia cell line is not affected by this antagonist. In fact, none of the antagonists tested had an effect on the basal cell degranulation nor on cells viability. Two hypotheses can be proposed to explain that high concentration of NK-1 receptor antagonists is required to inhibit IgE-dependent, and also IgE-independent degranulation of basophils. First, it is plausible that upon activation of basophils, the amount of tachykinins released produce high concentrations of tachykinins at the cell surface which require high concentration of antagonists to block SP-induced NK-1 receptors activation. The second hypothesis concerns the identity of the binding site or the active conformation of the NK-1 receptor [41-43] involved in the IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils. Binding and PCR-directed mutagenesis studies on the NK-1 receptor have led to the discovery of two binding sites on the NK-1 receptor, the first one with high affinity for SP binding (“classical” binding site), and a second one with preferential binding for the endogenous peptide NKA and “septide”, a synthetic SP agonist [44]. Different active conformations of NK-1 receptor have been also reported [41-43]. Whether SP released from activated basophils regulate stimulus-induced cell degranulation is attributable through its binding to the “classical” or the “septide” binding sites is unknown. However, it may be speculated that the active

NK-1 receptor binding site involved in the antigenic and non-antigenic degranulation of basophils would be the “septide” site because NK-1 receptor antagonists were found to have less affinity for this site [18].

It is of interest to note that treatment with MDL-125,212, a dual NK-1/NK-2 receptors antagonist did not significantly affect the antigenic degranulation of basophils (data not shown). The relative contribution of NK-1 and NK-2 receptors in allergic responses is still poorly known. Recently, in a Brown Norway rat model of allergic inflammation both the NK-1 and NK-2 receptors were found to be involved in allergen-induced late airway response [21]. This finding indicates that NK-1 and NK-2 receptors have similar role in the regulation of allergic responses. However, whether blocking both the NK-1 and NK-2 receptors would have different consequences on allergic responses remains to be clarified. Our findings in basophils suggest that the interactions between NK-1 and NK-2 receptors in the regulation of antigenic responses are probably more complex than initially suspected.

The intracellular mechanisms of autocrine tachykinergic regulation of stimulus-induced basophils degranulation remains to be defined. It is known that NK-1 receptor activation stimulates the formation of diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) which in turn induce respectively the activation of protein kinase C (PKC) and the mobilization of intracellular Ca²⁺ [45]. Antigen-aggregation of IgE-occupied FcεRI results in the activation of Lyn kinase followed by Syk kinase which leads to linker for activation of T cells (LAT) activation, PLC activation with subsequent Ca²⁺ mobilization and PKC activation, and MAPK activation. Aggregation of FcεRI also induces the rapid phosphorylation of Grb2-associated binder-like protein 2 (Gab2), an event that requires Fyn kinase [46]. Fyn kinase positively regulates Gab2 and its association with phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K) and is essential for initiation of the degranulation response. PKC δ is also activated in this pathway. In fact, cell degranulation process requires the combination of both PKC activation and the increase in intracellular Ca²⁺ [47]. Recently, a role for the kinases (ERK)-1/2 and p38 in metachromatic cells degranulation was found [7, 8, 11, 12], and we have decided to examine whether

these kinases was involved in the tachykinergic regulation of IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils. Our data confirmed that antigenic activation of basophils induced a significant increase of ERK-1/2 phosphorylation, and that cell treatment with the src kinase inhibitor PP1 abolished this response [28]. However, it is unlikely that ERK-1/2 is involved in the autocrine tachykinergic regulation of IgE-dependent degranulation of basophils since cells treatment with NK-1 receptor antagonists had no effect on the levels of ERK-1/2 phosphorylation. This finding suggests that ERK-1/2 phosphorylation, which upstream players include the Lyn-Syk-LAT pathway, may be not essential for granule release, at least in RBL-2H3 cells. This is consistent with some reports that indicate a role for ERK-1/2 in LTC₄ production but not granules secretion [11-12]. An another hypothesis would be that the autocrine tachykinergic system will act downstream the ERK1/2 activation pathway. Similarly, our data confirmed that p38 is phosphorylated in response to src kinases activation but that the inhibition of IgE-dependent degranulation of basophils by NK-1 receptor antagonists is not related to the alteration of p38 phosphorylation. This finding also suggests that the autocrine tachykinergic system will act downstream the p38 activation pathway in IgE-dependent degranulation of basophils.

Calcium ionophore alone is able to induce granules release from RBL-2H3 cells which effect is attributable to the constitutive activation of PKC β in RBL-2H3 cells [48]. Combination of PKC with sustained calcium signals from ionophore treatment causes a synergistic increase in granules secretion. Contrary to IgE-dependent activation of cell degranulation, we found that blocking the autocrine tachykinergic system prior to calcium ionophore stimulation repressed both ERK1/2 and p38 phosphorylation. Hanson *et al.* have shown that calcium ionophore-induced RBL-2H3 cells degranulation involves both ERK1/2 and PKC activation although the isoform of PKC involved in this response was not identified [28]. PKC δ , a calcium independent and DAG dependant isoform, was found to contribute to both antigenic and non-antigenic degranulation of RBL-2H3 cells [49]. Whether PKC δ activation is regulated by the autocrine tachykinergic system is an interesting issue to be explored. The activation of the Gab2-Fyn-PI3K pathway leads to p38 activation. Whether the activation of this signalling pathway is under the control of the tachykinergic system is also an exciting issue to be examined.

In conclusion, we found that a functional autocrine tachynergic system involving the NK-1 receptor regulates IgE-dependent and IgE-independent degranulation of basophils, and that the intracellular mechanisms underlying this regulation is likely to be different between the two types of stimulus. Blocking NK-1 receptors activation appears as an interesting therapeutic target for the treatment of diseases related to metachromatic cells activation.

3.6 Acknowledgements

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research MOP-57742. KM is a scholar of the 'Fonds de la Recherche en Santé du Québec'. NO has a studentship from the Canadian Institutes of Health Research and the 'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail'.

3.7 References

1. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 1999;402(6760 Suppl):B24-30.
2. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):773-86.
3. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From Physiology to Pathology. *Annual Review of Immunology* 1999;17:931-972.
4. Nadler MJS, Kinet JP. Uncovering new complexities in mast cell signalling. *Nature Immunology* 2002;3:707-708.
5. Oliver JM, Kepley CL, Ortega E, Wilson BS. Immunologically mediated signalling in basophils and mast cells: finding therapeutic targets for allergic diseases in the human Fc[ε]R1 signalling pathway. *Immunopharmacology* 2000;48(3): 269-281.
6. Saini SS, MacGlashan D. How IgE upregulates the allergic response. *Current Opinion in Immunology* 2002;14(6):694-697.
7. Xu R, Seger R, Pecht I. Cutting Edge: Extracellular Signal-Regulated Kinase Activates Syk: A New Potential Feedback Regulation of FcεReceptor Signalling. *J Immunol* 1999;163(3):1110-1114.
8. Offermanns S, Jones SVP, Bombien E, Schultz G. Stimulation of mitogen-activated protein kinase activity by different secretory stimuli in rat basophilic leukemia cells. *Journal of Immunology* 1994;152(1):250-61.
9. Zhang C, Baumgartner RA, Yamada K, Beaven MA. Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Regulates Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Release of Arachidonic Acid in Mast Cells. Indications Of Communication Between P38 and P42 Map Kinases. *J Biol Chem* 1997;272(20):13397-13402.
10. Hirasawa N, Scharenberg A, Yamamura H, iBeaven A, Kinet JP. A Requirement for Syk in the Activation of the Microtubule-associated Protein Kinase/Phospholipase A[IMAGE] Pathway by Fc[IMAGE]R1 Is Not Shared by a G Protein-coupled Receptor. *J Biol Chem* 1995;270(18):10960-10967.
11. Gibbs BF, Plath KES, Wolff HH, Grabbe J. Regulation of mediator secretion in human basophils by p38 mitogen-activated protein kinase: phosphorylation is sensitive to the effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and calcium mobilization. *J Leukoc Biol* 2002;72(2):391-400.

12. Miura K, Schroeder JT, Hubbard WC, MacGlashan DW Jr. Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate Leukotriene C4 Generation, But Not Histamine Release or IL-4 Production from Human Basophils. *J Immunol* 1999;162(7):4198-4206.
13. Kraneveld AD, Nijkamp FP. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. *International Immunopharmacology* 2001;1(9-10):1629-1650.
14. Chavolla-Calderon M, Bayer MK, Perez Fontan JJ. Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. *J Clin Invest.* 2003; 111(7):973-980.
15. Rameshwar P, Ganea D, Gascon P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood* 1993;81(2):391-398.
16. Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M, et al. Direct Neurite-Mast Cell Communication In Vitro Occurs Via the Neuropeptide Substance P. *J Immunol* 1999;163(5):2410-15.
17. Ohshiro H, Suzuki R, Furuno T, Nakanishi M. Atomic force microscopy to study direct neurite-mast cell (RBL) communication in vitro. *Immunology Letters* 2000;74(3):211-14.
18. Beaujouan JC, Torrens Y, Saffroy M, Kemel ML, Glowinski J. A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides* 2004;25(3):339-57.
19. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological Reviews* 1994;46(4):551-599.
20. Rameshwar P, Gascon P. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood* 1995;86(2):482-490.
21. Maghni K, Taha R, Afif W, Hamid Q, Martin JG. Dichotomy between Neurokinin Receptor Actions in Modulating Allergic Airway Responses in an Animal Model of Helper T Cell-Type 2 Cytokine-associated Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3):1068-1074.
22. Bozic CR, Hopken UE, Gerard C, Gerard NP. Neurogenic amplification of immune complex inflammation. *Science* 1996;273(5282): 1722-1725.
23. Louis RE, Radermecker MF. Substance P-induced histamine release from human basophils, skin and lung fragments: effect of nedocromil sodium and theophylline. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;92(4):329-33.
24. Forsythe P, Mcgarvey LPA, Heaney LG, Macmahon J, Ennis M. Sensory neuropeptides induce histamine release from bronchoalveolar lavage cells in

- both nonasthmatic coughers and cough variant asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2000;30(2):225-232.
25. Heaney LG, Cross LJM, Ennis M. Histamine release from bronchoalveolar lavage cells from asthmatic subjects after allergen challenge and relationship to the late asthmatic response. *Clin Exp Allergy* 1998; 28(2):196-204.
 26. Ouaked N, Lefort B, Poirier A, Maghni K. Evidence of autocrine tachykinergic regulation of basophil function. Collection of Free Papers presented at the 12th Int. Congress of Immunology and 4th annual Conference of FOCIS (Montreal Canada, July 18-23, 2004) *Immunology* 2004:293-297.
 27. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 2004;61(13):1652-1663.
 28. Hanson DA, Ziegler SF. Regulation of ionomycin-mediated granule release from rat basophil leukemia cells. *Molecular Immunology* 2002;38(16-18):1329-1335.
 29. McDonald PP, Braquet MS, Borgeat P. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B4 and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br J Pharmacol* 1994;111(3):852-60.
 30. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nature Immunology* 2000;1(5): 392 - 397.
 31. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR et al. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene* 2002;296(1-2): 205-212.
 32. Reeve JG, Bleehen NM. [D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11] Substance-P Induces Apoptosis in Lung Cancer Cell Lines in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;199(3):1313-1319.
 33. Okabe T, Hide M, Koro O, Yamamoto S. Substance P induces tumor necrosis factor-[alpha] release from human skin via mitogen-activated protein kinase. *European Journal of Pharmacology* 2000;398(2): 309-315.
 34. Noveral JP, Grunstein MM. Tachykinin regulation of airway smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1995; 269(3):L339-343.
 35. Yang CM, Hsiao LD, Chien CS, Lin CC, Luo SF, Wang CC. Substance P-induced activation of p42/44 mitogen-activated protein kinase associated with cell proliferation in human tracheal smooth muscle cells. *Cellular Signalling* 2002;14(11):913-923.

