



HAL
open science

**LIGNÉES DE CELLULES ENDOTHÉLIALES
HUMAINES COMME MODÈLE DE
L'ORGANO-SPÉCIFICITÉ: ÉTUDE DU RÔLE DES
CHIMIOKINES ET APPLICATIONS À
L'INFLAMMATION CUTANÉE**

Claire Crola da Silva

► **To cite this version:**

Claire Crola da Silva. LIGNÉES DE CELLULES ENDOTHÉLIALES HUMAINES COMME MODÈLE DE L'ORGANO-SPÉCIFICITÉ: ÉTUDE DU RÔLE DES CHIMIOKINES ET APPLICATIONS À L'INFLAMMATION CUTANÉE. domain_other. Université d'Orléans, 2004. Français. NNT: . tel-00009374v2

HAL Id: tel-00009374

<https://theses.hal.science/tel-00009374v2>

Submitted on 1 Aug 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

par

Claire Crola Da Silva

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Lignées de cellules endothéliales humaines comme modèle
de l'organo-spécificité :
étude du rôle des chimiokines et applications à l'inflammation cutanée**

soutenue le 21 décembre 2004

MEMBRES DU JURY :

- | | |
|--|--------------------|
| - Olivier Martin, Professeur, Université d'Orléans | Président du Jury |
| - Ghislain Opdenakker, Professeur, Université de Louvain | Rapporteur |
| - Salem Chouaib, Directeur de recherche, Institut Gustave Roussy | Rapporteur |
| - Sophie Leclère, Ingénieur de recherche, Société BioEurope | Examineur |
| - Daniel Locker, Professeur, Université d'Orléans | Examineur |
| - Claudine Kieda, Directeur de recherche, CBM | Directeur de thèse |

Remerciements

Monsieur le Professeur Paul Vigny de m'avoir accueillie au sein du Centre de Biophysique Moléculaire pour y effectuer ma thèse.

La société Bioeurope du groupe Solabia et L'ANRT pour avoir financé ces 3 années de thèse.

Le Docteur Claudine Kieda de m'avoir reçue pour un stage de maîtrise et m'avoir gardée en DEA puis en thèse. Tout cela n'aurait pas eu lieu sans cette rencontre.

Il y a des choses dans une vie que l'on ne peut oublier.

Encore merci.

Messieurs, le Professeur Ghislain Opdenakker et le Docteur Salem Chouaib, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir rapporter ce travail de thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils ont consacré à ce travail et pour leurs remarques qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Monsieur le Professeur Olivier Martin, président du jury, Monsieur le Professeur Daniel Locker et Madame Sophie Leclère pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit et de participer à ma soutenance de Thèse.

Michèle Mitterrand qui, en dépit de ce qu'elle pense, est essentielle à la vie de cette équipe. Merci d'avoir eu la patience à mes débuts de m'apprendre une grande partie de ce que je sais aujourd'hui. Et merci également d'avoir encore la patience de me supporter au quotidien.

Nathalie Lamerant, avec qui j'ai partagé énormément de choses durant ces dernières années. Pour tout ce temps passé côte à côte, à la paillasse, au bureau, en chambre de culture et même à la maternité où nous avons partagé le moment, qui reste à ce jour le plus émouvant

de toute ma vie. Merci pour toute cette complicité et cette entente qui dépasse la simple relation de travail.

David Gosset, pour qui il est difficile parfois de se faire entendre parmi tant de femmes. C'est un plaisir de partager ma vie de labo avec lui. Merci pour tout le temps passé au service de la science et des manip sur 24 heures !!!!

Tous les étudiantes et étudiants partageant au quotidien la vie de laboratoire : Aleskandra, Magdalena, Pauline, Corinne, Karol, qui rendent les conditions de travail si agréables !

Ma famille, qui n'attendait plus ce moment ! Et particulièrement mes parents, qui m'ont laissé toujours libre de mes choix.

Pedro, mon mari, car il faut bien dire que c'est lui qui en supporte le plus !!! je n'en dirais pas plus ... tout ce que je pourrais dire, il le sait déjà !!!

Sommaire

Remerciements	2
Abréviations	7
I Introduction.....	8
II Généralités	13
1 L'endothélium	14
1.1 Son origine embryonnaire	14
1.2 Les processus de formation de la vasculature : la vasculogénèse et l'angiogénèse ...	14
1.3 Ses rôles.....	15
1.4 Les hautes cellules endothéliales : HEC (High Endothelial Cells)	15
2 Les mécanismes de reconnaissance cellulaire.....	16
2.1 Le roulement des leucocytes : rôle des sélectines	17
2.2 L'activation des cellules endothéliales : rôle des chimiokines	19
2.3 L'adhésion ferme : rôle des intégrines	19
2.4 La diapédèse	20
3 Les chimiokines.....	21
3.1 Les chimiokines : une classe particulière de cytokines.....	22
3.2 Définition	22
3.3 Structure tridimensionnelle des chimiokines	24
3.4 Les possibilités de liaison des chimiokines à la surface des cellules	25
3.4.1 Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérodimériques	26
3.4.2 Les glycosaminoglycanes (GAGs) constituant les glycoprotéines de la matrice extracellulaire	27
3.4.3 Un récepteur non spécifique : le DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokine)	28
4 Les différentes familles de chimiokines.....	28
4.1 La famille CXC ou famille alpha	28
4.2 La famille CC ou famille beta	30
4.3 La famille C ou famille gamma.....	32
4.4 La Famille CX ₃ C ou famille delta.....	32
5 La fractalkine (CX ₃ CL1) et son récepteur CX ₃ CR1	33
5.1 Sa Description	33
5.2 Ses rôles.....	33
5.3 Son récepteur CX ₃ CR1.....	34
6 La 6Ckine (CCL21) et son récepteur CCR7	35
6.1 Sa description	35
6.2 Ses rôles.....	35
6.3 Son récepteur CCR7.....	36
7 La chimiokine SDF-1 (CXCL12) et son récepteur CXCR4.....	37
7.1 Sa description	37
7.2 Ses rôles.....	37
7.3 Son récepteur CXCR4.....	38
8 La chimiokine RANTES (CCL5) et un de ses récepteurs, le CCR5.....	39
8.1 Sa description	39
8.2 Ses rôles.....	39
8.3 Un de ces récepteurs, le CCR5.....	40
9 La CTACK (CCL27) et son récepteur CCR10	40

9.1 La chimiokine CTACK	40
9.2 Son récepteur CCR10.....	40
10 Les interactions des chimiokines avec les GAGs.....	41
11 Les implications des chimiokines dans les cancers et diverses pathologies	42
12 L'organo-spécificité de l'endothélium	42
12.1 Les récepteurs de « homing » et les adressines vasculaires	43
12.1.1 Dans les ganglions lymphatiques : L-sélectine et PNad (Peripheral Node addressins).....	43
12.1.2 Dans les plaques de Peyer : MadCAM-1 et intégrine $\alpha 4\beta 7$	43
12.1.3 Dans la peau inflammée : E-sélectine –CLA	44
12.2 Les chimiokines et leurs récepteurs	45
12.2.1 La chimiokine MEC (CCL28) et un de ses récepteurs, le CCR10.....	45
12.2.2 La chimiokine CTACK (CCL27) et son récepteur CCR10	45
12.2.3 La chimiokine 6Ckine (CCL21) et son récepteur CCR7	46
12.2.4 La chimiokine TARC (CCL17) et son récepteur CCR9	46
12.2.5 La chimiokine TECK (CCL25) et son récepteur CCR9	46
13 L'inflammation.....	46
13.1 l'inflammation cutanée.....	47
13.1.1 La structure et les fonctions de la peau	47
13.1.2 La cascade cellulaire de l'inflammation cutanée	48
13.2 pourquoi les sucres ?	49
13.3 Les molécules de la société BioEurope.....	50
13.4 Le stress oxydant : le système oxyde nitrique (NO) / oxyde nitrique synthase inductible (iNOS)	50
13.5 Notre modèle d'inflammation cutanée.....	51
III. Les chimiokines et leurs récepteurs : leur participation à l'organo-spécificité de l'endothélium	52
1 Matériel et méthodes	54
1.1 Le phénomène étudié et l'hypothèse de travail.....	55
1.2 Le choix des lignées	55
1.3 La culture des lignées endothéliales (cellules adhérentes) et des lymphocytes CEMT4 (cellules en suspension).....	56
1.4 Etude des récepteurs et de la présentation des chimiokines par cytométrie en flux. .	56
1.5 La détection des récepteurs de chimiokines par Western Blot.....	56
1.6 Expériences d'adhésion de lymphocytes CEMT4 sur les lignées endothéliales.....	57
1.7 Test de croissance des cellules endothéliales en présence de chimiokines.....	58
1.8 Les expériences d'angiogénèse <i>in vitro</i>	59
1.9 Le ciblage des chimiokines en conditions de flux.....	60
1.9.1 Présentation de l'appareillage	60
1.9.2 Culture des cellules endothéliales pour les conditions de flux.....	62
1.9.3 Fixation des chimiokines sur des billes de latex	62
1.9.4 Principe, fonctionnement et analyse des résultats	63
2 Résultats	64
2.1 Les chimiokines et leurs récepteurs participent à l'organo-spécificité de l'endothélium	65
2.2 Présentation des résultats complémentaires et non présentés dans l'article.....	75
2.2.1 La détection des récepteurs de chimiokines par Western blot	75
2.2.2 Action des chimiokines sur la croissance des cellules endothéliales humaines..	76

2.2.3 La modulation de l'angiogénèse par les chimiokines : exemple de la fractalkine	79
2.2.4 Ciblage des chimiokines en conditions de flux : exemple de la fractalkine	81
2.3 La chimiokine CTACK : présentation des expériences préliminaires	83
2.3.1 La CTACK augmente l'adhésion des lymphocytes CEMT4 sur les cellules endothéliales de la peau.....	83
2.3.2 Effet de la CTACK sur la croissance des cellules endothéliales humaines	84
2.3.3 La CTACK module spécifiquement l'angiogénèse des cellules endothéliales de la peau	85
2.3.4 Ciblage de la CTACK en conditions de flux.....	87
3 Discussion et perspectives.....	89
IV. Les cellules endothéliales de la peau : modèle pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires de molécules.....	94
1 Matériel et méthodes	96
1.1 Le phénomène étudié et l'hypothèse de travail.....	97
1.2 Les expériences d'adhésion.....	97
1.3 La détection de NO intracellulaire	97
1.4 Le marquage de iNOS intracellulaire.....	98
1.5 Les tests de croissance cellulaire.....	99
1.6 Les expériences d'angiogénèse <i>in vitro</i>	99
2 Résultats	100
3 Discussion et perspectives.....	120
V Conclusion Générale	123
Bibliographie.....	127
ANNEXES	144

Abréviations

PBSc : **P**hosphate **B**uffer **S**aline, tampon phosphate salin complet

HAPEC : **H**uman **A**ppendix **E**ndothelial **C**ells

HPLNECB3 : **H**uman **P**eripheral **L**ymph **N**odes **E**ndothelial **C**ells clone **B3**

HMLNEC : **H**uman **M**esenteric **L**ymph **N**odes **E**ndothelial **C**ells

HBrMEC : **H**uman **B**rain **M**icrovascular **E**ndothelial **C**ells

HSkMEC : **H**uman **S**kin **M**icrovascular **E**ndothelial **C**ells

CEMT4 : lymphocytes naïfs CD4⁺

PKH26-GL : **P**aul **K**arl **H**oran

DAF-FM : 4-amino-5-methylamino-2', 7'-difluorofluorescein

NO : **N**itric **O**xide, oxyde nitrique

iNOS : **i**nducible **N**itric **O**xide **S**ynthase, oxyde nitrique synthase inductible

PCA : L-**P**yrrolidone **C**arboxylique **A**cid

CFDA,SE : **C**arboxy**f**luorescein **D**i**A**cetate **S**uccinimidyl **E**ster

EDTA : **E**thylene **D**iamine **T**étra **A**cétate

Ig : **I**mmuno**G**lobuline

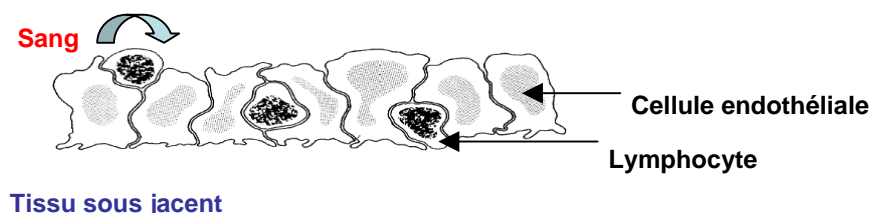
PFA **P**ara**F**orm**A**ldéhyde

SAB : **S**érum **A**lbumine **B**ovine

I. Introduction

Depuis le début du vingtième siècle, de nombreux scientifiques ont tenté d'élucider les mécanismes moléculaires contrôlant les interactions entre les lymphocytes, cellules circulantes, et les cellules bordant les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales. L'importance de cette reconnaissance intercellulaire est reconnue aussi bien dans les phénomènes physiologiques normaux que pathologiques.

La présence de lymphocytes dans les parois des veinules au sein des tissus lymphoïdes suscita les plus grandes interrogations sur les relations entre ces cellules circulantes et les cellules endothéliales. Les premiers travaux de Gowans en 1959 concernaient l'étude de la domiciliation des lymphocytes chez le rat (Gowans 1959). Il démontra, en les marquant, que leur trafic se faisait du sang vers les tissus lymphoïdes. Il s'agissait de comprendre comment les lymphocytes pouvaient passer la barrière des cellules endothéliales et pénétrer dans les tissus. La première étape dans la compréhension de ce phénomène consistait à analyser la morphologie de la paroi des vaisseaux, et plus particulièrement des cellules les constituant. Or des travaux plus anciens apportaient certaines réponses. La première analyse morphologique fut réalisée par Schulze qui conclut à l'existence de canaux à travers la paroi endothéliale permettant ainsi le passage de macromolécules et de lymphocytes du sang vers les tissus, et réciproquement. Mais constatant que certains lymphocytes se trouvaient à l'intérieur des cellules endothéliales, il suggéra l'existence d'une voie intracellulaire (Marchesi et Gowans 1964). Bien qu'il soit maintenant admis que cette voie existe, le passage des lymphocytes s'effectue principalement entre les cellules endothéliales par démantèlement des jonctions cellulaires. Schoefl publia en 1972 le premier schéma expliquant le passage trans-endothélial (Schoefl 1972) : modèle simplifié de celui qu'a décrit E. Butcher des années plus tard (Butcher *et al.* 1980).



D'après Schoefl, J Exp Med, vol 136 :568-88, 1972

Mais, ce modèle ne donnait pas d'indications sur les mécanismes moléculaires de la reconnaissance, or il semble que ces mécanismes soient les clés de l'adressage des lymphocytes à des sites précis.

En effet, la migration des lymphocytes dans les tissus ne se fait pas au hasard. Naît alors, la notion de «homing» des lymphocytes, c'est-à-dire leur domiciliation orientée et non aléatoire, notion largement décrite plus tard.

La fonction première des lymphocytes étant de déclencher la réponse immune, il fut d'abord admis qu'ils s'arrêtaient à l'endroit où l'antigène était concentré.

Selon E. Butcher, la domiciliation des lymphocytes n'est pas guidée par la présence de l'antigène puisque la migration sélective peut se produire en son absence (Halstead et Hall 1972). De plus, la localisation d'un antigène n'a pas d'effet sur le «homing» initial de lymphoblastes B spécifiques de l'antigène (Husband et Gowans 1978).

Il a été démontré que la spécificité provient de sites particuliers au niveau du «haut» l'endothélium appelés les hautes veinules endothéliales (HEVs pour High Endothelial Venules), situées dans les organes lymphoïdes secondaires (Guy-Grand *et al.* 1978) (Cahill *et al.* 1977). Cependant, leur migration à partir du sang n'est pas restreinte aux veinules des organes lymphoïdes ou des vaisseaux bordés du haut endothélium. En effet, ils peuvent être présents dans la lymphe de tous les organes dans un contexte d'inflammation grâce à des changements locaux de l'endothélium qui permettent le recrutement de cellules circulantes (Goldschneider et McGregor 1968; Morris 1968).

Dans les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer, il existe une spécificité dans la migration des lymphocytes (Butcher *et al.* 1980). E. Butcher proposa alors un modèle de circulation des lymphocytes en distinguant 3 groupes : les HEVs des plaques de Peyer, des ganglions mésentériques et des ganglions non mésentériques, qui implique des signaux d'adressage spécifiques pour chacun de ces organes.

La domiciliation des lymphocytes est un phénomène complexe étroitement lié aux cellules endothéliales. Mais quels sont les mécanismes de régulation de cette domiciliation?

Il apparaît alors la notion importante de «déterminants» sur les cellules endothéliales et la présence de récepteurs sur les lymphocytes, leur permettant d'identifier le lieu où ils doivent s'arrêter (Gallatin *et al.* 1983). Ces récepteurs sont appelés «récepteurs de homing» (Gallatin *et al.* 1986) et leurs ligands «adressines vasculaires» (Berg *et al.* 1989). Ces déterminants sont de type lectine c'est-à-dire des glycoprotéines reconnaissant des motifs saccharidiques (Stoolman *et al.* 1984; Rosen et Yednock 1986) (Stoolman *et al.* 1987).

Parmi les molécules participant aux processus de reconnaissance intercellulaire, de petites protéines ont été identifiées : les chimiokines (cytokines chimioattractantes).

Ces dernières ont des rôles clé dans la domiciliation des lymphocytes.

En effet, certaines chimiokines sont sélectivement chimioattractantes vis-à-vis de populations différentes de leucocytes, et d'autres sont exprimées uniquement dans certains tissus (Kunkel et Butcher 2002) (Campbell et Butcher 2000).

C'est pourquoi dans cette étude, nous avons choisi de nous intéresser aux chimiokines et à leurs récepteurs afin de comprendre leurs rôles dans la spécificité de l'endothélium et dans l'adressage des cellules circulantes. Dans le but de déchiffrer les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant la reconnaissance intercellulaire, notre laboratoire a mis au point des lignées humaines de cellules endothéliales provenant de différents organes. Ces lignées constituent l'outil de choix pour l'étude de l'hypothèse selon laquelle les chimiokines participent à l'organo-spécificité de l'endothélium.

Nous avons sélectionné 5 lignées endothéliales : 3 provenant d'organes lymphoïdes secondaires (modèle privilégié pour l'étude de la domiciliation des lymphocytes) et 2 lignées non lymphoïdes, servant d'une part de contrôle et d'autre part de modèle (lignée de cellules endothéliales de la peau) pour des études appliquées. Nous avons également sélectionné les chimiokines et leurs récepteurs en fonction de leurs rôles essentiels dans les processus de reconnaissance. Ces choix seront développés plus en détails dans le chapitre II (Généralités) de ce mémoire.

Ce travail s'inscrit à long terme dans un cadre de thérapie cellulaire. En effet, si les chimiokines peuvent servir de signaux d'adressage pour les cellules circulantes, il pourra être envisagé de remplacer un tissu endommagé à un endroit précis par de nouvelles cellules. De plus, certaines chimiokines étant pro-angiogéniques (favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins), elles peuvent contribuer à la réparation de tissus lésés. Quant aux chimiokines anti-angiogéniques, elles peuvent également intervenir dans le cas des traitements anti-tumoraux.

Grâce à ces lignées originales développées au laboratoire, nous avons collaboré avec une société française produisant des molécules actives destinées aux industries cosmétologiques et pharmacologiques. La société BioEurope du groupe Solabia développe des principes actifs, essentiellement de nature polysaccharidique et oligosaccharidique. En effet, certains sucres tels que le fucose, le rhamnose et le galactose ont un rôle important dans les phénomènes inflammatoires de la peau et certaines maladies. De plus, comme nous l'avons vu, les sucres

sont des déterminants essentiels dans les phénomènes de reconnaissance cellulaire (récepteurs de homing-adressines vasculaires). Nous avons réalisé une étude avec des molécules potentiellement anti-inflammatoires vis-à-vis des cellules endothéliales de la peau, au niveau de 3 marqueurs de l'inflammation : le taux d'oxyde nitrique (NO) intracellulaire, le taux intracellulaire d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la modulation de l'adhésion de lymphocytes. Puis nous avons testé leur capacité à moduler la formation de pseudo-vaisseaux *in vitro* (angiogénèse).

Les expériences réalisées *in vitro* ont permis de sélectionner des molécules aux propriétés anti-inflammatoires vis-à-vis des cellules endothéliales humaines de la peau.

II. Généralités

1 L'endothélium

1.1 Son origine embryonnaire

Les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques dérivent du même précurseur embryonnaire : l'hémangioblaste que Sabin décrivait en 1917 (Sabin 1917) comme un amas de cellules mésodermiques dont les cellules situées à l'intérieur donnaient naissance aux cellules souches hématopoïétiques tandis que celles situées en périphérie étaient à l'origine des cellules endothéliales (Murray 1932). Le terme hémangioblaste est maintenant utilisé pour définir une cellule ayant la capacité de donner soit une cellule précurseur de cellule endothéliale soit une cellule précurseur de cellule hématopoïétique (Dieterlen-Lievre et Le Douarin 2004). Les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des lignées lymphoïdes et myéloïdes elles-mêmes à l'origine des différentes populations de leucocytes. Leur origine embryologique commune confère aux cellules hématopoïétiques et endothéliales des marqueurs de surface communs comme les CDs (Cluster of differentiation) 34, 31, 45, la VE-cadhérine et le récepteur 2 du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

1.2 Les processus de formation de la vasculature : la vasculogénèse et l'angiogénèse

La formation du système vasculaire est contrôlée par deux processus appelés la vasculogénèse et l'angiogénèse.

La vasculogénèse est la formation de vaisseaux sanguins à partir de cellules progénitrices de cellules endothéliales dérivées des hémangioblastes nommés angioblastes (Flamme *et al.* 1997).

L'angiogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. Elle participe au développement du système vasculaire et requiert la dégradation par les protéases de la membrane basale et l'invasion par prolifération, migration et différenciation des cellules endothéliales dans la matrice extracellulaire (Risau 1997).

Les cellules endothéliales acquièrent des propriétés organo-spécifiques révélées par la présence de marqueurs de surface et/ou par des caractéristiques morphologiques spécifiques du microenvironnement.

Dans les conditions normales, l'angiogénèse est un phénomène restrictif à la réparation cellulaire et à la menstruation. Le processus d'angiogénèse dépend de la balance entre des

facteurs le favorisant (pro-angiogéniques) et ceux l'inhibant (anti-angiogéniques) (Keane *et al.* 1998; Moore *et al.* 1998). Le dérèglement de cet équilibre peut être à l'origine d'une angiogénèse pathologique avec de graves implications dans des maladies telles que le cancer (Folkman 1995).

Après l'activation par des facteurs angiogéniques tels que les chimiokines, les cellules endothéliales peuvent entraîner une nouvelle angiogénèse. En effet, les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'angiogénèse, particulièrement, dans les processus pathologiques comme la progression des tumeurs (Frederick et Clayman 2001). Les cellules tumorales produisent des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Fidler et Ellis 1994; Yoshiji *et al.* 1996), capables d'activer les cellules endothéliales possédant le récepteur 2 du VEGF (Millauer *et al.* 1993) provoquant une nouvelle angiogénèse favorisant l'apport d'oxygène et de nutriments à la tumeur contribuant ainsi à sa progression.

1.3 Ses rôles

L'endothélium, interface entre le sang et les tissus, filtre et décide du passage des molécules et des cellules du sang vers les tissus, et inversement. Il intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que l'homéostasie, la croissance vasculaire, le contrôle du tonus et la perméabilité vasculaire. Pour l'immuno-surveillance, il est indispensable que les cellules puissent circuler et migrer dans les tissus *via* l'endothélium. Ses propriétés en font un acteur fondamental du déroulement de pathologies et de l'inflammation (Johnson-Leger *et al.* 2000). L'endothélium est constitué de cellules endothéliales aux propriétés différentes selon l'organe ou le tissu considéré.

1.4 Les hautes cellules endothéliales : HEC (High Endothelial Cells)

Le passage de cellules circulantes s'effectue au niveau de sites spécialisés : les hautes veinules endothéliales (HEVs) des micro-capillaires. Les HEVs se trouvent dans tous les organes lymphoïdes secondaires à l'exception de la rate. Ce type de vaisseaux, grâce à un diamètre luminal de petite taille, possède un flux sanguin réduit et une concentration élevée de cellules circulantes, ce qui augmente la probabilité de rencontre entre ces dernières et la paroi des HEVs tapissée de hautes cellules endothéliales (HEC) (Girard et Springer 1995). Celles-ci sont un exemple de différenciation des cellules endothéliales et présentent des caractéristiques morphologiques particulières qui les distinguent des cellules endothéliales des autres

vaisseaux tels que les artères. Cette spécialisation est sous le contrôle du microenvironnement : cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, forces de flux (Drayson et Ford 1984). Les HECs qui bordent les veinules post-capillaires sont cuboïdes et hautes (10 à 12 μm) (Wenk *et al.* 1974) (Anderson *et al.* 1976). Leur ultrastructure est caractérisée par un appareil de Golgi très développé, par d'abondants poly-ribosomes et par un réticulum endoplasmique granuleux traduisant une activité de biosynthèse intense, à la différence de l'endothélium plat des autres vaisseaux (Freemont et Jones 1983). Ces cellules contiennent de nombreuses vésicules, telles que les granules de Weibel-Palade qui reflètent une machinerie sécrétoire importante. Les HECs forment un pavement régulier le long des veinules post-capillaires. Elles sont reliées par des jonctions discontinues différentes des jonctions serrées caractérisant les endothéliums des capillaires et des artères. Le démantèlement des protéines constituant ces jonctions permet le passage des cellules circulantes. Cette spécialisation est sous le contrôle du microenvironnement : cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, forces de flux (Drayson, 1984 #49; Drayson et Ford 1984).

Lors de processus inflammatoires, il peut y avoir recrutement de cellules circulantes dans d'autres organes que les organes lymphoïdes secondaires. En effet, les cytokines pro-inflammatoires produites au site d'inflammation, induisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Ces dernières changent de morphologie et adoptent alors un phénotype de type « HEC » leur permettant de recruter les cellules circulantes. Ce changement de propriétés des cellules endothéliales est local, temporaire et dépendant du microenvironnement.

Il est important de déchiffrer les mécanismes moléculaires de la reconnaissance entre les cellules circulantes et l'endothélium, particulièrement dans le cas des cancers, afin de contrôler le passage des métastases dans les tissus voisins.

2 Les mécanismes de reconnaissance cellulaire

Le passage des leucocytes à travers l'endothélium a lieu lors de processus physiologiques comme l'immunosurveillance, mais aussi, temporairement, au niveau de sites d'inflammation où le microenvironnement est modifié. La migration à travers l'endothélium se fait en 4 étapes (Butcher 1991) illustrées dans la figure 1.

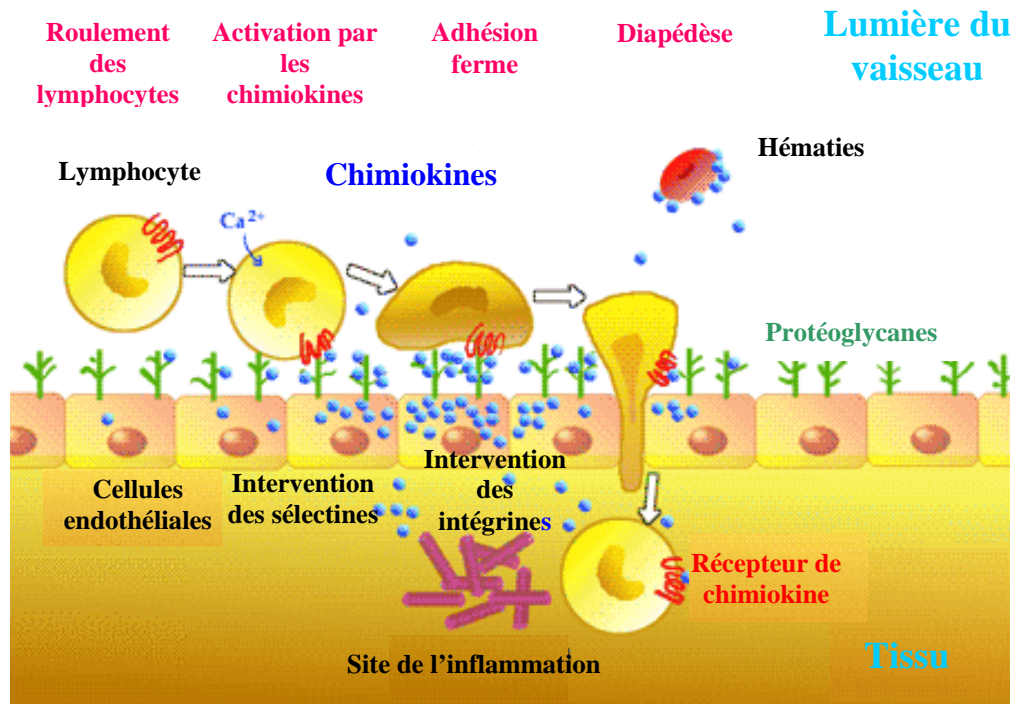


Figure 1 : Recrutement de cellules circulantes
(www.chemocentryx.com/.../science-chemokines.html)

2.1 Le roulement des leucocytes : rôle des sélectines

La première étape de la migration leucocytaire implique un contact initial entre le leucocyte et la cellule endothéliale. Le roulement du leucocyte le long de la paroi endothéliale sous les forces du flux sanguin est commandé par les interactions faibles et réversibles entre les sélectines et leurs ligands glycosylés.

La famille des sélectines comprend trois membres : la L- sélectine (L pour leucocyte), la P- sélectine (P pour plaquettes) et la E- sélectine (E pour endothéliale).

La L-sélectine est exprimée uniquement sur les leucocytes tandis que les deux autres types, E et P, sont trouvés au niveau des cellules endothéliales (Ley et Tedder 1995), (Rosen et Bertozzi 1994).

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, qui reconnaissent des ligands de type saccharidique et présentent des motifs structuraux communs (figure 2). Chacune possède un domaine lectine à l'extrémité amino-terminale (N-terminale) qui détermine la liaison aux ligands de type saccharidique, ainsi qu'un domaine EGF présentant de fortes homologies avec l'EGF (Epidermal Growth Factor). Ces domaines sont suivis respectivement de 2, 6 ou 9 domaines pour la L-, E- et P-sélectine, présentant des homologies

de séquence avec les protéines régulatrices du complément et appelés CR pour répétitions consensus (short Consensus Repeats).

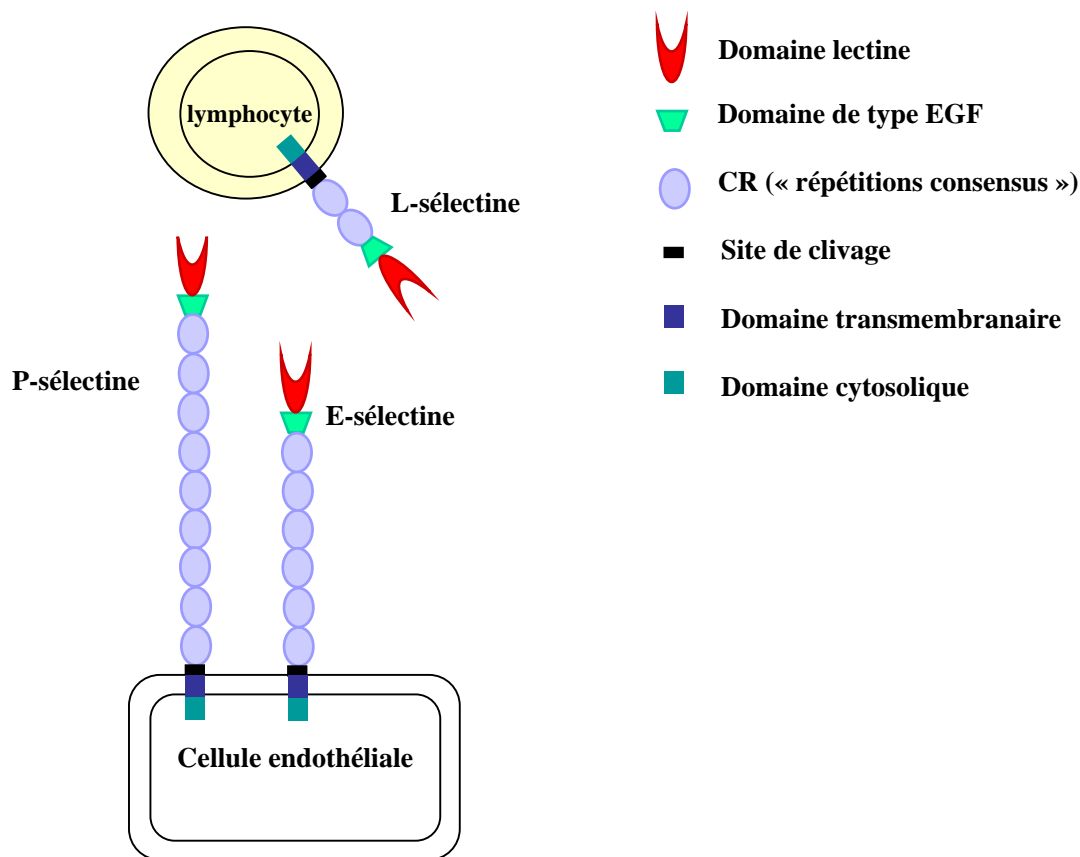


Figure 2 : La structure des sélectines

D'après Vestweber D. and Blanks J.E, Physiological Reviews, 1999

Leurs ligands sont glycosylés. La L-sélectine peut se lier à GLYCAM-1, CD34 et MAdCAM-1. Le ligand principal de la P-sélectine est PSGL-1 (P-Selectin Glycosylated Ligand 1) et celui de la E-sélectine est ESL-1 (E Selectin Ligand 1) (Vestweber et Blanks 1999) (Tedder *et al.* 1995).

Après cette étape de roulement, les leucocytes peuvent repartir dans la circulation ou adhérer plus fermement à l'endothélium.

2.2 L'activation des cellules endothéliales : rôle des chimiokines

La seconde étape de la migration des leucocytes à travers l'endothélium, implique leur stimulation par les chimiokines. Celles ci jouent un rôle crucial dans les réactions immunes et inflammatoires (Baggiolini 1998) (Hedrick et Zlotnik 1996). De nombreuses chimiokines sont induites après activation des cellules, mais certaines sont exprimées dans les tissus de manière constitutive.

Les protéoglycanes de la surface cellulaire sont capables de fixer les chimiokines à la surface des cellules endothéliales pour créer un gradient chimioattractant vis-à-vis des leucocytes circulants, et les guider ainsi dans leur migration (Tanaka *et al.* 1993a; Tanaka *et al.* 1993b).

Les chimiokines agissent à plusieurs niveaux dans la cascade de l'adhésion. Elles activent, orientent, et provoquent l'adhésion ferme des leucocytes à la surface des cellules endothéliales en induisant l'expression de molécules d'adhésion telles que les intégrines. Elles orientent ensuite, la migration des leucocytes à travers l'endothélium, en créant un environnement chimiotactique dans les tissus sous jacents.

2.3 L'adhésion ferme : rôle des intégrines

La stimulation des leucocytes par la liaison des chimiokines à leurs récepteurs provoque l'activation des intégrines et augmente ainsi, l'adhésion des leucocytes par liaison aux molécules de la superfamille des immunoglobulines présentes à la surface de l'endothélium.

Les intégrines sont des protéines hétérodimériques formées par l'association d'une chaîne α et d'une chaîne β (Shimizu *et al.* 1999). La liaison non covalente de ces deux chaînes forme un site de fixation pour un ligand du côté extracellulaire et un site de liaison pour des protéines intracellulaires comme celles du cytosquelette (figure 3). Les intégrines sont classées en sous familles selon le type de sous unité β qu'elles présentent. Les intégrines $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, Very Late Antigen 4), $\alpha L\beta 2$ (LFA-1, Lymphocyte Function associated Antigen 1), $\alpha 4\beta 7$ sont les intégrines les plus impliquées dans les interactions leucocytes-cellules endothéliales. Leurs ligands appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, comme ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule 1) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1). L'intervention de ces molécules entraîne une adhésion ferme qui provoque l'arrêt du leucocyte au site désiré le préparant ainsi à son extravasation.

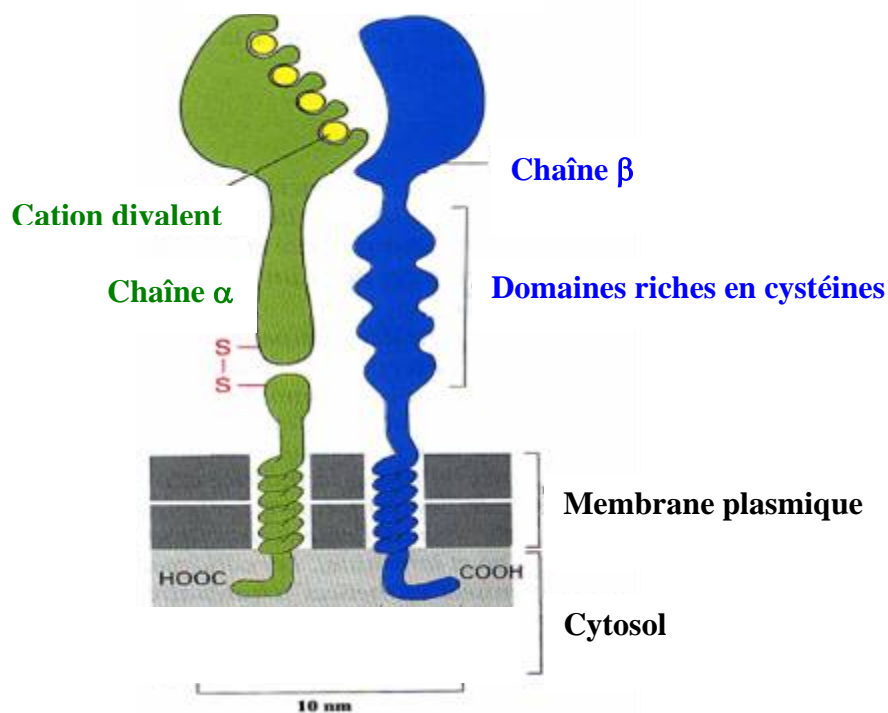


Figure 3: La structure des intégrines

(servnt.udi.fmv.ulg.ac.be/.../Image319.html)

2.4 La diapédèse

La diapédèse, également appelée extravasation, est le franchissement de l'endothélium par le leucocyte et constitue l'étape finale de la cascade de la reconnaissance cellulaire. Les mécanismes moléculaires de ce passage ne sont pas bien connus et il existe plusieurs hypothèses.

La voie la mieux décrite et la plus reconnue implique les jonctions existantes entre les cellules endothéliales (Anderson *et al.* 1993; Beyer 1993). Il existe trois types de jonctions : serrées «tight junctions», adhérentes «adherens junctions» et communicantes «gap junctions» formées par un réseau complexe de protéines transmembranaires spécifiques pour chaque type (Dejana *et al.* 1995) (Dejana et Del Maschio 1995).

La variation locale de la perméabilité et la production de molécules spécifiques dans le microenvironnement provoquent le relâchement de ces jonctions, permettant ainsi le passage des molécules et des cellules circulantes.

Une voie, encore controversée, la transcytose, est le passage d'un pôle à l'autre de la cellule (Baekkevold *et al.* 2001). Divers mécanismes sont proposés quant au passage de leucocytes ou molécules à travers la cellule, parmi eux l'existence de canaux transendothéliaux, ou encore le système d'endocytose dépendant des cavéoles (endocytose dirigée).

Cette migration à travers la barrière endothéliale est toujours guidée par les chimiokines produites localement. Celles-ci orientent le leucocyte dans le tissu sous jacent, au site d'inflammation ou de domiciliation.

3 Les chimiokines

3.1 Les chimiokines : une classe particulière de cytokines

Du grec kutos (cellule), et kinéo (stimuler), les cytokines sont des protéines produites en général en réponse à un signal activateur assurant la communication entre les différentes cellules de l'organisme sur le mode autocrine, paracrine et endocrine. Elles exercent leurs actions sur un nombre élevé de cellules cibles différentes (actions pléiotropiques) en se liant avec une forte affinité à des récepteurs spécifiques.

Les cytokines provoquent souvent la sécrétion d'autres cytokines par la cellule cible engendrant souvent une cascade de réponse « cytokines ». Les effets peuvent être inhibiteurs, additionnés voire synergiques.

Elles interviennent dans l'infection, l'inflammation, l'immunité, la croissance cellulaire.

Les cytokines peuvent être regroupées en trois catégories bien que cette classification n'exclue nullement de larges chevauchements : les cytokines de l'hématopoïèse, les cytokines de la réponse immunitaire et les cytokines de l'inflammation.

Les cytokines de l'hématopoïèse sont responsables de la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. La réponse immunitaire est directement sous la dépendance de plusieurs cytokines qui orientent le type de réponse qui doit être déclenchée à la suite d'une infection (IL-2, IFN γ , IL-12). Les cytokines de l'inflammation sont divisées en deux catégories : les cytokines pro-inflammatoires : IL1 et TNF α et les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-13).

Les cytokines interviennent donc dans de nombreux processus physiologiques mais aussi pathologiques tels que l'infection par le VIH (Alfano et Poli 2005) ou les cancers (Oppenheim et Fujiwara 1996). L'interféron gamma (IFN γ) est depuis longtemps utilisé dans les

traitements anti-cancéreux . Plus récemment, d'autres cytokines telles que l'IL-21 présentent également des propriétés anti-tumorales ouvrant la porte à de nouvelles thérapies (Smyth *et al.* 2004).

Les cytokines sont également impliquées dans les processus de reconnaissance cellulaire en modulant l'expression des molécules d'adhésion intervenant dans la cascade (cf.§2) particulièrement dans un contexte inflammatoire. En effet, certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou IL-1 (α et β) modulent l'expression des sélectines et des intégrines (Meager 1999) et sont particulièrement impliquées dans les phénomènes de recrutement cellulaire. Ces recrutements cellulaires sont très sélectifs et dirigés par des cytokines aux propriétés attractantes que sont les chimiokines.

Les chimiokines sont donc une classe particulière de cytokines qui regroupent toutes les cytokines aux propriétés chimioattractantes attirant spécifiquement certaines populations de cellules circulantes.

Depuis, d'autres fonctions ont été décrites pour ces cytokines particulières.

3.2 Définition

Les chimiokines sont des protéines essentielles dans les processus de reconnaissance cellulaire lors de la domiciliation des lymphocytes ou lors de phénomènes inflammatoires. Nous avons vu qu'elles interviennent à des étapes clés du processus de migration trans-endothéliale. Elles orientent les leucocytes en créant un gradient chimioattractant à la surface des cellules endothéliales. Elles activent les leucocytes en provoquant l'induction de molécules d'adhésion et l'adhésion ferme. Elles dirigent enfin la migration des cellules à travers les tissus sous jacents.

Le terme de chimiokines a été proposé en 1992, il combine les propriétés *chimioattractantes* et le caractère *cytokines* de ces petites protéines de masses moléculaires comprises entre 8 et 12 kDa. Elles présentent des séquences très conservées suggérant l'existence d'un gène ancestral commun. Il existe actuellement quatre classes de chimiokines. Ce classement est établi sur la base du réarrangement des résidus cystéines (C) conservés à l'extrémité N-terminale de la protéine mature (figure 4).

Dans la première classe, un acide aminé sépare les deux premières cystéines conservées. Elle est appelée classe CXC ou classe alpha. Dans la seconde classe, les deux premières cystéines sont adjacentes et la classe est appelée CC ou classe beta. Dans la troisième classe, il manque le premier et le troisième résidu cystéine, la classe est donc appelée C ou classe gamma. Il

existe une quatrième classe avec un unique représentant connu à l'heure actuelle : la fractalkine. Dans ce cas, les deux premières cystéines sont séparées par trois acides aminés. La classe est donc nommée CXXXC ou classe delta. Dans la nouvelle nomenclature, les chimiokines sont nommées selon la classe à laquelle elle appartient ex : CCL1 : CC pour la classe, L pour ligand, 1 pour l'ordre de découverte. Les récepteurs suivent la même règle : ex : CCR1, CC pour la classe, R pour récepteur et 1 pour ordre de découverte.

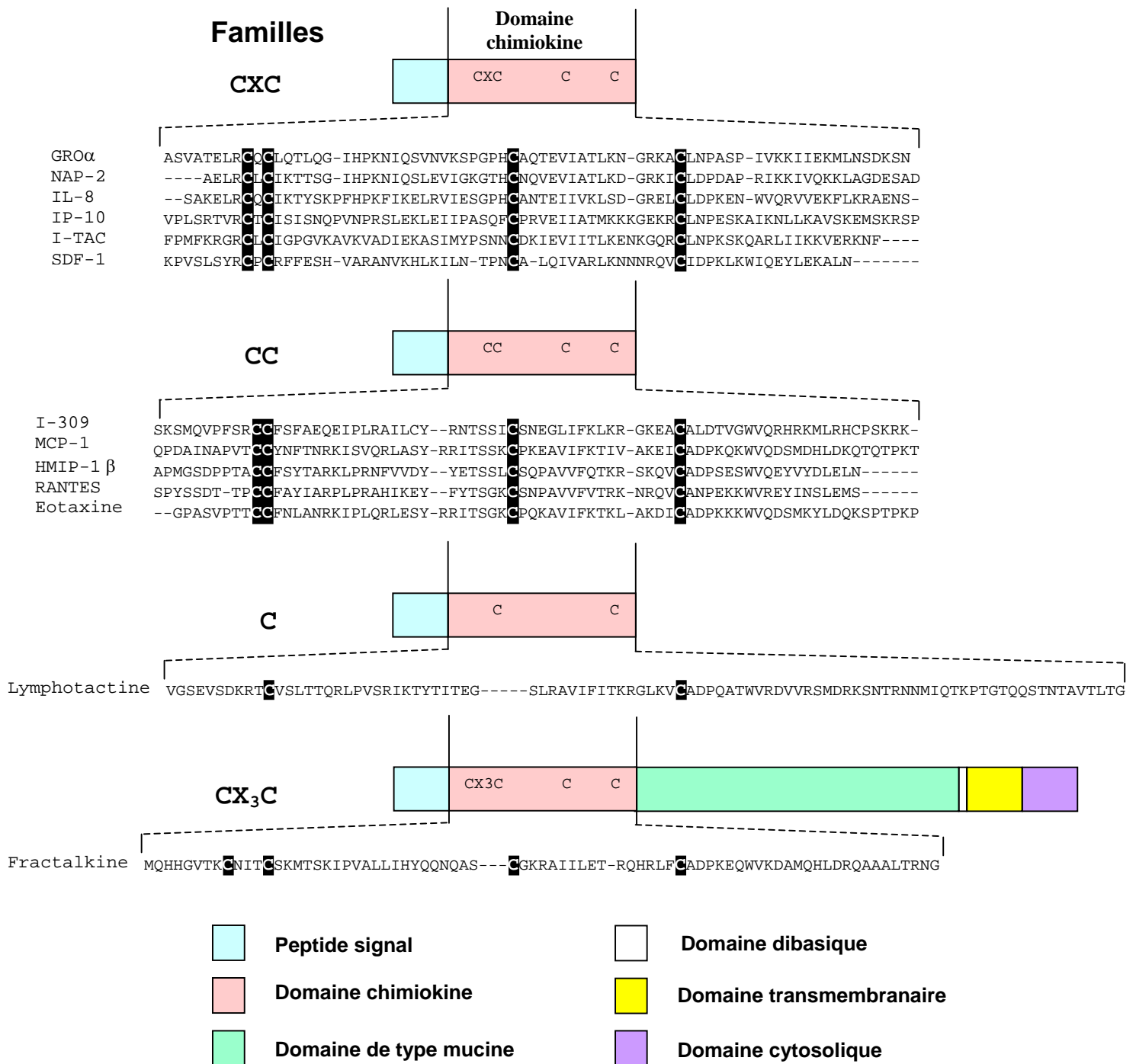


Figure 4: Exemples illustrant la structure primaire des 4 familles de chimiokines

3.3 Structure tridimensionnelle des chimiokines

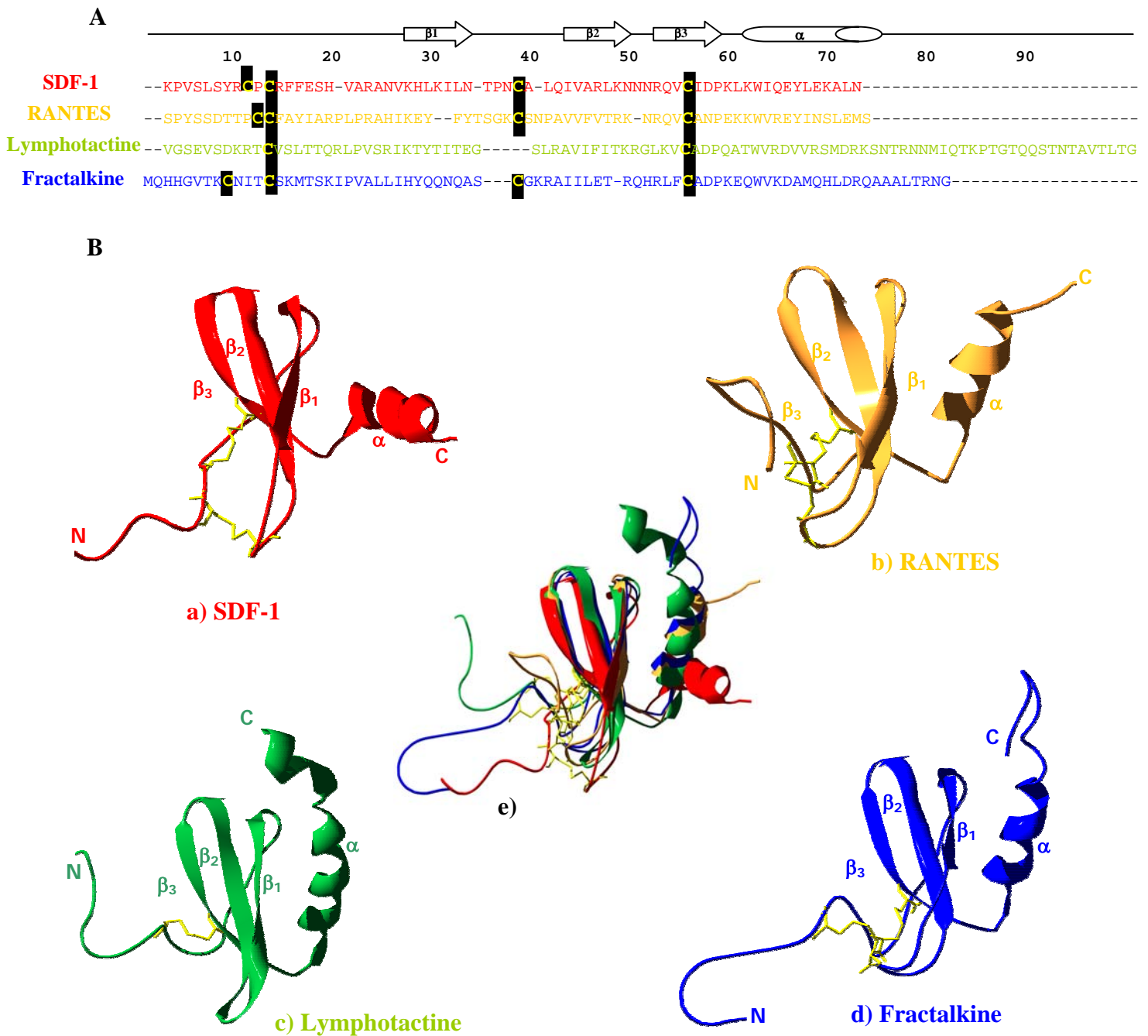


Figure 5 : Comparaison de la structure des quatre classes de chimiokines.

A) Alignement des séquences de SDF-1, RANTES, Lymphotactine et Fractalkine. Les structures secondaires sont situées en haut de l'alignement : les flèches représentent les brins du feuillet β et le cylindre l'hélice α . B) Structures tridimensionnelles : a) SDF-1, b) RANTES, c) Lymphotactine (1-73), d) Fractalkine, e) Superposition des structures 3D des 4 chimiokines.

Au niveau de leur structure tridimensionnelle, les quatre classes de chimiokines présentent un repliement commun : un feuillet β à trois brins antiparallèles et une hélice α en position C-terminale (figure 5). Les différences structurales se situent essentiellement au niveau du segment N-terminal qui possède les motifs cystéiniques définissant chaque classe de chimiokines. Cette région ne présente aucune structure secondaire et est douée d'une flexibilité importante. De plus, l'analyse des structures tridimensionnelles de nombreuses chimiokines révèle la capacité de ces protéines à s'homodimériser voire même à s'oligomériser. Cette propriété d'oligomérisation traduit soit un artefact technologique soit une réalité biologique.

Une même chimiokine a pu être ainsi identifiée à la fois sous forme de monomère ou de dimère. Par exemple, la structure dimérique de l'interleukine-8 (IL-8), représentant historique de la famille CXC, a été initialement déterminée par RMN (Clowes *et al.* 1990). Puis la même équipe, (Baldwin *et al.* 1991) a identifié, par radiocristallographie, le monomère de l'IL-8. De même, SDF-1 a été initialement identifiée sous forme de monomère en solution (Crump *et al.* 1997) puis sous forme de dimère par radiocristallographie (Ohnishi *et al.* 2000). Récemment la chimiokine TARC a été trouvée sous forme de dimère mais également d'octamère (Asojo *et al.* 2003). Ce phénomène d'oligomérisation a été également montré pour la partie soluble de la fractalkine initialement identifiée sous forme de monomère (Mizoue *et al.* 1999) puis sous forme de tétramère (Hoover *et al.* 2000).

Ces études structurales permettent d'appréhender le mode de fixation des chimiokines à leurs récepteurs et aux glycosaminoglycanes de la surface cellulaire (cf. § 3.3.1 et 3.3.2).

3.4 Les possibilités de liaison des chimiokines à la surface des cellules

Les chimiokines peuvent se fixer à la surface cellulaire de 3 manières connues à ce jour : par leurs récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G et responsables de la transduction du signal, par les glycosaminoglycanes constituant des protéoglycanes de la surface cellulaire et par un récepteur ubiquitaire appelé DARC pour Duffy Antigen Receptor for Chemokines.

3.4.1 Les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérodimériques.

L'activité des chimiokines s'exerce principalement par liaison à leurs récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (figure 6). Cette liaison provoque l'activation de la cellule et la transduction du signal activant les cascades de signalisation intracellulaire aboutissant à l'expression de certains gènes contrôlant l'expression de molécules d'adhésion, la croissance cellulaire, la migration cellulaire, le chimiotactisme.

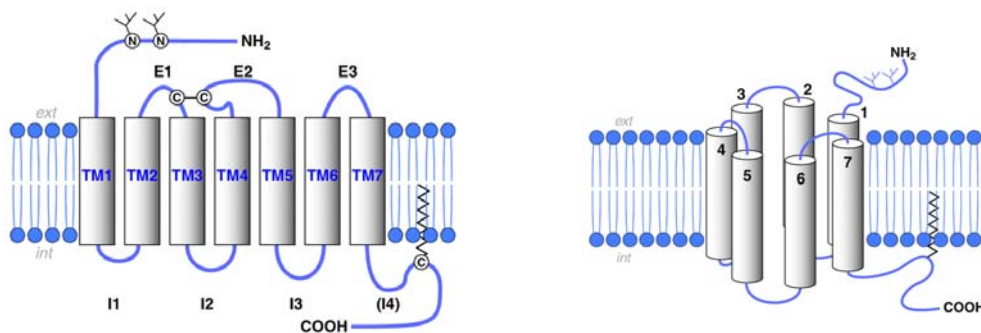


Figure 6: Structure des récepteurs à 7 domaines transmembranaires. L'extrémité N-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) est intracellulaire. Il y a 3 boucles extracellulaires E1, E2 et E3 et 3 boucles intracellulaires nommées I1, I2 et I3.

Les chimiokines d'une famille se lient aux récepteurs de la même famille : une chimiokine CC se lie à un récepteur CCR (Horuk 2001). La liaison de la chimiokine à son récepteur se fait par le domaine N-terminal de la protéine avec le domaine N-terminal du récepteur. D'après la structure des chimiokines (cf. § 3.2), le domaine N-terminal très flexible n'est pas structuré ; il détermine la liaison au récepteur et donc la spécificité.

L'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par son ligand entraîne un remaniement de la structure du récepteur qui active alors les protéines G intracellulaires. Celles-ci activent ensuite les effecteurs intracellulaires tels que la PLC ou PI3K. Les voies de signalisation déclenchées par la liaison des chimiokines à leurs récepteurs sont complexes et multiples et permettent d'activer l'expression de gènes impliqués dans les processus de chimiotactisme , de migration cellulaire, etc.

3.4.2 Les glycosaminoglycanes (GAGs) constituant les glycoprotéines de la matrice extracellulaire

Les protéoglycanes de la matrice extracellulaire sont constitués d'une partie protéique associée à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) attachées de façon covalente. Les GAGs sont des polysaccharides linéaires formés de motifs disaccharidiques répétés, associant un sucre aminé (N-acétyl-glucosamine ou N-acétyl-galactosamine) et un acide uronique (acide glucuronique ou acide iduronique). Il existe différentes classes de GAGs présentées dans la figure 7:

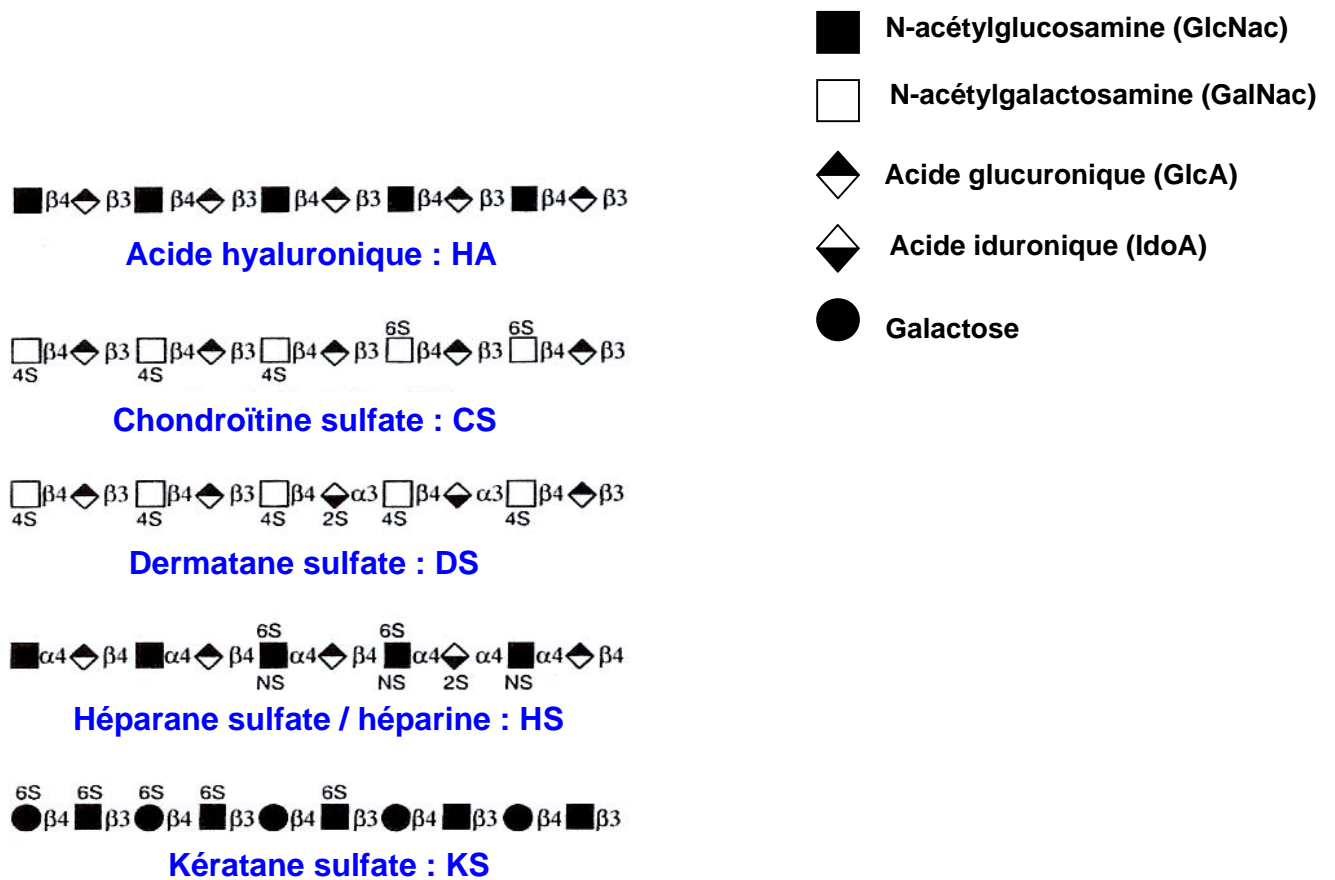


Figure 7 : Structure et composition des différentes classes de GAGs

D'après « Essentials of glycobiology », édité par Ajit Varki et al., 1999

La liaison des chimiokines avec les GAGs a un rôle biologique considérable en protégeant les chimiokines des dégradations protéolytiques éventuelles, en permettant la formation du gradient chimiotactique à la surface cellulaire (Patel *et al.* 2001) et en favorisant leur présentation à leurs récepteurs. De plus, les GAGs participent à l'organo-spécificité de

l'endothélium. En effet, ils sont présents à la surface de toutes les cellules mais sont de composition différente selon l'organe considéré (Kuschert *et al.* 1999). Par exemple, ils peuvent posséder des sulfatations différentes selon le tissu et l'environnement contribuant ainsi à la spécificité des cellules les présentant (Netelenbos *et al.* 2001).

3.4.3 Un récepteur non spécifique : le DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokine)

Le Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) est un récepteur identifié à l'origine sur les érythrocytes, permettant l'infection par le *Plasmodium vivax* (Miller *et al.* 1975; Horuk *et al.* 1993a; Chaudhuri *et al.* 1994).

Le DARC est exprimé de façon ubiquitaire sur les cellules endothéliales bordant les veinules post capillaires. Ce récepteur est capable de fixer des chimiokines des familles CXC et CC sans entraîner de transduction du signal (Horuk *et al.* 1993b; Neote *et al.* 1993a). Le rôle de ce récepteur dans la biologie des chimiokines est encore mal connu. Il semble qu'il n'interviendrait pas dans la spécificité de reconnaissance, mais pourrait aider à la présentation des chimiokines à leurs récepteurs couplés aux protéines G.

4 Les différentes familles de chimiokines

Note : Les chimiokines écrites en rouge dans les tableaux correspondent aux chimiokines choisies pour la présente étude.

4.1 La famille CXC ou famille alpha

A l'intérieur de cette classe, les chimiokines sont divisées en deux groupes : l'un possédant la séquence caractéristique de trois acides aminés : ELR (acide glutamique, leucine, arginine), l'autre non. Le motif ELR se trouve avant le premier résidu cystéine de l'extrémité N-terminale. Les chimiokines possédant ce motif, telles que l'interleukine 8, GRO $\alpha/\beta/\delta$, agissent préférentiellement sur les neutrophiles comme chimioattractants et activateurs, induisant la dégranulation des neutrophiles.

Les chimiokines CXC ne possédant pas le motif ELR, comme IP-10 et SDF-1 α , agissent sur d'autres types cellulaires comme les monocytes, les lymphocytes B et T, les cellules

dendritiques, les basophiles et les éosinophiles. De plus, il semble que le motif ELR soit impliqué dans l'angiogénèse : les chimiokines possédant ce motif ont une activité favorisant l'angiogénèse (Strieter *et al.* 1995a; Strieter *et al.* 1995b). Les chimiokines de cette famille sont répertoriées ainsi que leurs récepteurs dans le tableau 1.

	FAMILLE CXC = alpha	
Nomenclature	Autres noms	Récepteurs
CXCL1	GRO α (Growth Regulated Oncogene)	CXCR1 CXCR2
CXCL2	GRO β	CXCR2
CXCL3	GRO γ	CXCR2
CXCL4	PF4 : Platelet Factor 4	
CXCL5	ENA-78 (Epithelial Neutrophil Chemoattractant)	CXCR2
CXCL6	GCP-2 (Granulocyte Chemotactic Peptide)	CXCR1 CXCR2
CXCL7	NAP-2 (Neutrophil Activating Peptide)	CXCR2
CXCL8	IL8 (Interleukin 8)	CXCR1 CXCR2
CXCL9	MIG (Monokine Induced by IFN- γ)	CXCR3
CXCL10	IP10 (Immune Protein 10)	CXCR3
CXCL11	I-TAC (Interferon-Inducible T cell Alpha Chemokine)	CXCR3
CXCL12	SDF-1α/β : stromal derived factor 1 PBSF : pre-B cell stimulatory factor	CXCR4
CXCL13	BCA-1 BLC (B Lymphocyte Chemokine)/	CXCR5
CXCL14	BRAK (Breast and Kidney expressed Chemokine)	
CXCL15	Lungkine	
CXCL16		CXCR6

Tableau 1 : Liste des chimiokines et des récepteurs de la famille CXC

4.2 La famille CC ou famille beta

Les chimiokines de la classe CC agissent préférentiellement sur les monocytes, les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques et les NK (Natural Killer), les basophiles et éosinophiles, mais elles n'agissent pas sur les neutrophiles. Les chimiokines de cette famille et leurs récepteurs sont présentés dans le tableau 2.

	FAMILLE CC = beta	
Nomenclature	Autres noms	Récepteurs
CCL1	I-309	CCR8
CCL2	MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1)	CCR2 CCR11
CCL3	MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein-1 α)	CCR1 CCR5
CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES (Regulated and activated T-cell expressed and secreted)	CCR1 CCR3 CCR5
CCL6	C10	
CCL7	MCP-3	CCR1 CCR2 CCR3 CCR11
CCL8	MCP-2	CCR3 CCR5 CCR11
CCL9/10	MIP-1 γ	
CCL11	Eotaxin	CCR3 CCR11
CCL12	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4	CCR1

		CCR2 CCR3 CCR11
CCL14	HCC-1 (Hemofiltrate CC Chemokine 1)	CCR1 CCR5
CCL15	HCC-2 MIP-1 δ	CCR1 CCR3
CCL16	HCC-4	CCR1 CCR2
CCL17	TARC (Thymus and Activation Regulated Chemokine)	CCR4
CCL18	PARC (Pulmonary and Activation Regulated Chemokine)	
CCL19	ELC (EBI ligand Chemokine) MIP-3 β , exodus-3	CCR7
CCL20	LARC (Liver and Activation Regulated Chemokine) MIP-3 α , exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckine, SLC : secondary Lymphoid chemokine, exodus-2	CCR7
CCL22	MDC (Macrophage-Derived Chemokine)	CCR4
CCL23	MIP1F-1 (Myeloid Progenitor Inhibitory Factor 1)	CCR1 CCR3
CCL24	Eotaxin 2 MIP1F-2	CCR3
CCL25	TECK (Thymus Expressed Chemokine)	CCR9
CCL26	Eotaxine 3	CCR3
CCL27	CTACK : Cutaneous T cell-attracting Chemokine ESkine	CCR10
CCL28	MEC : Mucosae-associated Epithelial Chemokine	CCR3 CCR10

Tableau 2 : Liste des chimiokines et des récepteurs de la famille CC

4.3 La famille C ou famille gamma

	Famille C	
Nomenclature	Autres noms	Récepteurs
XCL1	Lymphotactine 1	XCR1
XCL2	Lymphotactine 2	XCR1

Tableau 3 : Les chimiokines et les récepteurs de la famille C

La famille C a un unique représentant : la lymphotactine (Houck et Chang 1977; Kelner *et al.* 1994). Elle est chimiotactique vis-à-vis des lymphocytes et de NK (Hedrick *et al.* 1997). Son récepteur a été identifié par l'équipe de Yoshida en 1998 (Yoshida *et al.* 1998b) (cf. tableau 3).

4.4 La Famille CX₃C ou famille delta

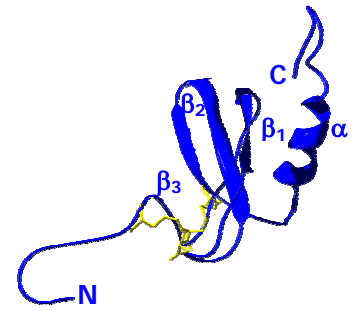
	Famille CXXXC	
Nomenclature	Autres noms	Récepteur
CX₃CL1	Fractalkine	CX₃CR1

Tableau 4 : La famille CX₃C et son récepteur CX₃CR1

La fractalkine, unique représentante connue actuellement de cette famille, est chimiotactique pour les cellules T et les monocytes (cf. tableau 4). Cette chimiokine a une structure particulière puisqu'elle existe sous forme soluble comme toutes les autres chimiokines mais aussi sous forme transmembranaire avec un domaine de type mucine qui lui confère des propriétés particulières.

5 La chimiokine fractalkine (CX₃CL1) et son récepteur CX₃CR1

5.1 Sa Description



La chimiokine CX₃CL1, plus communément appelée la fractalkine, a été identifiée par bioinformatique (Bazan *et al.* 1997). La fractalkine possède un motif cystéine unique dans la mesure où les deux premiers résidus cystéines sont séparés par trois autres acides aminés dans la partie N-terminale de la protéine. Elle constitue le premier membre découvert de la quatrième classe de chimiokines, CXXXXC.

Contrairement aux autres chimiokines, la fractalkine est une protéine membranaire de type I possédant un domaine chimiokine dans la partie N-terminale proche d'un long domaine de type mucine. Récemment, une autre chimiokine transmembranaire, CXCL16 a été découverte (Matloubian *et al.* 2000). Cette chimiokine appartient à la famille CXC.

L'ADNc de la fractalkine humaine code pour une protéine membranaire de 397 résidus avec un peptide signal de 24 acides aminés, un domaine chimiokine de 76 acides aminés, une région intermédiaire de type mucine de 241 acides aminés, un segment transmembranaire de 19 acides aminés et une queue cytoplasmique de 37 acides aminés. La fractalkine peut être clivée au niveau du site dibasique pour libérer une glycoprotéine soluble de 95 kDa.

5.2 Ses rôles

La fractalkine joue un rôle important dans les interactions entre leucocytes et cellules endothéliales (Imaizumi *et al.* 2004). Elle est exprimée préférentiellement dans les tissus de type muqueux tels que l'intestin grêle (Muehlhoefer *et al.* 2000) et sa forme transmembranaire est principalement trouvée sur les cellules épithéliales *in vivo* (Lucas *et al.* 2001). La fractalkine contribue au recrutement des lymphocytes T dans les tissus lymphoïdes et elle participe à un circuit d'amplification de réponse immunitaire de type Th1 (Fratice *et al.* 2001).

Sous sa forme transmembranaire, elle provoque l'adhésion de monocytes et de cellules T par son domaine chimiokine (Fong *et al.* 1998; Haskell *et al.* 2000). Il semble que le domaine de type mucine de la fractalkine ne soit pas directement impliqué dans l'adhésion mais contribuerait à une meilleure présentation du domaine chimiokine aux cellules circulantes (Fong *et al.* 2000). La fractalkine se lie aussi aux cellules NK et sa forme soluble aurait un rôle important dans leur activité biologique en augmentant leur activité cytolytique (Yoneda

et al. 2000; Robinson *et al.* 2003). Elle est également exprimée au niveau du cerveau où elle participe à la coopération entre les neurones et les cellules gliales (Harrison *et al.* 1998; Hatori *et al.* 2002) et dans la peau où elle est exprimée par les kératinocytes (Sugaya *et al.* 2003). Elle pourrait donc servir directement de molécule « signal » pour les cellules endothéliales dermiques dans la cascade de signalisation cellulaire de la peau.

L'inactivation du gène codant pour la fractalkine (Cook *et al.* 2001) ne provoque pas de changement phénotypique significatif (Soriano *et al.* 2002) et ne permet pas de conclure quant au rôle biologique *in vivo* de la fractalkine. Ceci illustre bien l'un des aspects généraux de la redondance des molécules biologiques.

5.3 Son récepteur CX₃CR1

La fractalkine agit *via* son récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G : le CX₃CR1, premier récepteur identifié de la famille CX₃C (Imai *et al.* 1997; Combadiere *et al.* 1998). Récemment, deux nouvelles isoformes fonctionnelles de CX₃CR1 ont été découvertes et sont obtenues après l'épissage alternatif du gène. Ces isoformes diffèrent par leur partie N-terminale plus ou moins longue. Le récepteur CX₃CR1 et ses deux nouvelles isoformes montrent la même activité en ce qui concerne la liaison à la fractalkine (Garin *et al.* 2003).

L'inactivation du gène codant pour le récepteur CX₃CR1 n'altère pas le phénotype mais suggère une implication du récepteur dans l'athérosclérose (Lesnik *et al.* 2003). En effet, la délétion du gène entraîne une réduction du recrutement des macrophages et une réduction de la lésion athérosclérotique (Jung *et al.* 2000; Combadiere *et al.* 2003; Lesnik *et al.* 2003). Le CX₃CR1 est aussi impliqué dans les rejets de greffes cardiaques, l'absence de CX₃CR1 diminuant l'infiltration des cellules NK sur le site de la greffe et augmentant le temps de survie du greffon (Haskell *et al.* 2001).

6 La chimiokine 6Ckine (CCL21) et son récepteur CCR7

6.1 Sa description

La 6 Ckine (CCL21) est une chimiokine appartenant à la classe CC. Elle a été récemment découverte à partir des banques de données EST par trois groupes de recherche différents. La 6Ckine (Hedrick et Zlotnik 1997) aussi appelée SLC pour Secondary Lymphoid Chemokine (Nagira *et al.* 1997) ou encore exodus 2 (Hromas *et al.* 1997), montre 21-33% d'identité avec les autres chimiokines de type CC.