36. Amoui M, Draber P, Draberova L. Src family-selective tyrosine kinase inhibitor, PP1, inhibits both Fc[ϵ si]RI- and Thy-1-mediated activation of rat basophilic leukemia cells. *European Journal of Immunology* 1997; 27(8): 1881-1886.
37. Kepley CL, McFeeley PJ, Oliver JM, Lipscomb MF. Immunohistochemical Detection of Human Basophils in Postmortem Cases of Fatal Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(6): 1053-1058.
38. Cooke HJ, Fox P, Alferes L, Fox CC, Wolfe SA JR. Presence of NK1 receptors on a mucosal-like mast cell line, RBL-2H3 cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 76: 188-93, 1998.
39. Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG, Siraganian RP. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol* 1981;11(4):317-23.
40. Moriarty D, Goldhill J, Selve N, O'Donoghue DP, Baird AW. Human colonic anti-secretory activity of the potent NK1 antagonist, SR140333: assessment of potential anti-diarrhoeal activity in food allergy and inflammatory bowel disease 2001; 133(8):1346-1354.
41. Rosenkilde MM, Cahir M, Gether U, Hjorth SA, Schwartz TW. Mutations along transmembrane segment II of the NK-1 receptor affect substance P competition with non-peptide antagonists but not substance P binding. *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269(45):28160-28164.
42. Hastrup H, Schwartz TW. Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Letters* 1996;399(3):264-266.
43. Torrens Y, Beaujouan J-C, Saffroy M, Glowinski J. Further Evidence for the Presence of "Septide-Sensitive" Tachykinin Binding Sites in Tissues Possessing Solely NK1 Tachykinin Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;270(2):668-672.
44. Petitet F, Saffroy M, Torrens Y, Lavielle S, Chassaing G, Loeuillet D et al. Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. *Peptides* 1992;13(2):383-388.
45. Mochizuki-Oda N, Nakajima Y, Nakanishi S, Ito S. Characterization of the substance P receptor-mediated calcium influx in cDNA transfected Chinese hamster ovary cells. A possible role of inositol 1,4,5-trisphosphate in calcium influx. *J Biol Chem* 1994; 269(13): 9651-9658.
46. Gu H, Saito K, Klaman LD, Shen J, Fleming T, Wang YP, et al. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* 2001;412(6843):186-90.

47. Sagi-Eisenberg R, Pecht I. Protein kinase C, a coupling element between stimulus and secretion of basophils. *Immunology Letters* 1984; 8(5): 237-241.
48. Wolfe PC, Chang EY, Rivera J, Fewtrell C. Differential Effects of the Protein Kinase C Activator Phorbol 12-Myristate 13-Acetate on Calcium Responses and Secretion in Adherent and Suspended RBL-2H3 Mucosal Mast Cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(12): 6658-6665.
49. Cho SH, Woo CH, Yoon SB, Kim JH. Protein kinase C[delta] functions downstream of Ca²⁺ mobilization in Fc[epsilon]RI signalling to degranulation in mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004; 114(5):1085-1092.

Section 4 : Discussion

Le rôle des basophiles dans la pathologie de l'asthme a été négligé durant plusieurs années. Les basophiles partagent plusieurs caractéristiques avec les mastocytes telles que l'expression du récepteur FcεRI et la présence de granules de sécrétion contenant des médiateurs de l'inflammation. L'absence d'outils permettant leur identification et leur purification a fait en sorte que les basophiles ont longtemps été considérés comme des mastocytes circulants sans rôle important dans l'asthme [8]. Le développement d'anticorps monoclonaux reconnaissant des structures spécifiques aux basophiles (BB1 et 2D7) [185, 186] a permis de les différencier des mastocytes, et ainsi de pouvoir les étudier. Ces nouveaux marqueurs ont permis de montrer que le nombre de basophiles était augmenté dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques comparativement aux sujets sains [187, 188]. D'autres études ont montré que le nombre de basophiles était corrélé à la sévérité de l'asthme [189], et que leur nombre augmentait durant les épisodes d'exacerbation de l'asthme [190], ainsi qu'en réponse à une exposition à l'allergène [17, 188, 191]. Suite à leur recrutement dans les voies respiratoires, les basophiles activés représentent une source majeure d'IL-4, interleukine clé orchestrant la réponse allergique, ainsi que de LCT4, un peptidoleucotriène impliqué dans la bronchoconstriction, l'hypersécrétion de mucus, le recrutement de cellules inflammatoires, l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que dans la prolifération des cellules de muscles lisses des voies respiratoires [192]. Les basophiles sont principalement activés via le pontage du récepteur FcεRI par deux IgE et un antigène. Bien qu'il soit maintenant possible de purifier les basophiles du sang humain, le nombre obtenu ne permet pas de réaliser des études extensives. Les cellules basophiliques de rat RBL-2H3 constituent un modèle cellulaire très utilisé pour l'étude des mécanismes impliqués dans l'activation du récepteur FcεRI. En fait, cette lignée basophilique a permis l'identification de plusieurs protéines régulatrices des voies de signalisation intracellulaires de l'activation du complexe FcεRI-IgE [24]. De manière similaire aux mastocytes et aux basophiles humains, l'activation antigénique des cellules RBL-2H3 mènent principalement à la relâche de granules contenant de l'histamine [193], à la synthèse de cystéinyl-leucotriènes [194], ainsi qu'à la production de cytokines de type Th2 [46]. L'ensemble de ces travaux indiquent que la lignée RBL-

2H3 constitue un modèle cellulaire adéquat pour l'étude des fonctions des basophiles.

L'étude des mécanismes de l'inflammation neurogénique attribut un rôle important aux tachykinines dans le processus inflammatoire [117]. Dans le cas de l'asthme, les tachykinines induisent plusieurs événements caractéristiques de cette pathologie tels que la contraction des muscles lisses, la sécrétion des glandes submucosales, l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que la stimulation des cellules inflammatoires [92, 117, 120, 123]. Récemment, Andoh *et al.* ont montré que le récepteur FcεRI est exprimé sur les cellules neuronales de type C-sensitives [195] ce qui suppose l'existence d'une régulation neuro-immunologique de la fonction de ces fibres nerveuses. Plusieurs évidences supportent la présence d'interactions entre les systèmes neurologique et immunitaire. Une communication directe a été démontrée entre les neurones et les mastocytes, cette interaction cellulaire étant impliquée dans la régulation des fonctions cellulaires [72, 137]. Un des principaux médiateurs de cette interaction est la libération par les neurones de la SP qui agit sur la régulation des fonctions mastocytaires. D'autres études ont montré une action histamino-sécrétagogue de la SP sur les basophiles sanguins [138]. Il est peu probable que la source de SP dans le sang soit neuronale, ce qui soulève des questions sur la source extra-neuronale de la SP. Jusqu'à récemment, les fibres nerveuses étaient identifiées comme la seule source connue de tachykinines [76]. Cependant, depuis quelques années plusieurs études ont montré que différents types de cellules non-neuronales possèdent la capacité de synthétiser des tachykinines [74, 133]. La présente étude avait pour but la détermination de l'implication du système tachykinergique, plus particulièrement l'implication de la SP et du récepteur NK-1, dans le processus d'activation antigénique et non-antigénique des basophiles. Afin de répondre à cette question nous avons utilisé la lignée RBL-2H3 comme modèle cellulaire. Dans un premier temps, nous avons confirmé que ces cellules exprimaient le récepteur NK-1 [184]. Nous avons complété cette connaissance en montrant que la majorité des cellules RBL-2H3 expriment la récepteur NK-1, et que ces cellules sont une source potentielle de SP et de NKA (Article 1) [184]. Ces résultats suggèrent l'existence d'une régulation autocrine des fonctions des basophiles par les tachykinines. Il existe d'autres exemples de régulation de la fonction cellulaire par

les tachykinines dans la littérature. La lignée monocytique U-937 constitue un de ces exemples. En effet, la présence du messager du récepteur NK-1 a été détecté dans ces cellules, et suite à une incubation avec la SP, l'expression de l'ARNm du récepteur NK-1 augmente considérablement [130]. Cependant, la régulation autocrine des fonctions cellulaires observées dans différents systèmes peut également être due à d'autres tachykinines. Ainsi, la récente découverte de nouveaux peptides, tels les hémokinines et les endokinines, appartenant à la famille des tachykinines remet en question plusieurs rôles qui ont été attribués à la SP [88]. Nos résultats concernant la détection de la SP par EIA confirment les résultats reportés dans la littérature [88] indiquant que les anticorps utilisés dans les kits commerciaux de dosage de la SP ne distinguent pas entre la SP, les hémokinines et les endokinines.

Dans la présente étude, les cellules RBL-2H3 sensibilisées avec des IgE anti-DNP ont servi de modèle pour examiner les mécanismes d'activation du récepteur FcεRI. Nos résultats ont indiqué que la SP est potentiellement libérée des basophiles lors de la stimulation antigénique, et que cette libération de SP serait un événement précoce dans le mécanisme de régulation conduisant à la dégranulation des basophiles. Afin de s'assurer de bloquer l'action autocrine des tachykinines agissant via le récepteur NK-1, les cellules ont été traitées avec les antagonistes du récepteur NK-1 avant d'être stimulées avec l'antigène DNP couplé à la BSA. Une enzyme contenue dans des granules de sécrétion, la β -hexosaminidase, a servi de marqueur de la dégranulation de ces cellules. Les RBL-2H3 ont été traitées avec cinq différents antagonistes spécifiques du récepteur NK-1. À l'exception des résultats obtenus suite au traitement par l'antagoniste D (aucun effet), nos résultats indiquent que le blocage du récepteur NK-1 provoque une inhibition de la dégranulation des basophiles. Il est intéressant de noter que l'antagoniste D induit l'apoptose des petites cellules cancéreuses du poumon, mais n'a eu aucun effet sur les RBL-2H3 qui sont des cellules leucémiques [115]. L'antagoniste double pour les récepteurs NK-1 et NK-2, le MDL-125,212, n'a pas affecté la dégranulation antigénique des basophiles. Ce résultat suggère que le récepteur NK-2 activé par la NKA serait impliqué dans l'inhibition de la dégranulation antigénique des basophiles. Cependant, lorsque les récepteurs NK-1 et NK-2 sont activés la réponse du récepteur NK-1 (induction de la

dégranulation) domine. Ainsi, les récepteurs NK-1 et NK-2 agiraient en opposition dans la régulation de la dégranulation antigénique des basophiles, et le blocage des deux récepteurs inhiberait leur action respective, et de ce fait n'affecterait pas la dégranulation antigénique. Ainsi, nous postulons que les tachykinines pourraient être impliquées dans l'homéostasie cellulaire, favorisant ou inhibant l'activation des basophiles selon les conditions présentes.

L'effet d'inhibition maximale des antagonistes du récepteur NK-1 sur la dégranulation antigénique des basophiles a été obtenue à une concentration de 10 μ M. Deux explications probables à cette valeur de la concentration de l'antagoniste: 1) la concentration de SP libérée suite à la stimulation antigénique serait très élevée à la surface de la cellule justifiant alors une concentration importante de l'antagoniste pour bloquer son effet et/ou 2) le site du récepteur NK-1 impliqué dans la régulation du récepteur Fc ϵ RI serait le site dit « septide », site pour lequel les antagonistes du récepteur NK-1 présentent moins d'affinité [73].

Le mécanisme intracellulaire par lequel le système tachykinergique interagit avec l'activation du récepteur Fc ϵ RI est inconnu. Un grand nombre de protéines sont impliquées dans les événements menant à la relâche de médiateurs de l'inflammation par les basophiles. Plusieurs sécrétagogues induisent une mobilisation intracellulaire de calcium chez le basophile. En fait, le calcium est l'un des événements essentiels à la libération des granules de sécrétion, l'autre événement étant l'activation des PKCs [196]. Nos résultats ont montré que le blocage du récepteur NK-1 par un traitement avec un antagoniste sélectif n'influence pas la mobilisation calcique induite par la stimulation antigénique (résultats non montrés). Outre le signal calcique, quelques protéines ont été identifiées comme étant plus critique au mécanisme d'activation du Fc ϵ RI, et la dégranulation subséquente des cellules.

Parmi les éléments importants dans le mécanisme conduisant à la dégranulation, la PI3K semble jouer un rôle critique dans la régulation du processus d'exocytose des granules. De plus, elle exerce son action de façon indépendante à

l'activation de la PLC γ ainsi que de la mobilisation calcique. Les mastocytes déficients en Gab2, montrent une perte dramatique de l'activité de la PI3K et une absence de dégranulation alors qu'ils présentent une réponse calcique normale [197]. Une diminution de la dégranulation a également été observée suite à un traitement des mastocytes avec des anticorps inhibiteurs de la sous-unité p110 de la PI3K [198]. La PI3K active plusieurs protéines, et parmi celles-ci, la MAPKinase p38 semblent être un élément critique dans la dégranulation des basophiles humains. Plusieurs études ont préalablement suggéré un rôle essentiel de p38 dans la libération des médiateurs inflammatoires et ce, suite à une stimulation par plusieurs sécrétagogues [47, 48]. Sa phosphorylation est augmentée suite à une stimulation antigénique, et elle est concomitante à la libération d'histamine. Un rôle de p38 dans la phosphorylation de ERK a été suggéré car la phosphorylation de ERK est diminuée suite à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de p38 [48]. Le rôle de la kinase ERK dans la libération de médiateurs de l'inflammation par les basophiles est illustrée par son implication dans la synthèse *de novo* de cystéinyl-leucotriènes. Son rôle dans la libération d'histamine par les basophiles, via une régulation de la Syk kinase, est plus controversée [42]. La cascade connue qui conduit à la phosphorylation de ERK implique l'activation de la RasGTPase qui active ensuite Raf-1, MEK et finalement ERK. Cependant, des études utilisant une protéine Ras non-fonctionnelle ont montré que MEK et ERK pouvaient quand même être activées [199], suggérant l'existence de plus d'une voie d'activation de cette kinase. Bien que nos résultats indiquent que le récepteur NK-1 participe au mécanisme de dégranulation des basophiles suite à l'activation du récepteur Fc ϵ RI, le blocage du récepteur NK-1 par des antagonistes sélectifs n'a pas eu d'influence sur la phosphorylation de p38 ou ERK suite à l'activation antigénique. Ainsi, le mécanisme d'action du récepteur NK-1 dans la dégranulation des basophiles induite par l'activation du Fc ϵ RI ne se situe pas au niveau des protéines ERK et p38. D'autres voies d'activation peuvent cependant être envisagées. Le récepteur NK-1 est couplé à une protéine G, qui agit sur une PLC β . L'activation de la PKC δ n'est pas influencée par le calcium, et elle n'est pas sous l'action de la PLC γ 1 ou γ 2. Il est donc possible que le récepteur NK-1 agisse en activant PKC δ via l'activation de PLC β (Figure 15).

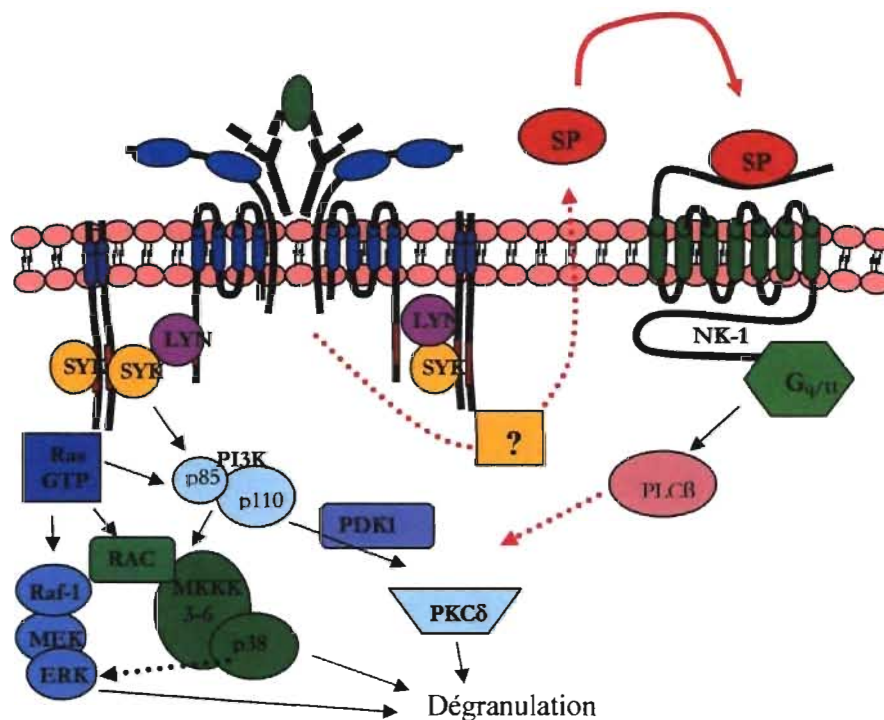


Figure 15. Mécanismes intracellulaires hypothétiques de la régulation tachykinergique de l'activation antigénique des basophiles. Les flèches pleines représentent des voies connues, et les flèches pointillées représentent des voies hypothétiques.

Afin de décortiquer le mécanisme d'action du récepteur NK-1, l'effet du blocage de ce récepteur sur la dégranulation non-antigénique a été étudié. Le calcium ionophore agit directement sur la mobilisation calcique. Chez les cellules RBL-2H3, ce signal est suffisant pour induire une dégranulation des cellules puisque la PKC β est activée de manière constitutive [44]. La relâche de granules induite par l'ionomycine a également été inhibée par le blocage du récepteur NK-1 en utilisant l'antagoniste L-703,606. Cependant, le mécanisme d'action n'est probablement pas le même que lors d'une stimulation antigénique car la phosphorylation de ERK et de p38 est inhibée suite au blocage du récepteur NK-1. Lors des stimulations des cellules RBL-2H3 par le calcium ionophore, l'inhibiteur PPI inhibe la phosphorylation de ERK, mais pas celle de p38. Cependant, aucune inhibition de la dégranulation par PPI n'a été observée (résultats non-montrés). Hanson *et al.* ont proposé l'existence d'une voie de signalisation impliquant PKC et ERK. Bien qu'ils ne spécifient pas quel isoforme de PKC serait impliquée, cette hypothèse est basée

sur leurs observations que les inhibiteurs de MEK ne réussissent pas à bloquer totalement la phosphorylation de ERK, et que des inhibiteurs des PKC n'affectent aucunement la phosphorylation de ERK. Cependant, la combinaison des deux inhibiteurs empêche totalement l'activation de ERK. Nous postulons donc que le récepteur NK-1 pourrait réguler la dégranulation des basophiles induite par le calcium ionophore en agissant sur cette voie impliquant PKC et ERK. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires afin de déterminer le type d'isoforme de PKC impliquée dans cette voie d'activation.

Le blocage du récepteur NK-1 inhibe l'activation antigénique et non-antigénique des basophiles en agissant sans doute à différents niveaux intracellulaires. Il aurait été possible que le traitement avec des antagonistes du récepteur NK-1 empêche toute réponse subséquente des cellules. Cependant, cette hypothèse a été exclut puisque les cellules répondent à une stimulation à l'ionomycine après avoir été traitées avec l'antagoniste L-703,606 et stimulées avec l'antigène. Cependant, ce résultat est paradoxal puisque nos travaux ont clairement indiqué que le même antagoniste à la même concentration était capable de bloquer l'effet de l'ionomycine sur la dégranulation des basophiles. L'ensemble de ces données suggèrent que la régulation de la dégranulation antigénique des basophiles par le système tachykinergique est très complexe. Ainsi, il serait possible que le récepteur NK-1 régule l'activation des basophiles en agissant sur la PKC δ , mais que les événements en aval de cette PKC diffèrent selon le type de stimulation, antigénique ou non-antigénique.

D'autres travaux devront être réalisés afin de conclure sur le mécanisme d'action précis du récepteur NK-1 dans l'activation des basophiles induite par le Fc ϵ RI, ou par un calcium ionophore. La modulation de l'activité de la PKC δ suite au blocage du récepteur NK-1 par des antagonistes sélectifs est une voie particulièrement intéressante à explorer en considération du rôle important de cette kinase dans la régulation de la dégranulation. L'étude de la modulation des autres fonctions d'activation du basophile, telles la synthèse et la libération de dérivés lipidiques pro-inflammatoires et la production de cytokines (IL-4) est également d'un

intérêt particulier et pourrait mener à une meilleure compréhension de la régulation par les tachykinines de l'activation du complexe IgE-FcεRI.