La 6Ckine doit son nom à la présence des 4 cystéines caractéristiques des chimiokines CC mais aussi de 2 cystéines additionnelles qui se trouvent à l'intérieur de son domaine C-terminal. L'ADNc de la 6Ckine humaine code pour une protéine précurseur hautement basique de 134 acides aminés avec un signal peptidique de 23 acides aminés qui est clivé pour former la forme mature de la protéine de 111 acides aminés.

6.2 Ses rôles

La 6Ckine est constitutivement et fortement exprimée dans les tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer, la rate et l'appendice, surtout au niveau des hautes cellules endothéliales de ces organes.

Contrairement aux autres chimiokines de la même famille, la 6Ckine n'est pas chimiotactique pour les monocytes et les neutrophiles mais attire les lymphocytes T, avec une activité préférentielle vis-à-vis des lymphocytes T naïfs (Gunn *et al.* 1998). Elle peut également attirer les lymphocytes B (Nagira *et al.* 1998). Il a été clairement montré que la 6Ckine et son récepteur CCR7 sont impliqués dans la domiciliation des lymphocytes T au niveau des hautes veinules endothéliales des plaques de Peyer, les lymphocytes T s'accumulent préférentiellement dans les zones des plaques de Peyer où la 6Ckine est fortement exprimée. Par contre, même si les lymphocytes B peuvent répondre à la 6Ckine, leur localisation à l'intérieur des plaques de Peyer ne dépend pas de l'expression de cette chimiokine (Warnock *et al.* 2000). Ceci confirme le fait que les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la domiciliation des lymphocytes T et B sont dépendants du microenvironnement.

Des études ont été menées chez des souris présentant une mutation *plt* (paucity of lymph node T cells), c'est-à-dire une mutation autosomale entraînant un nombre réduit de cellules T dans les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer et la pulpe blanche de la rate. Cette mutation

provoque la perte de l'expression des chimiokines dites lymphoïdes : 6Ckine et ELC (CCL19) dans les organes lymphoïdes secondaires (Gunn *et al.* 1999). Cela provoque de graves anomalies de la migration des cellules T naïves et des cellules dendritiques dans les zones cellules T des organes lymphoïdes suggérant ainsi un défaut de la réponse immune dépendante des cellules T.

La surexpression de la 6Ckine entraîne un manque de chimiotactisme vis-à-vis des cellules T et des cellules dendritiques ainsi que des anomalies dans l'architecture des ganglions. Ceci suggère que la régulation du trafic des lymphocytes dans les organes secondaires par la 6Ckine est un processus hautement régulé et dépendant de la concentration locale en chimiokine. Normalement, le recrutement de cellules T naïves se fait dans les organes lymphoïdes secondaires, mais les tissus non lymphoïdes soumis à l'inflammation chronique peuvent recruter des cellules T naïves. Il a été montré que la 6Ckine suffit à attirer les cellules T naïves dans les organes non lymphoïdes dans un état inflammatoire temporaire (Weninger *et al.* 2003).

Cette chimiokine a un rôle clé dans la recirculation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires.

6.3 Son récepteur CCR7

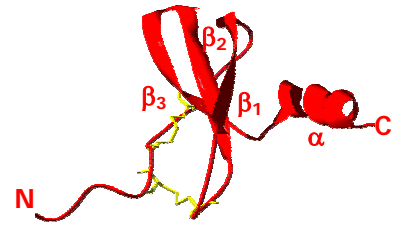
La 6Ckine se fixe au récepteur de la même famille : le CCR7 (Schweickart *et al.* 1994) (Yoshida *et al.* 1998a). Elle agit sur le recrutement des lymphocytes T et B via ce récepteur exprimé sur les deux types cellulaires (Willmann *et al.* 1998).

La 6Ckine murine peut se lier au récepteur CXCR3 (Soto *et al.* 1998). C'est la première fois qu'une chimiokine appartenant à la famille CC se lie à un récepteur d'une famille différente. Or, la 6Ckine humaine n'est pas un ligand pour le CXCR3 humain ou murin (Jenh *et al.* 1999) suggérant que la 6Ckine est une chimiokine ayant une spécificité de l'espèce puisqu'il semble que la 6Ckine murine se lie à CCR7 et CXCR3 alors que la 6Ckine humaine ne se lie qu'à CCR7.

L'inactivation du gène codant pour le CCR7 entraîne de graves anomalies dans la migration des lymphocytes et de profondes altérations des organes lymphoïdes secondaires. La réponse anticorps est retardée indiquant que le CCR7 est requis pour le bon fonctionnement de la réponse humorale (Forster *et al.* 1999).

7 La chimiokine SDF-1 (CXCL12) et son récepteur CXCR4

7.1 Sa description



Les protéines SDF-1 α et SDF-1 β (stromal cell derived factor 1) sont les premières chimiokines identifiées par clonage à partir d'une lignée de cellules stromales de la moelle osseuse murine (Tashiro *et al.* 1993). Ces protéines ont ensuite été clonées à partir de cellules stromales humaines et ont été identifiées comme cytokines provoquant la prolifération des cellules B précurseur dépendantes des cellules stromales. Elles ont donc été appelées « facteurs stimulant la croissance des cellules B » (PBSF : Pre-B cell growth Stimulating Factor). Les ADNc codent pour des protéines précurseur de 89 et 93 acides aminés. Les deux protéines sont codées par un seul gène qui subit un épissage alternatif et ne diffèrent que par les 4 derniers acides aminés de l'extrémité C terminale, présents chez SDF-1 β et absents chez SDF-1 α (Shirozu *et al.* 1995). D'après leur séquence en acides aminés, les deux protéines sont classées comme des chimiokines appartenant à la famille CXC. Une troisième forme a été identifiée chez le rat, SDF-1 γ (Gleichmann *et al.* 2000). L'ARNm de SDF-1 γ est similaire à celui de SDF-1 β avec un exon additionnel inséré près de la partie C-terminale de la région codante mais les 4 acides aminés terminaux présents chez SDF-1 β sont remplacés par un segment de 30 acides aminés contenant 17 résidus chargés positivement chez SDF-1 γ .

7.2 Ses rôles

Les cellules B et T naïves circulent dans les organes lymphoïdes secondaires pour être activées. Les chimiokines exprimées dans le microenvironnement particulier des tissus lymphoïdes secondaires (SDF-1 ou 6Ckine) régulent la migration des cellules naïves. Les lymphocytes effecteurs expriment un éventail différent de récepteurs de chimiokines, ce qui peut déterminer des profils d'infiltration spécifique des différents types cellulaires (Kim et Broxmeyer 1999).

La chimiokine SDF-1 au contraire des autres chimiokines de la même famille, est exprimée constitutivement dans de nombreux tissus. SDF-1 est un puissant chimioattractant pour les lymphocytes T et les monocytes mais pas pour les neutrophiles (Bleul *et al.* 1996b). Elle attire aussi les cellules progénitrices humaines CD34⁺. Cette chimioattraction pourrait expliquer

leur recrutement à partir du sang périphérique (Aiuti *et al.* 1997) car les cellules progénitrices humaines CD34⁺ expriment le récepteur de SDF-1: CXCR4 (Mohle *et al.* 1998).

Dans la moelle osseuse, la croissance et la maturation des cellules B progénitrices dépendent étroitement des cellules stromales qui produisent SDF-1. Cette dernière a été la première chimiokine décrite chimioattractante pour des cellules précurseurs de cellules B dans les étapes précoces du développement (D'Apuzzo *et al.* 1997).

Chez le rat, la protéine SDF-1 γ est exprimée dans le cerveau adulte de rat tandis que la protéine SDF-1 β est exprimée dans le cerveau néonatal et embryonnaire. La fonction de ce variant est pour l'instant inconnue.

Le manque d'expression du gène codant pour SDF-1 provoque la mort périnatale des embryons due à un manque dramatique de cellules B progénitrices dans le foie fœtal et la moelle osseuse. Les cellules progénitrices myéloïdes sont réduites uniquement dans la moelle osseuse, indiquant que SDF-1 est responsable de la lymphopoïèse des cellules B et de la myélopoïèse dans la moelle osseuse. Les embryons présentent aussi une déficience au niveau des ventricules cardiaques. La chimiokine SDF-1 est donc essentielle pour le développement viable des embryons (Nagasawa *et al.* 1996). Les expressions embryogéniques de SDF-1 et de son récepteur (McGrath *et al.* 1999) sont détectées à 7.5 jours de gestation et CXCR4 est alors le récepteur de chimiokine le plus exprimé. Les autres récepteurs testés apparaissent à 12.5 jours. Les gènes codant pour SDF-1 et CXCR4 ont des profils d'expressions similaires pendant l'organogénèse.

7.3 Son récepteur CXCR4

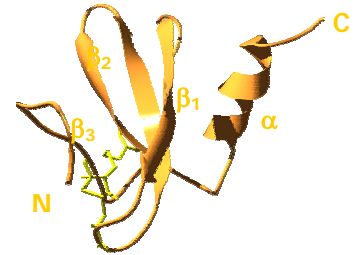
Ce récepteur est bien connu et bien décrit comme co-récepteur pour l'entrée du virus VIH-1 dans les cellules (Bleul *et al.* 1996a) et par conséquent, SDF-1 en se fixant sur son récepteur constitue un puissant inhibiteur de l'entrée du virus dans la cellule. Un nouveau variant de CXCR4 a été cloné, il diffère dans les 9 premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale (Gupta et Pillarisetti 1999). Le CXCR4 est fortement exprimé sur les lymphocytes T (Hesseltger *et al.* 1998).

La première description de CXCR4 au niveau de l'endothélium (Volin *et al.* 1998) a été réalisée sur les cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC : Bovine Aortic Endothelial Cells) et les cellules endothéliales de cordon ombilical (HUVEC : Human Umbilical Venule Endothelial Cells) (Feil et Augustin 1998).

L'inactivation du gène codant pour le récepteur CXCR4 provoque l'apparition de défauts cardiaques et hématopoïétiques, identiques à ceux observés lors de l'inactivation du gène de son ligand SDF-1 (Zou *et al.* 1998). L'effet de l'inactivation des gènes codant pour CXCR4 et SDF-1 montre également une vasculature réduite dans le tractus gastro-intestinal des embryons de souris (Tachibana *et al.* 1998). Les souris meurent donc *in utero* par défaut de développement vasculaire, de cardiogenèse et d'hématopoïèse. Elles souffrent de plus d'un développement anormal du cervelet (Ma *et al.* 1998).

8 La chimiokine RANTES (CCL5) et un de ses récepteurs, le CCR5

8.1 Sa description



La protéine résultante d'un gène cloné codant pour une nouvelle chimiokine est exprimée dans des lignées de cellules T et appelée RANTES pour Regulated on Activated Normal T cell Expressed and Secreted chemokine (Schall *et al.* 1988). La protéine précurseur de 10 kDa, après clivage de son peptide signal, donne une protéine mature de 8 kDa (68 résidus).

8.2 Ses rôles

RANTES attire sélectivement les monocytes et les lymphocytes T mémoires. Cette attraction préférentielle de certaines sous populations de leucocytes peut expliquer partiellement comment les lymphocytes migrent au niveau de sites spécifiques (Schall *et al.* 1990).

Les cellules endothéliales de cordon ombilical (HUVEC) produisent RANTES après activation par le TNF- α (Tumor Necrosis Factor - α) et IFN- γ (Interféron- γ).

Les lymphocytes Th1 et Th2 diffèrent dans leurs propriétés intrinsèques de migration et dans leur réponse vis-à-vis des chimiokines. En effet, seuls les lymphocytes Th1 répondent à RANTES, MIP-1 α et β (Siveke et Hamann 1998; Ding *et al.* 2000).

L'inactivation du gène codant pour RANTES prouve que la chimiokine est nécessaire au développement normal des cellules T et à leur recrutement aux sites d'inflammation (Makino *et al.* 2002).

8.3 Un de ces récepteurs, le CCR5

La chimiokine RANTES peut se lier à trois récepteurs de la même famille : le CCR1 (Neote *et al.* 1993b) le CCR3 (Combadiere *et al.* 1995) et le CCR5 (Power *et al.* 1995).

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au CCR5, récepteur principal de RANTES et co-récepteur pour l'entrée du VIH-1 dans les cellules (Lavi *et al.* 1998; Mack *et al.* 2000). Le CCR5 est exprimé aussi bien dans les organes lymphoïdes comme le thymus et la rate que dans les leucocytes du sang périphérique comme les macrophages et les cellules T.

9 La CTACK (CCL27) et son récepteur CCR10

9.1 La chimiokine CTACK

En 1999, l'équipe de J.Morales découvre dans la peau, une nouvelle chimiokine et l'appelle CTACK : Cutaneous T-cell-Attracting Chemokine (CCL27). Cette chimiokine est donc principalement exprimée dans la peau (épiderme, kératinocytes) et attire sélectivement les lymphocytes T mémoires (Morales *et al.* 1999). Elle se lie au récepteur CCR10 (Homey *et al.* 2000). L'interaction entre la CTACK et le CCR10 régule le recrutement de cellules T lors de l'inflammation cutanée (Homey *et al.* 2002). La CTACK est également impliquée dans les maladies inflammatoires de la peau telles que le psoriasis et la dermatite atopique où son expression est augmentée (Kakinuma *et al.* 2003; Nomura *et al.* 2003).

9.2 Son récepteur CCR10

Dans la peau, le récepteur CCR10 n'est pas exprimé par les kératinocytes, mais par les mélanocytes et les fibroblastes dermiques ainsi que par les cellules endothéliales microvasculaires de la peau, les cellules T et les cellules de Langerhans (Homey *et al.* 2000). La chimiokine CTACK étant produite par les kératinocytes, elle peut servir de molécule de signalisation pour les autres types cellulaires possédant le CCR10.

10 Les interactions des chimiokines avec les GAGs

Nous avons vu que les activités biologiques des chimiokines sont influencées par leurs associations avec les GAGs de la surface cellulaire.

D'une part, les chimiokines se protègent d'éventuelles dégradations protéolytiques en se fixant aux GAGs. D'autre part, les interactions chimiokines/GAGs favorisent leur concentration à la surface cellulaire et contribuent donc à l'établissement du gradient chimiotactique qui attire les leucocytes circulants (Netelenbos *et al.* 2002). Enfin, cela permet d'augmenter leur avidité et de favoriser la présentation de la chimiokine à son récepteur.

Le site de fixation aux GAGs est distinct de celui des récepteurs (Amara *et al.* 1999) (Proudfoot *et al.* 2001). La liaison aux GAGs se fait dans la partie C-terminale de la protéine.

Certaines chimiokines telles que RANTES et SDF-1 sont des ligands pour des co-récepteurs du VIH-1, elles sont donc des inhibiteurs naturels de la liaison du VIH-1 à son co-récepteur.

Par conséquent, l'élaboration d'antagonistes de ces récepteurs constitue une nouvelle stratégie pour enrayer l'infection (Stojanovic *et al.* 2002). Il faut connaître pour cela le mode d'interaction des ligands avec les récepteurs. Afin d'identifier les régions (résidus) impliquées dans cette interaction (Nardese *et al.* 2001), il est nécessaire de déterminer la structure tridimensionnelle des chimiokines dans le but d'obtenir des antagonistes efficaces (Burns *et al.* 1998) (Murakami *et al.* 1997) (Schols *et al.* 1997; Burns *et al.* 1999).

Les interactions GAGs-chimiokines ne se font pas au hasard mais dépendent du type et de la localisation de l'endothélium. Les héparanes sulfates diffèrent au niveau de leur structure et de leur composition au niveau des domaines sulfatés dans de nombreux tissus et peuvent contribuer à l'organo-spécificité des tissus. RANTES se lie préférentiellement aux héparines et héparanes sulfates (Martin *et al.* 2001).

Cette préférence de RANTES pour certains GAGs peut contribuer à l'organo-spécificité des tissus les présentant et permet d'orienter préférentiellement certaines populations de cellules circulantes.

Même si ces interactions ne sont pas obligatoires pour la liaison des chimiokines à leurs récepteurs, elles favorisent les effets des chimiokines.

11 Les implications des chimiokines dans les cancers et diverses pathologies

Le rôle des chimiokines dans les processus physiologiques a pour conséquence qu'un dérèglement à leur niveau entraîne certaines pathologies.

Les récepteurs CXCR4 et CCR5 ainsi que leurs ligands respectifs, SDF-1 et RANTES sont impliqués dans les maladies dérivées de l'infection par le virus VIH-1 telles que la démence associée au VIH-1.

Elles sont impliquées dans la biologie des cancers (Opdenakker et Van Damme 2004) (Opdenakker *et al.* 2001) soit en participant à la dissémination des cellules cancéreuses (Muller *et al.* 2001) soit, au contraire, en ayant des propriétés anti-tumorales (Nomura et Hasegawa 2000; Sharma *et al.* 2000; Vicari *et al.* 2000) (cf. annexe 1).

Certaines chimiokines sont impliquées dans les maladies inflammatoires de la peau telles que la dermatite atopique (Echigo *et al.* 2004) et le psoriasis (Raychaudhuri *et al.* 2001) (Fukuoka *et al.* 1998) (Raychaudhuri *et al.* 1999).

L'implication des chimiokines dans des pathologies variées illustre leurs rôles clés dans les processus physiologiques.

12 L'organo-spécificité de l'endothélium

C'est de l'étude des phénomènes régissant la reconnaissance cellulaire entre les cellules endothéliales et les lymphocytes lors de leur domiciliation dans les organes lymphoïdes secondaires qu'est née la notion d'organo-spécificité de l'endothélium.

Il est maintenant admis que les cellules B et T naïves circulent du sang vers les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques ou les Plaques de Peyer et retournent dans la circulation sanguine via les vaisseaux lymphatiques dans le but de rencontrer l'antigène. La collecte de l'antigène se fait essentiellement au niveau des surfaces épithéliales, les tissus somatiques et le sang. Lorsque les lymphocytes rencontrent l'antigène ils sont activés, prolifèrent et éventuellement se différencient en lymphocytes T mémoires connus pour leurs capacités à migrer dans les sites extra lymphoïdes lors d'une inflammation. Comme nous l'avons vu, cette circulation ne se fait pas au hasard, elle est dictée par des molécules spécifiques à la surface des deux partenaires.

Nous donnons ici quelques exemples de molécules et de chimiokines sélectivement exprimées dans certains tissus, régissant les mécanismes de recrutement, et qui illustrent l'organo-spécificité de l'endothélium.

Cette partie est plus amplement développée dans l'article intitulé «**Tumor and host endothelial cell selective interactions and modulation by microenvironmental chemokines**», présenté en annexe 1 de ce manuscrit.

12.1 Les récepteurs de « homing » et les adressines vasculaires

12.1.1 Dans les ganglions lymphatiques : L-sélectine et PNad (Peripheral Node addressins)

Les cellules naïves et mémoires migrent dans les ganglions périphériques. La présence de la L-sélectine sur les lymphocytes est nécessaire pour cette domiciliation. Comme détaillé dans le paragraphe 2.1, toutes les sélectines possèdent au niveau de leur région N-terminale un domaine lectine, c'est à dire un domaine de reconnaissance des motifs saccharidiques.

Les ligands glycosylés de la L-sélectine sont exprimés sur les glycoprotéines présentes à la surface des hautes cellules endothéliales des ganglions lymphatiques périphériques (Warnock et al. 2000). Ces glycoprotéines possédant les bons motifs saccharidiques sont appelées les adressines spécifiques des ganglions périphériques (PNad : Peripheral Nodes addressin), parmi lesquelles se trouvent GLYCAM-1 (Glycosylation-dependent Cell Adhesion Molecule 1) (Lasky *et al.* 1992) et le CD34 (Cluster of differentiation).

Les PNad peuvent être induites sur les cellules endothéliales de vaisseaux inflammés qui peuvent alors recruter des lymphocytes. Ce recrutement extra lymphoïde est assuré par la liaison de la L-sélectine à ces PNad (Michie *et al.* 1993).

12.1.2 Dans les plaques de Peyer : MadCAM-1 et intégrine $\alpha 4\beta 7$

Les cellules T circulent à travers les hautes cellules endothéliales des plaques de Peyer de l'intestin et de la *lamina propria*. Les hautes cellules endothéliales des tissus lymphoïdes de type muqueux expriment une molécule appelée MadCAM-1 pour Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1 (Briskin *et al.* 1993). MadCAM-1 appartient à la superfamille des immunoglobulines et possède des domaines similaires à ceux trouvés dans d'autres molécules

d'adhésion comme ICAM-1 (Intercellular Communication Adhesion Molecule-1) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1).

MadCAM-1 possède une région qui peut porter des motifs saccharidiques trouvés sur les adressines spécifiques des ganglions lymphatiques périphériques (PNad) seulement dans les plaques de Peyer et non dans la *lamina propria*. MadCAM-1 a donc le potentiel d'interagir avec des récepteurs multiples à la surface des différentes sous populations de lymphocytes.

L'intégrine $\alpha 4\beta 7$, présente sur les cellules naïves et mémoires, est le récepteur majeur de MadCAM-1. Cette intégrine a été décrite comme un récepteur de « homing » pour les sites muqueux (Abitorabi *et al.* 1996) et porte le nom de LPAM pour Lymphocyte Peyer's Patch Adhesion Molecule (Hu *et al.* 1992). Elle est suffisamment exprimée sur les cellules T naïves pour interagir avec MadCAM-1. Elle est fortement exprimée sur les cellules T mémoires particulièrement celles stimulées dans les intestins (Williams et Butcher 1997). La L-sélectine est aussi un récepteur pour MadCAM-1 mais ceci est restreint aux plaques de Peyer où les cellules endothéliales présentent des motifs saccharidiques de type PNad (Berg *et al.* 1993).

12.1.3 Dans la peau inflammée : E-sélectine –CLA

Le trafic spécifique des tissus réalisé par les lymphocytes est surtout étudié au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Cependant, la peau constitue un site important de recrutement de lymphocytes et particulièrement de cellules T lors de processus inflammatoires. De nombreuses molécules d'adhésion sont induites au niveau des cellules endothéliales dermiques et contribuent au recrutement cellulaire. La E-sélectine est impliquée dans la recirculation des cellules T mémoires spécifiques de la peau. La E sélectine est induite sur les cellules endothéliales par des médiateurs de l'inflammation comme TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) et IL-1 (Interleukin-1). Elle a été décrite initialement comme une molécule provoquant l'adhésion des leucocytes polymorphonucléaires (Bevilacqua *et al.* 1987). Les cellules T mémoires se lient fortement à la E-sélectine (Picker *et al.* 1991). La E-sélectine reconnaît des motifs saccharidiques particuliers exprimés par des glycoprotéines ou des glycolipides à la surface des cellules T dont ceux présents sur la molécule CLA (Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen). La molécule CLA est préférentiellement exprimée par les cellules T qui se regroupent au niveau de sites inflammatoires cutanés. Dans le sang périphérique ou l'appendice, la molécule CLA est présente sur une petite population de cellules mémoires. Elle est aussi exprimée au niveau de lymphocytes mémoires provenant des

ganglions lymphatiques périphériques et plus particulièrement ceux qui ont drainé des sites cutanés illustrant la maturation due au microenvironnement.

12.2 Les chimiokines et leurs récepteurs

Certaines chimiokines et leurs récepteurs participent à la sélectivité de la domiciliation des lymphocytes. En effet, l'expression de certaines chimiokines est restreinte à un type d'organe et confère une spécificité aux tissus qui les expriment (Campbell et Butcher 2000; Kunkel et Butcher 2002).

12.2.1 La chimiokine MEC (CCL28) et un de ses récepteurs, le CCR10

La chimiokine MEC pour Mucosae-associated Epithelial Chemokine (CCL28) a un rôle important dans la domiciliation des lymphocytes dans les organes de type muqueux. Elle est fortement exprimée au niveau des épithéliums des bronches, du colon, des glandes salivaires et mammaires, mais aussi, à des taux plus faibles dans l'intestin grêle (Pan *et al.* 2000).

Elle se fixe au récepteur CCR10 qui est abondamment exprimé dans le colon et l'intestin grêle.

Bien que la chimiokine MEC soit très peu exprimée dans la peau, elle est étroitement liée à la chimiokine CTACK et se lie au même récepteur CCR10 (Wang *et al.* 2000). Contrairement à la CTACK, MEC peut également se lier au récepteur CCR3 trouvé initialement sur les éosinophiles. C'est pourquoi MEC est chimiotactique pour les éosinophiles en plus des cellules T mémoires.

12.2.2 La chimiokine CTACK (CCL27) et son récepteur CCR10

Comme nous l'avons vu précédemment (cf. § 9), la chimiokine CTACK (Cutaneous T Cell Attracting Chemokine) et son récepteur CCR10 sont impliqués dans la circulation des lymphocytes dans la peau. La CTACK est exprimée dans les kératinocytes et attire les cellules T mémoires possédant le CCR10.

12.2.3 La chimiokine 6Ckine (CCL21) et son récepteur CCR7

La 6Ckine est constitutivement et fortement exprimée dans les tissus lymphoïdes tels que les ganglions lymphatiques, les plaques de Peyer, la rate et l'appendice et surtout au niveau des hautes cellules endothéliales de ces organes. Les rôles de la 6Ckine et de son récepteur CCR7 sont bien connus dans la domiciliation des lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes secondaires et ont été détaillés dans le paragraphe 6.

12.2.4 La chimiokine TARC (CCL17) et son récepteur CCR4

La chimiokine TARC (Thymus Activation Regulated Chemokine) est exprimée au niveau de l'endothélium cutané. Elle se lie au récepteur CCR4 qui est fortement exprimé sur les cellules T mémoires de la peau CLA⁺. La chimiokine TARC provoque l'adhésion des lymphocytes dans les veinules dermiques, plus particulièrement lors d'une inflammation (Campbell *et al.* 1999).

12.2.5 La chimiokine TECK (CCL25) et son récepteur CCR9

La chimiokine TECK (Thymus Expressed ChemoKine) attire une sous population de cellules mémoires CD4⁺ et $\alpha 4\beta 7^+$ issues de l'intestin, mais pas celles provenant d'autres organes (Zabel *et al.* 1999). Le récepteur de TECK, CCR9 est exprimé sur ces cellules CD4⁺ issues de l'intestin et absent d'autres populations CD4⁺. La chimiokine TECK est exprimée au niveau de l'intestin grêle, essentiellement par les cellules épithéliales (Wurbel *et al.* 2000).

13 L'inflammation

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la domiciliation des lymphocytes dans les organes non lymphoïdes est la réponse nécessaire à un phénomène inflammatoire.

Le microenvironnement inflammatoire provoque un changement local dans le phénotype des cellules endothéliales qui peuvent alors recruter les cellules circulantes selon des mécanismes moléculaires complexes.

La recherche de principes actifs dans les maladies inflammatoires et le vieillissement de la peau sont un enjeu majeur dans les domaines de la dermatologie, la cosmétologie et la pharmacologie.

Qu'ils soient issus des techniques de biotechnologie (synthèse enzymatique, fermentation, hydrolyse contrôlée) ou d'extractions végétales, les molécules actives du groupe Solabia sont destinées plus particulièrement à l'industrie cosmétique.

La démonstration des performances cosmétiques s'appuie, entre autres, sur des tests de validation effectués sur des modèles cellulaires *in vitro*.

13.1 l'inflammation cutanée

13.1.1 La structure et les fonctions de la peau

La peau est constamment soumise aux agressions extérieures de diverses origines (bactérienne, lumineuse, chimique, etc.). Les premiers symptômes en réponse à ces agressions sont bien connus : rougeur, gonflement, chaleur et douleur ; c'est la réaction inflammatoire.

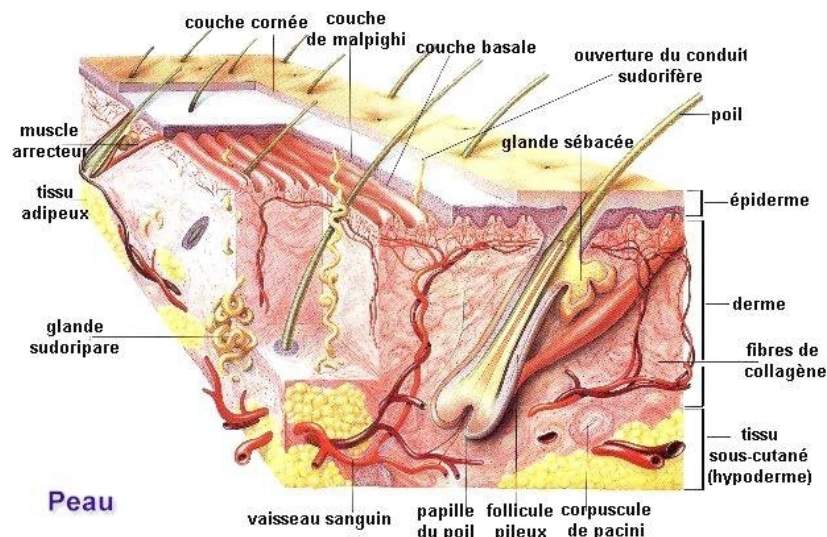


Figure 8: Coupe transversale de la peau

(www.esthetique.qc.ca/.../images/schema_peau.html)

La peau est constituée de trois tissus (Figure 8).

- l'épiderme, en surface, est un épithélium pavimenteux, stratifié et kératinisé. Son rôle principal est de protéger l'organisme des agressions extérieures. Quatre types de cellules se trouvent dans ce tissu : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merckel,

- le derme : il constitue un tissu de soutien et de nutrition pour l'épiderme auquel il est relié par la jonction dendrodentritique. Il renferme le système vasculaire de la peau et de

nombreuses fibres nerveuses. Les cellules constituant le derme sont majoritairement des fibroblastes synthétisant les protéines constituant la matrice extracellulaire,

- l'hypoderme : il constitue la partie profonde de la peau. C'est un tissu conjonctif lâche et adipeux ayant un rôle dans la thermorégulation. Il constitue une réserve d'énergie grâce aux adipocytes qui stockent les lipides.

La microcirculation cutanée assure la nutrition et l'oxygénation des 3 tissus. Elle favorise aussi l'élimination des déchets issus du métabolisme des cellules et maintient l'homéostasie interne. Cette microcirculation est formée d'artérioles qui se terminent en un réseau de capillaires, niveau d'échanges privilégiés permettant le recrutement de cellules du système immunitaire lors des phénomènes inflammatoires.

13.1.2 La cascade cellulaire de l'inflammation cutanée

L'inflammation cutanée est un phénomène complexe mettant en jeu des cascades de réactions biochimiques et physiologiques (figure 9).

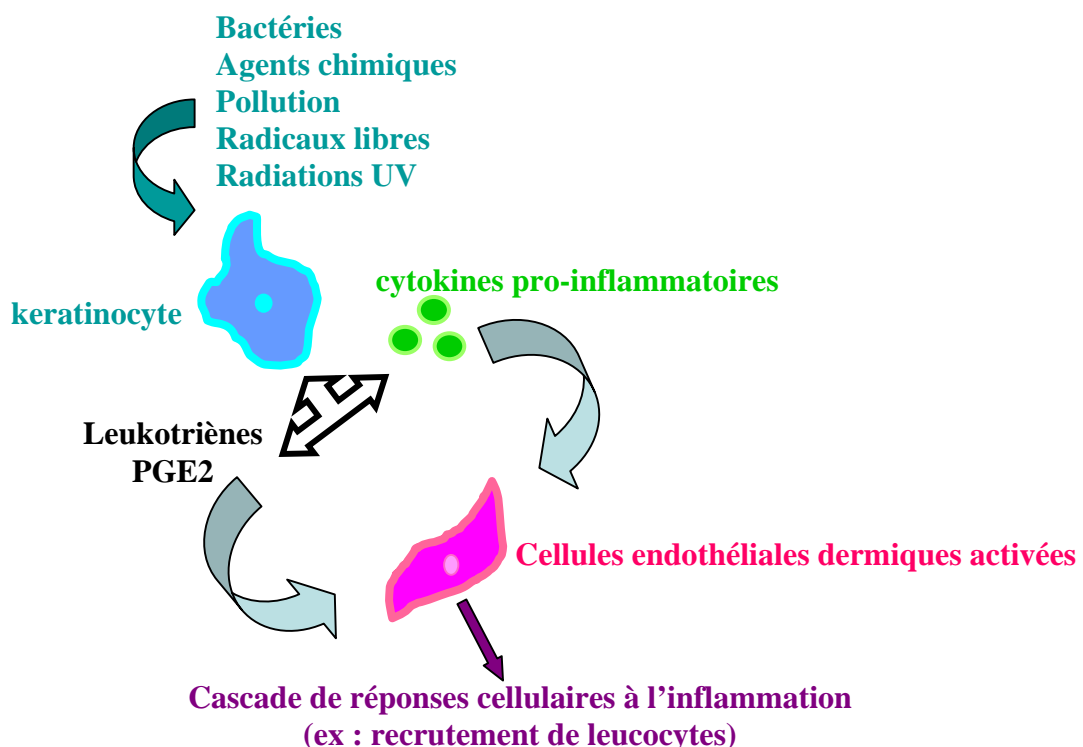


Figure 9 : Modèle simplifié de la cascade cellulaire mise en jeu lors de l'inflammation cutanée

Lors d'une agression, les premières cellules activées sont les kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme. En réponse à cette activation, ils sécrètent des molécules participant à la signalisation intra- et intercellulaire : les cytokines pro-inflammatoires et les médiateurs de l'inflammation tels que les leukotriènes et les prostaglandines (PGE2). Ces molécules sont capables d'activer d'autres types cellulaires pour amorcer une coopération entre les cellules afin de répondre à l'agression. Les cellules endothéliales dermiques activées par ces signaux, mettent en œuvre les mécanismes de réponses cellulaires tels que le recrutement massif de leucocytes au site d'inflammation.

13.2 pourquoi les sucres ?

Les sucres sont essentiels dans les mécanismes de reconnaissance (ex : récepteurs de homing-adressines vasculaires, GAGs). En effet, grâce aux récepteurs présents sur les lymphocytes, ceux-ci reconnaissent les motifs de type saccharidique des glycoprotéines présentes à la surface des cellules endothéliales.

De plus, les GAGs des surfaces cellulaires jouent un rôle important dans la biologie des chimiokines, notamment en favorisant leur présentation à la surface cellulaire dans le but d'optimiser la liaison au récepteur présent sur l'autre type cellulaire.

Des travaux ont montré le rôle des sucres tels que le fucose, le galactose et mannose dans l'inflammation cutanée (Carrino *et al.* 2000; Isnard *et al.* 2002). Dans cet esprit, la société BioEurope développe des principes actifs, poly- et oligosaccharidiques.

BEC 441 est un polysaccharide caractérisé comme « bio-atténuateur de l'inflammation » de structure ramifiée et riche en rhamnose (50% de la masse totale du polysaccharide). Il a été obtenu par fermentation bactérienne ; et contient également du galactose et de l'acide glucuronique.

Ce composé a été testé sur un modèle de kératinocytes qui possèdent des lectines affines du rhamnose et du galactose.

Les polysaccharides BEC 441 ont une action anti-inflammatoire : ils diminuent le taux de prostaglandines PGE2 et ils inhibent l'adhésion de bactéries à la surface de la peau. Ils réduisent les signaux intervenant dans l'activation kératinocytaire en se fixant aux kératinocytes au niveau des lectines spécifiques du rhamnose et galactose. Ils court-circuitent la cascade de signalisation entre les différents types cellulaires constituant la peau et limitent ainsi le processus inflammatoire.

A partir de ces observations, la société BioEurope a développé d'autres polysaccharides ainsi que leur dérivés oligosaccharidiques issus d'une hydrolyse contrôlée.

13.3 Les molécules de la société BioEurope

On distinguera deux types de polysaccharides: BEC 1645 riches en résidus fucose et galactose et BEC 1615 constitués majoritairement de résidus fucose et glucose.

Les oligosaccharides dérivés sont obtenus par hydrolyse contrôlée des polysaccharides avec une masse moléculaire moyenne de 15 kDa et 5 kDa.

Nous avons également testé un PCA d'arginine, l'association d'un sel de L-arginine et de l'acide L-pyrrolidone carboxylique. Le PCA est un agent hydratant de la peau et l'arginine un acide aminé présent dans la plupart des tissus de l'organisme intervenant dans la synthèse de l'urée, dans la composition des protéines de la peau et dans l'inhibition de la libération de l'oxyde nitrique (NO).

Les polysaccharides ou oligosaccharides sont utilisés comme antagonistes des récepteurs de sucres présents sur les cellules endothéliales. Ils entraîneraient ainsi l'inhibition de la cascade de signalisation intercellulaire bloquant ainsi la réaction inflammatoire et la production de NO.

13.4 Le stress oxydant : le système oxyde nitrique (NO) / oxyde nitrique synthase inducible (iNOS)

Le NO intracellulaire est nécessaire pour le maintien du tonus vasculaire mais peut devenir néfaste à des taux trop élevés (Bruch-Gerharz *et al.* 1998a; b).

Dans les conditions normales, le NO est essentiellement produit dans les cellules endothéliales par la NO synthase constitutive : eNOS (endothelial NO Synthase). Cette production basale de NO est associée à ses activités régulatrices dans les tissus.