Ainsi, la recherche sur les tachykinines et les basophiles indique que les antagonistes du récepteur NK-1 auraient une utilité en tant que modulateurs de l'activation des basophiles pour la prévention ou le traitement d'une grande variété de maladies ou de syndromes allergiques impliquant ces cellules. Cette conclusion pourrait s'élargir à l'ensemble des pathologies impliquant les basophiles ou les mastocytes, telles que la rhinite allergique, l'asthme allergique, l'urticaire, les maladies auto-immunes impliquant les cellules métachromatiques, ainsi que tout autre désordre immunologique impliquant des cellules métachromatiques. Il est fort probable que les antagonistes du récepteur NK-1 pourraient également réussir à inhiber les pathologies allergiques découlant d'une amplification de cascades induite par les endokinines ou l'hémokinine. L'utilisation d'une combinaison d'antagonistes des différents récepteurs des tachykinines n'est pas non plus exclue car ces peptides ont la capacité d'agir sur plus d'un récepteur. Cependant, le rôle des récepteurs NK-2 et NK-3 dans la réponse allergique est peu documenté.

Bien que leur nombre soit faible dans la population leucocytaire du sang, les basophiles jouent un rôle important dans perpétuation de la réponse allergique, dans la défense anti-parasitaire ainsi que dans la capture des antigènes menant à l'activation des cellules B. Les futures études sur les basophiles nous révéleront peut-être que ces cellules jouent un rôle clé dans la physiopathologie de l'asthme. L'étude de la régulation des basophiles par les tachykinines sera probablement d'un grand intérêt pour le développement de traitements contre les maladies ou les syndromes allergiques. Ainsi, les tachykinines et les basophiles permettront certainement d'élargir nos connaissances dans le domaine de la neuro-immunologie, et de permettre de découvrir dans l'avenir de nouveaux concepts de régulation de la réponse immunitaire.

Section 5 : Références

1. Kay AB. Allergy and Allergic Diseases- First of Two Parts. *N Engl J Med*, 2001;344(1):30-37.
2. Burrows B, Martinez FD, Halonen M, Barbee RA, Cline MG. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989;320(5):271-277.
3. Holgate ST. The epidemic of asthma and allergy. *J R Soc Med* 2004;97(3):103-110.
4. Busse WW, Lemanske RF. Asthma. *N Engl J Med* 2001;344(5):350-362.
5. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003;111(3):450-463.
6. Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol* 2001;77:93-122.
7. Arock M, Schneider E, Boissan M, Tricottet V, Dy M. Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leukoc Biol* 2002;71(4):557-564.
8. Falcone FH, Haas H, Gibbs BF. The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood* 2000;96(13):4028-4038.
9. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 1992;148(4):1086-1092.
10. Bochner BS, Luscinskas FW, Gimbrone MA Jr, Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991;173(6):1553-1557.
11. Ugucioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, LaRosa GJ et al. High Expression of the Chemokine Receptor CCR3 in Human Blood Basophils . Role in Activation by Eotaxin, MCP-4, and Other Chemokines. *J Clin Invest* 1997;100(5):1137-1143.
12. Yamada H, Hirai K, Miyamasu M, Likura M, Misaki Y, Shoji S et al. Eotaxin Is a Potent Chemotaxin for Human Basophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;231(2):365-368.
13. Liu MC, Hubbard WC, Proud D, Stealey BA, Galli SJ, Kagey-Sobotka A et al. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of

- the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(1):51-8.
14. Yanagihara, Kajiwara, Basaki, Ikizawa, Ebisawa, RA et al. Cultured basophils but not cultured mast cells induce human IgE synthesis in B cells after immunologic stimulation. *Clin Exp Immunol* 1998;111(1):136-143.
 15. Marone G, Spadaro G, De Marino V, Aliperta M, Triggiani M. Immunopharmacology of human mast cells and basophils. *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 1998;28(1):12-22.
 16. Nouri-Aria KT, Irani A-MA, Jacobson MR, O'Brien F, Varga EM, Till SJ et al. Basophil recruitment and IL-4 production during human allergen-induced late asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;108(2):205-211.
 17. Gauvreau GM, Lee JM, Watson RM, Irani A-MA, Schwartz LB, O'byrne PM. Increased Numbers of Both Airway Basophils and Mast Cells in Sputum after Allergen Inhalation Challenge of Atopic Asthmatics. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2000;161(5):1473-1478.
 18. MacGlashan DJr, Gauvreau G, Schroeder J. Basophils in Airway Disease. *Current Allergy and Asthma Reports* 2002;2(2):126 - 132.
 19. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From Physiology to Pathology. *Annual Review of Immunology* 1999;17:931-972.
 20. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):773-86.
 21. Schroeder JT, MacGlashan DW Jr, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol* 2001;77:93-122.
 22. MacGlashan DJr, Lichtenstein LM. Studies of antigen binding on human basophils. I. Antigen binding and functional consequences. *J Immunol* 1983;130(5):2330-2336.
 23. Kinet JP. The high-affinity IgE receptor (FcεRI): From Physiology to Pathology. *Annual Review of Immunology* 1999;17:931-972.
 24. Turner H, Kinet JP. Signalling through the high-affinity IgE receptor FcεRI. *Nature* 1999;402(6760 Suppl):B24-30.
 25. Miller L, Blank U, Metzger H, Kinet J-P. Expression of High-Affinity Binding of Human Immunoglobulin E by Transfected Cells. *Science* 1989;244(4902):334-338.

26. Lin S, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. The Fc[epsilon]RI[beta] Subunit Functions as an Amplifier of Fc[epsilon]RI[gamma]-Mediated Cell Activation Signals. *Cell* 1996;85(7):985-995.
27. Dombrowicz D, Lin S, Flamand V, Brini AT, Koller BH, Kinet JP. Allergy-Associated FcR[beta] Is a Molecular Amplifier of IgE- and IgG-Mediated In Vivo Responses. *Immunity* 1998;8(4):517-529.
28. Saini SS, Richardson JJ, Wofsy C, Lavens-Phillips S, Bochner BS, MacGlashan DW Jr. Expression and modulation of Fc[epsilon]RI[alpha] and Fc[epsilon]RI[beta] in human blood basophils. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;107(5):832-841.
29. Donnadieu E, Cookson WO, Jouvin MH, Kinet JP. Allergy-Associated Polymorphisms of the FcεRIβ Subunit Do Not Impact Its Two Amplification Functions. *J Immunol* 2000;165(7):3917-3922.
30. Eiseman E, Bolen JB. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature* 1992;355(6355):78-80.
31. Vonakis BM, Chen H, Haleem-Smith H, Metzger H. The unique domain as the site on Lyn kinase for its constitutive association with the high affinity receptor for IgE. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(38):24072-24080.
32. Honda Z. Roles of C-terminal Src kinase in the initiation and the termination of the high affinity IgE receptor-mediated signalling. *J Biol Chem* 1997;272:25753-25760.
33. Trowbridge IS, Thomas ML. CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development. *Annual Review of Immunology* 1994;12(1):85-116.
34. Salim K. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 1996;15:6241-6250.
35. Rawlings DJ. Activation of BTK by a phosphorylation mechanism initiated by SRC family kinases. *Science* 1996;271:822-825.
36. Rameh LE, Arvidsson A-K, Carraway III KL, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A et al. A Comparative Analysis of the Phosphoinositide Binding Specificity of Pleckstrin Homology Domains. *J Biol Chem* 1997;272(35):22059-22066.
37. Saitoh S. LAT is essential for Fc[epsilon]RI-mediated mast cell activation. *Immunity* 2000;12:525-535.
38. Hendricks-Taylor LR, Motto DG, Zhang J, Siraganian RP, Koretzky GA. SLP-76 is a substrate of the high affinity IgE receptor-stimulated protein

- tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272(2):1363-1367.
39. Turner H, Reif K, Rivera J, Cantrell DA. Regulation of the adapter molecule Grb2 by the FcεR1 in the mast cell line RBL2H3. *J Biol Chem* 1995;270:9500-9506.
 40. Arudchandran R. The Src homology 2 domain of Vav is required for its compartmentation to the plasma membrane and activation of c-jun NH2-terminal kinase 1. *J Exp Med* 2000;191:47-60.
 41. Marshall CJ. Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:197-204.
 42. Xu R, Seger R, Pecht I. Cutting Edge: Extracellular Signal-Regulated Kinase Activates Syk: A New Potential Feedback Regulation of Fc{epsilon} Receptor Signalling. *J Immunol* 1999;163(3):1110-1114.
 43. Offermanns S, Jones SVP, Bombien E, Schultz G. Stimulation of mitogen-activated protein kinase activity by different secretory stimuli in rat basophilic leukemia cells. *Journal of Immunology* 1994;152(1):250-61.
 44. Hanson DA, Ziegler SF. Regulation of ionomycin-mediated granule release from rat basophil leukemia cells. *Molecular Immunology* 2002;38(16-18):1329-35.
 45. Zhang C, Baumgartner RA, Yamada K, Beaven MA. Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Regulates Production of Tumor Necrosis Factor-alpha and Release of Arachidonic Acid in Mast Cells. Indications Of Communication Between P38 and P42 Map Kinases. *J Biol Chem* 1997;272(20):13397-13402.
 46. Hirasawa N, Sato Y, Fujita Y, Ohuchi K. Involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase-p38 mitogen activated protein kinase pathway in antigen-induced IL-4 production in mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2000;1456(1):45-55.
 47. Miura K, Schroeder JT, Hubbard WC, MacGlashan DW Jr. Extracellular Signal-Regulated Kinases Regulate Leukotriene C4 Generation, But Not Histamine Release or IL-4 Production from Human Basophils. *J Immunol* 1999;162(7):4198-4206.
 48. Gibbs BF, Plath KES, Wolff HH, Grabbe J. Regulation of mediator secretion in human basophils by p38 mitogen-activated protein kinase: phosphorylation is sensitive to the effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors and calcium mobilization. *J Leukoc Biol* 2002;72(2):391-400.
 49. Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang YP, et al. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* 2001;412(6843):186-90.

50. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *J Immunol* 2002;3(8):741-748.
51. Nishizumi H, Yamamoto T. Impaired tyrosine phosphorylation and Ca²⁺ mobilization, but not degranulation, in lyn-deficient bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 1997;158:2350-2355.
52. Kawakami Y. Redundant and opposing functions of two tyrosine kinases, Btk and Lyn, in mast cell activation. *J Immunol* 2000;165:1210-1219.
53. Putney JW, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. *BioEssays* 1999;21:38-46.
54. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 1997;77:901-930.
55. Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992;355:353-356.
56. Ott VL, Cambier JC. Activating and inhibitory signalling in mast cells: New opportunities for therapeutic intervention? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000;106(3):429-440.
57. Daron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 1997;15:203-234.
58. Ravetch JV, Lanier LL. Immune Inhibitory Receptors. *Science* 2000;290(5489):84-89.
59. Paolini R, Jouvin MH, Kinet JP. Phosphorylation and dephosphorylation of the high affinity receptor for IgE immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature* 1991;353:855-858.
60. Malbec O, Fong DC, Turner M, Tybulewicz VLJ, Cambier JC, Fridman WH. FcεReceptor I-Associated lyn-Dependent Phosphorylation of FcγReceptor IIB During Negative Regulation of Mast Cell Activation. *J Immunol* 1998;160(4):1647-1658.
61. Katz HR, Vivier E, Castells MC, McCormick MJ, Chambers JM, Austen KF. Mouse mast cell gp49B1 contains two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and suppresses mast cell activation when coligated with the high-affinity Fc receptor for IgE. *PNAS* 1996;93(20):10809-10814.
62. Lu-Kuo JM, Joyal DM, Austen KF, Katz HR. Gp49B1 Inhibits IgE-initiated Mast Cell Activation through Both Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs, Recruitment of src Homology 2 Domain-containing Phosphatase-1, and Suppression of Early and Late Calcium Mobilization. *J Biol Chem* 1999;274(9):5791-5796.