L'activation par des cytokines pro-inflammatoires entraîne une augmentation massive de NO induit par la NOS inducible : iNOS (inducible NO synthase).

Dans notre modèle, les cellules endothéliales produisent du NO toxique à la suite d'un stress oxydant provoqué artificiellement par ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans le milieu.

Le taux d'oxyde nitrique dans la cellule dépend de la balance NO/iNOS.

Le vieillissement de la peau est une conséquence directe de l'inflammation due à la production de radicaux libres (ex : ROS) (Jenkins 2002). En effet, les ROS (Reactive Oxygen

Species) provoquent des dommages aux niveaux des lipides, des protéines et de l'ADN des cellules et donc influencent la sénescence par l'accumulation de radicaux libres. Le stress oxydant contribue largement à la sénescence des cellules de la peau par l'accumulation de dommages oxydants. Ceci est particulièrement observé dans des peaux exposées aux agents environnementaux comme les radiations ultraviolettes (Suschek *et al.* 2001) et l'ozone (Valacchi *et al.* 2002).

13.5 Notre modèle d'inflammation cutanée.

Notre modèle consiste à activer *in vitro* les cellules endothéliales de la peau par ajout de H₂O₂ dans le milieu de culture. Ce système d'activation crée ainsi un stress oxydant important pour la cellule qui mime un état inflammatoire. Cela va permettre d'étudier l'effet des molécules à différentes étapes de la réaction inflammatoire selon divers critères tels que :

- la modulation du taux de NO intracellulaire
- la modulation du taux de iNOS intracellulaire
- la modulation du recrutement des lymphocytes T

Ces trois paramètres nous permettront d'identifier les molécules potentiellement anti-oxydantes et anti-inflammatoires vis-à-vis des cellules endothéliales humaines de la peau.

D'autre part, le test d'angiogénèse *in vitro* permettra d'évaluer les effets des molécules sur la formation de pseudo-vaisseaux.

III.

Les chimiokines et leurs récepteurs :

Leur participation à l'organo-spécificité de l'endothélium

Cette première partie concerne l'étude du rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'organo-spécificité de l'endothélium.

Les protocoles des expériences menées sont détaillés, puis les résultats obtenus sont analysés et discutés.

1. Matériel et méthodes

1.1 Le phénomène étudié et l'hypothèse de travail

Nous avons sélectionné 5 des 11 lignées humaines établies au laboratoire. Ces cellules endothéliales sont issues de cultures primaires, immortalisées et clonées afin de créer des lignées stables permettant des études *in vitro*. Elles ont été caractérisées par les marqueurs spécifiques de cellules endothéliales tels que le Von Willebrand factor (vWF) et l'ACE (Angiotensine Converting Enzyme) (Kieda *et al.* 2002).

A partir de ces lignées, nous étudierons le rôle des chimiokines et leurs récepteurs dans l'organo-spécificité de l'endothélium.

1.2 Le choix des lignées

Les 5 lignées choisies représentent un bon modèle pour étudier les mécanismes moléculaires de la reconnaissance des cellules circulantes et les cellules endothéliales ainsi que les signaux d'adressage à ces sites spécifiques.

En effet, trois lignées cellulaires proviennent d'organes lymphoïdes secondaires. Comme nous l'avons vu, ces organes sont les sites privilégiés de la domiciliation des lymphocytes. Ces 3 lignées sont:

- HAPEC (Human Appendix Endothelial Cells), cellules endothéliales issues d'appendice humain;
- HPLNECB3 (Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells), cellules endothéliales de ganglions lymphatiques périphériques, clone B3;
- HMLNEC (Human Mesenteric Lymph Nodes Endothelial Cells), cellules de ganglions mésentériques.

Les deux autres lignées proviennent d'organes non lymphoïdes :

- HBrMEC (Human Brain Microvascular Endothelial Cells), cellules endothéliales issues de cerveau humain ;
- HSkMEC (Human Skin Microvascular Endothelial Cells), cellules endothéliales issues de peau humaine.

Ces deux dernières lignées ont été choisies pour leur origine embryonnaire commune et leur différenciation séparée. Il est fondamental d'avoir un outil représentant la biologie particulière de la barrière hémato-encéphalée afin d'étudier les signaux d'adressage dans le cerveau où l'endothélium est particulier (blood brain barrier : BBB).

La lignée endothéliale de la peau constitue un modèle de choix pour les études appliquées dans les domaines de la pharmacologie et dermatologie.

Dans le cadre des expériences d'adhésion sur les cellules endothéliales, nous avons utilisé une lignée de lymphocytes T naïfs CD4⁺: CEMT4 qui sont cultivées en suspension. Ces cellules sont un don du Docteur Olivier de l'Institut Pasteur et sont un modèle de lymphocytes CD4⁺ activés.

1.3 La culture des lignées endothéliales (cellules adhérentes) et des lymphocytes CEMT4 (cellules en suspension)

Pour les passages d'entretien, les cellules sont décollées par hydrolyse enzymatique à l'aide d'une solution de trypsine 0.25%/ EDTA (éthylène diamine tétra acétate) 1mM, pendant 2 minutes à température ambiante. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de milieu complet. Après une centrifugation de 5 minutes à 20°C et à 400g, le culot cellulaire est repris dans du milieu OptiMEM complet (cf. annexe 3). Les cellules sont comptées sur lame de Mallassez,ensemencées à 2×10^4 cellules par cm^2 incubées dans une étuve à 37°C, sous atmosphère humide de 5% CO₂/ 95% air pendant 48 heures. Les lymphocytes CEMT4 poussent en suspension dans du milieu OptiMEM complet. Ils sont ensemencés à raison de 1×10^6 lymphocytes par ml de milieu.

1.4 Etude des récepteurs et de la présentation des chimiokines par cytométrie en flux.

Les conditions expérimentales concernant la détection des récepteurs et des chimiokines en cytométrie en flux sont détaillées dans l'article intitulé « **Original human endothelial cell lines to illustrate the contribution of chemokines to endothelial cells organospecificity** » soumis au journal « Experimental Cell Research »

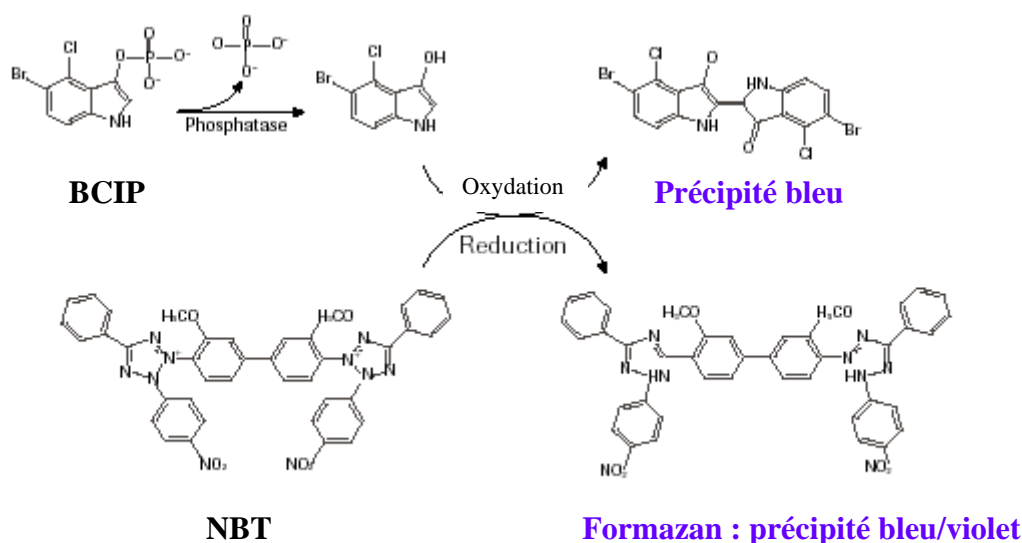
Cet article est présenté dans la partie résultats (cf. chap. III § 2.1).

1.5 La détection des récepteurs de chimiokines par Western Blot

Les étapes préliminaires de préparation des lysats cellulaires, de dosage de protéines et de migration-transfert sont décrites dans l'annexe 5.

La révélation des membranes se fait en plusieurs étapes et débute par une incubation d'1H30 avec l'anticorps primaire à la concentration finale de 50ng/ml de PBSc-Tween20 0,5%. L'anti-CX₃CR1 humain est fait chez le lapin, les autres anticorps primaires (anti-CXCR4, CCR5 et CCR7 humains) sont faits chez la chèvre.

L'incubation est suivie d'une série de lavages avec une solution de PBS-Tween20 0,5%. Les membranes sont alors incubées en présence des anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline pendant 1 heure (anticorps faits chez la chèvre dirigés contre les immunoglobulines de lapin dans le cas de CX₃CR1, anticorps faits chez le lapin dirigés contre les immunoglobulines de chèvre dans le cas des trois autres récepteurs). A la fin de cette incubation, les membranes sont lavées 3 fois avec une solution de PBS-Tween20 0,5%. Elles sont ensuite révélées par le substrat de la phosphatase alcaline : un mélange NBT (Nitroblue Tetrazolium) /BCIP (Bromochloroindolylphosphate) permettant une révélation colorimétrique des différents récepteurs, suivant la réaction :



1.6 Expériences d'adhésion de lymphocytes CEMT4 sur les lignées endothéliales

Les cellules endothéliales sont ensemencées dans de l'OptiMEM complet en plaques de 24 puits à raison de 2×10^4 cellules par cm^2 . Après 48 heures de culture à 37°C sous atmosphère humide de 5% CO₂/ 95% air, le milieu est remplacé par les solutions de chimiokines préalablement diluées dans de l'OptiMEM aux concentrations désirées. Les cellules sont

ensuite incubées pendant 90 minutes ou 5 heures en présence des chimiokines avant l'expérience d'adhésion.

Des lymphocytes CEMT4, préalablement marqués par le PKH-26GL (cf. annexe 4), sont mis en présence des cellules endothéliales dans de l'OptiMEM à raison de 5 lymphocytes pour une cellule endothéliale (conditions mises au point au laboratoire). Après 20 minutes d'incubation à 4°C, les lymphocytes non adhérents aux cellules endothéliales sont éliminés par trois lavages doux avec une solution de PBS complet (PBSc, cf. annexe 3). Les cellules restantes sont ensuite décollées à l'aide d'une solution de trypsine/ EDTA pendant 2 minutes à température ambiante, puis lavées au PBSc-SAB 0.5%. Après une centrifugation de 5 minutes à 20°C et à 400g, le culot cellulaire est remis en suspension dans 500µl de PBSc pour l'analyse au cytomètre de flux.

Après excitation à 488nm, les lymphocytes marqués par le PKH26-GL fluorescent à 560nm. Ce marquage permet de les séparer par leur fluorescence, des cellules endothéliales non marquées et d'évaluer ainsi le pourcentage des deux populations. Ceci correspond au taux d'adhésion, exprimé en nombre de lymphocytes fixés par cellule endothéliale. Chaque expérience est réalisée à raison de trois puits par molécule et par concentration.

1.7 Test de croissance des cellules endothéliales en présence de chimiokines

Les cellules endothéliales sontensemencées sur des plaques de microtitration (96 puits) à la concentration de 2×10^4 cellules par cm^2 en présence ou non (contrôle) des chimiokines à différentes concentrations. Les tests de croissance cellulaire sont réalisés avec une molécule non toxique, stable et soluble dans le milieu de culture : l'Alamar BlueTM. Le test est basé sur la détection de l'activité métabolique des cellules : celles-ci incorporent cet indicateur d'oxydo-réduction qui fluoresce en réponse à une réduction chimique du milieu proportionnelle à la croissance cellulaire. Pour obtenir une courbe de croissance, les cellules sont incubées à des temps variables (0, 24, 48 et 72 heures). A la fin de chaque temps, 10µl d'une solution d'Alamar blueTM, dilué au 1/5 dans de l'OptiMEM, sont ajoutés par puits et sont incubés 3 heures à 37°C sous atmosphère humide de 5%CO₂/ 95% air.

Les résultats sont analysés par lecture des plaques au spectrofluorimètre (λ excitation : 560 nm, λ émission : 590 nm).

Les résultats sont ensuite analysés en pourcentage de croissance par rapport au témoin sans chimiokines. Chaque expérience est réalisée à raison de trois puits par concentration et par chimiokine.

1.8 Les expériences d'angiogénèse *in vitro*

Les expériences d'angiogénèse *in vitro* sont réalisées sur des plaques de 24 puits recouvertes au préalable par une matrice : le matrigel. C'est une préparation de composition proche de la membrane basale, solubilisée, et extraite à partir d'ascites d'un sarcome de souris, une tumeur riche en protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine, le collagène de type IV, des protéoglycanes à héparanes sulfates, de l'entactine et du nidogène. Le matrigel contient également des facteurs de croissance tels que le TGF- β (Tumor Necrosis Factor β), le FGF (Fibroblast Growth Factor) et d'autres facteurs naturellement présents dans la tumeur. Les cellules endothéliales en culture forment naturellement des pseudo-vaisseaux sur cette matrice à une vitesse dépendante, entre autres, de la composition en protéines du matrigel utilisé. Celui-ci, étant préparé à partir d'ascite de tumeurs *in vivo*, sa composition est variable selon le lot. Dans notre cas, la concentration en protéines est de 9,4mg/ml.

Le matrigel est liquide à 4°C mais se polymérise très rapidement quand la température augmente. Sa manipulation se fait donc sur la glace et le matériel de culture cellulaire utilisé est placé préalablement à 4°C. Le revêtement des puits de 2cm² est réalisé avec 500 μ l de matrigel. L'excédent est enlevé 10 secondes plus tard, et le revêtement des autres puits est réalisé ainsi de proche en proche (il reste environ 50 μ l de matrigel par puits). Après polymérisation 1heure à température ambiante, en conditions stériles sous une hotte à flux d'air laminaire, les cellules sontensemencées sur la matrice à raison de 2.5 X 10⁴ cellules par cm² dans de l'OptiMEM. Après leur adhésion sur la matrice, le milieu est remplacé par les solutions de chimiokines préparées au préalable dans de l' OptiMEM.

L'expérience consiste à observer au cours du temps, le réarrangement des cellules endothéliales et la cinétique de la formation des pseudo-vaisseaux sur la matrice. C'est la modulation de cette cinétique par les chimiokines (inhibition ou activation du processus) qui est évaluée par observation des cellules sous microscope inversé (Axiovert 200, Zeiss). *L'analyse se fait par prises de vues à différents temps, comparativement au contrôle sans chimiokine. La morphologie, le réarrangement, la cinétique de la formation de réseaux cellulaires et de la formation de pseudo-vaisseaux sont ainsi analysés. Ces critères vont permettre d'évaluer qualitativement l'effet des chimiokines sur la formation de pseudo-vaisseaux in vitro.*

1.9 Le ciblage des chimiokines en conditions de flux

Afin de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo*, les expériences de ciblage sont réalisées à l'aide de la « station de flux ».

1.9.1 Présentation de l'appareillage

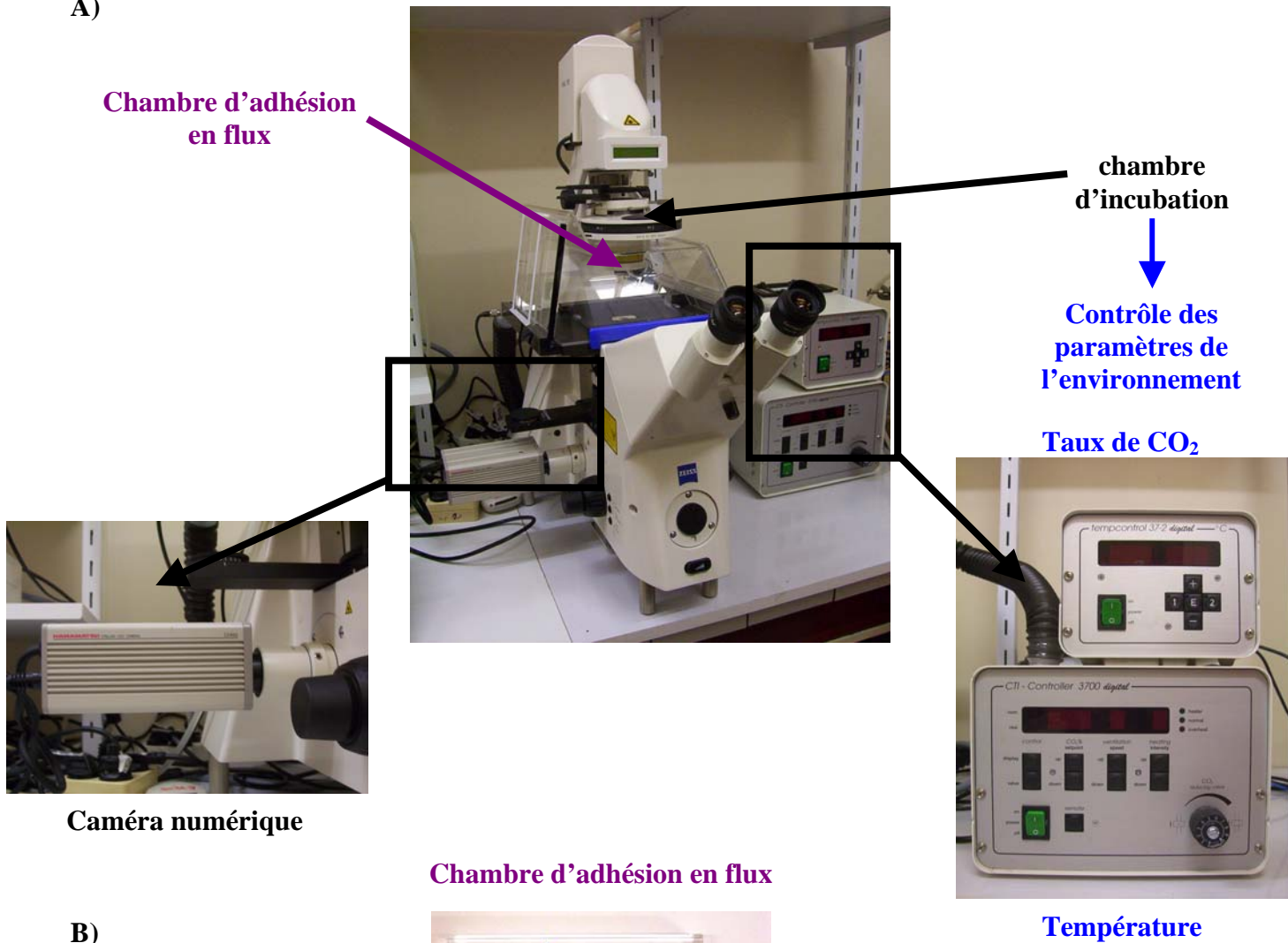
La station de flux (figure 1) est composée :

- ♦ d'un microscope inversé et de fluorescence (Zeiss, Axiovert 200M) (figure 2A) ;
- ♦ d'un système de flux composé d'une chambre de flux CAF10 (Cell Adhesion Flow chamber, Immunetics, Boston, USA) reliée à un ensemble pompe-seringue (Harvard apparatus, PHD 2000 Programmable Syringe pump series) qui crée le flux par aspiration et par l'intermédiaire d'une pompe à vide (figure 2B) ;
- ♦ d'une chambre de contrôle des paramètres de l'environnement (température, taux d'humidité et de CO₂) (figure 2A) ;
- ♦ d'un système vidéo (caméra, magnétoscope numériques) et informatique (logiciel Axiovision 3.0 de Zeiss) afin de permettre l'acquisition et le traitement des données sous l'application Windows 2000 Pro (figure 1).



Figure 1 : Présentation de la station de flux

A)



B)

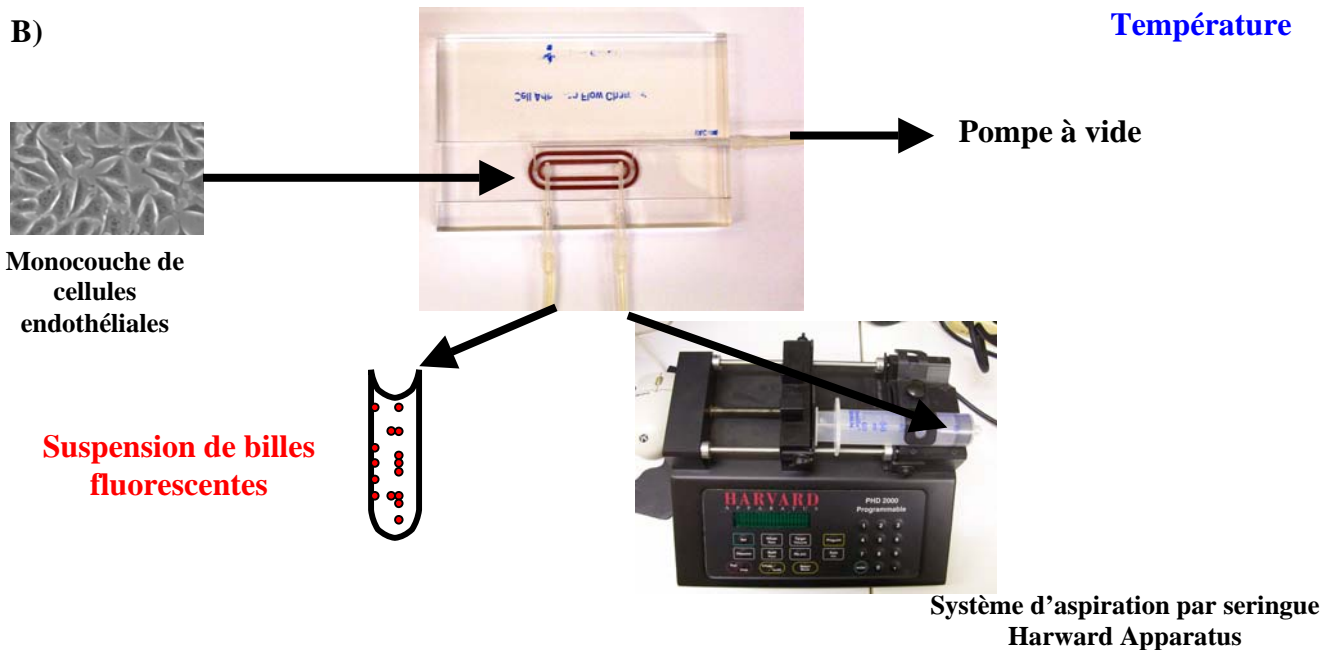
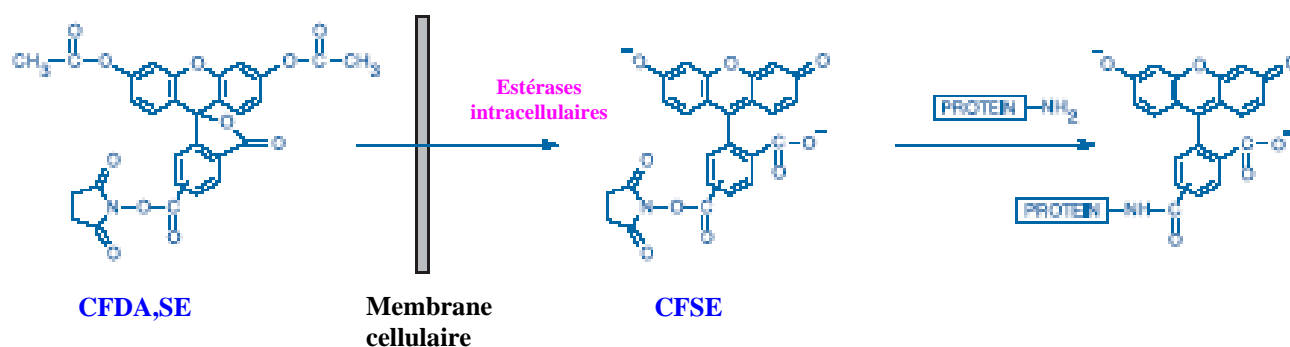


Figure 2: Présentation du microscope et la chambre de contrôle des paramètres (A) et de la chambre d'adhésion (B)

1.9.2 Culture des cellules endothéliales pour les conditions de flux

Dans le cadre des expériences en conditions de flux, les cellules endothéliales sont ensemencées en mono-culture ou co-culture sur des lames en polystyrène pour la culture de cellules adhérentes. Elles sont ensemencées à raison de 2×10^4 par cm^2 pour une mono-culture et de 1×10^4 par cm^2 et par lignée au sein d'une co-culture.

Au sein d'une co-culture, afin d'identifier chaque lignée cellulaire, une d'entre elles est préalablement marquée à l'aide d'une sonde fluorescente : le CFDA,SE (5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) (cf. annexe 6). Le CFDA,SE est une molécule apolaire traversant passivement les membranes cellulaires. A l'intérieur des cellules, il est converti par les estérases en CFSE anionique capable de se coupler aux fonctions amines des protéines.



Le CFDA,SE est un mélange d'isomères (5 et 6) permettant un marquage uniforme de la cellule, facilitant sa visualisation en microscopie de fluorescence (en vert) après excitation à 488nm et émission à 520nm. Ce composé est non toxique, les cellules ainsi marquées peuvent être remises en culture durant plusieurs jours. De plus, il se transmet de façon équivalente aux deux cellules filles lors des divisions cellulaires, et permet ainsi d'évaluer la croissance des cellules.

1.9.3 Fixation des chimiokines sur des billes de latex

Pour les expériences de ciblage en conditions de flux, les chimiokines sont préalablement fixées sur des billes de latex fluorescentes de $2 \mu\text{m}$ (cf. annexe 6).

Ce procédé présente les avantages suivants :

- il permet d'augmenter l'avidité des chimiokines pour une meilleure affinité avec les récepteurs présents à la surface cellulaire.

- la fluorescence des billes permet de les identifier sous microscope à fluorescence et facilite leur dénombrement au sein de co-cultures où une des lignées de cellules endothéliales est marquée avec le CFDA,SE.

Nous choisirons des billes fluorescentes dans le rouge afin de pouvoir plus facilement les identifier sur les cellules en co-culture.

1.9.4 Principe, fonctionnement et analyse des résultats

L'expérience consiste à faire passer la suspension de «billes-chimiokines» sur les cellules endothéliales pendant un temps et à une vitesse de flux déterminés.

Pour générer le flux, la chambre de flux est positionnée sur la lame de cellules endothéliales en monocouche, maintenue en faisant le vide. L'ensemble est connecté au système pompe-seringue et au réservoir contenant la suspension de billes, le flux de billes est alors généré par activation de la pompe seringue et par création du vide d'air (figure 2B). Le débit du flux est contrôlé afin de ne pas endommager la monocouche de cellules endothéliales de la lame.

Le logiciel d'acquisition d'image Axiovision (Zeiss) permet la prise de photos et l'analyse de séquences vidéo.

Le dénombrement des «billes-chimiokines» fixées, par rapport à l'adhésion de billes-témoins, permet d'évaluer la spécificité de liaison des chimiokines en conditions de flux, sur diverses lignées endothéliales en mono- et co-cultures.

2 Résultats

2.1 Les chimiokines et leurs récepteurs participent à l'organo-spécificité de l'endothélium

Les résultats obtenus en étudiant le rôle des quatre récepteurs de chimiokines CX₃CR1, CXCR4, CCR5 et CCR7 et de leurs ligands respectifs, fractalkine, SDF-1 α , RANTES et 6Ckine, dans l'organo-spécificité de l'endothélium sont présentés dans l'article intitulé :

«Original human endothelial cell lines to illustrate the contribution of chemokines to endothelial cells organospecificity», soumis à publication dans le journal "Experimental Cell Research" et présenté ci-après.

Résumé des résultats obtenus :

Nos résultats montrent que les 4 récepteurs de chimiokines choisis: CX₃CR1, CXCR4, CCR5 et CCR7, sont exprimés dans les 5 lignées endothéliales : HAPEC, HPLNECB3, HMLNEC, HBrMEC et HSkMEC avec des taux d'expression variables.

De plus, leurs ligands respectifs : la fractalkine, SDF-1 α , RANTES et la 6Ckine, sont capables de se lier à la surface de toutes les lignées endothéliales avec des taux de liaison variables selon la lignée.

Quant au recrutement des lymphocytes : la fractalkine augmente spécifiquement l'adhésion de lymphocytes CEMT4 sur les cellules endothéliales issues d'appendice (HAPEC), la 6Ckine agissant spécifiquement sur les cellules issues de ganglions périphériques (HPLNECB3).

Quant à la capacité des chimiokines à moduler la cinétique de formation des pseudo-vaisseaux *in vitro*, elle est démontrée ici par la fractalkine. En effet, cette chimiokine utilisée à 10 μ M et après 5 heures de culture, accélère fortement le processus d'angiogénèse des lignées HAPEC et HSkMEC alors qu'elle n'a pas d'effet sur la lignée HMLNEC.

Ces résultats contribuent à l'illustration du rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'organo-spécificité de l'endothélium, puisqu'ils mettent en évidence l'action spécifique de deux chimiokines vis-à-vis d'une lignée de cellules endothéliales. En effet, la fractalkine agit spécifiquement sur le recrutement des lymphocytes T par les cellules endothéliales d'appendice (HAPEC) et sur leur capacité d'angiogénèse *in vitro*, tandis que la 6Ckine augmente spécifiquement le taux d'adhésion sur les cellules endothéliales de ganglions périphériques (HPLNECB3).

Chemokines contribution to organospecificity in human endothelial cell lines

Claire Crola Da Silva¹, Nathalie Lamerant¹, Michèle Mitterrand¹, Maria Paprocka² and Claudine Kieda¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS affiliated to Orléans University, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France

² IITD, PAN, Wroclaw, Poland

Abstract

Organ- and tissue-specific endothelial cells (ECs) control leukocyte-recruitment and entry of receptor-targeted molecules from blood into lymphoid organs or inflammation tissue sites. Chemokines (CKs) activity and chemokine receptors (CKRs) expression vary according to EC origin. They are a function of the microenvironment which participates to provide ECs their selectivity. The use of an original cellular model based on organospecific, immortalized and stabilised EC lines helped to delineate CK organospecificity. Three EC lines were derived from lymphoid organs that are significant for homing cell selection, and two lines were derived from non lymphoid tissues. These lines were compared for the presence of CKRs and CK expression and presentation, as well as for their role in lymphocyte recruitment and activity in angiogenesis.

The results showed that specificity did not correspond to the presence of CKR surface proteins as CKRs (CX3CR1, CXCR4, CCR5 and CCR7) were detectable on all of the EC lines. The lack of correlation between CKR expression and the corresponding CK binding of fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6CKine, pointed to the importance of other regulatory pathways. Moreover, we demonstrated for two of these CKs, fractalkine and 6CKine, lymphocyte recruitment and angiogenesis were clearly EC line-restricted.

This unique cellular model used in this work evidenced the role of chemokines in conferring organospecificity and the endothelium potential for site-targeting.

Keywords : chemokine . chemokine receptors . endothelium . adhesion . organo-specificity angiogenesis

Introduction

Responses to tissue damage, infection or immune reactions require orchestrated molecular events as a result from a multistep process [1] which controls the highly specific and regulated leukocyte recruitment. The activation of ECs upregulates [2] a number of inducible cell adhesion molecules such as selectins, and integrins, and soluble factors as cytokines and CKs. These all contribute to this chronologically controlled cascade of events [3].

The homing selectivity of invasive cells, pathological or not, depends on the specificity of the receptors expressed and controlled on the endothelium by microenvironment. Among the molecules which confer the endothelium specificity there are CKs and their receptors which both participate to the adhesion cascade. It has been reported that CKs play an important role in making

recognition specific [4]. They have complex properties such as chemoattractants [5], but also as adhesion molecules [6], as angiogenic factors [7] and viral infection-suppressive factors [8]. They are often upregulated by environmental stimuli during inflammation, cancer and other pathological situations. Their activity is described as being essentially mediated and signalled by their binding to seven-transmembrane-domain G protein-coupled receptors [9].

To elucidate the molecular mechanisms which confer on endothelium its organo-selectivity and makes the endothelial cells the decision makers for cell and tissue invasion, we have designed an *in vitro* cellular model. We immortalized ECs from distinct organ- and vessel type- origins and stabilised their phenotype [10]. To approach the lymphocyte homing molecular process, the model lines were made from peripheral lymph nodes (HPLNEC.B3) as

opposed to mucosal tissue-associated high endothelial cells (HAPEC.1) and were compared mesenteric lymph nodes (HMLNEC). These represent the main secondary lymphoid organs to which lymphocyte subpopulations are routing and differentially homing [11]. We compared them to non lymphoid endothelial cells from skin (HskMEC) and brain (HBrMEC) microvasculature because of their common embryonic lineage but distinct maturation which results in distinct biological behaviors.

To test the hypothesis that cell homing specificity could partly result from CKs if their expression and action are restricted in an organ-selective way, we investigated the distribution of CKRs and the binding of their corresponding CK ligands.

This study concerns four CKRs (CX3CR1, CXCR4, CCR5 and CCR7) and their respective ligands (fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6CKine) chosen because of their implication in lymphocyte homing. Indeed, it has been reported that fractalkine (CX3CL1), a transmembrane CK [12], is expressed in mucosal sites such as the intestine or appendix. Fractalkine interacts with its receptor, CX3CR1 on leukocytes to induce firm adhesion [6] [13].

The 6CKine CK, also called SLC (Secondary Lymphoid tissues Chemokine), Exodus-2, and CCL21, is constitutively expressed in the secondary lymphoid tissues such as lymph nodes, appendix, and spleen [14]. It is the functional ligand for CCR7 [15], a receptor which is highly expressed in various lymphoid tissues and on blood T and B lymphocytes [16].

CKRs, such as CXCR4, CCR5 with their respective ligands SDF1 α and RANTES, which are involved in various processes such as leukocyte recruitment [17], intercellular communication in brain and HIV infection [18].

This paper demonstrates that CKR expression did not correlate with the level of binding of their respective ligands. Moreover, we showed that CK action is endothelial cell origin-selective. This could be evidenced and measured by their ability to activate EC adhesion in a CK selective way. As shown here by the action of the 6CKine towards HPLNEC.B3 and of the fractalkine towards HAPEC.1. While RANTES displayed a unrelated but specific activity and SDF-1 α was not involved in adhesion activation at all.

Angiogenesis induced by the CKs activity towards endothelial cells confirmed the observed selectivity

by which a CK acts in an EC type restricted way. As an example here, the fractalkine pro-angiogenic activity is selective for mucosal and skin-derived EC line.

As such, the behavior of these CKs and their receptors are consistent with the endothelium organo-specificity hypothesis [10].

Materials and methods

Endothelial cell lines

The five immortalized endothelial cell lines used in this study display the general endothelial characteristics, as compared to *in vivo* endothelium phenotype (the presence of angiotensin converting enzyme ACE, von Willebrand factor or VE-cadherin) [10]. Three lines from secondary lymphoid organs and two lines isolated from non lymphoid tissues were compared.

The three lines from lymphoid organs are:

HAPEC.1 : Human Appendix Endothelial Cells

HPLNEC.B3 : Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells

HMLNEC : Human Mesenteric Lymph Nodes Endothelial Cells and two lines from non-lymphoid organs

and two lines from non lymphoid organs are:

HBrMEC : Human Brain Microvascular Endothelial Cells

HskMEC : Human Skin Microvascular Endothelial Cells

Endothelial cell culture

Cells were cultured in OptiMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2% fetal bovine serum (BioWest, AbCys, Paris, France), 40 μ g/mL gentamycin (Invitrogen), and 50 ng/mL fungizone (Invitrogen). Cells were seeded at 2×10^4 cells/cm², 48 hours before the experiment. Cells were maintained at 37°C under a 5% CO₂/95% air atmosphere and after 24 hours, cells were placed in a serum- and antibiotic-free medium.

Reagents and antibodies

The recombinant human CKs : fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6CKine were from R&D systems (Abingdon, UK). Goat IgG anti-human CK

polyclonal antibodies, i.e. anti-fractalkine, anti-SDF-1 α , anti-RANTES and anti-6Ckine, were from R&D systems. Secondary antibody was FTC-rabbit IgGs anti-goat IgGs (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Rabbit polyclonal Igs anti-human CX3CR1 was from eBioscience (San Diego, CA). Mouse IgGs monoclonal antibodies anti-human CKRs i.e.: CXCR4, CCR5 were from BD Pharmingen (San Diego, CA). Mouse monoclonal IgGs anti-human CCR7 was from R&D systems. For flow cytometry analysis, secondary antibodies were FTC-goat Igs anti-mouse IgGs (Sigma-Aldrich) and FTC goat IgGs anti-rabbit IgGs (Pharmingen). For western blotting analysis, the secondary antibodies were AP (alkaline phosphatase) coupled goat Igs anti-mouse IgGs (Sigma-Aldrich) and AP-goat IgGs anti-rabbit IgGs (Biorad, Hercules, USA).

Detection of chemokine receptors and chemokines in endothelial cells

Chemokine receptors detection

About 5×10^6 cells were washed twice with c- PBS (complete Phosphate Buffered Saline) (1M CaCl₂, 0,5M MgCl₂)-0.5% BSA (bovine serum albumin) w/v (Sigma-Aldrich)-0.1% NaN₃ w/v (Merck-Eurolab, Strasbourg, France). ECs were detached from 75 cm² cultured plates by 0.5 mg/mL type-I collagenase (Invitrogen) in a c-PBS-0.5%BSA (w/v) solution. After washings with c-PBS, cells were incubated in the presence of 5 μ g/mL of primary antibody against human CKRs for 30 minutes at 37°C and then fixed by a 2% (w/v) PFA (paraformaldehyde, Merck-Eurolab) solution in c-PBS for 10 minutes at 37°C. The reaction was stopped by washings with c-PBS solution and cells were incubated with 0.2M urea (Merck-Eurolab) in c-PBS for 10 min at room temperature and washed, then incubated with FTC-goat Igs anti-mouse IgGs (20 μ l of a 1/100 dilution in c-PBS) for 30 minutes at 4°C.

For total cell CKRs detection, cells were permeabilized with 1% (w/v) PFA-0.2% (w/v) saponine (Merck-Eurolab) in c-PBS before incubation with primary antibodies. Further washings and incubations were performed in 0.2 % saponine solution in c-PBS.

Chemokine binding and presentation by endothelial cells

Cells were prepared as described above for CKRs detection and then incubated v/v with the studied CK for 30 minutes at 37°C. Cells were washed and fixed as described before. Then, cells were incubated with 500ng/mL goat IgGs anti-human CK antibodies for 30 minutes at 37°C. Bound CK detection was achieved by a third incubation in the presence of FTC-rabbit IgGs anti-goat IgGs (20 μ l of 1/200 dilution) for 30 minutes at 4°C.

For total cell CK fixation, cells were permeabilized with 1% (w/v) PFA-0.2% (w/v) saponine (Merck-Eurolab) in c-PBS before incubation with the CKs.

Western blotting analyses

Cells were lysed with a 10mM Tris-1% SDS solution and protein concentration was normalized by determination of the total protein amount using the BCA method. Per lane, 25 μ g of total protein extract was allowed to migrate in sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After migration, proteins were blotted to nitrocellulose membrane by electro-transfer. Proteins were detected by staining the membrane using specific AP-coupled antibodies against CKRs followed by colorimetric detection. Revelation was obtained by addition of the reaction substrate: NBT/BCIP: (Nitroblue Tetrazolium /Bromochlorylindolophosphate) mixture (Promega, Madison, USA).

Endothelial cell stimulation by chemokines and adhesion

ECs were seeded in 24-well plates (Falcon, Grenoble, France) at 2×10^4 /cm². After 48 hours of culture, ECs were stimulated by increasing concentrations of CKs (fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6Ckine) for 90 minutes up to 5 hours. After stimulation, cells were washed twice with PBS and incubated (20 minutes at 4°C) with a previously PKH26-labeled CEMT4 lymphocyte suspension in a ratio of 5 lymphocytes to one EC. After gentle washings to protect the lymphocytes specifically bound to endothelial cells, cells were detached by a trypsin/EDTA solution, washed and analysed by flow cytometry as described below.

Flow cytometry analyses

The results were analysed by flow cytometry on a FACS Sort (BD, Sunnyvale, CA, USA). Data were collected on ten thousand cells (gated by forward and side scatters). Mean channels of fluorescence intensity were calculated with the use of CellQuest software (Becton Dickinson).

For CK fixation and CKR detection, FTC antibodies (λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 520nm) were used to analyse the results in relative fluorescence intensity rFI.

For adhesion experiments, the ratio of PKH labeled-CEMT4 and non-labeled endothelial cells was evaluated after excitation at 488 nm and emission at 560 nm. The results were expressed as the number of CEMT4 per 100 ECs.

Angiogenesis : "in vitro" assay

Angiogenesis was performed on Matrigel™-coated 24-well plates (BD Biosciences). The matrigel contains extracellular matrix proteins and growth factors which enable ECs to spontaneously form pseudo-vessels. After coating, cells were seeded at 5×10^4 cells per well. Once adhesion on the matrix had been achieved, cells were incubated in the presence of CKs dissolved in OptiMEM at recommended concentrations. The rearrangement of the cells and pseudo-vessels formation were followed under the inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss). The qualitative analysis consisted in taking pictures at several time lapses and to compare them to the controls performed in the absence of CKs and thus evaluating their effect on vessel formation.

Results

Endothelial cells express CX3CR1, CXCR4, CCR5 and CCR7.

CKRs on ECs were detected by specific antibodies on fixed and permeabilized ECs as shown in Fig. 1 which shows data from cytochemical labeling and flow cytometry detection. Results are expressed as the relative fluorescence intensity calculated from the difference between sample FI minus the isotopic control. All four receptors were detected in every EC line but their expression level varied according to the EC line origin. Fig. 1 A represents the detection of

CKRs on the cell surface (fixed cells). CX3CR1 was highly expressed on the three lymphoid organ derived cells and on skin cells but poorly on brain EC. Fig. 1 B confirms the poor expression of CX3CR1 in brain and its high expression on HMLNEC. CXCR4 was the main receptor detected in large quantities in all five lines. CCR5 is expressed in HPLNEC.B3 where it is more expressed than in mucosal and mesenteric ECs. It is poorly expressed in non lymphoid organ ECs (skin and brain). CCR7 was also expressed in the five lines but most intensely on the HMLNEC and on the HSkMEC surface.

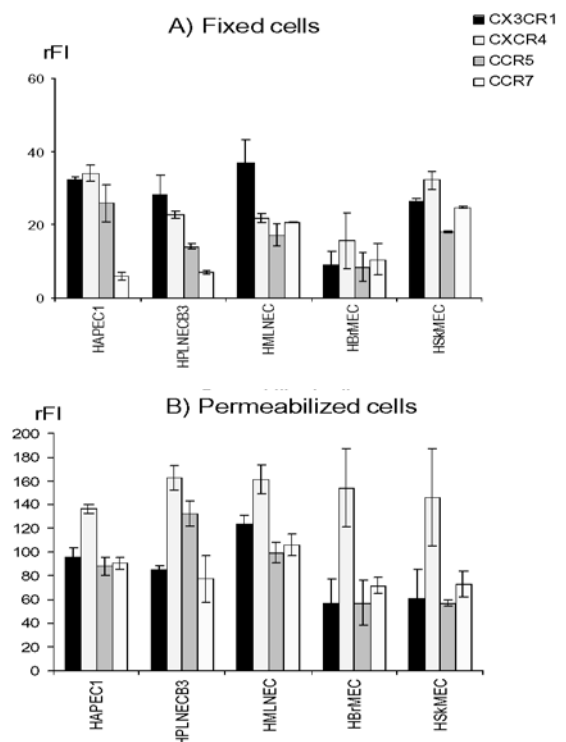


Figure 1. Endothelial chemokine receptors : distinct expression levels according to the endothelium origin. (A) cell surface detection of chemokine receptors on fixed HAPEC.1, HPLNEC.B3, HMLNEC, HBrMEC and HSkMEC. and (B) detection of global amount of chemokine receptors after permeabilization. The results are expressed as the relative fluorescence intensity (rFI), data are from a typical experiment in triplicate.

It should be noted that total receptor detection in ECs (Fig.1B) as obtained after saponine permeabilisation, indicated that the highest overall expression was observed for CXCR4 and the expression in the five EC lines appeared significantly more intense inside the cells than on the surface (from 3 to 10 times).

Chemokines bind to and are presented by endothelial cells

In order to establish the link between receptor expression and the binding capacity of CKs by ECs, we have studied the CKs corresponding to the selected receptors, i. e.: fractalkine, SDF-1 α , 6Ckine, RANTES. The ability of CK molecules to bind ECs was assessed after CKs had been incubated with ECs as described in materials and methods.

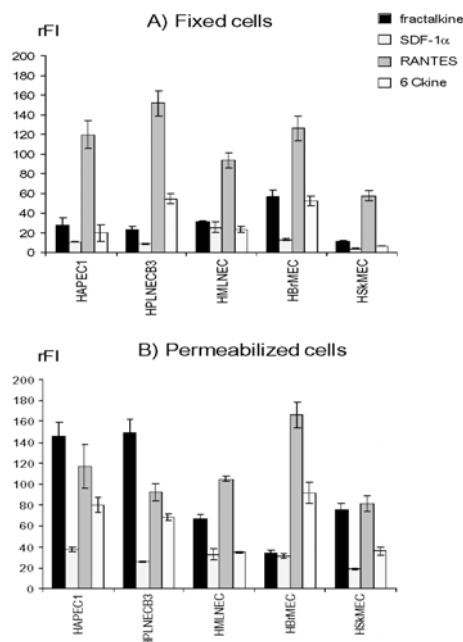


Figure 2. Chemokine binding varies as a function of the endothelial cell origin, on fixed cells (A) and in permeabilized cells (B). Chemokine binding was detected by their specific antibodies analyzed by flow cytometry. Results give the relative fluorescence intensity (rFI). The data are from a typical experiment in triplicate.

The data shown in Fig. 2 express the rFI of ECs to which CKs have been allowed to bind and were then detected on the cell surface (Fig. 2 A). The five EC lines bound mainly RANTES and poorly SDF-1 α , as opposed to the distribution expected from the receptor detection data. Lymphoid organ-derived cells bound differently the 6Ckine which was mainly recognized by HPLNEC.B3. While HBrMEC bound 6Ckine efficiently on the cell surface (Fig. 2A), permeabilized cells (Fig. 2B) displayed high amounts

of the bound cytokine in HPLNEC.B3, HAPEC.1 and HBrMEC. Fractalkine was mainly evidenced to bind the brain derived cell surface while it was preferentially found to bind mucosal and peripheral lymphoid organ permeabilised ECs. In a general approach, CK binding was higher in permeabilized cells than in fixed cells. This was especially true for fractalkine (Fig 2B) and to a lesser extent, for 6Ckine. RANTES presented approximately the same binding level on fixed cells and after cell permeabilization. SDF-1 α bound poorly both to the surface and inside each EC line tested. Considering the fact that CKs were able to bind each EC line tested but with distinct binding profiles, it was not possible to draw any clear relation between the CKs binding (Fig 2) and the receptor expression (fig 1), as detected by flow cytometry.



Figure 3. Western blotting for chemokine receptors. Chemokine receptors CX3CR1, CXCR4, CCR5, CCR7, were detected on HPLNEC.B3 and HBrMEC with specific antibodies and revealed by PA-colorimetric reaction from 25 μ g of total protein. A triple band was revealed around 36.4kD and corresponds to chemokine receptor Mr.

Western blotting for chemokine receptors confirms the CKR presence detected by flow cytometry

We completed these analyses by biochemical detection of CKRs. The results are illustrated by HPLNEC.B3 and HBrMEC and presented in the Fig. 3. As demonstrated here with these two lines, the four CKRs were detected as a triple band close to 36,4 kDa. This triplet can be attributed to the original form and the truncated forms of the chemokine receptor. The four receptors were present in the five tested endothelial cell lines (data not shown) and this corroborates the results obtained by flow cytometry analyses.

Chemokine-mediated endothelial cell specific modulation of CEMT4 adhesion

The biological significance of CK selective distribution and expression as well as restricted binding to ECs was assessed by estimation of their putative effect in the leukocyte to EC adhesion process. For this assay, ECs were exposed to CKs for various periods of time and this was followed by an adhesion test as described under materials and methods. We analysed the lymphocyte adhesive behavior towards the three EC lines from lymphoid tissues: peripheral, mucosal, mesenteric and the two from non lymphoid organs, brain and skin. The results are shown in Fig. 4. Upon stimulation by fractalkine, HAPEC.1 (Fig 4A), displayed a significantly increased adhesion capacity for CEMT4 cells. This effect is restricted to fractalkine and is clearly enhanced by a five-hour stimulation by the chemokine. Whereas 6Ckine provoked a very small increase, SDF-1 α and RANTES have no effect on the mucosal derived EC line (HAPEC.1). The lymphocyte recruitment increase was time- and CK concentration-dependent : a maximal effect was obtained after a 5-hours stimulation with a 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fractalkine solution. In Fig.. 4B, HPLNEC.B3 were shown to display a 6Ckine specificity. The greatest CEMT4 adhesion was obtained after 5 hours in the presence of 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6Ckine solution. Although RANTES significantly increased the CEMT4 adhesion after 90 min., this effect disappeared 5 hours later. Fractalkine and SDF-1 α had no effect towards PLN derived ECs. In the case of HMLNEC (Fig 4C), we observed a mixed profile and a reduced activation effect of CKs as compared to peripheral lymphoid or mucosal derived ECs. Indeed, fractalkine, 6Ckine and RANTES were able to slightly increase the lymphocyte recruitment after a 90-min. incubation with fractalkine (0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 6Ckine (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and, after a 5-hour incubation with RANTES (0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

An opposite effect was observed only with SDF-1 α , which reduced the adhesion in the three lymphoid cell lines tested, whatever the concentrations and incubation times. Interestingly, the EC lines from brain and skin were not significantly affected by CK in their lymphocyte binding activity.

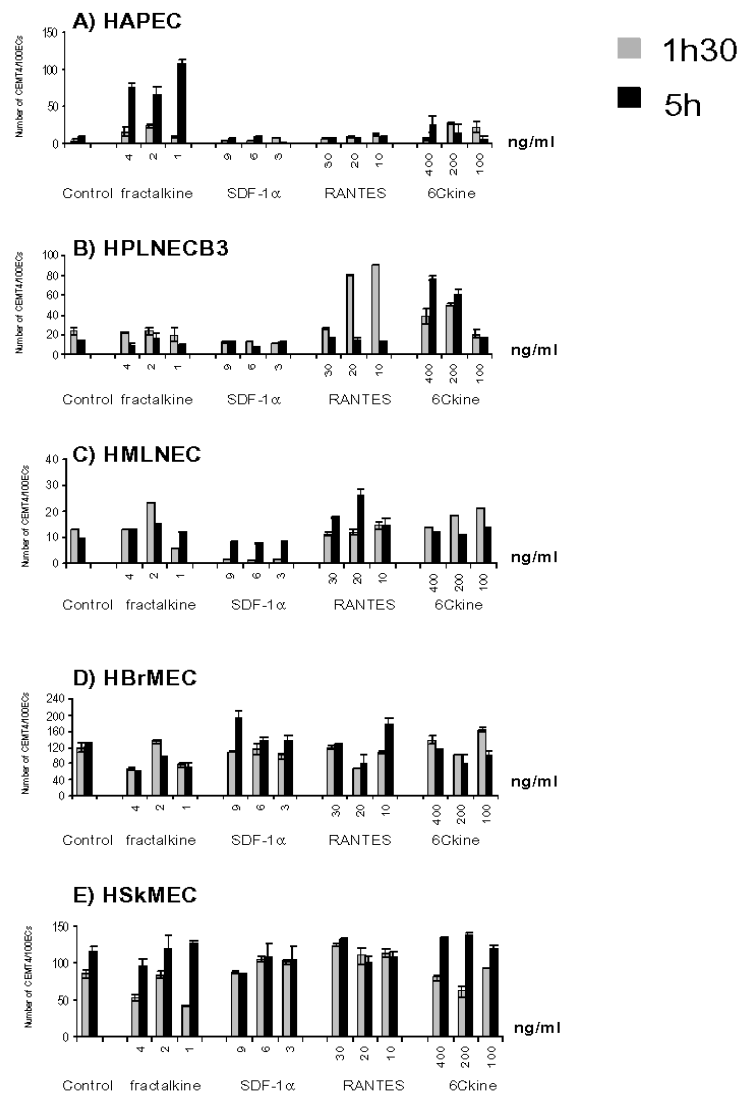


Figure 4. Chemokines selectively regulate endothelial cells adhesion capacity. Lymphocyte adhesion on HAPEC1 (A), HPLNEC.B3 (B), HMLNEC (C), HBrMEC (D) and HSkMEC (E) was estimated after stimulation by fractalkine, SDF1 α , RANTES and 6Ckine. Endothelial cell adhesion-capacity towards CEMT4 lymphocytic cells was quantified by flow cytometry. Data are given as the number of PKH 26 labelled CEMT4 (FL2) bound per one endothelial cell. Data are from a typical experiment conducted in triplicate

As shown in Fig. 4 D, after a 90-minute stimulation by fractalkine (at 0.001 and 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RANTES (at 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a decrease in the adhesion capacity could be observed for HBrMEC. No significant effect was seen for the other CKs except SDF-1 α (5 hours incubation, 0.009 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RANTES (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in which case a small increase in the adhesion level was observed. Similarly, HSkMEC (Fig. 4E), submitted to a 90 minute stimulation by fractalkine (at 0.001 and 0.004

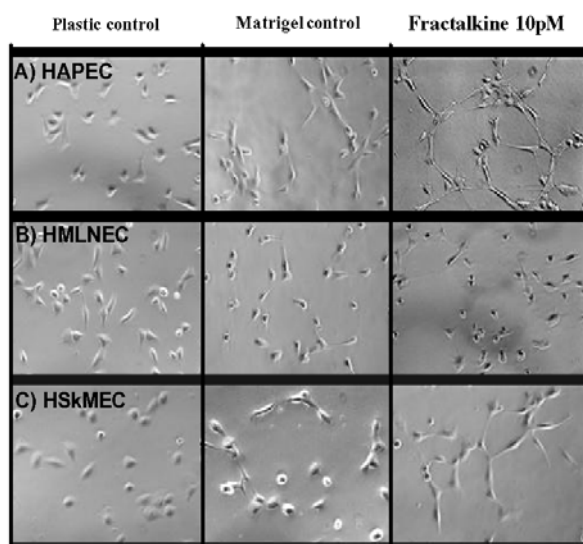
µg/mL), displayed a weak decrease in adhesion after treatment as observed above with HBrMEC. An increase was noticed with SDF-1α (at 0.003 and 0.006 µg/mL) and RANTES (at the three tested concentrations) but no significant effect with 6Ckine. After, 5 hours of stimulation, there was no significant effect of CKs except a 6Ckine induced increase in the adhesion level.

Fractalkine specifically modulates angiogenesis in vitro

We have realized a series of angiogenesis experiments conducted to detect the possible pro or anti angiogenic properties of CK as a function of the CK type as well as the EC type and origin. The results are illustrated here by fractalkine and its effect on the kinetics of endothelial cell angiogenesis (Fig. 5).

Compared to the control on matrigel without chemokine, the presence of fractalkine at 10pM (85pg/ml) significantly favoured the formation of pseudo-vessels for HAPEC.1 and HSkMEC whereas there is no significant effect on HMLNEC. Fractalkine had no effect on HPLNEC.B3 but can weakly accelerate the rearrangement of HBrMEC (data not shown).

Figure 5 : Fractalkine acts specifically on



angiogenesis of HAPEC.1 and HSkMEC. After 5 hours in the presence of fractalkine at 10pM, the rearrangement of cells and formation of pseudo-vessels of HAPEC.1 (A), HMLNEC (B) and HSkMEC (C) were followed and compared to the control without chemokine.

Discussion

This work confirms that both the expression of CKRs and the binding and activities of CKs to ECs, provide new insights to explain endothelium organospecificity and cell homing specificity and may contribute to endothelium-based cell immunotherapy [19].

Flow cytometry experiments to detect CKRs showed that the presence or absence of CKRs on ECs cannot directly explain this specificity. Indeed, the CKRs investigated in this study were expressed in all EC lines even though the expression levels differed according to endothelium origin. The presence of the receptors in all endothelial cell lines was confirmed by western blotting analyses. CKs are able to dimerize in order to bind both EC and leukocyte CKRs [20]. Consequently, their receptor, in addition to signal transduction, can serve as a means to present the CK active site to other cell surface receptors. Here, we observed that the measured amounts of bound CKs did not correlate with the level of expression of their corresponding receptors (for example, SDF-1α was poorly bound and CXCR4 was highly expressed). This rules out the dimerization mechanism for SDF-1α to be a binder to both EC and leukocytes. It suggests that, while CK receptors could represent the signal transduction pathway, they might not be the only means for CK presentation. Such a lack of correlation between receptors expression and CKs binding activity to EC lines was also observed for the fractalkine and CX3CR1, RANTES and the CCR5 as well as 6Ckine and CCR7. This, consequently, suggests the role of glycosaminoglycans (GAGs) in the presentation and action of CKs, which is under active investigation for its high significance during invasive processes. As cited above, the biological activity of CKs is mediated via seven transmembrane receptors (coupled to G-proteins) on ECs and other cell types (like leukocytes) but their activity is also influenced by their association with GAGs [21]. Indeed, GAGs are components of the extracellular matrix and cell surfaces. They can act as an antenna to concentrate the CKs close to the receptor, thus participating in the formation of the cell surface chemotactic gradient. Moreover, GAGs help to present CKs to specific cell surface receptors and permit their protection from proteolytic degradation [22]. As it has been shown that the composition of cell surface GAGs depends on

the location and the type of endothelium, GAGs may contribute to the selectivity of leukocyte recruitment by controlling the type of CK which are able to bind on specific GAGs and as such participate in the selectivity of the microenvironment in organospecific endothelium. Their role in the biological CK activities must be investigated.

The chemokine stimulation data partially validated the endothelium organospecificity hypothesis because it stimulated both a chemokine- and endothelial cell-specific response. More precisely, 6Ckine specifically acted on peripheral lymph node EC (HPLNEC.B3) to increase the adhesion capacity towards CEMT4 lymphocytes ; fractalkine specifically acted on mucosal endothelial cells – HAPEC.1 – to produce a similar effect towards CEMT4 lymphocyte recruitment. HMLNEC, as the representative EC line for mesenteric lymph nodes, showed an intermediate response to both fractalkine and 6Ckine while RANTES acted on both the peripheral node- and mesenteric node-derived EC. The two non lymphoid organ-derived lines, HSkMEC and HBrMEC, did not display any specificity for CKs. Indeed, the extent of the CK effect observed on these endothelial cells is negligible compared to the high effect of the same CKs on lymphoid-derived endothelial cells.

In terms of angiogenesis, it seems that chemokines are able to accelerate the kinetics of the pseudo-vessels formation on specific endothelial cell lines. This is illustrated here by the specific action of fractalkine on HAPEC.1 and HSkMEC which clearly favour angiogenesis in this *in vitro* assay. Fractalkine is expressed in mucosal sites but its presence has been detected in brain [23] and skin [24] where it can act as a signal molecule in intercellular communication within these organs.

These results suggest various possible mechanisms for CKs action. They could induce adhesion molecules expression [25] or CKRs as well as *de novo* CK secretion by endothelial cells [26]. Moreover the CKs used in the assays could work as adhesion molecules by themselves (i.e fractalkine for example [27]). While fractalkine, RANTES and 6Ckine clearly increased the adhesion activity of distinct EC, the SDF1 α was only able to lower it. These various possibilities for CK binding and presentation suggest that CKs play a crucial role in the recognition of circulating cells by ECs. Although the chronological sequence of events is not yet

established, we know that EC activation by CEMT4 lymphocyte adhesion did not stimulate CKs themselves, nor CKR expression (data not shown). CKs and their receptors may act in early steps of the recognition process or control early adhesion signals [28]. Further work will contribute to defining the molecular cascade of events which intervene in the cell recognition process to approach the actors of the specificity and help define site-targeted therapies.

Acknowledgments

This work was supported by a Biotechnocentre grant CK 2002; KNB grant 3P05A0625 and grant from Jérôme Lejeune Fondation.

CC is CIFRE fellow (Solabia, Bioeurope, French ministry of education); NL is a fellow from the Ligue Nationale contre le Cancer; MM is AI CNRS; MP is an assistant PAN, Poland; Special thanks to Danuta Dus, Poland, for her remarks and suggestions.

CK is research director CNRS.

References

- [1] E.C. Butcher, Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity, *Cell* 67 (1991) 1033-1036.
- [2] E.C. Butcher, L.J. Picker, Lymphocyte homing and homeostasis, *Science* 272 (1996) 60-66.
- [3] T.A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* 76 (1994) 301-314.
- [4] B.J. Rollins, Chemokines, *Blood* 90 (1997) 909-928.
- [5] M. Nagira, T. Imai, R. Yoshida, S. Takagi, M. Iwasaki, M. Baba, Y. Tabira, J. Akagi, H. Nomiyama, O. Yoshie, A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells, *Eur J Immunol* 28 (1998) 1516-1523.
- [6] A.M. Fong, L.A. Robinson, D.A. Steeber, T.F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, D.D. Patel, Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow, *J Exp Med* 188 (1998) 1413-1419.
- [7] M.V. Volin, J.M. Woods, M.A. Amin, M.A. Connors, L.A. Harlow, A.E. Koch, Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis, *Am J Pathol* 159 (2001) 1521-1530.
- [8] J.M. Burns, G.K. Lewis, A.L. DeVico, Soluble complexes of regulated upon

- activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and glycosaminoglycans suppress HIV-1 infection but do not induce Ca(2+) signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 14499-14504.
- [9] C. Gerard, N.P. Gerard, The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte, *Curr Opin Immunol* 6 (1994) 140-145.
- [10] C. Kieda, M. Paprocka, A. Krawczenko, P. Zalecki, P. Dupuis, M. Monsigny, C. Radzikowski, D. Dus, New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes, *Endothelium* 9 (2002) 247-261.
- [11] E.C. Butcher, R.G. Scollay, I.L. Weissman, Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules, *Eur J Immunol* 10 (1980) 556-561.
- [12] J.F. Bazan, K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, T.J. Schall, A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif, *Nature* 385 (1997) 640-644.
- [13] T. Imai, K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, O. Yoshie, Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion, *Cell* 91 (1997) 521-530.
- [14] M. Nagira, T. Imai, K. Hieshima, J. Kusuda, M. Ridanpaa, S. Takagi, M. Nishimura, M. Kakizaki, H. Nomiyama, O. Yoshie, Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13, *J Biol Chem* 272 (1997) 19518-19524.
- [15] R. Yoshida, M. Nagira, M. Kitaura, N. Imagawa, T. Imai, O. Yoshie, Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7, *J Biol Chem* 273 (1998) 7118-7122.
- [16] V.L. Schweickart, C.J. Raport, R. Godiska, M.G. Byers, R.L. Eddy, Jr., T.B. Shows, P.W. Gray, Cloning of human and mouse EB1, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2, *Genomics* 23 (1994) 643-650.
- [17] S.K. Gupta, P.G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein, J.M. Stadel, Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines, *J Biol Chem* 273 (1998) 4282-4287.
- [18] M. Minami, M. Satoh, [Chemokines as mediators for intercellular communication in the brain], *Nippon Yakurigaku Zasshi* 115 (2000) 193-200.
- [19] A. Bielawska-Pohl, C. Crola, A. Caignard, C. Gaudin, D. Dus, C. Kieda, S. Chouaib., Human natural killer cells kill organo-specific endothelial cells : analysis of the adhesion and cytotoxic mechanisms., (2004).
- [20] M. Baggiolini, B. Dewald, B. Moser, Human chemokines: an update, *Annu Rev Immunol* 15 (1997) 675-705.
- [21] S. Ali, A.C. Palmer, B. Banerjee, S.J. Fritchley, J.A. Kirby, Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans, *J Biol Chem* 275 (2000) 11721-11727.
- [22] G.S. Kuschert, F. Coulin, C.A. Power, A.E. Proudfoot, R.E. Hubbard, A.J. Hoogewerf, T.N. Wells, Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses, *Biochemistry* 38 (1999) 12959-12968.
- [23] J.K. Harrison, Y. Jiang, S. Chen, Y. Xia, D. Maciejewski, R.K. McNamara, W.J. Streit, M.N. Salafra, S. Adhikari, D.A. Thompson, P. Botti, K.B. Bacon, L. Feng, Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10896-10901.
- [24] M. Sugaya, K. Nakamura, H. Mitsui, T. Takekoshi, H. Saeki, K. Tamaki, Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1, *J Dermatol Sci* 31 (2003) 179-187.
- [25] C. Weber, J. Kitayama, T.A. Springer, Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 10939-10944.
- [26] J.J. Campbell, J. Hedrick, A. Zlotnik, M.A. Siani, D.A. Thompson, E.C. Butcher, Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions, *Science* 279 (1998) 381-384.
- [27] C.A. Haskell, M.D. Cleary, I.F. Charo, Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion, *J Biol Chem* 275 (2000) 34183-34189.
- [28] J.J. Campbell, E.C. Butcher, Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing, *Curr Opin Immunol* 12 (2000) 336-341.

2.2 Présentation des résultats complémentaires et non présentés dans l'article

2.2.1 La détection des récepteurs de chimiokines par Western blot

Les 4 récepteurs de chimiokines ont été détectés par Western Blot dans les 5 lignées de cellules endothéliales.

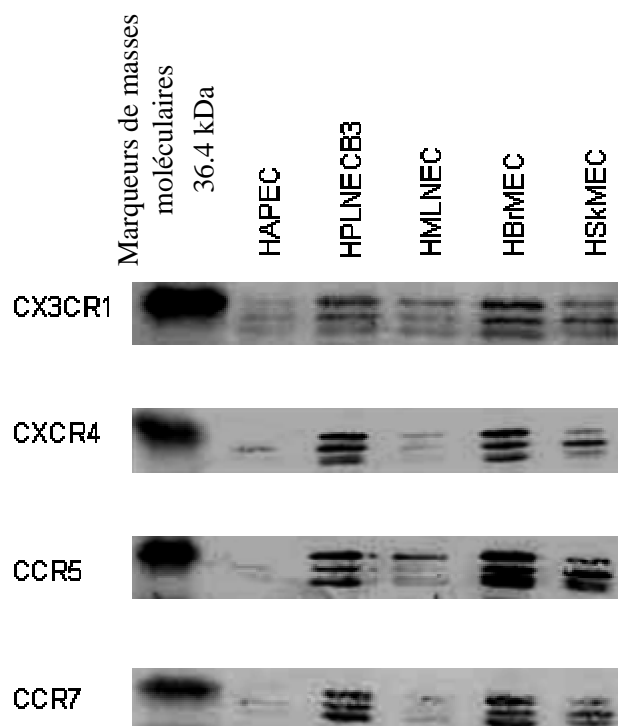


Figure 3 : Détection des récepteurs de chimiokines par western blot

La présence de récepteurs de chimiokines dans les 5 lignées étudiées (figure 3) confirme les résultats obtenus par cytométrie de flux. Les récepteurs de chimiokines ont une masse moléculaire d'environ 40 kDa. Ici, on détecte un triplet de masse moléculaire proche de 36.4 kDa. Une des trois bandes observées peut correspondre à la forme originale, les deux autres bandes peuvent être des formes tronquées du récepteur.

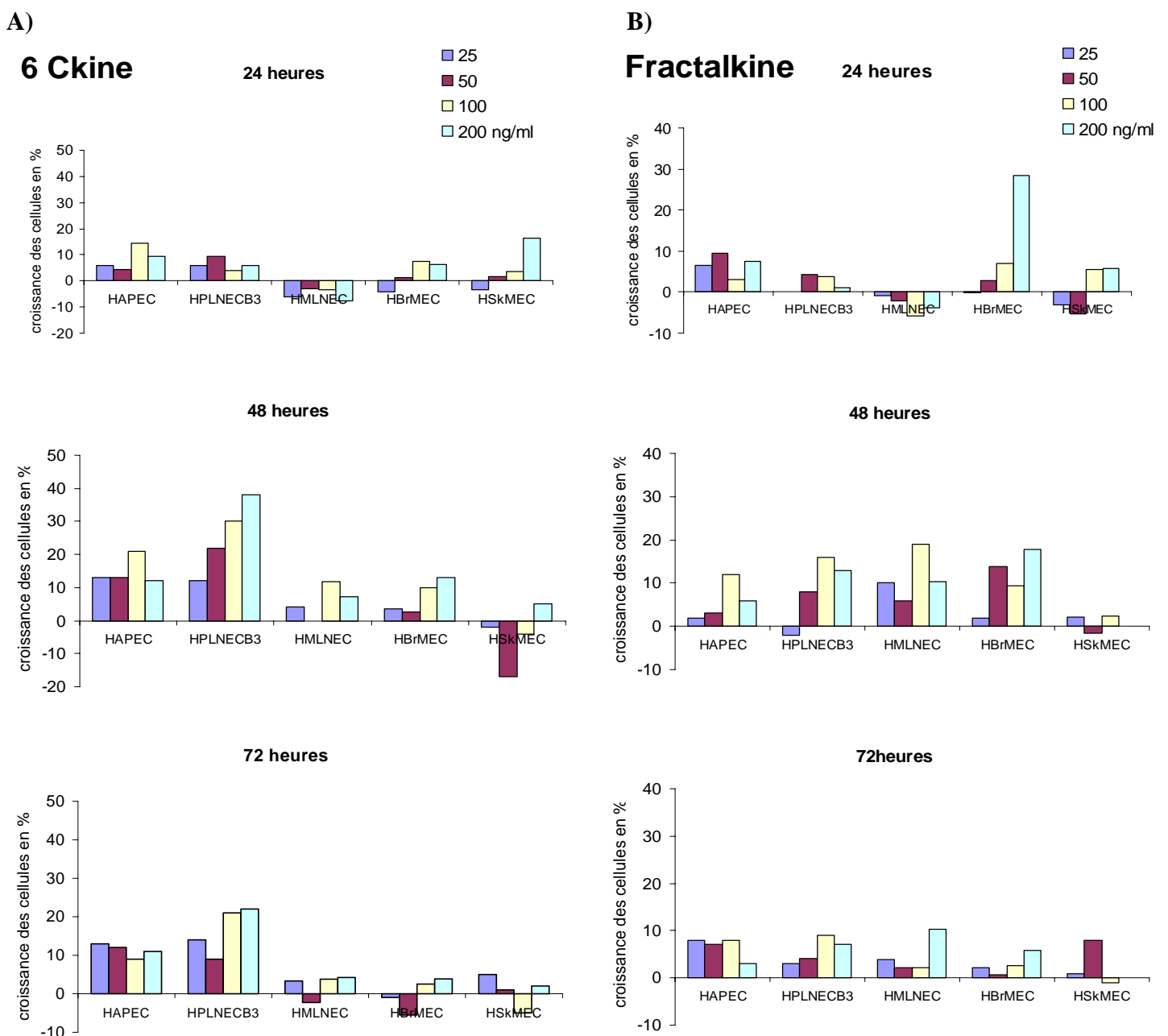
Les détections par western blot valident de façon qualitative la présence des récepteurs dans toutes les lignées bien que les niveaux d'expression ne corrélaient pas avec ceux détectés par les expériences de cytométrie. En effet, les intensités des bandes observées pour les lignées HAPEC et HMLNEC sont faibles par rapport aux taux d'expression observés en cytométrie de flux. Dans d'autres expériences, nous avons détecté dans ces deux lignées la présence de ces récepteurs à des taux corrélant avec ceux observés en cytométrie. Cela est probablement

dépendant, entre autres, de l'état de la cellule endothéliale (activée ou non) et du nombre de passages effectués.

2.2.2 Action des chimiokines sur la croissance des cellules endothéliales humaines

A l'aide du marqueur Alamar blue™, nous avons observé les effets des chimiokines sur la croissance des cellules endothéliales durant 72 heures.

Les résultats sont présentés dans la figure 4 et sont exprimés en pourcentage de croissance cellulaire par rapport aux cellules témoins cultivées sans chimiokine.



SD ± 10%

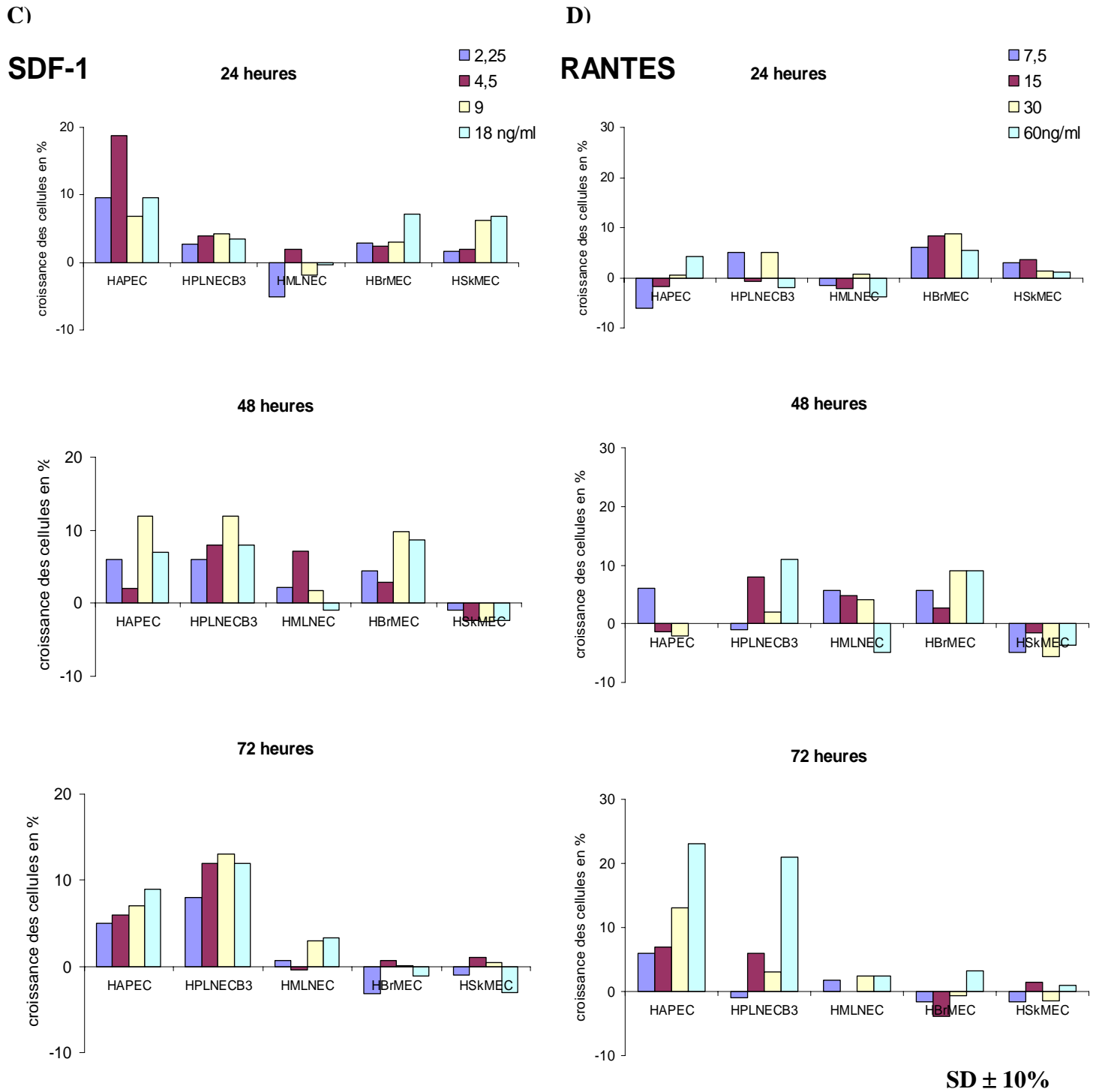


Figure 4 : modulation de la croissance des 5 lignées de cellules endothéliales par la 6Ckine (A), la fractalkine (B), SDF-1 α (C) et RANTES (D) en fonction du temps

La 6Ckine stimule fortement la croissance des cellules de la lignée HPLNECB3 (+ 40% à 200ng/ml) au bout de 48 heures, cet effet étant fonction de la concentration (figure 4A). Elle a un effet modéré sur les HAPEC, HMLNEC, HBrMEC et n'agit pas sur la lignée HSkMEC.