63. Yamashita Y, Ono M, Takai T. Inhibitory and Stimulatory Functions of Paired Ig-Like Receptor (PIR) Family in RBL-2H3 Cells. *J Immunol* 1998;161(8):4042-4047.
64. Blery M, Kubagawa H, Chen C-C, Vely F, Cooper MD, Vivier E. The paired Ig-like receptor PIR-B is an inhibitory receptor that recruits the protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *PNAS* 1998;95(5):2446-2451.
65. Uehara T, Blery M, Kang D-W, Chen C-C, Ho LH, Gartland GL et al. Inhibition of IgE-mediated mast cell activation by the paired Ig-like receptor PIR-B. *J Clin Invest* 2001;108(7):1041-1050.
66. Kharitonov A, Chen Z, Sures I, Wang H, Schilling J, Ullrich A. A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors. *Nature* 1997;386:181 - 186.
67. Lienard H, Bruhns P, Malbec O, Fridman WH, Daron M. Signal Regulatory Proteins Negatively Regulate Immunoreceptor-dependent Cell Activation. *J Biol Chem* 1999;274(45):32493-32499.
68. Song J, Hagen GM, Roess DA, Pecht I, Barisas BG. The Mast Cell Function-Associated Antigen and Its Interactions with the Type I Fc Receptor. *Biochemistry* 2002;41(3):881 - 889.
69. Xu R, Abramson J, Fridkin M, Pecht I. SH2 Domain-Containing Inositol Polyphosphate 5'-Phosphatase Is the Main Mediator of the Inhibitory Action of the Mast Cell Function-Associated Antigen. *J Immunol* 2001;167(11):6394-6402.
70. Kraneveld AD, Nijkamp FP. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. *International Immunopharmacology* 2001;1(9-10):1629-1650.
71. Mori N, Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wada M, Teshima R et al. Nerve-mast cell (RBL) interaction: RBL membrane ruffling occurs at the contact site with an activated neurite. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283(6):C1738-1744.
72. Ohshiro H, Suzuki R, Furuno T, Nakanishi M. Atomic force microscopy to study direct neurite-mast cell (RBL) communication in vitro. *Immunology Letters* 2000;74(3):211-14.
73. Beaujouan JC, Torrens Y, Saffroy M, Kemel ML, Glowinski J. A 25 year adventure in the field of tachykinins. *Peptides* 2004;25(3):339-57.
74. Pennefather JN, Lecci A, Candenás ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences* 2004;74(12):1445-1463.

75. Joos GF, De Swert KO, Schelfhout V, Pauwels RA. The Role of Neural Inflammation in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann NY Acad Sci* 2003;992(1):218-230.
76. Patacchini R, De Giorgio R, Bartho L, Barbara G, Corinaldesi R, Maggi C.A. Evidence that tachykinins are the main NANC excitatory neurotransmitters in the guinea-pig common bile duct. *British Journal of Pharmacology* 1998;124(8):1703-1711.
77. Linnik MD, Moskowitz MA. Identification of immunoreactive substance P in human and other mammalian endothelial cells. *Peptides* 1989;10(5):957-962.
78. Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology* 1991;128(5):2441-2448.
79. Lai J-P, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *Journal of Neuroimmunology* 1998;86(1):80-86.
80. Simon C, Portalier P, Chamoin MC, Ternaux JP. Substance P like-immunoreactivity release from enterochromaffin cells of rat caecum mucosa. Inhibition by serotonin and calcium-free medium. *Neurochemistry International*, 1992;20(4):529-536.
81. Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000;106(4):713-722.
82. Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K et al. Substance P induced preprotachykinin-A mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *International Archives of Allergy and Immunology* 2002;127(4):316-321.
83. Khan I, Collins SM. Fourth Isoform of Preprotachykinin Messenger RNA Encoding for Substance P in the Rat Intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;202(2):796-802.
84. Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, et al. Airway Smooth Muscle Cells Express Functional Neurokinin-1 Receptors and the Nerve-Derived Preprotachykinin-A Gene: Regulation by Passive Sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(1): p103-110.
85. Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martin JD et al. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *British Journal of Pharmacology* 2003;139(3):523-532.

86. Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, Hidalgo A, Baamonde A, Sanchez T et al. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biology of Reproduction* 2003;69(3):940-946.
87. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F. The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004;201(2):167-80.
88. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 2004;61(13):1652-1663.
89. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nature Immunology* 2000;1(5):392-97.
90. Kurtz MM, Wang R, Clements MK, Cascieri MA, Austin CP, Cunningham BR et al. Identification, localization and receptor characterization of novel mammalian substance P-like peptides. *Gene* 2002;296(1-2): 205-212.
91. Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, et al. Characterization of the endokinins: Human tachykinins with cardiovascular activity. *PNAS* 2003;100(10):6245-6250.
92. Patacchini R, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as targets for new drugs. *European Journal of Pharmacology* 2001;429(1-3):13-21.
93. Duffy RA, Hedrick JA, Randolph G, Morgan CA, Cohen-Williams ME, Vassileva G et al. Centrally administered hemokinin-1 (HK-1), a neurokinin NK1 receptor agonist, produces substance P-like behavioral effects in mice and gerbils. *Neuropharmacology* 2003;45(2):242-250.
94. Morteau O, Lu B, Gerard C, Gerard NP. Hemokinin 1 is a full agonist at the substance P receptor. *Nat Immunol* 2001;2(12):1088.
95. Maggi CA and Schwartz TW. The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 1997;18(4): 351-355.
96. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological Reviews* 1994;46(4):551-99.
97. Rameshwar P. Substance P: A Regulatory Neuropeptide for Hematopoiesis and Immune Functions. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1997;85(2): 129-133.
98. Bandari PS, Qian J, Yehia G, Seegopaul HP, Harrison JS, Gascon P et al. Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. *Neuropeptides* 2002;36(1):13-21.

99. Petitet F, Saffroy M, Torrens Y, Lavielle S, Chassaing G, Loeuillet D et al. Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. *Peptides* 1992;13(2):383-388.
100. Ciucci A, Palma C, Manzini S, Werge TM. Point mutation increases a form of the NK1 receptor with high affinity for neurokinin A and B and septide. *British Journal of Pharmacology* 1998;125(2):393-401.
101. Lecat S, Bucher B, Mely Y, Galzi JL. Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signalling but preserve intracellular calcium responses. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277(44):42034-42048.
102. Gazi L, Nickolls SA, Strange PG. Functional coupling of the human dopamine D2 receptor with Gi1, Gi2, Gi3 and Go G proteins: Evidence for agonist regulation of G protein selectivity. *British Journal of Pharmacology* 2003;138(5):775-786.
103. Kenakin T. Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2002;42:349-379.
104. Rosenkilde MM, Cahir M, Gether U, Hjorth SA, Schwartz TW. Mutations along transmembrane segment II of the NK-1 receptor affect substance P competition with non-peptide antagonists but not substance P binding. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269(45):28160-28164.
105. Hastrup H, Schwartz TW. Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Letters* 1996;399(3):264-266.
106. Torrens Y, Beaujouan J-C, Saffroy M, Glowinski J. Further Evidence for the Presence of "Septide-Sensitive" Tachykinin Binding Sites in Tissues Possessing Solely NK1 Tachykinin Receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;270(2):668-672.
107. Sagan S, Lavielle S. Internalization of [3H]Substance P Analogues in NK-1 Receptor Transfected CHO Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;282(4):958-964.
108. Sagan S, Beaujouan J-C, Torrens Y, Saffroy M, Chassaing G, Glowinski J et al. High affinity binding of H³propionyl-Met(O²)-substance P(7-11), a tritiated septide-like peptide, in Chinese hamster ovary cells expressing human neurokinin-1 receptors and in rat submandibular glands. *Molecular Pharmacology* 1997;52(1):120-127.
109. Maggi CA. The troubled story of tachykinins and neurokinins: an update. *Trends in Pharmacological Sciences* 2001;22(1):16.

110. Wijkhuisen A, Sagot M-A, Frobert Y, Creminon C, Grassi J, Boquet D et al. Identification in the NK1 tachykinin receptor of a domain involved in recognition of neurokinin A and septide but not of substance P. *FEBS Letters* 1999;447(2-3):155-159.
111. Bhaskar RV, Lisa DA, Kenneth CA, Malcolm RB, John AD, Ramanuj G et al. Synthesis and substance P receptor binding activity of androstano[3,2-b]pyrimido[1,2-a]benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry* 1992;34(2):374 - 378.
112. Harrison T, Williams BJ, Swain CJ, Ball RG. Piperidine-ether based hNK1 antagonists 1: Determination of the relative and absolute stereochemical requirements. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1994;4(21):2545-2550.
113. Cascieri MA, Ber E, Fong TM, Sadowski S, Bansal A, Swain C et al. Characterization of the binding of a potent, selective, radioiodinated antagonist to the human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol* 1992;42(3):458-63.
114. Garret C, Carruette A, Fardin V, Moussaoui S, Peyronel J, Blanchard J et al. Pharmacological Properties of a Potent and Selective Nonpeptide Substance P Antagonist. *PNAS* 1991;88(22):10208-10212.
115. Reeve JG, Bleehen NM. [D-Arg1, D-Phe5, D-Trp7,9, Leu11] Substance-P Induces Apoptosis in Lung Cancer Cell Lines in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994;199(3):1313-1319.
116. Kudlacz EM, Shatzer SA, Knippenberg RW, Logan DE, Poirot M, Van Giersbergen PL et al. In vitro and in vivo characterization of MDL 105,212A, a nonpeptide NK- 1/NK-2 tachykinin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;277(2):840-851.
117. Barnes PJ. Neurogenic inflammation in the airways. *Respiration Physiology* 2001;125(1-2):145-154.
118. Luts A, Uddman R, Alm P, Basterra J, Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in human airways: distribution and coexistence pattern. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101(1):52-60.
119. Lundberg JM, HÅkfelt T, Martling C-R, Saria A, Cuello C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell and Tissue Research (Historical Archive)* 1984; 235(2): 251-261.
120. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000;55(4):321-337.

121. Nieber K, Baumgarten CR, Rathsack R, Furkert J, Oehme P, Kunkel G. Substance P and β -endorphin-like immunoreactivity in lavage fluids of subjects with and without allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;90(4 I):646-652.
122. Crimi N, Palermo F, Oliveri R, Polosa R, Magri S, Mistretta A. Inhibition of neutral endopeptidase potentiates bronchoconstriction induced by neurokinin A in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 1994;24(2):115-20.
123. Conlon JM. Substance P. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier Science Inc. 2004;339-342.
124. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000;55(4):321-337.
125. Ollerenshaw SL, Jarvis D, Sullivan CE, Woolcock AJ. Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. *Eur Respir J* 1991;4(6):673-682.
126. Chanez P, Springall D, Vignola AM, Moradoghi-Hattvani A, Polak JM, Godard P et al. Bronchial Mucosal Immunoreactivity of Sensory Neuropeptides in Severe Airway Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(3):985-990.
127. Heaney LG, Cross LJM, McGarvey LPA, Buchanan KD, Ennis M, Shaw C. Neurokinin A is the predominant tachykinin in human bronchoalveolar lavage fluid in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1998;53(5):357-362.
128. Weinstock JV, Blum A, Walder J, Walder R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis *mansoni* produce substance P. *J Immunol* 1988;141(3):961-966.
129. Metwali A, Blum AM, Ferraris L, Klein JS, Fiocchi C, Weinstock JV. Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *Journal of Neuroimmunology* 1994;52(1):69-78.
130. Germonpre PR, Bullock GR, Lambrecht BN, Van De Velde V, Luyten WH, Joos GF et al. Presence of substance P and neurokinin 1 receptors in human sputum macrophages and U-937 cells. *Eur Respir J* 1999;14(4):776-782.
131. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997;159(11):5654-5660.

132. Cook GA, Elliott D, Metwali A, Blum AM, Sandor M, Lynch R et al. Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis *mansoni* express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J Immunol* 1994;152(4):1830-1835.
133. Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regulatory Peptides* 1997;70(2-3):75-90.
134. Joos GF, Pauwels RA. Pro-inflammatory effects of substance P: new perspectives for the treatment of airway diseases? *Trends in Pharmacological Sciences* 2000;21(4):131-33.
135. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part I: Ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides* 1997;31(6):537-563.
136. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The Tachykinin Peptide Family. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):285-322.
137. Suzuki R, Furuno T, McKay DM, Wolvers D, Teshima R, Nakanishi M, et al. Direct Neurite-Mast Cell Communication In Vitro Occurs Via the Neuropeptide Substance P. *J Immunol* 1999;163(5):2410-15.
138. Louis RE, Radermecker MF. Substance P-induced histamine release from human basophils, skin and lung fragments: effect of nedocromil sodium and theophylline. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990;92(4):329-33.
139. Forsythe P, Mcgarvey LPA, Heaney LG, Macmahon J, Ennis M. Sensory neuropeptides induce histamine release from bronchoalveolar lavage cells in both nonasthmatic coughers and cough variant asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2000;30(2):225-232.
140. Heaney LG, Cross LJM, Ennis M, Histamine release from bronchoalveolar lavage cells from asthmatic subjects after allergen challenge and relationship to the late asthmatic response. *Clin Exp Allergy* 1998;28(2):196-204.
141. Zhang Y, Paige CJ. T-cell developmental blockage by tachykinin antagonists and the role of hemokinin 1 in T lymphopoiesis. *Blood* 2003;102(6):2165-2172.
142. Rameshwar P, Ganea D, Gascon P. In vitro stimulatory effect of substance P on hematopoiesis. *Blood* 1993;81(2):391-398.
143. Rameshwar P, Gascon P. Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood* 1995;86(2):482-490.

144. Payan D, Goetzl E. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J Immunol* 1985;135(2):783S-786.
145. Moore TC, Lami JL, Spruck CH. Substance P increases lymphocyte traffic and lymph flow through peripheral lymph nodes of sheep. *Immunology* 1989;67(1):109-14.
146. Schratzberger P, Reinisch N, Prodingner WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R et al. Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1997;158(8):3895-3901.
147. Advenier C, Joos G, Molimard M, Lagente V, Pauwels R. Role of tachykinins as contractile agonists of human airways in asthma. *Clin Exp Allergy* 1999;29(5):579-584.
148. Stanisz A, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J Immunol* 1986;136(1):152-156.
149. Scicchitano R, Bienenstock J, Stanisz AM. In vivo immunomodulation by the neuropeptide substance P. *Immunology* 1988;63(4):733-5.
150. Bost KL, Pascual DW. Substance P: a late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 1992;262(3):C537-545.
151. Pascual DW, Xu-Amano JC, Kiyono H, McGhee JR, Bost KL. Substance acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. *J Immunol* 1991;146(7):2130-2136.
152. Carucci JA, Auci DL, Herrick CA, Durkin HG. Neuropeptide-mediated regulation of hapten-specific IgE responses in mice. I. Substance P-mediated isotype-specific suppression of BPO-specific IgE antibody-forming cell responses induced in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol* 1995;57(1):110-115.
153. Calvo C, Chavanel G, Senik A. Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. *J Immunol* 1992;148(11):3498-3504.
154. Rameshwar P, Gascon P, Ganea D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol* 1993;151(5):2484-2496.
155. Nio DA, Moylan RN, Roche JK. Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol* 1993;150(12):5281-5288.

156. Croitoru K, Ernst PB, Bienenstock J, Padol I, Stanisz AM. Selective modulation of the natural killer activity of murine intestinal intraepithelial leucocytes by the neuropeptide substance P. *Immunology* 1990;71(2):196-201.
157. Guo C-J, Lai J-P, Luo H-M, Douglas SD, Ho W-Z. Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1[β] expression in human T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology* 2002;131(1-2):160-167.
158. Covas MJ, Pinto LA, Victorino RM. Disturbed immunoregulatory properties of the neuropeptide substance P on lymphocyte proliferation in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1994;96(3):384-8.
159. Ruff MR, Wahl SM, Pert CB. Substance P receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. *Peptides* 1985;6(Supplement 2):107-111.
160. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Substance P augments interleukin-10 and tumor necrosis factor- α release by human cord blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmunol* 1996;71(1-2):73-80.
161. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988;241(4870):1218-21.
162. Murriss-Espin M, Pinelli E, Pipy B, Leophonte P, Didier A. Substance P and alveolar macrophages: effects on oxidative metabolism and eicosanoid production. *Allergy* 1995;50(4):334-9.
163. Boichot E, Lagente V, Paubert-Braquet M, Frossard N. Inhaled substance P induces activation of alveolar macrophages and increases airway responses in the guinea-pig. *Neuropeptides* 1993;25(5): 307-313.
164. Bar-Shavit Z, Goldman R, Stabinsky Y, Gottlieb P, Fridkin M, Teichberg VI, Blumberg S., Enhancement of phagocytosis - a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1980. 94(4): p. 1445-51.
165. Haines KA, Kolasinski SL, Cronstein BN, Reibman J, Gold LI, Weissmann G. Chemoattraction of neutrophils by substance P and transforming growth factor- β 1 is inadequately explained by current models of lipid remodeling. *J Immunol*, 1993. 151(3): p. 1491-1499.
166. Zimmerman BJ, Anderson DC, Granger DN. Neuropeptides promote neutrophil adherence to endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1992;263(5):G678-682.
167. Iwamoto I, Nakagawa N, Yamazaki H, Kimura A, Tomioka H, Yoshida S. Mechanism for substance P-induced activation of human neutrophils and eosinophils. *Regulatory Peptides* 1993;46(1-2):228-230.

168. Kuo H-P, Lin H-C, Hwang K-H, Wang C-H, Lu L-C. Lipopolysaccharide Enhances Substance P-mediated Neutrophil Adherence to Epithelial Cells and Cytokine Release. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1891-1897.
169. DeRose V, Robbins RA, Snider RM, Spurzem JR, Thiele GM, Rennard SI et al. Substance P increases neutrophil adhesion to bronchial epithelial cells. *J Immunol* 1994;152(3):1339-1346.
170. Kroegel C, Giembycz M, Barnes P. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe. *J Immunol* 1990;145(8):2581-2587.
171. Wiedermann FJ, Kahler CM, Reinisch N, Wiedermann CJ. Induction of normal human eosinophil migration in vitro by substance P. *Acta Haematol* 1993; 89(4):213-5.
172. Nilsson G, Alving K, Ahlstedt S, Hokfelt T, Lundberg JM. Peptidergic innervation of rat lymphoid tissue and lung: relation to mast cells and sensitivity to capsaicin and immunization. *Cell Tissue Res* 1990;262(1):125-33.
173. Naukkarinen A, Harvima I, Paukkonen K, Aalto ML, Horsmanheimo M. Immunohistochemical analysis of sensory nerves and neuropeptides, and their contacts with mast cells in developing and mature psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res* 1993;285(3):341-6.
174. Shanahan F, Denburg JA, Fox J, Bienenstock J, Befus D. Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* 1985;135(2):1331-1337.
175. Repke H, Bienert M. Mast cell activation--a receptor-independent mode of substance P action? *FEBS Letters* 1987;221(2):236-40.
176. Fewtrell CMS, Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, Renner H, Stewart JM. The effects of substance P on histamine and 5hydroxytryptamine release in the rat. *J Physiol*, 1982;330:393-411.
177. Cross LJ, Heaney LG, Ennis M. Further characterisation of substance P induced histamine release from human bronchoalveolar lavage mast cells. *Inflamm Res* 1996;45(Suppl 1):S11-2.
178. Heaney LG, Cross LJ, Stanford CF, Ennis M. Substance P induces histamine release from human pulmonary mast cells. *Clin Exp Allergy* 1995;25(2):179-86.
179. Joos GF, Lefebvre RA, Bullock GR, Pauwels RA. Role of 5-hydroxytryptamine and mast cells in the tachykinin-induced contraction of rat trachea in vitro. *European Journal of Pharmacology* 1997;338(3):259-268.

180. Okada T, Hirayama Y, Kishi S, Miyayasu K, Hiroi J, Fujii T. Functional neurokinin NK-1 receptor expression in rat peritoneal mast cells. *Inflammation Research* 1999;48(5):274-279.
181. Germonpre PR, Joos GF, Pauwels RA. Modulation by 5-HT1A receptors of the 5-HT2 receptor-mediated tachykinin-induced contraction of the rat trachea in vitro. 1998;123(8):1571-1578.
182. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993;150(10):4478-4485.
183. Barsumian EL, Isersky C, Petrino MG, Siraganian RP. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. *Eur J Immunol* 1981;11(4):317-23.
184. Ouaked N, Lefort B, Poirier A, Maghni K. Evidence of autocrine tachykinergic regulation of basophil function. Collection of Free Papers presented at the 12th Int. Congress of Immunology and 4th annual Conference of FOCIS (Montreal Canada, July 18-23, 2004) *Immunology* 2004:293-297.
185. McEuen AR, Calafat J, Compton SJ, Easom NJW, Buckley MG, Knol EF et al. Mass, charge, and subcellular localization of a unique secretory product identified by the basophil-specific antibody BB1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;107(5):842-848.
186. Kepley C, Craig S, Schwartz L. Identification and partial characterization of a unique marker for human basophils. *J Immunol* 1995;154(12):6548-6555.
187. Koshino T, Teshima S, Fukushima N, Takaishi T, Hirai K, Miyamoto Y et al. Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 1993;23(11):919-25.
188. Pin I, Gibson PG, Kolendowicz R, Girgis-Gabardo A, Denburg JA, Hargreave FE; et al. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47(1):25-9.
189. Koshino T, Arai Y, Miyamoto Y, Sano Y, Itami M, Teshima S, et al. Airway basophil and mast cell density in patients with bronchial asthma: relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Asthma* 1996;33(2):89-95.
190. Maruyama N, Tamura G, Aizawa T, Ohru T, Shimura S, Shirato K et al. Accumulation of basophils and their chemotactic activity in the airways during natural airway narrowing in asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(4):1086-1093.