A 72 heures, l'action de la 6Ckine est encore visible sur la lignée HPLNECB3 avec une augmentation de la croissance cellulaire de 20% à 100 et 200ng/ml.

La fractalkine augmente fortement la croissance des cellules de la lignée HBrMEC à 200ng/ml (+30%) après 24 heures de culture (figure 4B). Elle favorise légèrement (+10%) la croissance des cellules de la lignée HAPEC mais ne présente pas d'action significative sur les trois autres lignées. A 48 heures de culture, elle augmente la croissance cellulaire (15 % en moyenne) de toutes les lignées endothéliales excepté HSkMEC. A 72 heures, les effets observés sur la croissance des cellules endothéliales sont moindres sauf un effet demeurant sur les HAPEC.

D'une manière générale, la chimiokine SDF-1 α agit modérément sur la croissance des 5 lignées endothéliales testées (figure 4C). Le taux de croissance moyen est d'environ 10% excepté pour la concentration de 4,5ng/ml sur la lignée HAPEC au bout de 24 heures (20%). A 72 heures, l'effet perdure sur la lignée HAPEC et est maximum sur la lignée HPLNECB3.

Comme pour SDF-1 α , RANTES augmente légèrement la croissance des cellules endothéliales. Contrairement aux autres chimiokines, l'augmentation maximale est observée au bout de 72 heures de culture pour les lignées HAPEC et HPLNECB3, à la concentration de 60ng/ml (+ 20%).

L'effet des chimiokines sur la croissance des cellules endothéliales est spécifique. La 6Ckine favorise clairement la croissance des cellules de ganglions lymphatiques périphériques (HPLNECB3), la fractalkine agit préférentiellement sur HAPEC et HBrMEC durant les 72 heures. Les chimiokines RANTES et SDF-1 α ont des effets plus modérés sur la croissance endothéliales mais semble favoriser la croissance des lignées HAPEC et HPLNECB3.

2.2.3 La modulation de l'angiogénèse par les chimiokines : exemple de la fractalkine

Afin d'analyser les effets de la fractalkine sur la formation de pseudo-vaisseaux *in vitro*, une gamme de concentrations de 10pM à 1µM (85pg/ml à 8.5µg/ml) a été testée sur les lignées HAPEC et HSkMEC.

Les clichés ont été pris au cours du temps (2, 5, 8 et 24 heures). La fractalkine augmente la vitesse de formation des vaisseaux sur ces deux lignées ceci est fonction de la concentration en chimiokine. Nous avons sélectionné les deux concentrations les plus actives 10 et 100pM que nous avons testées conjointement sur les 5 lignées.

Des exemples de photos obtenues après 5 heures d'incubation avec la fractalkine sont présentées dans la figure 5.

La fractalkine accélère fortement le réarrangement des cellules endothéliales d'appendice, HAPEC (figure 5A). Cet effet est particulièrement net quand la concentration en fractalkine est de 10pM : les cellules forment un réseau bien organisé dessinant clairement les futurs pseudo-vaisseaux. Quand la concentration en fractalkine est de 100pM, les cellules se réarrangent moins rapidement. Il y a donc un effet de dose optimale car des doses supérieures semblent ralentir le processus d'angiogénèse et pourraient, à forte concentration, inverser l'action de la chimiokine. Les cellules endothéliales issues de ganglions lymphatiques périphériques, (HPLNECB3), ne sont pas sensibles à la fractalkine : on n'observe pas de différence significative entre le témoin sans chimiokine et en présence de la fractalkine quelle que soit la concentration (figure 5B).

Les cellules endothéliales de la lignée issue des ganglions mésentériques (HMLNEC), montrent une faible sensibilité à la fractalkine : les cellules s'organisent en un début de réseau pour une concentration de 100pM en fractalkine. Il n'y a pas d'effet significatif à la concentration de 10pM qui était la plus active pour les HAPEC (figure 5C).

La fractalkine favorise le réarrangement des cellules endothéliales du cerveau (HBrMEC). En effet, les cellules se sont regroupées comparativement au témoin sans molécule et commencent à s'organiser en réseau dès la concentration de 100pM en fractalkine (figure 5D).

Les effets sont cependant moindres que ceux observés avec les lignées HAPEC et HSkMEC.

La fractalkine a une action significativement positive sur les cellules endothéliales de la peau (HSkMEC) (figure 5E). On observe la formation de réseaux bien organisés en présence de

Culture sur matrigel en présence de fractalkine

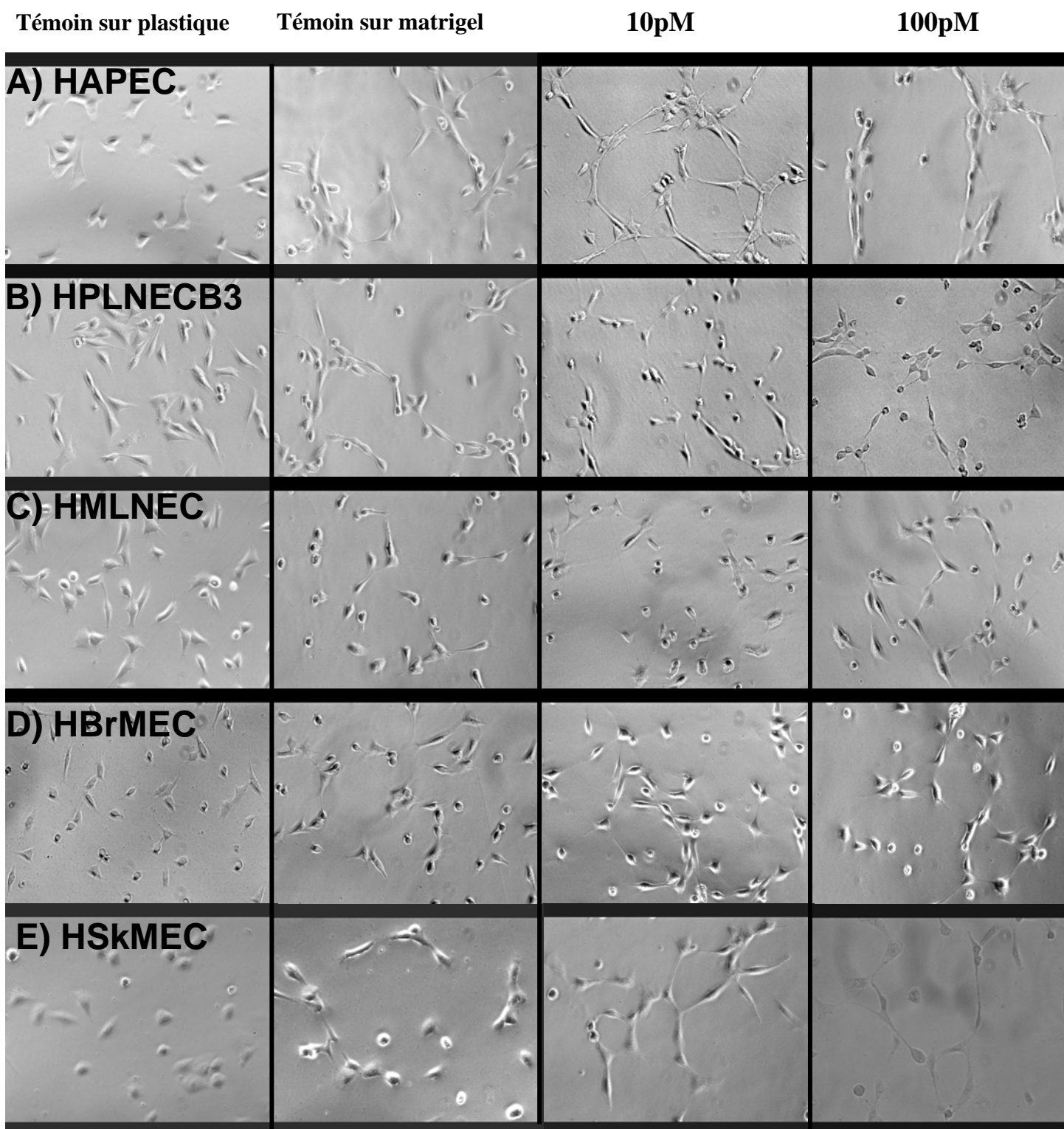


Figure 5 : Modulation de l'angiogénèse *in vitro* par la fractalkine après 5 heures de culture

fractalkine comparativement au témoin sans chimiokine où les cellules commencent à peine à s'allonger et à migrer après 5 heures. La fractalkine agit donc préférentiellement sur les lignées HAPEC et HSkMEC en favorisant la formation de pseudo-vaisseaux *in vitro*.

2.2.4 Ciblage des chimiokines sur les cellules endothéliales en conditions de flux : exemple de la fractalkine

La démonstration d'une spécificité exige que les cellules que l'on veut étudier se trouvent dans des conditions parfaitement comparables. Nos études de ciblage vont alors être réalisées à l'aide de co-cultures de cellules endothéliales afin de permettre à la chimiokine testée de distinguer au sein d'une même culture la présence de son (ses) récepteur(s) parmi les cellules présentes.

En outre, il convient d'éliminer l'éventuelle influence des conditions expérimentales et de s'assurer que le marquage des cellules par le CFDA,SE ne modifie pas les propriétés intrinsèques des cellules endothéliales. Nous avons donc comparé l'adhésion des billes témoins sur une monocouche de cellules endothéliales marquées au CFDA,SE et une monocouche de cellules de la même lignée non marquée. Les résultats obtenus sont illustrés ici par la lignée HAPEC (figure. 6).

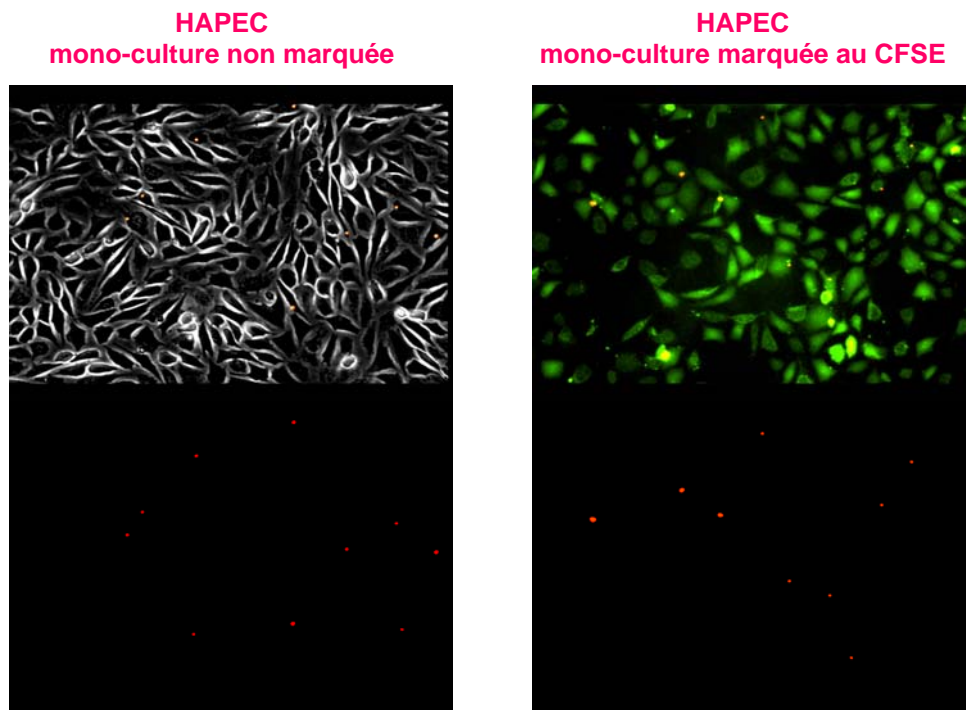


Figure 6 : Contrôle des capacités d'adhésion des cellules HAPEC en mono-culture, marquées ou non au CFDA,SE

Le marquage par le CFSE ne modifie pas les propriétés des cellules endothéliales puisque l'on décompte approximativement le même nombre de billes-témoins dans les deux cas (10 et 9).

Un exemple d'expériences de ciblage de chimiokines en conditions de flux est donné ci-après avec une co-culture des lignées HAPEC et HSkMEC. La fractalkine a été fixée sur des billes et leur adhésion est comparée à celle des billes-témoins (figure 7). Le débit du flux généré est égal à 50 μ l par minute.

Co-culture : HAPEC marquées/ HSkMEC non marquées

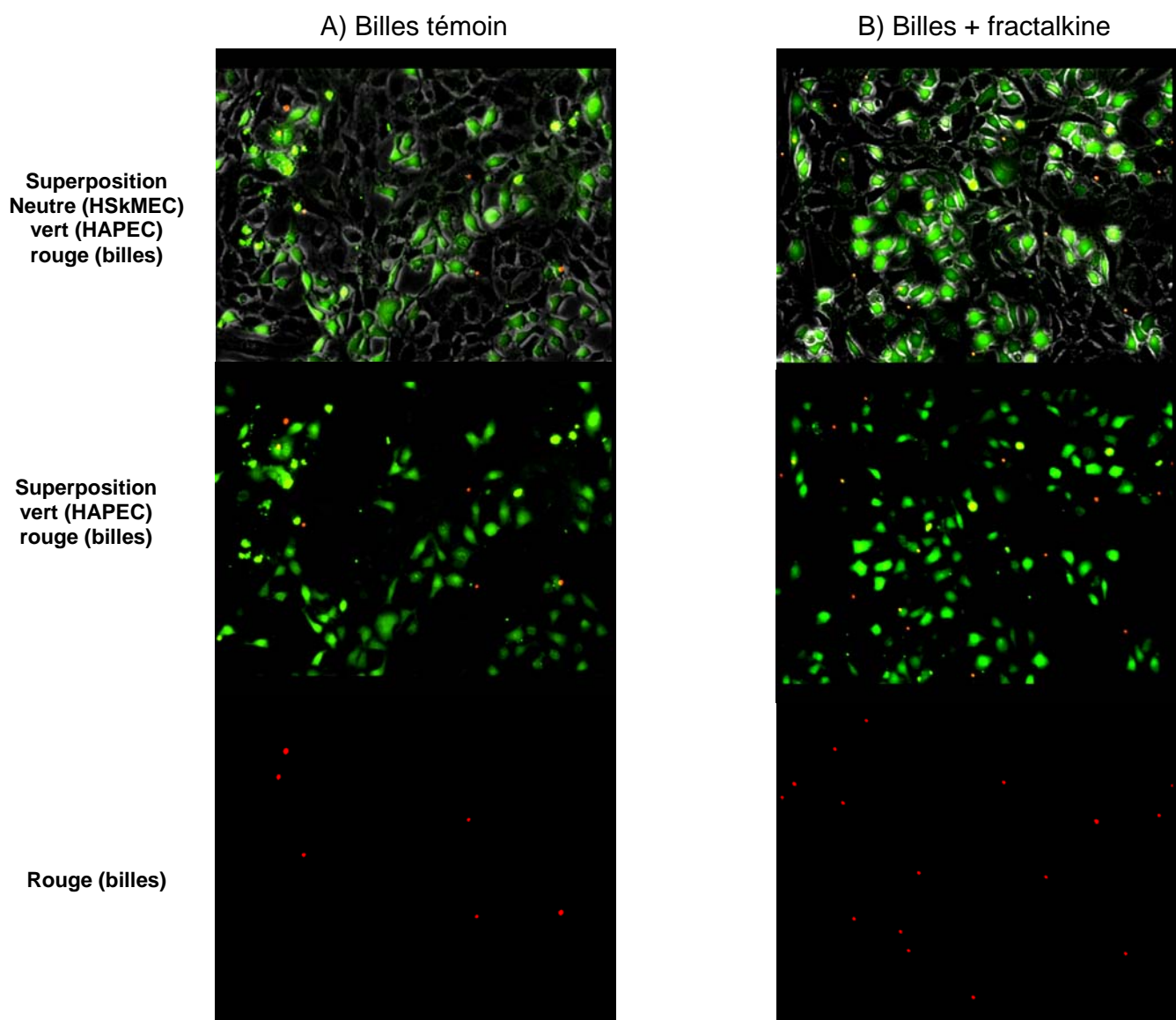


Figure 7: exemple de ciblage de cellules endothéliales en co-culture (HAPEC-HSkMEC) par des billes de latex substituées par la fractalkine

Les billes-fractalkine (figure 7B) ont adhéré davantage que les billes-témoins (figure 7A). D'autre part, les billes fractalkine se sont fixées de façon équivalente aux cellules d'appendice (HAPEC) et de la peau (HskMEC), on dénombre respectivement 7 et 9 billes.

Ces résultats sont effectivement en accord avec les résultats obtenus par cytométrie de flux et par mesure de l'angiogénèse montrant que la fractalkine est active vis-à-vis de ces deux lignées endothéliales.

2.3 La chimiokine CTACK : présentation des expériences préliminaires

Au cours de nos études sur les chimiokines, nous avons intégré la CTACK, chimiokine particulièrement intéressante au niveau des cellules endothéliales de la peau.

Les résultats préliminaires obtenus avec cette chimiokine sont présentés ci après.

2.3.1 La CTACK augmente l'adhésion des lymphocytes CEMT4 sur les cellules endothéliales de la peau.

Afin de tester la capacité de la CTACK à moduler l'adhésion des lymphocytes CEMT4 *in vitro*, nous avons testé une gamme de concentrations (6.25 à 400ng/ml) sur le recrutement lymphocytaire par les cellules endothéliales de la peau : HskMEC (figure 8).

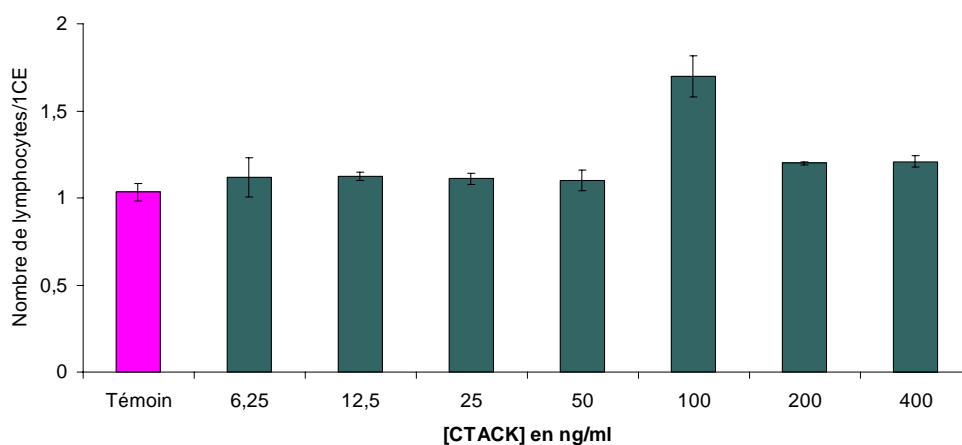


Figure 8: Effet de la CTACK sur l'adhésion de lymphocytes sur HskMEC

La CTACK est capable d'augmenter le taux d'adhésion des lymphocytes sur les cellules endothéliales de la peau de 70% lorsque sa concentration est de 100ng/ml.

2.3.2 Effet de la CTACK sur la croissance des cellules endothéliales humaines

Les tests de croissance ont été réalisés sur les 5 lignées endothéliales en présence de quatre concentrations de CTACK et toutes les 24 heures durant 72 heures (figure 9).

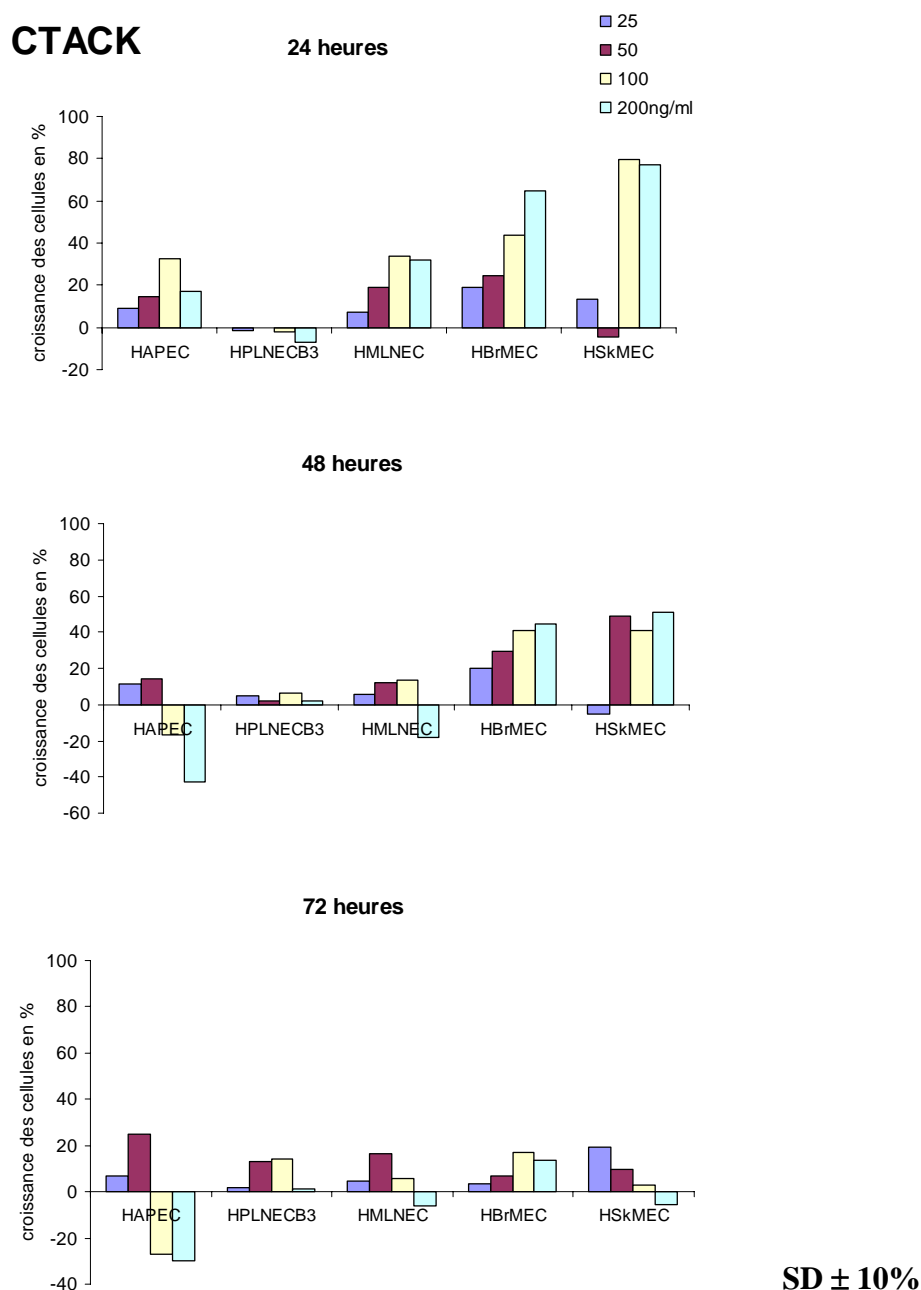


Figure 9 : croissance des cellules endothéliales en présence de CTACK

Dès 24 heures, la CTACK augmente d'environ 80% la croissance des cellules endothéliales de la peau (HskMEC) aux concentrations de 100 et 200ng/ml. Elle semble également favoriser la croissance des cellules de cerveau (HBrMEC) proportionnellement à la concentration. De plus, elle induit une augmentation significative (30% aux concentrations les plus fortes) de la croissance des cellules d'appendice (HAPEC) et de ganglions mésentériques (HMLNEC), mais n'a pas d'effet sur la croissance des cellules endothéliales de ganglions périphériques (HPLNECB3).

Après 48 heures de culture, l'action de la CTACK perdure uniquement sur les lignées HBrMEC et HskMEC alors qu'elle diminue fortement pour les trois autres lignées jusqu'à inhiber la croissance à certaines concentrations telles que 100 et 200ng/ml sur la lignée HAPEC.

Après 72 heures de culture, l'effet de la CTACK sur la croissance des cellules endothéliales diminue pour toutes les lignées.

La CTACK favorise préférentiellement la croissance des cellules endothéliales de la peau et du cerveau.

2.3.3 La CTACK module spécifiquement l'angiogénèse des cellules endothéliales de la peau

Afin de déterminer l'effet de la CTACK sur la formation de pseudo-vaisseaux, une gamme de concentrations de 0,625nM à 20nM (de 6,25ng/ml à 200ng/ml) a été testée sur la lignée HskMEC. Nous avons sélectionné les deux concentrations favorisant la formation des pseudo-vaisseaux : 0,625nM et 2,5nM sur HskMEC afin de les tester sur les 5 lignées cellulaires, concomitamment. Des photos ont été prises à 2, 5, 8 et 24 heures. Les résultats obtenus après 5 heures d'incubation sont illustrés dans la figure 10.

La lignée HAPEC (figure 10A) ne présente pas de différence significative comparativement au témoin, aux deux concentrations utilisées.

Les lignées HPLNECB3 (figure 9B), HMLNEC (figure 10C) et HBrMEC (figure 10D) ne répondent pas à la CTACK qui n'a aucun effet sur la formation des pseudo-vaisseaux *in vitro*. En revanche, dès 5 heures de culture et aux deux concentrations testées, la CTACK favorise fortement la réorganisation des cellules endothéliales de la peau (HskMEC) et leur assemblage en réseau afin de former des pseudo-vaisseaux (figure 10E).

Culture sur matrigel en présence de CTACK

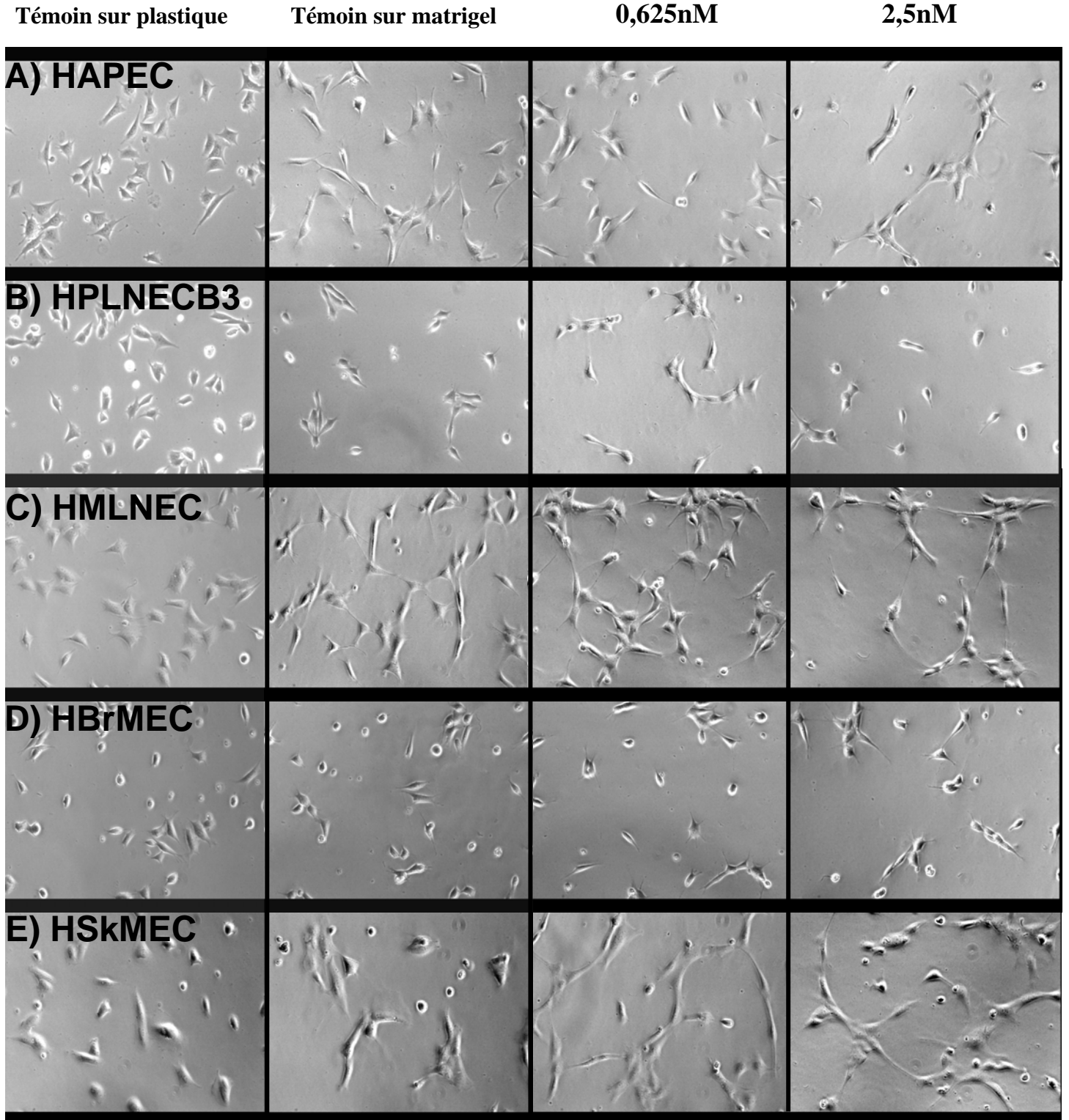


Figure 10 : Modulation de l'angiogénèse *in vitro* par la CTACK après 5h de culture

La CTACK agit spécifiquement vis-à-vis des cellules endothéliales de la peau, rapidement et à faible concentration.

2.3.4 Ciblage de la CTACK en conditions de flux

Les expériences ont été réalisées avec la CTACK de la même façon qu'avec la fractalkine. Les résultats sont illustrés ici par une co-culture HAPEC-HSkMEC (figure 11).

Co-cultures HAPEC marquées/ HSkMEC non marquées

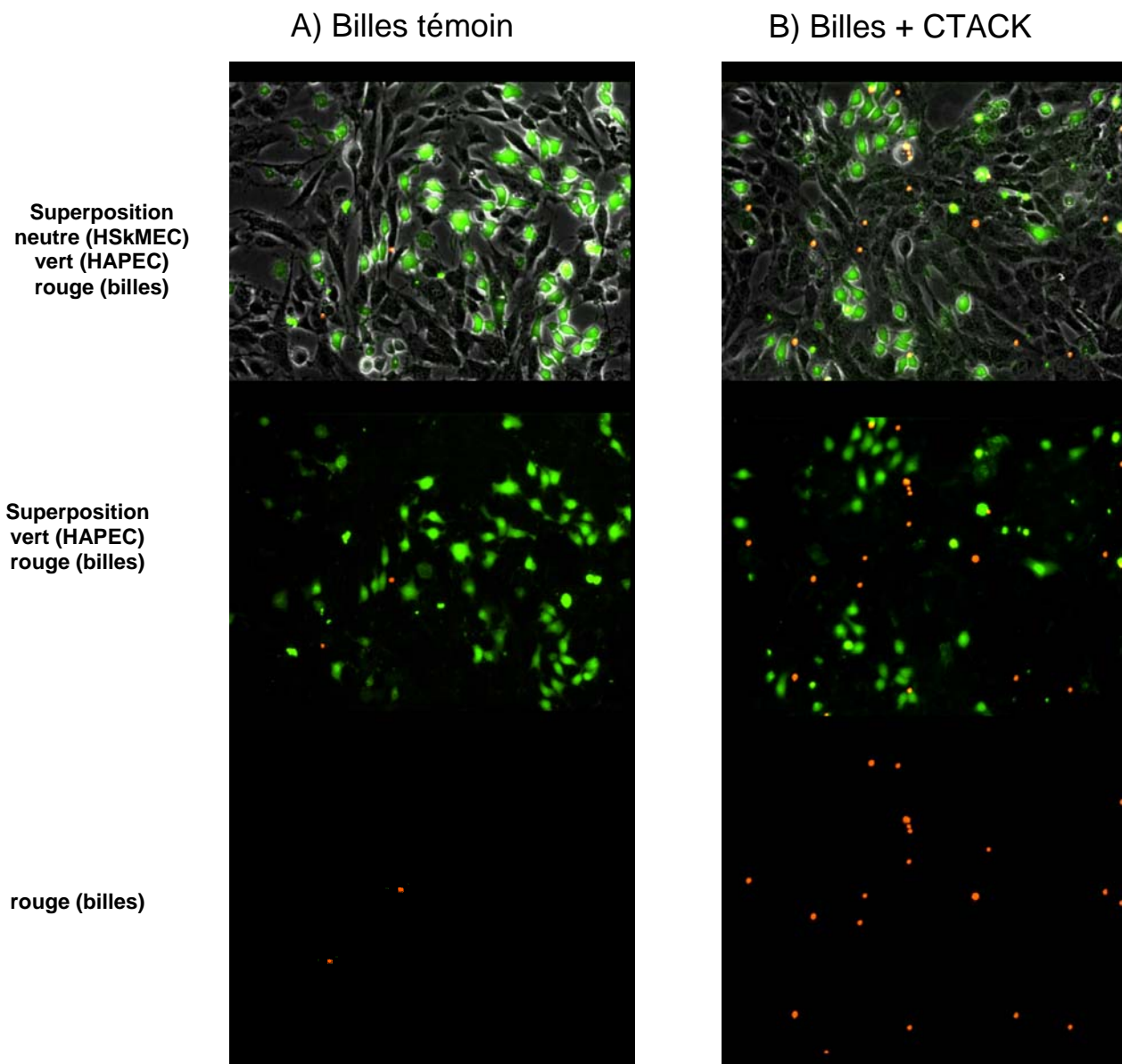


Figure 11: Ciblage des « billes CTACK » sur une co-culture HAPEC/HSkMEC

Les billes-CTACK (figure 11B) se fixent plus que les billes-témoins (figure 11A). De plus, les billes-CTACK se fixent préférentiellement sur les cellules endothéliales de la peau (figure 11B). Sur 20 billes fixées au total, 16 se fixent sur les cellules endothéliales de la peau (non marquées) tandis que seulement 4 se fixent sur les cellules vertes c'est à dire les cellules endothéliales d'appendice.

Cette expérience montre clairement la spécificité de la CTACK pour les cellules endothéliales de la peau.

Toutes ces expériences mettent en évidence la capacité de certaines chimiokines telles que la 6Ckine, la fractalkine, et la CTACK à agir spécifiquement sur les lignées de cellules endothéliales spécifiques des organes dans lesquels elles sont exprimées.

3 Discussion et perspectives

La présence ou l'absence des récepteurs de chimiokines à la surface des cellules endothéliales n'est pas la clé de la spécificité puisque nos résultats ont montré que les quatre récepteurs CX₃CR1, CXCR4, CCR5 et CCR7 sont exprimés dans les 5 lignées : HAPEC, HPLNECB3, HMLNEC, HBrMEC et HSkMEC.

De plus, la spécificité n'est pas due à la capacité de liaison des chimiokines vis-à-vis de certaines cellules endothéliales puisque les 4 chimiokines étudiées se fixent à la surface de toutes les lignées présentées dans cette étude. En dépit du fait que les taux de fixation varient selon la lignée, elles sont toutes présentées par les cellules endothéliales de chacun des organes testés.

Néanmoins, les résultats ont montré une «spécificité d'action» de certaines chimiokines vis-à-vis d'un endothélium particulier.

La fractalkine agit en effet, spécifiquement vis-à-vis des cellules endothéliales d'appendice en augmentant fortement le recrutement des lymphocytes par ces cellules et en modulant l'angiogénèse. Bien qu'elle soit capable de se fixer aux cellules endothéliales du cerveau et de la peau (cf. expériences de cytométrie), elle ne module pas l'adhésion des lymphocytes sur les lignées HBrMEC et HSkMEC. La fractalkine est pourtant exprimée dans ces deux organes où elle joue un rôle important dans la coopération cellulaire (Harrison et al. 1998) (Sugaya et al. 2003). Mais le recrutement de lymphocytes dans ces organes se fait essentiellement dans des conditions d'inflammation. Or lors des expériences d'adhésion réalisées dans cette étude, les cellules endothéliales ne sont pas activées au préalable et ne subissent que l'action des chimiokines. Nous montrons ici que la liaison d'une chimiokine à une cellule entraîne des effets distincts qui reflètent des signaux distincts. Ainsi, les chimiokines telles que la fractalkine activent des mécanismes de transduction du signal et de régulation cellulaire, dont l'induction de molécules d'adhésion, uniquement dans les lignées vis-à-vis desquelles elles sont spécifiques. Cependant, la fractalkine peut se fixer aux cellules endothéliales de la peau (cf. expériences de cytométrie et de ciblage en conditions de flux) et favoriser la formation de pseudo-vaisseaux *in vitro* sans modifier les propriétés d'adhésion des HSkMEC. On peut supposer que la différence observée dans la spécificité d'action est due au mode de liaison de la chimiokine à la cellule (récepteurs, GAGs, DARC...).

En terme de fixation des chimiokines, les expériences réalisées en conditions de flux confirment les résultats obtenus dans les expériences en «conditions statiques» dans cette étude (adhésion, cytométrie de flux, angiogénèse).

Il est très important de valider en conditions de flux les résultats obtenus au préalable en conditions statiques afin de nous rapprocher des conditions *in vivo*. En effet, le flux sanguin

est très important dans les processus de reconnaissance cellulaire. Ces conditions permettent d'une part, de rapprocher les cellules circulantes des parois des vaisseaux afin de favoriser leur rencontre avec les cellules endothéliales et provoquent l'expression de molécules d'adhésion qui vont renforcer le recrutement cellulaire (Nagel *et al.* 1994; Chappell *et al.* 1998).

L'adhésion des billes-fractalkine devra être comparée avec les autres lignées endothéliales. Les co-cultures de HAPEC ou HSkMEC, lignées positives pour l'adhésion à la fractalkine, avec une autre lignée telle que HPLNECB3 valideront le rôle spécifique de la fractalkine vis-à-vis des cellules endothéliales d'appendice et de la peau. Les expériences d'adhésion devront également être réalisées en conditions de flux pour valider la spécificité des chimiokines.

La 6Ckine agit préférentiellement sur les cellules endothéliales de ganglions périphériques en accord avec son expression constitutive dans les organes lymphoïdes secondaires (Gunn *et al.* 1998) (Nagira *et al.* 1997) et avec le fait que, la 6Ckine favorise la croissance des cellules endothéliales HPLNECB3.

La 6Ckine et la fractalkine augmentent également le taux d'adhésion des lymphocytes sur les cellules endothéliales de ganglions mésentériques. Butcher et ses collaborateurs ont montré que des lymphocytes, isolés de ganglions lymphatiques périphériques (non-mésentériques) et de plaques de Peyer, sont capables de regagner les organes dont ils sont issus une fois réinjectés *in vivo* chez la souris. Trente minutes après injection, les lymphocytes issus des plaques de Peyer retournent dans les plaques de Peyer, les lymphocytes issus de ganglions périphériques dans les ganglions périphériques tandis que les ganglions mésentériques recrutent de façon équivalente les deux types de lymphocytes (Butcher *et al.* 1980). Ce qui implique que les cellules endothéliales des ganglions mésentériques présentent à leur surface soit, les deux ligands nécessaires à la reconnaissance des deux types de récepteurs présents sur les lymphocytes, soit, un troisième ligand, capable de se lier à deux récepteurs différents. Ces ganglions ont un donc comportement intermédiaire quant au recrutement des lymphocytes entre les organes lymphoïdes de type muqueux et les ganglions lymphatiques périphériques. Ce qui est confirmé ici par le comportement de la lignée HMLNEC dans les expériences d'adhésion sous l'influence de la fractalkine, spécifique des tissus muqueux et de la 6Ckine, spécifique des ganglions périphériques.

La spécificité de la 6Ckine vis-à-vis des cellules endothéliales d'organes lymphoïdes secondaires devra être vérifiée en conditions de flux et quant à son action sur l'angiogénèse.

Parmi les chimiokines étudiées, seule la CTACK, chimiokine spécifique de la peau, est capable d'augmenter le recrutement cellulaire par les HSkMEC, les autres chimiokines,

fractalkine, 6Ckine, SDF-1 α et RANTES, n'ayant aucun effet. Elle seule active les mécanismes moléculaires nécessaires au recrutement de lymphocytes T naïfs par les cellules de la peau, celui-ci n'ayant pas lieu habituellement dans cet organe. La CTACK favorise fortement la croissance des lignées HSkMEC et HBrMEC, ce qui est à rapprocher du fait que ces deux lignées ont une même origine embryonnaire même si elles se différencient par la suite. Cela peut en partie expliquer le comportement similaire de ces deux lignées dans certaines expériences telles que la croissance cellulaire ou l'adhésion. De plus, un variant de la CTACK nommé PESKY (Baird *et al.* 1999) est exprimé au niveau du cerveau. Son rôle est encore inconnu d'autant plus que cette chimiokine est nucléaire. En effet, elle ne possède pas de peptide signal et est directement transloquée dans le noyau.

La CTACK active fortement et spécifiquement le processus d'angiogénèse par les cellules HSkMEC et se fixe préférentiellement sur les cellules endothéliales de la peau au sein d'une co-culture HAPEC-HSkMEC en conditions de flux. Les expériences d'adhésion en conditions statiques et en conditions de flux devront être réalisées avec cette chimiokine et interprétées comparativement aux résultats des marquages en cytométrie de flux.

Toutes les expériences présentées dans cette étude valident clairement la spécificité de la CTACK vis-à-vis de l'endothélium de la peau et valident le modèle organo-spécifique de l'endothélium.

Afin de généraliser ces notions, les expériences d'adhésion devront être réalisées avec d'autres lymphocytes (B, NK) afin de comparer le comportement de chaque lymphocyte vis-à-vis des différentes lignées dans le contexte de la sélectivité de l'activité des chimiokines.

Des chimiokines ont été identifiées récemment pour être spécifiques d'organes : CTACK pour la peau, TECK pour l'intestin, MEC pour les muqueuses. Les études préliminaires réalisées avec la chimiokine MEC au laboratoire semblent confirmer sa spécificité pour les tissus muqueux puisqu'elle se fixe préférentiellement aux cellules endothéliales issues de sites muqueux tels que l'appendice ou les poumons.

Ces chimiokines peuvent donc constituer des références pour illustrer l'organo-spécificité de l'endothélium et leur étude peut contribuer à élucider les mécanismes moléculaires de la spécificité de reconnaissance.

Nous possédons des lignées tumorales au laboratoire : mélanome, cancers du sein, du rein et des poumons. La spécificité des chimiokines pourra être étudiée vis-à-vis de ces lignées afin de préciser les signaux d'adressage de ces cellules tumorales comparativement aux cellules endothéliales saines issues des mêmes organes.

L'installation d'un nouvel équipement va permettre, entre autres, de suivre en temps réel et sous microscope, le processus d'angiogénèse. Cela permettra d'établir de façon plus précise la cinétique de formation des pseudo-vaisseaux *in vitro* et sa modulation par les chimiokines ou d'autres molécules.

Enfin, les interactions des chimiokines avec les glycosaminoglycane de la surface cellulaire devront être étudiées ainsi que leur rôle dans l'organo-spécificité. Il a été démontré que les GAGs peuvent aussi être spécifiques de certains organes. Il conviendra de trouver la meilleure association chimiokine-GAGs de spécificité optimale pour le ciblage d'un organe.

IV. Les cellules endothéliales de la peau :
Modèle pour évaluer les propriétés anti-
inflammatoires de molécules

Cette seconde partie concerne le travail effectué dans le cadre de la collaboration avec la Société Bioeurope groupe Solabia. Les études ont consisté à évaluer les propriétés potentiellement anti-inflammatoires et anti-oxydantes de nouvelles molécules produites par la société Bioeurope.

1 Matériel et méthodes

1.1 Le phénomène étudié et l'hypothèse de travail

Les cellules endothéliales de la peau établies au laboratoire sont un modèle de choix d'étude *in vitro* permettant par exemple, d'évaluer les propriétés de principes actifs destinés à la cosmétologie ou à la pharmacologie fournis par la Société BioEurope groupe Solabia.

La culture de cellules endothéliales de la peau HSkMEC est identique à celle des autres lignées (cf. chap. III § 1.3).

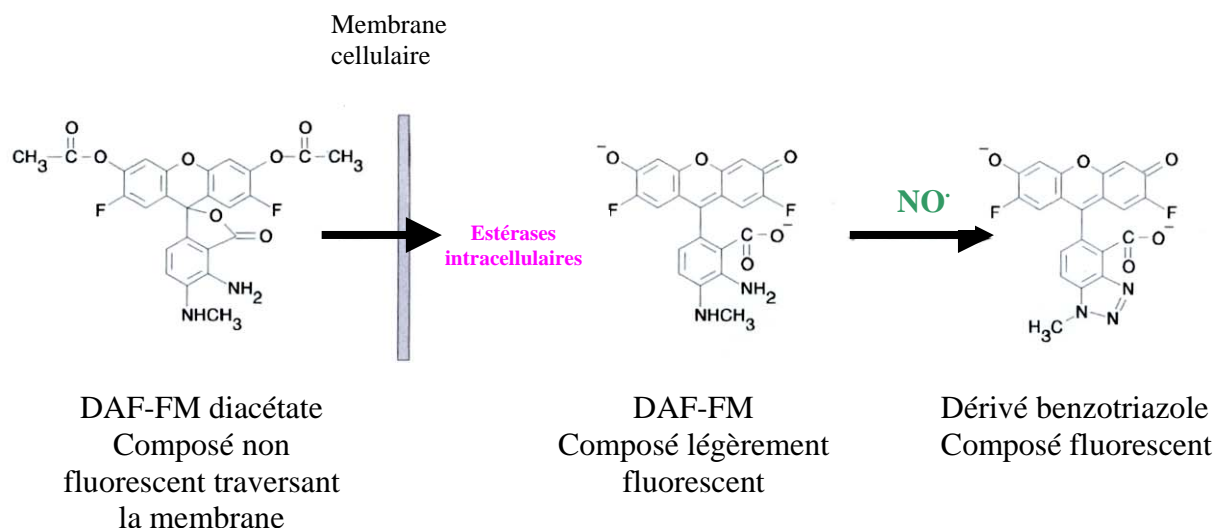
1.2 Les expériences d'adhésion

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 2.5×10^4 cellules par cm^2 dans de l'OptiMEM complet. Dix sept heures avant le début du test d'adhésion, les HSkMEC sont incubées pendant 1 heure avec une solution de H_2O_2 à $150\mu\text{M}$ préparée dans de l'OptiMEM. Les cellules endothéliales ainsi activées miment la réaction à un état inflammatoire. Cette activation sera suivie pendant 5 heures d'incubation avec les molécules diluées dans de l'OptiMEM aux concentrations désirées. Le test d'adhésion est réalisé après 11 heures supplémentaires de culture des cellules endothéliales dans de l'OptiMEM sans sérum ni antibiotiques. Les HSkMEC sont alors incubées avec une suspension de lymphocytes préalablement marqués avec le PKH26-GL (annexe 4) dans la proportion de 5 lymphocytes CEMT4 pour une cellule endothéliale. Après 30 minutes à température ambiante, les lymphocytes non adhérents aux cellules endothéliales sont éliminés par trois lavages avec du PBSc. Les cellules sont ensuite décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA, lavées au PBSc-SAB 0.5% puis centrifugées à 400g pendant 5 minutes à 20°C . le culot cellulaire est repris dans 500 μl de PBSc pour l'analyse en cytométrie de flux.

Les résultats sont exprimés en nombre de CEMT4 adhérents par cellule endothéliale (taux d'adhésion).

1.3 La détection de NO intracellulaire

La détection du NO intracellulaire dans les cellules endothéliales activées ou non par H_2O_2 est réalisé à l'aide d'un marqueur traversant passivement les membranes cellulaires, le DAF-FM diacétate (4-amino-5-méthylamino-2', 7'-difluorofluorescein) (Molecular probes).



A l'intérieur des cellules, il est hydrolysé par les estérases intracellulaires en DAF-FM. Ce nouveau composé peut alors réagir avec l'oxyde nitrique intracellulaire pour former un produit fluorescent dans le vert (λ émission 520 nm) quand il est excité à une longueur d'onde de 488 nm.

Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence relative (IFr) proportionnelle à la quantité de NO détectée.

1.4 Le marquage de iNOS intracellulaire

Les cellules sont décollées avec une solution de collagénase à 5mg/ml de PBSc-SAB 0,5%. Elles sont ensuite perméabilisées pendant 10 minutes à 37°C avec une solution de PFA 1%-saponine 0,2% dans du PBSc. Après saturation des sites aldéhydes libres par une solution d'urée 0,2M puis un lavage au PBSc, les cellules endothéliales sont incubées 30 minutes à 37°C avec un anticorps primaire dirigé contre l'iNOS humaine (anti-iNOS humain fait chez la souris, concentration finale = 10ng/ml). L'anticorps primaire est ensuite fixé avec une solution de PFA 1% dans du PBSc pendant 10 minutes à 37°C. La fixation est stoppée par un lavage par le PBSc-SAB 0,5% et les cellules sont ensuite incubées avec une solution d'urée (0,2M) puis lavées par le PBSc. La détection de iNOS se fait avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome : un anticorps fait chez la chèvre dirigé contre les immunoglobulines de souris et couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine à une concentration finale de 50ng/ml, 30 minutes à 4°C.

Après excitation à 488 nm, la molécule fluorescéine, fixée sur l'anticorps secondaire (FITC), fluoresce à 520 nm permettant ainsi une analyse de cytométrie de flux. L'intensité de fluorescence relative (IFr) résultante reflète la quantité de l'enzyme présente dans la cellule comparativement au témoin isotypique (IgGs de souris).

1.5 Les tests de croissance cellulaire

Les tests de croissance en présence des molécules fournies par la société BioEurope sont réalisés dans les mêmes conditions que pour ceux réalisés en présence de chimiokines (chap. III § 1.7.).

1.6 Les expériences d'angiogénèse *in vitro*

Les conditions expérimentales sont décrites dans le chapitre III § 1.8. Les HSkMEC sont incubées en présence des molécules à différentes concentrations.

Comme dans le cas des chimiokines, la modulation de la cinétique de formation des pseudo-vaisseaux par les molécules est évaluée sous microscope inversé (Axiovert 200, Zeiss). *L'analyse se fait par prises de vues à différents temps comparativement au contrôle sans molécule. La morphologie, le réarrangement, la formation de réseau cellulaire et la formation de pseudo-vaisseaux sont alors examinés au cours du temps. Ces critères vont permettre d'évaluer qualitativement l'effet des molécules sur la formation de pseudo-vaisseaux in vitro.*

2 Résultats

La société BioEurope nous a fourni 8 molécules afin d'évaluer leurs activités potentielles sur les cellules endothéliales de la peau : HSkMEC. Parmi ces molécules se trouvent un PCA-d'arginine et un polysaccharide riche en rhamnose nommé BEC 441. Il y a également deux familles de polysaccharides : BEC 1645 et 1615 ainsi que les oligosaccharides dérivés de leur hydrolyse contrôlée et de masses moléculaires moyennes 15 et 5 kDa. La description de ces molécules a été détaillée dans le chapitre II § 13.2 et 13.3.

Les trois molécules présentant les effets les plus significatifs vis-à-vis des HSkMEC, c'est à dire les polysaccharides BEC441, le PCA-d'arginine et les oligosaccharides 1615 15 kDa, font l'objet d'un article intitulé « **Skin endothelial cells as a model to screen anti-inflammatory molecules** » soumis à publication dans le journal « Journal of Investigative Dermatology ».

Résumé des résultats

Les molécules présentées dans cet article montrent des propriétés anti-inflammatoires, par leur capacité à diminuer la production de NO et iNOS intracellulaires, et/ou de réduire le recrutement cellulaire résultant du stress oxydant appliqué aux cellules endothéliales.

Les polysaccharides BEC 441 n'ont pas d'effet sur le recrutement de lymphocytes mais agissent sur la production de NO/iNOS. De plus, ils favorisent la croissance (fiche 1D) et la formation de pseudo-vaisseaux *in vitro* par les cellules endothéliales de la peau.

Le PCA-d'arginine est capable de diminuer l'adhésion des lymphocytes aux concentrations de 0.1ng/ml et 10ng/ml. Il diminue fortement le taux de NO en fonction de sa concentration jusqu'à restaurer un taux de NO équivalent à celui détecté dans les cellules endothéliales de la peau non activées. Vis-à-vis du taux de iNOS, la réponse est variable selon la concentration. Il diminue ce taux à 1ng/ml tandis qu'il l'augmente à 0.1ng/ml. Aucun effet significatif du PCA-d'arginine n'est observé sur la croissance et le processus d'angiogénèse des cellules HSkMEC. Les résultats obtenus montrent que les oligosaccharides 1615 15 kDa diminuent l'adhésion des lymphocytes aux concentrations de 0.01 et 10ng/ml. Ils diminuent la production de NO et l'expression de iNOS aux mêmes concentrations d'utilisation (0.1 et 10ng/ml).

De plus, ils agissent modérément sur la croissance (fiche 6D) et la formation de pseudo-vaisseaux par les HSkMEC.

Skin endothelial cells as a model to screen anti-inflammatory molecules

Crola da Silva Claire.¹, Leclère Sophie.², Lassale Laurent², Philbé Jean-Luc² and Kieda Claudine¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS affiliated to Orléans University, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France

²Société BioEurope groupe Solabia, Route D'Oulins, 28260 Anet, France

Abstract:

Dermal inflammation studies mainly focus on keratinocytes as the major skin cell type. An external aggression results in the production of keratinocyte factors which act as intercellular signals recognized by dermal endothelial cells (ECs), the main transmitters of the inflammatory state to internal body tissues. In response to intercellular signals, ECs, interfacing blood and tissues, mediate and control the passage of cells and molecules.

Based on the dermal ECs selectivity, an original human skin microvascular endothelial cell line (HskMEC) was established in our laboratory and used in this work to design a cellular model which enables the screening of a panel of molecules for their putative activity towards the skin inflammatory state.

Inflammation was mimicked by HskMEC activation through an oxidant stress then putative anti-inflammatory molecules were assessed in several ways: by their capacity to inhibit lymphocyte adhesion, nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) expression, and by their influence on ECs angiogenic properties *in vitro*.

This original model identified three anti-inflammatory molecules which were directly active towards the skin endothelium and, using oligo/polysaccharides, uncovered new therapeutic tools against inflammatory processes.

Keywords : skin endothelial cells, cutaneous inflammation, oxidative stress, lymphocyte adhesion, angiogenesis.

Introduction

The skin is the largest organ of the body, organised in a network allowing cell communications. The various types of cells communicate with the other parts of the body through the microvasculature which provides nutrients and reflects the biological signals.

Overall, keratinocytes, the major epidermis cell type, are the first cells to be activated in response to injury and to produce free radicals and pro-inflammatory

cytokines such as IL-1 α and TNF- α . These intercellular signals are able to activate other cells such as ECs. The ECs receive and give information from and towards microenvironmental cells. From these signals, ECs elaborate the surface presentation of a set of molecules such as chemokines and adhesion molecules which can then recruit circulating cells at the inflammatory site (Middleton et al., 2002). In the skin, the dermal ECs are responsible for inflammatory cell recruitment and the subsequent inflammation reaction. The vascular endothelium is one of the major targets of oxidative stress (Lum and Roebuck, 2001). In our endothelial cell model of inflammation, oxidative stress is created *in vitro* by activating the skin ECs by H₂O₂. Oxidative stress, by ROS (Reactive Oxygen Species) such as NO radicals, increases vascular permeability (Gonzalez et al., 2003) and promotes leukocyte adhesion (Lum and

Abbreviations : ECs : Endothelial Cells, HskMEC : Human Skin Microvascular Endothelial cells, NO : Nitric Oxide, iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase, PCA : 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid, cPBS : complete phosphate buffer saline, OS : oligosaccharides, ROS: Reactive Oxygen Species.

Roebuck, 2001). Moreover, the production of free radicals is directly correlated with aging of the skin (Jenkins, 2002). Consequently, oxidative stress is a major factor in cellular senescence of the skin.

Our *in vitro* model enables the modulator effects of putative biologically active molecules to be evaluated at distinct levels:

- * the ability of a molecule to inhibit the massive recruitment of circulating cells in response to inflammatory signals by evaluating leukocytes adhesion to non- and H₂O₂-activated HSkMEC;

- * the effect of a molecule on the intracellular levels of NO and iNOS;

- * the capacity of a molecule to modulate pseudo-vessel formation in an angiogenesis *in vitro* assay.

In this study, we present three molecules that are particularly efficient towards skin ECs. The first molecule is a rhamnose rich-polysaccharide, named BEC441, which contains galactose, and glucuronic acid. The second molecule is an efficient anti-inflammatory compound, arginine-PCA which is a combination of L-arginine and PCA (2-pyrrolidone-5-carboxylic acid). The last one is the oligosaccharide (OS) 1615 (15kDa) which is fucose-, glucose-, glucuronic acid- rich oligosaccharide obtained by controlled hydrolysis of the polysaccharide BEC 1615 (not presented in this study). The role of carbohydrates in skin function has been investigated with a view to the development of therapeutic agents against inflammatory processes based on poly/oligosaccharide structure. Indeed, glycosaminoglycans, which compose the extracellular matrix proteoglycans, are fundamentals for the skin's integrity (hydration, elasticity) and are active in the specific recruitment of leukocytes during inflammation. Furthermore, some monosaccharides such as L-fucose have an important role in the skin. For example, it has been shown that L-fucose and fucose-rich polysaccharides are able to down-regulate MMP-2 and MMP-9 (Isnard et al., 2002) and protect the cell from ROS induced death (Peterszegi et al., 2003). Moreover, rhamnose has been shown to be present in the skin (Malawista and Davidson, 1961). As keratinocytes have cell surface sugar specific receptors, this enables them to bind L-rhamnose neoglycoproteins (Cerdan et al., 1991).

This study describes a cellular model based on specific skin ECs which evidences the anti-inflammatory properties of given saccharidic

structures as illustrated here by the polysaccharide BEC441 and the OS 1615 15kDa.

Materials and methods

Molecules and reagents

The skin endothelial cell line : HSkMEC, for Human Skin Microvascular Endothelial Cell, was established in our laboratory, stabilized and characterized with specific endothelial cell makers (Kieda et al., 2002). The three molecules studied, BEC441, arginine-PCA and OS 1615 15kDa were produced by Bioeurope-Solabia society. The DAF-FM diacetate (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) for NO detection was from Molecular probes (Leiden, The Netherlands). The mouse IgGs anti-human iNOS was from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The "matrigel" matrix for the angiogenesis *in vitro* assay was from BD Biosciences.

Endothelial cell culture

HSkMEC were cultured in OptiMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 5% foetal bovine serum (BioWest, AbCys, Paris, France), 40 µg/ml gentamycin (Invitrogen), 50 ng/ml fungizone (Invitrogen). Cells were maintained at 37°C under a 5% CO₂/95% air atmosphere.

In the following experiments, we have tested four concentrations for each molecule, which were determined by the preliminary cytotoxicity test (data not shown).

Adhesion experiment

HSkMEC were seeded in 24-well tissue culture plates (Falcon, Becton Dickinson, France) at 5 X 10⁴ cells per well in complete OptiMEM medium.

After 24 hours in culture, HSkMEC were stimulated for 1 hour by H₂O₂ (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (150µM) followed by a 5h incubation in the presence of the tested molecules then an 11-hour post incubation in OptiMEM without serum. After stimulation, cells were washed once with complete PBS (cPBS) and incubated (30 minutes at room temperature) with a previously PKH26-GL (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France)-labeled CEMT4 lymphocyte suspension in a 5 lymphocytes to one endothelial cell proportion. Non-adherent CEMT4 were removed by gentle washings. Cells were detached by a trypsin/EDTA

(1X) solution (Invitrogen), washed and analysed by flow cytometry. PKH26-GL is a fluorescent marker (excitation: 488nm, emission: 590nm) which is used here to label one cell population (CEMT4) in order to discriminate it easily from the non labelled one (EC) by flow cytometry, thus allowing evaluation of the adhesion level as a number of CEMT4 specifically bound to one endothelial cell.

Detection of intracellular nitric oxide (NO)

The detection of intracellular NO is achieved by using DAF-FM diacetate. This membrane permeant probe is hydrolysed by intracellular esterases into DAF-FM, which reacts with NO to form a green-fluorescent product which can be excited at 488 nm to fluoresce at 520 nm.

HskMEC were seeded in 24-well plate at 5×10^4 cells per well. After 48 hours in culture, cells were washed twice with cPBS and were incubated with a solution of 1 μ M DAF-FM diacetate in cPBS for 1 hour (400 μ l per well). At the end of the incubation, cells were washed again twice with PBSc and 400 μ l of cPBS were added for 15 minutes. After washing, cells were detached by a trypsin-EDTA solution, washed and diluted in cPBS (400 μ L) for flow cytometry analysis. Upon laser excitation at 488nm of DAF-FM the emission at 520nm gives the relative fluorescence intensity (rFI) which is related to the quantity of intracellular NO.

Labeling of intracellular iNOS

HskMEC were detached from the culture plates by 0.5 mg/ml type-I collagenase (Invitrogen) in a PBS-0.5%BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) (w/v) solution.

For intracellular detection, cells were permeabilized with 1% (w/v) PFA (paraformaldehyde)-0.2% (w/v) saponine (VWR, Fontenay-sous-bois, France) in cPBS before incubation with primary antibody against iNOS.

Cells were incubated for 30 minutes at 37°C with mouse IgGs anti-human iNOS (10 μ l of 1/50 dilution). Primary antibody was fixed by 2% (w/v) PFA solution in cPBS for 10 minutes at 37°C. The reaction was stopped by PBS-0.5%BSA solution and cells were incubated with 0.2M urea (VWR) in PBS for 10 min at room temperature and washed.

Intracellular iNOS detection was achieved by incubation in the presence of FTC-goat anti-mouse IgGs (Sigma-Aldrich) (20 μ l of 1/200 dilution) for 30

minutes at 4°C. The cells were washed then diluted in 400 μ l of cPBS for flow cytometry analysis. By laser excitation of FTC at 488nm and emission at 520nm the relative fluorescence intensity rFI, which reflects the intracellular iNOS level, was obtained.

Angiogenesis : “in vitro” assay

Angiogenesis was evaluated on MatrigelTM-coated 24-well plates (BD Biosciences). The matrigel contains extracellular matrix proteins and growth factors which permit ECs to spontaneously form pseudo-vessels. After coating, cells were seeded at 5×10^4 cells per well. Once cell adhesion on the matrix had been achieved, cells were incubated with the tested molecules dissolved in OptiMEM. The rearrangement of the cells and pseudo-vessels formation were followed under the inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss). The qualitative analysis consisted in taking pictures at given time lapses, and comparing them to the control in the absence of molecules in order to evaluate the effect of the molecule on the vessel formation kinetics.

Results

Arginine-PCA and OS 1615 15 kDa significantly decrease CEMT4 lymphocytes adhesion on skin endothelial cells (HskMEC).

The massive recruitment of circulating leucocytes from blood is the main event during inflammation. Consequently, the anti-inflammatory properties of molecules can be illustrated by their capacity to inhibit lymphocyte recruitment at the inflammatory site.

On figure 1, the increase in the CEMT4-lymphocyte adhesion level after incubation with H₂O₂ reflects the inflammatory state reached by ECs activation.

In the absence or the presence of H₂O₂, BEC441 weakly increased the adhesion level as compared to the control. It seems that BEC441 is not able to inhibit the recruitment of CEMT4-lymphocytes in activated conditions (figure 1a).

Arginine-PCA had no effect on non-activated cells but was able to significantly decrease the level of adhesion of H₂O₂-activated cells at 0.1ng/ml and 10ng/ml (figure 1b).

OS 1615 15kDa weakly decreased the adhesion level in non-activated cells but significantly decreased this level at 0.01ng/ml and 10ng/ml when cells were H₂O₂-activated (figure 1c).

These three molecules gave different responses in terms of lymphocyte recruitment after induction of an oxidant stress at the endothelial cell level.

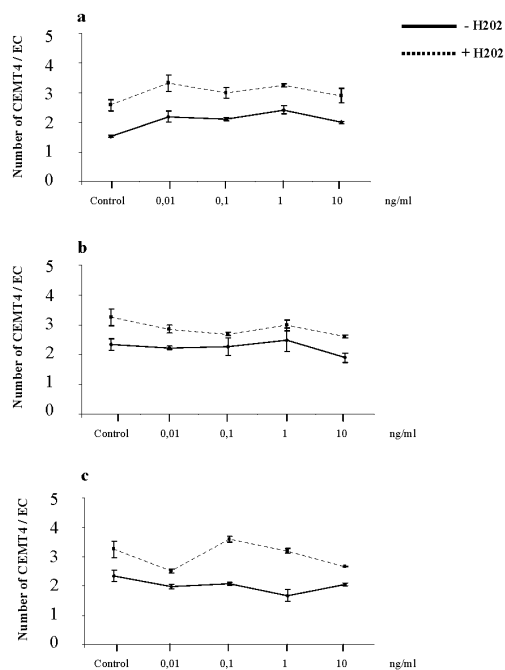


Figure 1. Modulation of CEMT4 adhesion towards HSkMEC by anti-inflammatory molecules : (a), BEC441, (b) arginine-PCA and (c) oligosaccharides 1615 15kDa. The adhesion level is expressed in number of CEMT4 specifically bound per one endothelial cell.

Direct effect of molecules on the intracellular level of NO.

In our cellular model, HSkMEC were activated by H_2O_2 . We thus created an oxidative state which provokes the intervention of the NO/iNOS system regulation by ECs. In this oxidative stress context, the capacity of molecules to inhibit or limit the quantity of intracellular NO was investigated by direct labelling of NO with a DAF-FM fluorescent probe.

On figure 2, it can be seen that the intracellular NO level increased upon activation of HSkMEC by H_2O_2 . Globally, BEC441 (figure 2a) had no effect on non-activated cells except at 0.01ng/ml, as the unique concentration which increased the intracellular NO. On H_2O_2 - activated cells, BEC441 was able to significantly decrease the level of intracellular NO when used at 0.1ng/ml and 10ng/ml.

Arginine-PCA (figure 2b) had no effect on non-activated cells. On H_2O_2 - activated cells, it decreased the level of intracellular NO in a concentration-

dependent manner with a maximal effect at 10ng/ml, enabling complete restoration of the basal level of intracellular NO to be reached / attained (comparable to NO concentration in non-activated cells).

On H_2O_2 - activated cells, OS 1615 15kDa significantly decreased the level of intracellular NO at 0.1ng/ml and 10ng/ml whereas they had globally no action on non-activated cells (figure 2c) except at 1ng/ml, where there was a weak increase in the NO level.

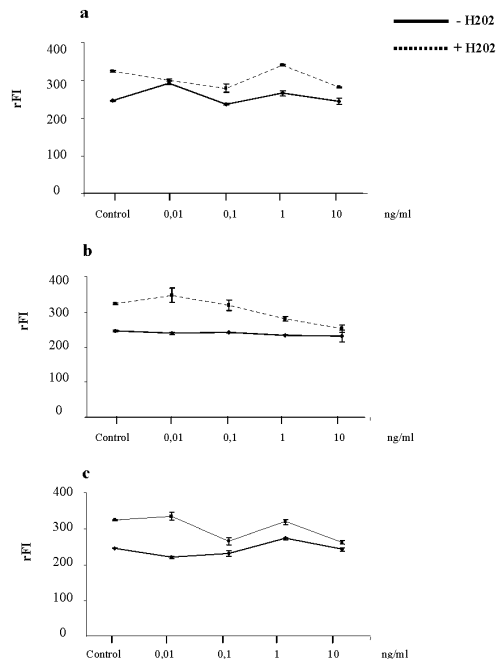


Figure 2. Intracellular NO detection in HSkMEC by flow cytometry on H_2O_2 -activated and non-activated HSkMEC. Cell hydrolysis of DAF-FM probe permits to evaluate the effect of molecules: (a) BEC441 (b) arginine-PCA and (c) oligosaccharides 1615 15kDa on modulation of intracellular NO level.

Labeling of intracellular iNOS

In order to complete the study of oxidative stress and perhaps to establish the correlation between NO and iNOS, the intracellular level of iNOS was studied by direct labeling with an antibody on non-and activated ECs.

On figure 3, intracellular iNOS induction corresponds to an activation of HSkMEC in oxidative stress conditions.

On non-activated cells, BEC441 (figure 3a) has globally no effect on iNOS expression. After activation, it was able to inhibit iNOS when used at

1ng/ml and this did not correlate with its action on intracellular NO (figure 2a).

The effect of arginine-PCA (figure 3b) on the iNOS expression profile showed two different kinds of responses. Indeed, at 0.1ng/ml, we see an increase in iNOS expression whereas at 1ng/ml the expression of iNOS significantly decreased in non- and activated cells.

OS 1615 15kDa (figure 3c) have no action on non-activated cells but they were effective on activated cells to restore the iNOS basal level (efficient concentrations: 0.1ng/ml and 10ng/ml). This correlates with the results observed for NO production where the same concentrations of OS are active on activated cells.

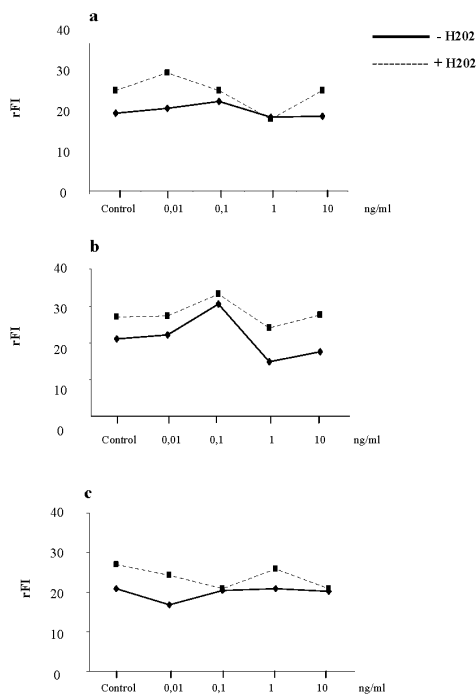


Figure 3. The labelling with a specific antibody allows the effect of (a) BEC441 (b), arginine-PCA and (c) oligosaccharides 1615 15 kDa on the iNOS intracellular level to be evaluated.

Modulation of *in vitro* vessel formation by the molecules.

The influence of molecules on angiogenesis *in vitro* was tested by incubation of HSkMEC independently with the three molecules for 24 hours. The vessel formation speed was followed under the microscope at several times. The results are shown in figure 4 and are given here for the molecule concentration of 1ng/ml.

In this *in vitro* angiogenesis test, 3h30 after incubation with BEC441 at 1ng/ml (figure 4d), HSkMEC underwent rearrangement and began to establish a network which will give future vessels as compared to the control (figure 4a) where cells hardly began to lengthen on the matrix.

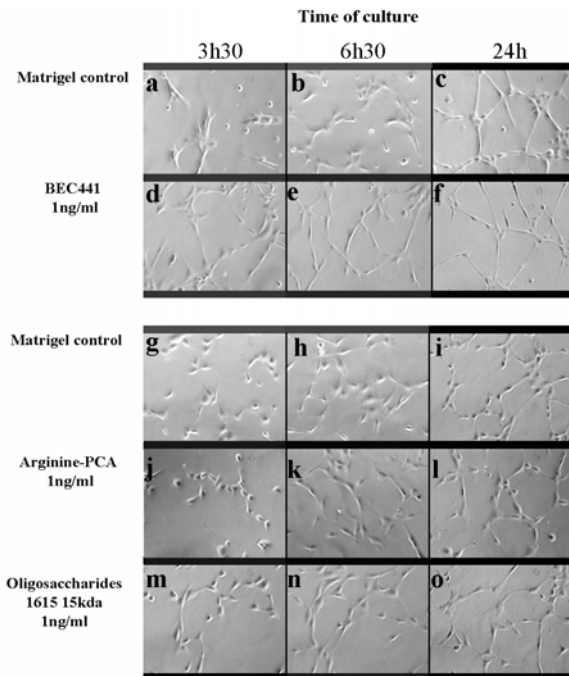


Figure 4. Effects of the anti-inflammatory molecules towards HSkMEC angiogenesis. Cell rearrangement and pseudo-vessels formation were followed as a function of time on Matrigel matrix. The vessel formation speed in presence of (d-e-f) BEC441, (j-k-l) arginine-PCA and (m-n-o) oligosaccharides 1615 15kDa was assessed compared to the control in the absence of molecules (a-b-c) for BEC441 and (g-h-i) for arginine-PCA and oligosaccharides 1615 15kDa at various time lapses.