191. Gauvreau, GM, Watson RM, O'byrne PM. Kinetics of Allergen-Induced Airway Eosinophilic Cytokine Production and Airway Inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(2):640-647.
192. Currie GP, Srivastava P, Dempsey OJ, Lee DKC. Therapeutic modulation of allergic airways disease with leukotriene receptor antagonists. *QJM* 2005;98(3):171-182.
193. Urata C, Siraganian RP. Pharmacologic modulation of the IgE or Ca²⁺ ionophore A23187 mediated Ca²⁺ influx, phospholipase activation, and histamine release in rat basophilic leukemia cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1985;78(1):92-100.
194. Garcia-Gil M, Siraganian R. Phospholipase A2 stimulation during cell secretion in rat basophilic leukemia cells. *J Immunol* 1986;136(1):259-263.
195. Andoh T, Kuraishi Y. Expression of Fcε receptor I on primary sensory neurons in mice. *Neuroreport* 2004;15(13):2029-2031.
196. Rivera J. Molecular adapters in FcεRI signalling and the allergic response. *Current Opinion in Immunology* 2002;14(6):688-693.
197. Gu H, Saito K, Klamann LD, Shen J, Fleming T, Wang YP, et al. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* 2001;412(6843):186-90.
198. Smith AJ, Surviladze Z, Gaudet EA, Backer JM, Mitchell CA, Wilson BS. p110β and p110δ Phosphatidylinositol 3-Kinases Up-regulate FcεRI-activated Ca²⁺ Influx by Enhancing Inositol 1,4,5-Trisphosphate Production. *J Biol Chem* 2001;276(20):17213-17220.
199. Graham TE, Pfeiffer JR, Lee RJ, Kusewitt DF, Martinez AM, Foutz T et al. MEK and ERK Activation in Ras-Disabled RBL-2H3 Mast Cells and Novel Roles for Geranylgeranylated and Farnesylated Proteins in FcεRI-Mediated Signalling. *J Immunol* 1998;161(12):6733-6744.

Annexe 1

**Mise au point d'une méthode de mesure de
l'activation des basophiles humains**

Introduction

Mon projet de maîtrise était d'étudier principalement la modulation de l'activation des basophiles par le système tachykinergique. J'ai réalisé ce projet dans le cadre d'une bourse qui m'a été octroyée par les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC) en mai 2004. De façon concomitante à ce projet, j'ai également travaillé sur un projet portant sur la mise au point d'une méthode de mesure de l'activation des basophiles humains pour la détermination de la présence d'un asthme professionnel (AP) aux agents de bas poids moléculaire, les isocyanates [1]. Ce projet a été effectué dans le cadre d'une bourse attribuée par l'Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et Sécurité au Travail (IRSST) et le Centre Asthme et Travail (subvention des IRSC).

Des travailleurs qui manipulent et/ou sont exposés à des agents allergisants dans leur milieu professionnel sont susceptibles de se sensibiliser à ces agents, et ultérieurement de développer un asthme professionnel (AP). La prévalence de l'AP, qui représente de 2 à 6% de la population asthmatique, en fait l'une des maladies professionnelles les plus répandues en milieu de travail [2]. Dans plusieurs pays industrialisés, les isocyanates sont responsables de plus de cas d'AP que toutes autres classes d'agent causal [3]. La détection précoce d'une sensibilisation aux agents de haut ou de bas poids moléculaire, suivi de l'arrêt de l'exposition à l'agent sensibilisant, pourrait prévenir le développement d'un AP à cet agent [4].

Le diagnostic d'un AP requiert une approche systématique combinant des informations sur le travailleur tel que son histoire professionnelle, des tests de fonctions respiratoires ainsi que des tests immunologiques. La détection d'une sensibilisation à l'agent professionnel suspectée d'être responsable des symptômes d'asthme est un élément important dans le diagnostic d'un AP. En effet, l'absence de tests cutanés positifs à un agent professionnel de haut poids moléculaire exclut quasiment le diagnostic d'AP à cet agent. Cependant, un test cutané positif aux agents de haut poids moléculaire n'implique pas obligatoirement

l'existence d'un AP. Dans le cas des agents de bas poids moléculaire comme les isocyanates, il n'existe pas de test cutané pour identifier une sensibilisation à ces agents. La mesure des immunoglobulines de type E (IgE) ou G (IgG) spécifiques pour un agent de haut ou de bas poids moléculaire dans le sérum du travailleur permet de confirmer l'existence d'une sensibilisation à cet agent. Cependant, la mesure des IgE ou des IgG sériques spécifiques n'est pas un facteur suffisant pour le diagnostic de l'existence ou de la prévalence du risque de développer un AP [5]. La détermination des IgE ou IgG sériques spécifiques pour un agent de haut ou de bas poids moléculaire nécessite l'utilisation de techniques coûteuses, et qui ne semblent pas toujours assez sensibles pour la détection des IgE, particulièrement dans le cas des agents de bas poids moléculaire [5]. De plus, il est important de noter qu'une partie des travailleurs avec des tests cutanés positifs ou des tests sériques positifs pour des agents de haut ou de bas poids moléculaire sont asymptomatiques.

Récemment, la protéine transmembranaire CD203c, une ecto-nucléotide pyrophosphate-phosphodiesterase, a été identifiée comme étant un marqueur de l'activation des basophiles humains car son expression augmente à la surface des basophiles (et des mastocytes) après une activation antigénique ou non-antigénique des cellules [6]. Un test de détection de l'activation des basophiles pourrait être un outil intéressant dans la détermination d'un diagnostic d'AP aux agents de bas poids moléculaires, tels les isocyanates. Le CD203c pourrait servir de marqueur dans la détection de l'activation des basophiles suite à une stimulation par un agent antigénique. La présente étude vise donc à déterminer la faisabilité de la mesure de l'activation des basophiles sanguins pour la détection de la sensibilisation des sujets aux agents de bas poids moléculaire dans l'AP.

Matériels et méthodes

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr Catherine Lemièrre et le Dr Jean-Luc Malo, chercheurs cliniciens œuvrant dans le domaine de l'AP à l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Ces deux chercheurs ont été responsables du recrutement et du suivi des travailleurs participant à cette étude, et leur personnel technique a été responsable des questionnaires, des tests cutanés et des tests de

fonctions respiratoires, de l'induction d'expectorat ainsi que des prises de sang. Le Dr Maghni et moi-même, étions responsables du développement, de la validation et de l'utilisation des outils d'investigation (activation des basophiles).

Sujets et taille d'échantillon

Cette étude se voulait une étude pilote. Dix sujets exposés aux isocyanates, asymptomatiques et sans IgE spécifiques et 10 sujets avec AP aux isocyanates prouvés en laboratoire devaient être recrutés.

Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion sont les suivants :

- Sujets asymptomatiques exposés aux isocyanates dans leur milieu de travail.
- Sujets avec un AP aux isocyanates prouvés en laboratoire.

Critères d'exclusion

Sont exclus les sujets avec: 1) une infection pulmonaire dans le mois précédant la participation à cette étude, 2) une grossesse en cours et/ou 3) une incapacité à signer un consentement éclairé.

Prélèvements sanguins activation des basophiles

L'activation des basophiles a été déterminée par cytométrie en flux selon un protocole développé par le Dr Guillaume Monneret (Hôpital de Lyon Sud ; France) [7]. Brièvement, l'activation basale et post-stimulation des basophiles sanguins a été faite dans un volume de 100 µl de sang total. L'échantillon de sang a été stimulé avec du formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) 10^{-6} M comme contrôle positif [8], avec un allergène commun, ou avec différentes dilutions d'un conjugué d'isocyanate couplé à l'albumine sérique humaine (ASH). Après 10 min de stimulation à 37°C, la réaction a été stoppée durant 10 min sur la glace. Les cellules sanguines ont ensuite été incubées avec 10 µl d'anticorps de chèvre anti-IgE humain couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) et 20 µl d'anticorps monoclonaux de souris anti-CD203c couplés à la phycoérythrine (PE) (Immunotech, Marseilles, France). Les globules rouges ont été

lysés avec la solution PharM Lyse™ (BD Biosciences, San Jose, CA) selon les instructions du fabricant. Après deux lavages avec du tampon phosphate « *phosphate buffered saline* » (PBS), les cellules ont été resuspendues dans 500 µl de PBS et analysées au cytofluoromètre (EPICS XL, Beckman Coulter, Ville Saint-Laurent, Qc). Lors de l'analyse, nous avons sélectionné en premier lieu la portion des cellules correspondant aux basophiles en utilisant des paramètres en cytométrie qui répartissent les cellules selon leur granularité et la présence du CD203c (Figure 16). Les cellules de la région C de la figure 16 correspondent aux basophiles. Seulement ces cellules ont été analysées pour l'expression d'IgE et du CD203c à leur surface. Ainsi, la région G (Figure 16) correspond aux basophiles possédant des IgE à leur surface. Lors de l'analyse du pourcentage d'activation qui est déterminé selon l'expression du CD203c, seulement les cellules de la région G ont été considérées. Ainsi, le pourcentage d'activation correspond au pourcentage de basophiles qui sont à la fois positifs pour la détection des IgE à leur surface et pour le CD203c.

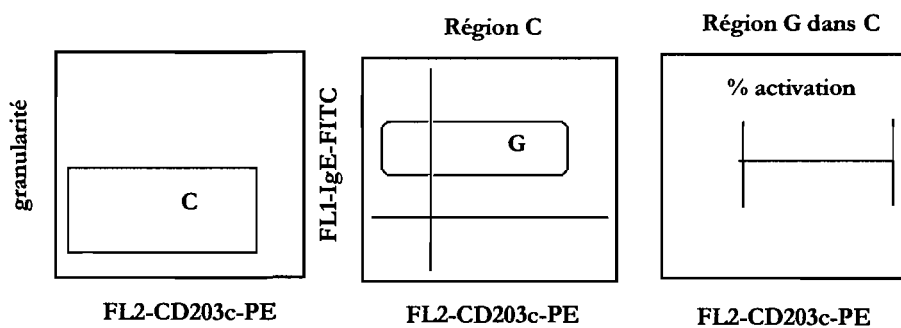


Figure 16. Schéma de l'analyse du pourcentage d'activation des basophiles sanguins par cytométrie en flux.

Préparation des conjugué d'isocyanates

Le conjugué hexaméthylène diisocyanate (HDI), méthylène diphényl diisocyanate (MDI) et deux conjugués de toluène diisocyanate (TDI) ont été synthétisés par le Dr William Brown (Carnegie Mellon University ; USA). Le conjugué TDI C61 a été produit par passage de vapeur de TDI au travers une solution d'ASH dans du PBS. Ce conjugué est considéré comme étant faiblement modifié. Le conjugué TDI C98 a été produit par addition liquide de TDI à une solution d'ASH dans le PBS. Ce conjugué est considéré comme étant hautement modifié.

Résultats

Patient ML-70 : Diagnostique d'une sensibilisation au HDI

Dans un premier temps, les conjugués ont été testés avec un échantillon sanguin provenant d'un patient diagnostiqué avec un AP au HDI. Le niveau basal d'activation des basophiles du sujets ML-70 était très élevé car 86,2% des basophiles étaient activés (Figure 17). Le sujet avait également un diagnostique d'allergie à l'herbe à poux (test cutané positif). En stimulant l'échantillon de sang de ce patient avec cet allergène, nous avons confirmé son diagnostique d'allergie à l'herbe à poux puisque le pourcentage d'activation des basophiles est passé de 86,2% à 92,2%. Il est à noter que dans le cas présent, l'activation des basophiles n'a pas été faite avec le conjugué HDI-ASH. En effet, lorsque nous avons effectué les expériences avec le sang de ce patient, le Dr Brown n'avait pas terminé la synthèse du conjugué HDI-ASH. Cependant, suite à la stimulation en présence du conjugué MDI-ASH, aucune activation supplémentaire des basophiles (86,6%) n'a été détectée en comparaison avec le niveau de base (86,2%). Ainsi, l'ensemble de ces résultats indiquent que bien que le niveau d'activation de base soit élevé, les basophiles peuvent toujours être activés suite à une stimulation avec un allergène auquel le patient est sensibilisé. De plus, ces résultats montrent qu'une sensibilisation avec un agent de faible poids moléculaire, qui n'est pas celui qui a été identifié comme étant la cause de l'AP, ne peut pas activer les basophiles.

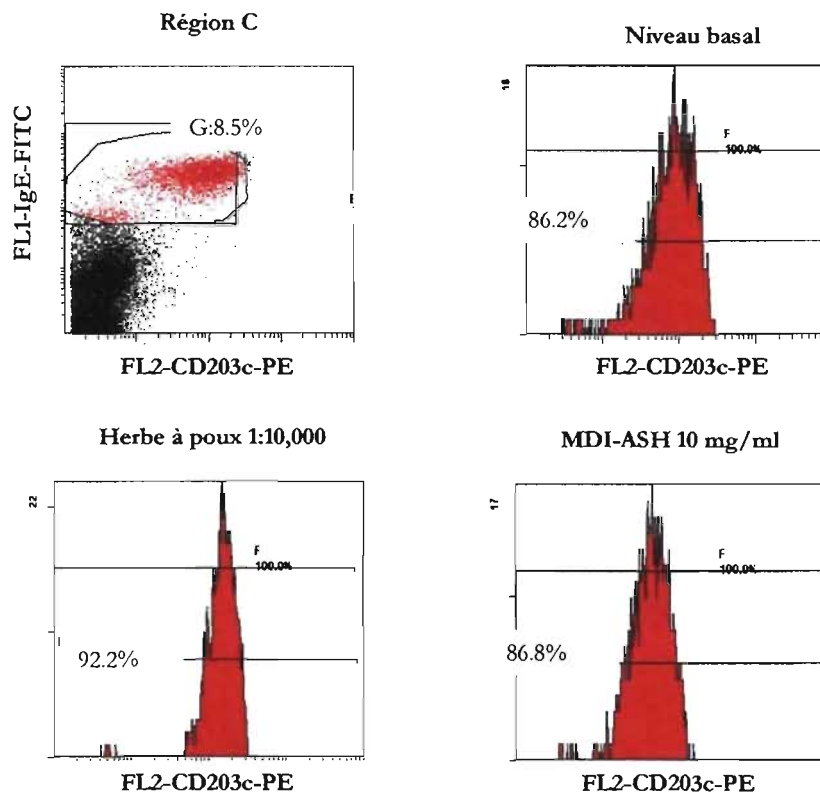


Figure 17. Activation des basophiles d'un patient sensibilisé au MDI-ASH.

Patient A-B : Diagnostique d'une sensibilisation au TDI

Le sang d'un patient diagnostiqué avec un AP au TDI a été analysé. Le niveau de base d'activation des basophiles était de 55,7%. Ce patient ne présentait pas d'allergie à un allergène commun. Nous avons confirmé ce diagnostique car suite à une stimulation avec l'herbe à poux aucune augmentation de l'activation des basophiles n'a été détectée (résultats non-montrés). Le test de détection de la sensibilisation au TDI a été effectué avec les deux conjugués TDI C61 ou TDI C98. Le graphique de la figure 18 illustre une augmentation de l'activation des basophiles selon la concentration du conjugué TDI C61, le conjugué de TDI-ASH faiblement modifié. Ces résultats indiquent qu'un échantillon sanguin provenant d'un patient avec un diagnostique d'AP aux TDI montre une réponse positive, en terme

d'activation des basophiles, en réponse à une stimulation avec un conjugué TDI-ASH.

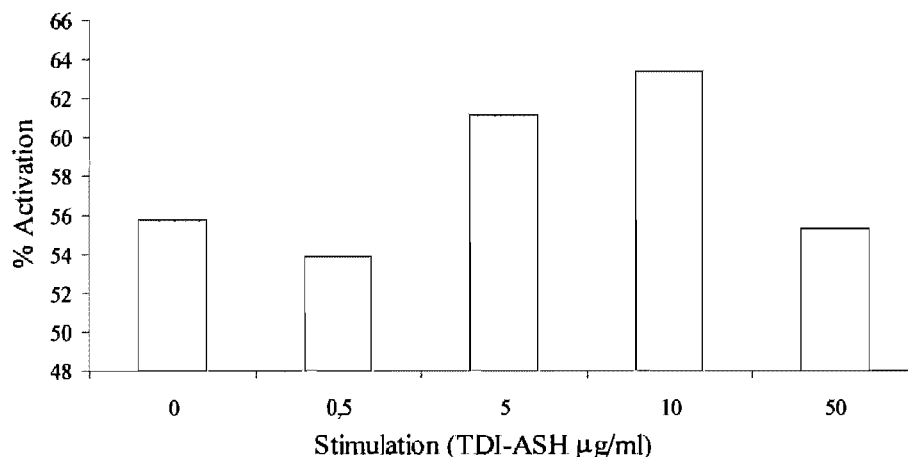


Figure 18. Activation des basophiles d'un patient sensibilisé au TDI par le conjugué TDI C61.

Un autre conjugué, le TDI C98 a été utilisé pour mesurer l'activation des basophiles chez ce même sujet. Cependant, suite à une stimulation avec ce conjugué considéré hautement modifié, les basophiles sanguins n'ont pas été activés par ce conjugué (résultats non montrés). Ainsi, ces résultats indiquent que le type de conjugué utilisé pour détecter une sensibilisation au TDI (hautement versus faiblement modifié) est critique pour l'activation des basophiles, du moins chez ce sujet.

Conclusions et perspectives

Le diagnostic d'AP demande souvent une procédure complexe et exhaustive pour le patient. Il est parfois difficile de différencier les sujets asthmatiques dont l'asthme s'exacerbe dans leur milieu de travail des sujets dont l'asthme est consécutif à une sensibilisation à un agent professionnel car ils sont exposés à des facteurs irritants, et dans certains cas, à un empoussièremment important. Si le test d'activation des basophiles peut permettre de différencier les sujets sensibilisés mais asymptomatiques des sujets ayant un AP, ce test pourrait être d'une

aide précieuse au diagnostique. Dans cette étude, nos résultats préliminaires indiquent que la mesure de l'activation des basophiles et l'utilisation des conjugués TDI-ASH sont des outils intéressants pour la détection de la sensibilisation aux agents de bas poids moléculaires. Ces résultats sont donc très prometteurs pour le développement de nouvelles méthodes non-invasives de détection et/ou de la confirmation d'un diagnostique d'AP au isocyanates chez les travailleurs exposés à ces agents dans leur milieu de travail.

Ce test pourrait aussi permettre l'étude de la modulation de l'activation des basophiles humains par les tachykinines sans avoir à purifier ces cellules. En effet, mon projet de maîtrise consistait à étudier la modulation de l'activation des basophiles par les tachykinines en utilisant un modèle cellulaire, la lignée basophilique de rat RBL-2H3. Lors de ce projet, le rôle des tachykinines et du récepteur NK-1 dans l'activation de différentes protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires suivant l'activation antigénique des basophiles a été étudié. Bien que d'autres expériences soient nécessaires afin de connaître le mécanisme d'action précis des tachykinines dans l'activation antigénique des basophiles, les données recueillies avec les RBL-2H3 ont fourni des pistes pour étudier le mécanisme chez les basophiles humains. Le test d'activation des basophiles pourrait également servir à déterminer l'implication des tachykinines dans les étapes préalables à la dégranulation, particulièrement dans la sensibilisation des sujets, via la modulation de l'expression du CD203c.

Références

1. Chan-Yeung, M. and J.-L. Malo, *Occupational Asthma*. N Engl J Med 1995; **333**(2):107-112.
2. Meredith, S. and H. Nordman, *Occupational asthma: measures of frequency from four countries*. Thorax 1996;**51**(4):435-440.
3. Meredith SK, Taylor VM, and M. JC, *Occupational respiratory disease in the United Kingdom 1989: a report to the British Thoracic Society and the Society of Occupational Medicine by the SWORD project group*. Br J Ind Med 1991; **48**(5):292-8.

4. Bardana, J., Emil J., 8. *Occupational asthma and allergies*. Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003;111(2, Supplement 2):530-539.
5. Bernstein, D.I. and A. Jolly, *Current diagnostic methods for diisocyanate induced occupational asthma*. Am J Ind Med 1999;36(4):459-68.
6. Platz, I.J., et al., *Hymenoptera-Venom-Induced Upregulation of the Basophil Activation Marker Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 3 in Sensitized Individuals*. International Archives of Allergy and Immunology 2001; 126(4): 335-342.
7. Boumiza, R., et al., *Marked improvement of the basophil activation test by detecting CD203c instead of CD63*. Clin Exp Allergy 2003;33(2): 259-265.
8. Dvorak AM, W.J., Kissell S, Lichtenstein LM, MacGlashan DW Jr., *F-met peptide-induced degranulation of human basophils*. Lab Invest 1991;64(2):234-53.