After 6h30, control cells started to form a network (figure 4b), whereas we observed very thin vessels within an organized network in the presence of BEC441 (figure 4e).

After 24 hours of culture with BEC441 (figure 4f), we observed a homogeneous vessel network compared to the control (figure 4c) where we could still observe undifferentiated cells.

When cells were incubated with arginine-PCA, we observed an advancement of cell rearrangement after 3h30 (figure 4j) compared to the control (figure 4g) although less than with BEC441 (figure 4d). But after 6h30 (figure 4k) and 24h (figure 4l), we could not see

any significant advance in the angiogenic rearrangements as compared to the control (figures 4h and 4i).

In the presence of OS 1615 15kDa, after 3h30 (figure 4m), cells are more grouped than in the control (figure 4g) and clearly design the future vessel network. After 6h30 (figure 4n), the formation of the network was slightly more efficient than the control (figure 4h) but less clearly than with BEC441 (figure 4e). At 24 hours, the differences between cells in the presence (figure 4o) or absence (figure 4i) of OS 1615 15kDa were no longer visible.

Discussion

These studies report the potential activity of three anti-inflammatory molecules towards skin ECs.

BEC441, an anionic polysaccharide, which contains rhamnose, galactose and glucuronic acid, is known to inhibit cellular adhesion on keratinocytes and propagation of inflammatory signals in the skin. It has been shown / demonstrated here to affect the intracellular levels of NO and iNOS, whereas it is not efficient on lymphocyte adhesion. This effect can be related to the presence of ramified rhamnose OS within the polysaccharide chain. This was shown to favour the presentation of rhamnose to the endothelial cell receptors (Cerdan et al., 1991). This could be a useful tool to regulate the overproduction of NO when a stress or any injury induces iNOS and consequently NO production in ECs. Furthermore, BEC441 has clearly a positive effect on HSkMEC angiogenesis. This can be correlated with the proliferation test which showed BEC441 to be able to activate the proliferation of HSkMEC (data not shown), indicating a real pro-angiogenic effect in which proliferation is combined with migration and rearrangement of the cells.

The L-arginine PCA salt (2-pyrrolidone-5-carboxylic acid) was used because it is a physio-regenerant component associating the hydrating properties of PCA and the cell regenerator properties of L-arginine. Indeed, L-arginine is the substrate of NO synthesis. The excess of L-arginine acts as an inhibitor in the biosynthesis cascade. The present results confirm the inhibitor role of L-arginine because the arginine-PCA reduced the production of intracellular NO to the basal level found in non-activated cells.

As far as angiogenesis is concerned, arginine-PCA induced a fast but limited cell rearrangement and it did not affect cell proliferation (data not shown).

OS 1615 15kDa were obtained from the hydrolysis of polysaccharides BEC 1615 with a mean size of 15kDa. As compared to the polysaccharide (data not shown), they were active in all experiments as shown here: they inhibited CEMT4-adhesion on H₂O₂-activated cells, and reduced the intracellular levels of NO and iNOS. The OS contain mainly fucose residues. Hydrolysis of the polysaccharide BEC1615 reveals the fucose residues which can undergo an interaction with their receptor on skin endothelial cells and inhibit the inflammatory processes. OS 1615 15kDa have no significant effect on HSkMEC angiogenesis but they induce HSkMEC growth (data not shown).

By controlling iNOS and consequently, the resulting production of NO, it could be possible to protect cells from ROS induced apoptosis. As direct end products of NO regulation pathways, ROS are highly toxic species, consequently they are aimed to be reduced in order to gain faster recovery after cell injury or to achieve a protective effect by competing with the induced level of NO.

This study has shown that oligo/polysaccharides which contain fucose and rhamnose clearly display anti-inflammatory properties towards the skin microvascular endothelial cells.

Acknowledgments

This work was supported by a PhD grant from Bioeurope-Solabia company for CC and by an ARC grant 1117 and INSERM progress grant 48009E. LS, LL and P J.P. are working in the Research and Development section of the BioEurope Society

CK is Director of research CNRS.

References

- Cerdan D, Grillon C, Monsigny M, Redziniak G and Kieda C : Human keratinocytemembrane lectins: characterization and modulation of their expression by cytokines. *Biol Cell* 73 : 35-42, 1991
- Garbacki N, Gloaguen V, Damas J, Hoffmann L, Tits M and Angenot L : Inhibition of croton oil-induced oedema in mice ear skin by capsular polysaccharides from cyanobacteria. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361: 460-4, 2000
- Gonzalez D, Herrera B, Beltran A, Otero K, Quintero G and Rojas A : Nitric oxide disrupts VE-cadherin

complex in murine microvascular endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 304 : 113-8, 2003

Isnard N, Peterszegi G, Robert AM and Robert L :
Regulation of elastase-type endopeptidase activity,
MMP-2 and MMP-9 expression and activation in
human dermal fibroblasts by fucose and a fucose-rich
polysaccharide. *Biomed Pharmacother* 56 : 258-64,
2002

Jenkins G: Molecular mechanisms of skin ageing.
Mech Ageing Dev 123 : 801-10, 2002

Kieda C, Paprocka M, Krawczenko A *et al* : New
human microvascular endothelial cell lines with
specific molecules phenotypes. *Endothelium* 9(4) :
247-61, 2002

Lum H and Roebuck KA : Oxidant stress and
endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell
Physiol* 280 : 719-41, 2001

Malawista I. and Davidson EA : Isolation and
identification of rhamnose from rabbit skin. *Nature*
192 : 871-2, 1961

Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C
and Ashton BA : Leukocyte extravasation:
chemokine transport and presentation by the
endothelium. *Blood* 100 : 3853-60, 2002

Peterszegi G, Robert AM. and Robert L : Protection
by L-fucose and fucose-rich polysaccharides against
ROS-produced cell death in presence of ascorbate.
Biomed Pharmacother 57: 130-3,

Les autres molécules sont capables de moduler un ou plusieurs indicateurs d'inflammation testés dans cette étude mais présentent globalement un effet moindre que les trois molécules étudiées dans l'article.

Les résultats pour chaque molécule, y compris celles présentées dans l'article, sont présentés sous forme de fiches individuelles (numérotées de 1 à 8). Chaque fiche rassemble les données expérimentales obtenues dans les 5 types d'expériences réalisées :

- A) Expériences d'adhésion
- B) Dosage du NO intracellulaire
- C) Marquage de iNOS intracellulaire
- D) Test de prolifération
- E) Exemple de résultats d'angiogénèse

Afin d'en simplifier la lecture, les résultats sont récapitulés dans le tableau (page suivante). Les concentrations les plus actives y sont indiquées et les résultats surlignés en bleu concernent les trois molécules décrites dans l'article.

Les 2 polysaccharides, BEC 1645 (fiche 3A) et BEC 1615 (fiche 6A), n'ont pas d'effet significatif sur le recrutement de lymphocytes par les HSkMEC quelle que soit la concentration des molécules et l'état des cellules (traitées ou non par H₂O₂). Néanmoins, ils diminuent le taux de NO à 0,1 et 10ng/ml, concentrations actives pour les 2 polysaccharides (fiches 3B et 6B). La modulation du taux de iNOS par les polysaccharides reste à déchiffrer car nous observons deux types de réponses. Les polysaccharides augmentent le taux de iNOS à la concentration de 0,1ng/ml mais semblent le réduire à des concentrations supérieures excepté à 10ng/ml pour BEC 1645 (fiche 3C). Les polysaccharides BEC 1645 (fiche 3D) et BEC 1615 (fiche 6D) n'ont pas d'effet sur la croissance des cellules endothéliales de la peau ni sur le processus d'angiogénèse contrairement à BEC 441 (fiche 1D).

Les oligosaccharides 1645 15 kDa (fiche 4A) baissent l'adhésion uniquement à la concentration de 0,01ng/ml. Ils diminuent faiblement le taux de NO aux concentrations testées (fiche 4B). Ils diminuent également le taux iNOS à 0,1ng/ml (fiche 4C).

Les oligosaccharides 1645 5 kDa diminuent l'adhésion lorsqu'ils sont utilisés aux concentrations les plus faibles (0,01 et 0,1ng/ml) alors qu'ils l'augmentent aux concentrations supérieures (1 et 10ng/ml) (fiche 5A). Bien que le taux de NO soit réduit pour

Tableau récapitulatif des résultats obtenus avec les molécules BioEurope

Cases vides = pas d'effet significatif	adhésion	Dosage NO intracellulaire	Marquage iNOS intracellulaire	angiogénèse	Croissance cellulaire
BEC 441		0,1ng/ml 10ng/ml	1ng/ml	++	+
PCA d'arginine	0,1ng/ml 10ng/ml	1ng/ml 10ng/ml		+/-	
Polysaccharides BEC 1645		0,1ng/ml 10ng/ml	1ng/ml	-	
Oligosaccharides 1645 15 kDa	0,01ng/ml		0,1ng/ml		+/-
Oligosaccharides 1645 5 kDa	0,01ng/ml 0,1ng/ml	0,1ng/ml 10ng/ml			
Polysaccharides BEC 1615		10ng/ml	10ng/ml	-	
Oligosaccharides 1615 15 kDa	0,01ng/ml 10ng/ml	0,1ng/ml 10ng/ml	0,1ng/ml 10ng/ml	+	+
Oligosaccharides 1645 5 kDa		0,1ng/ml 10ng/ml			

les concentrations les plus fortes en oligosaccharides, le taux de iNOS augmente aux mêmes concentrations (fiches 5B et 5C).

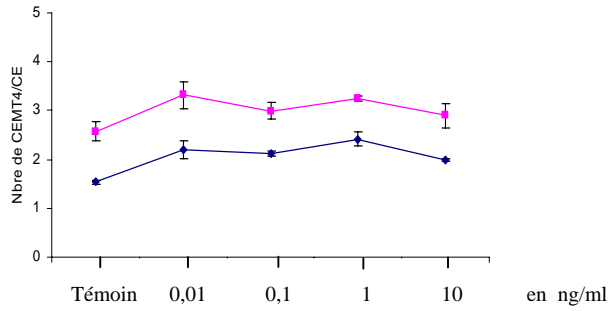
Quant aux oligosaccharides 1615 5 kDa, ils ne sont actifs que sur le taux de NO intracellulaire aux concentrations les plus élevées. Cette baisse n'est pas reliée au taux de iNOS, qui au contraire, tend à augmenter aux mêmes concentrations.

Fiche 1.

Polysaccharides BEC441

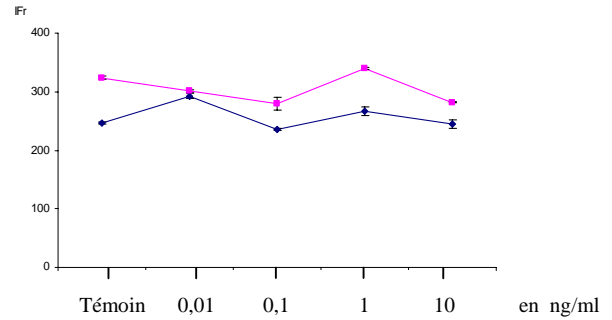
A) Adhésion

— Avec H₂O₂
— Sans H₂O₂



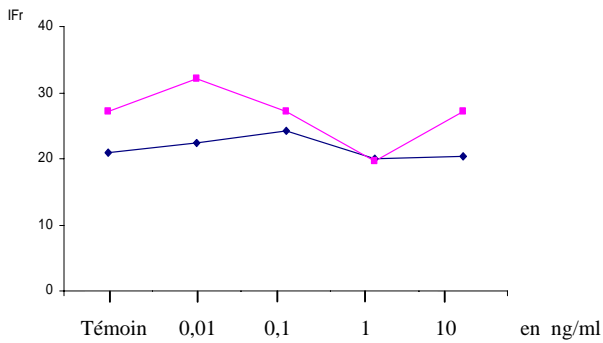
B) Dosage de NO

— Avec H₂O₂
— Sans H₂O₂



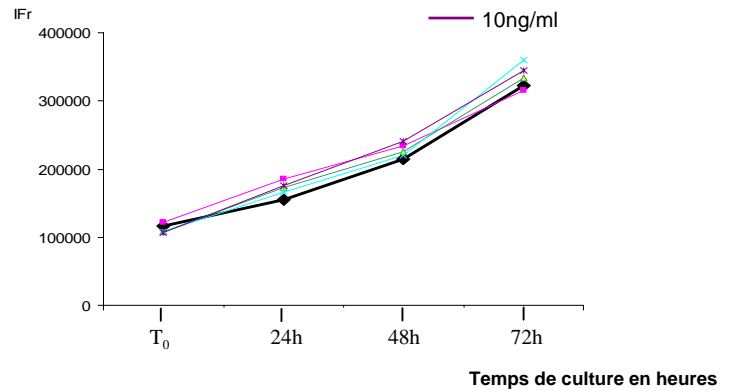
C) Marquage de iNOS

— Avec H₂O₂
— Sans H₂O₂



D) Test de croissance

— Témoin sans molécules
— 10pg/ml
— 100pg/ml
— 1ng/ml
— 10ng/ml



E) Angiogénèse

Témoin matrigel sans molécules

0,01

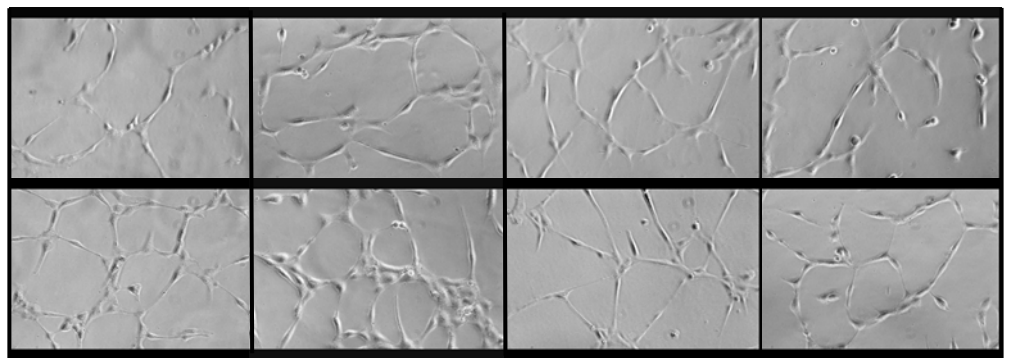
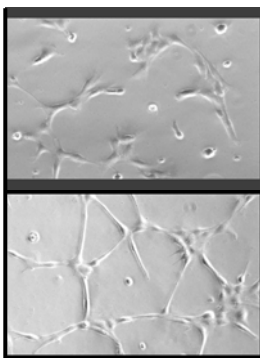
0,1

1

10 ng/ml

6h30

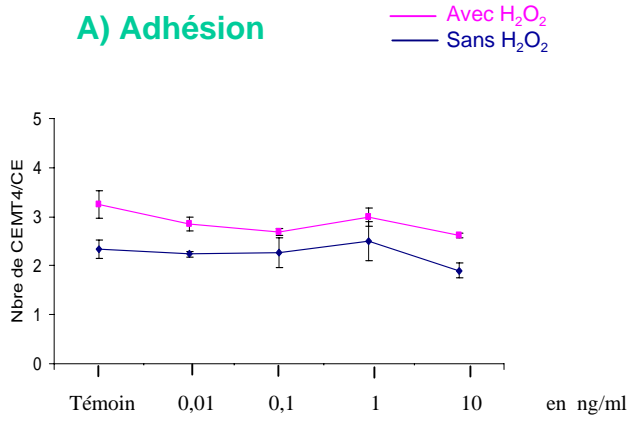
24h



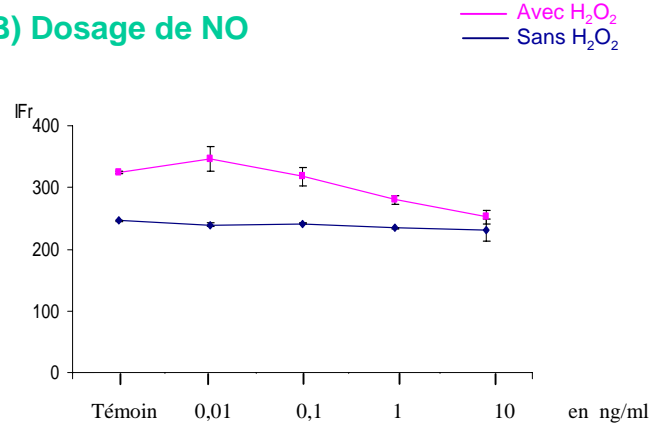
Fiche 2.

PCA d'arginine

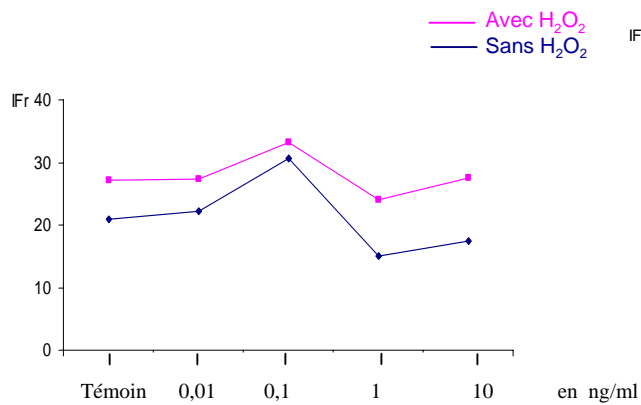
A) Adhésion



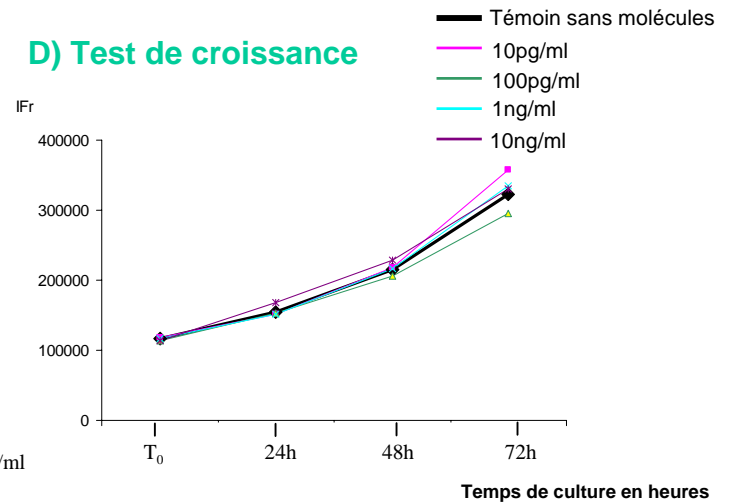
B) Dosage de NO



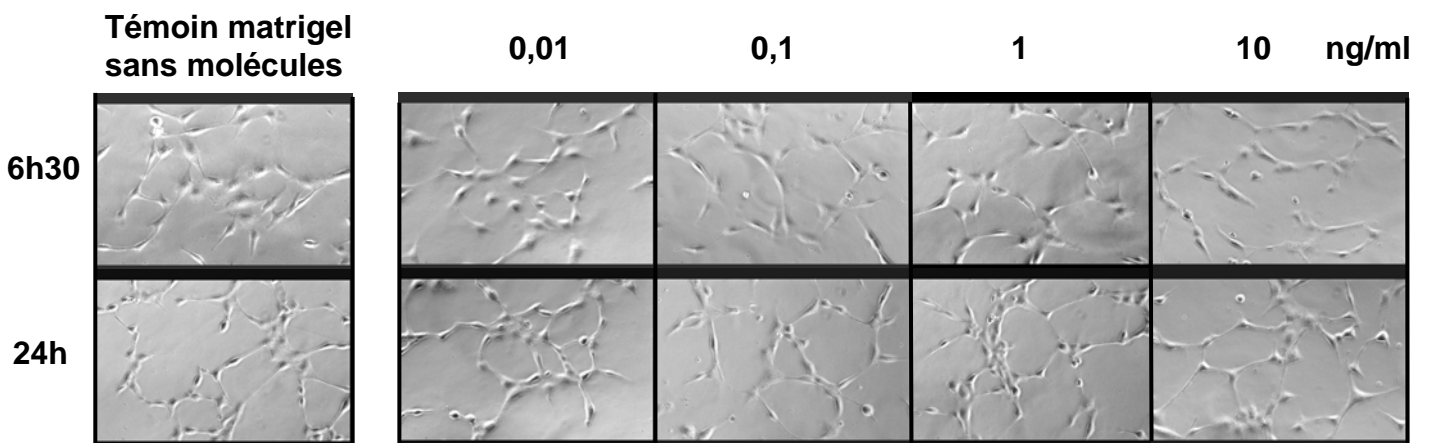
C) Marquage de iNOS



D) Test de croissance

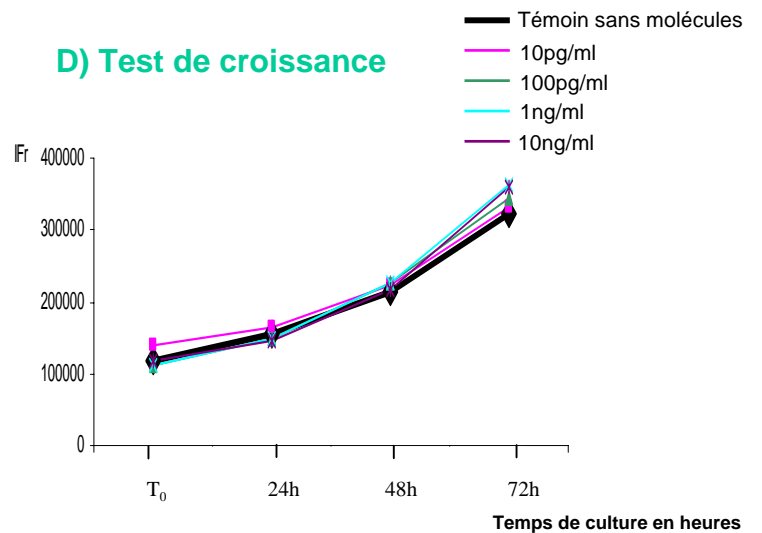
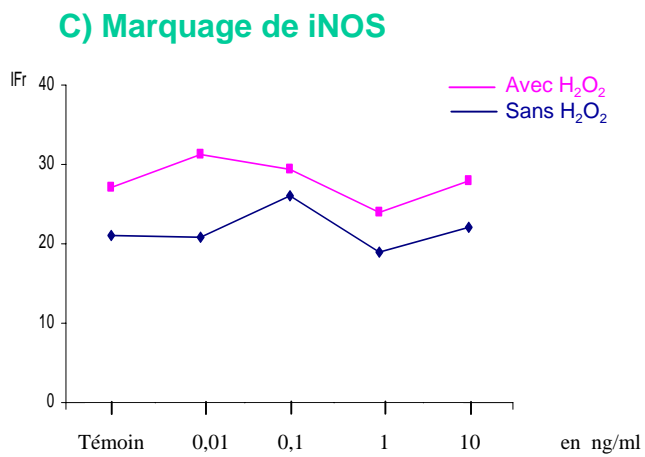
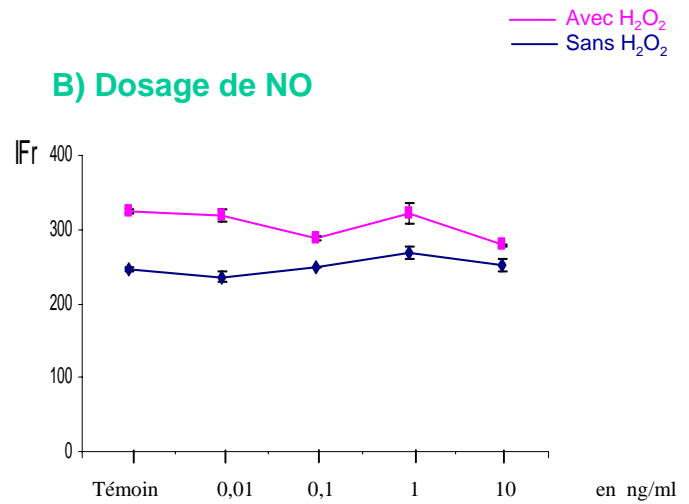
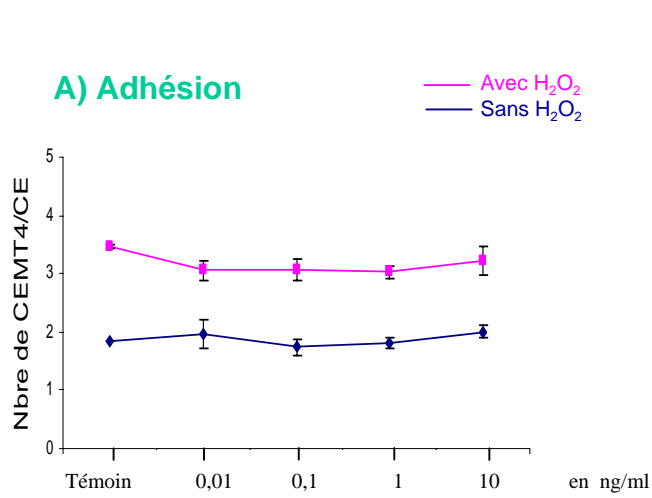


E) Angiogénèse

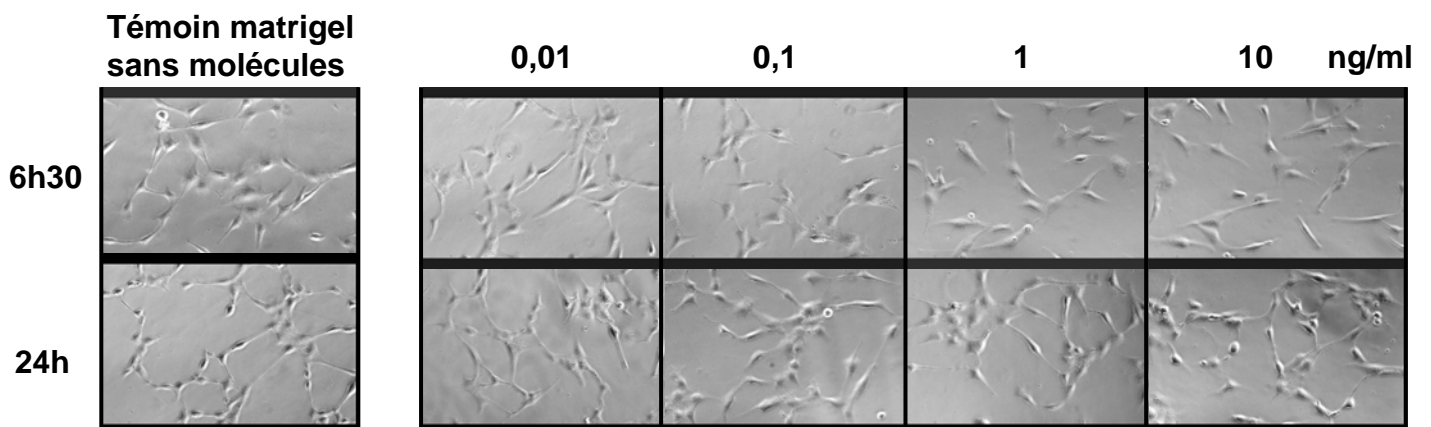


Fiche 3.

Polysaccharides BEC 1645



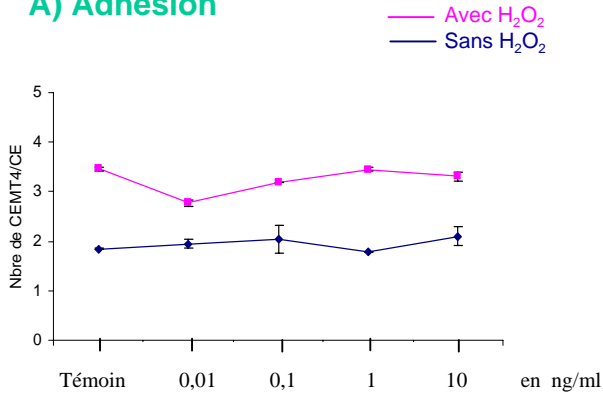
E) Angiogénèse



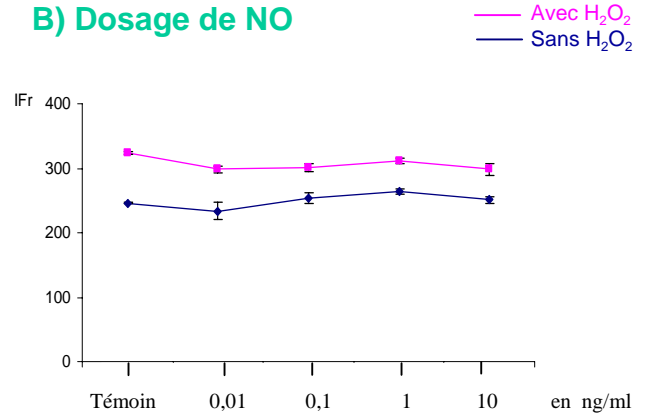
Fiche 4.

Oligosaccharides 1645 15kDa

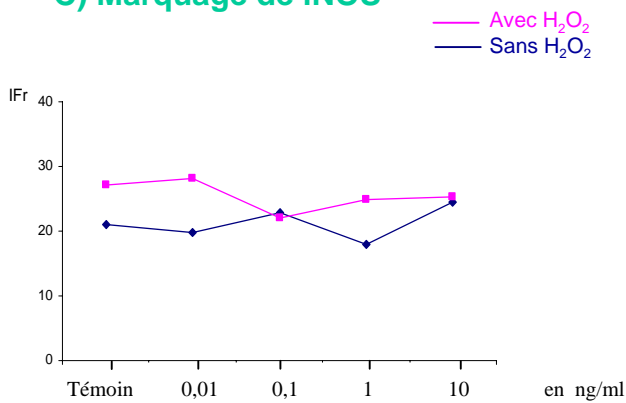
A) Adhésion



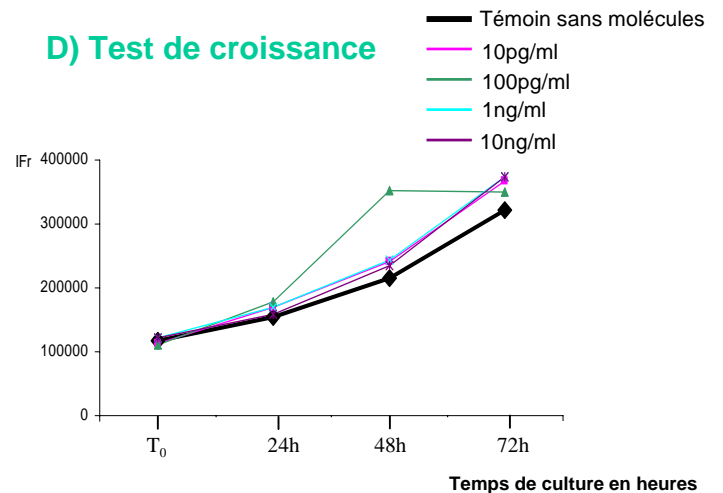
B) Dosage de NO



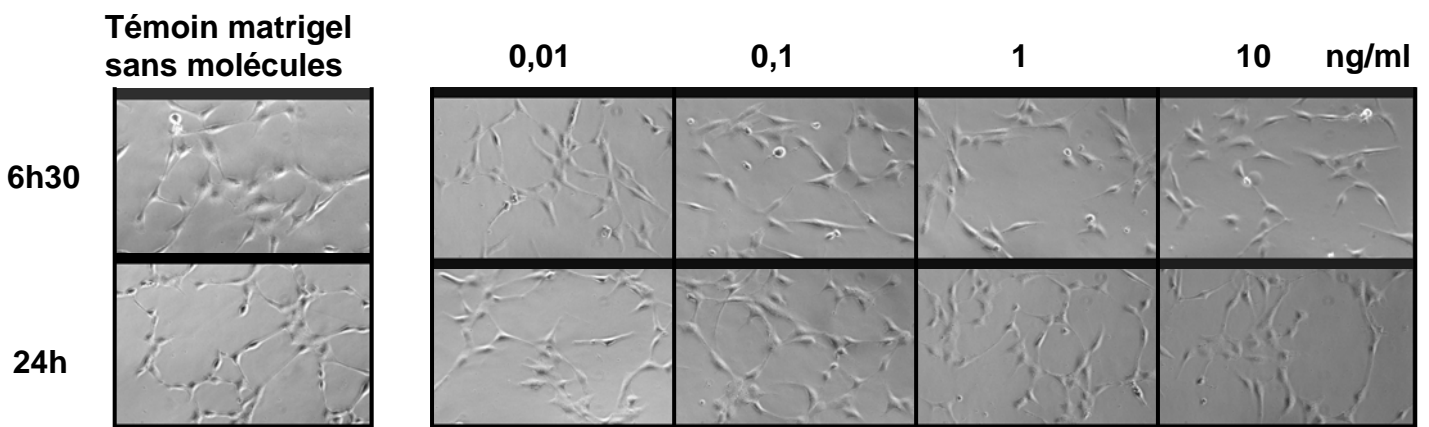
C) Marquage de iNOS



D) Test de croissance

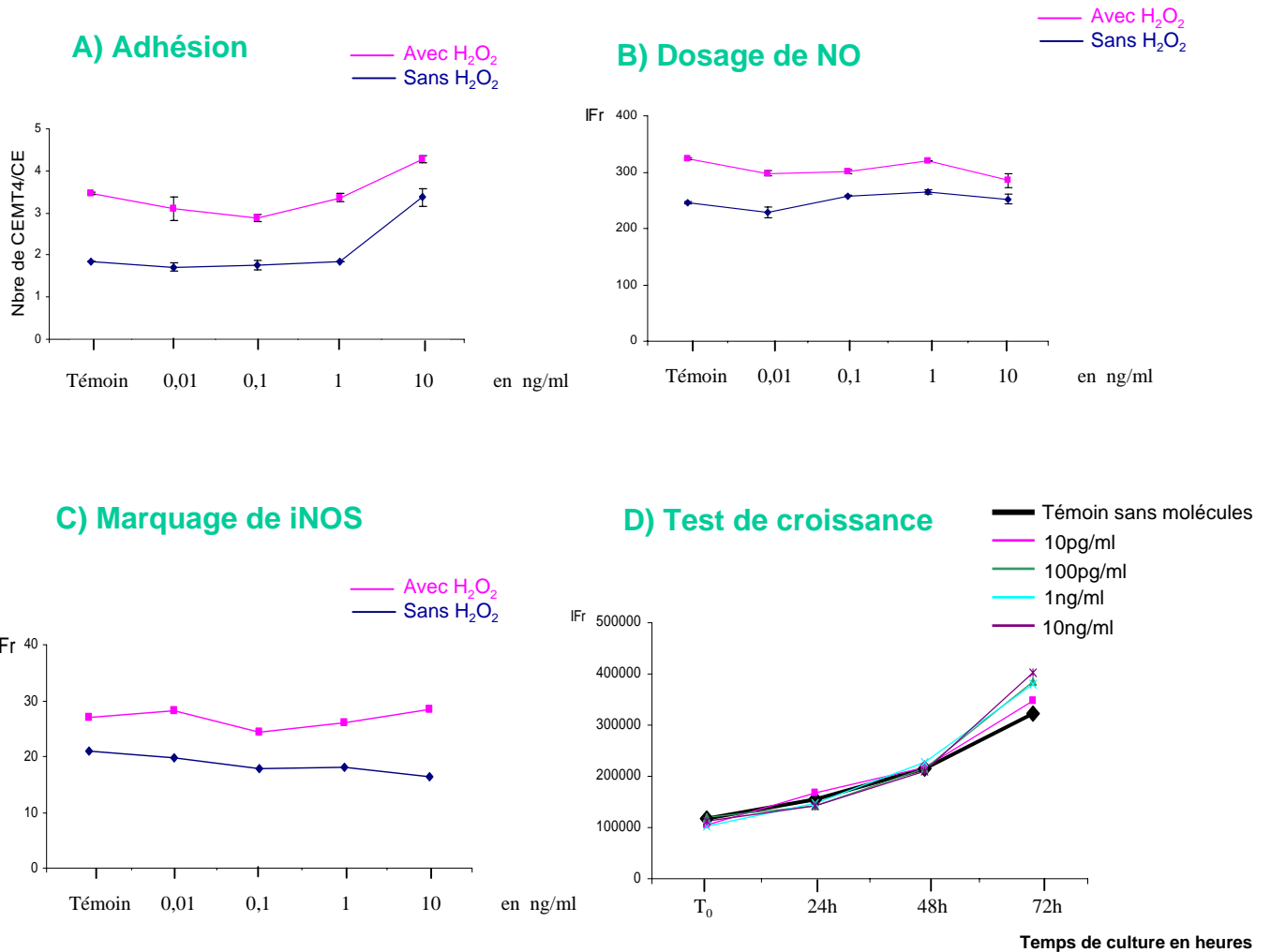


E) Angiogénèse

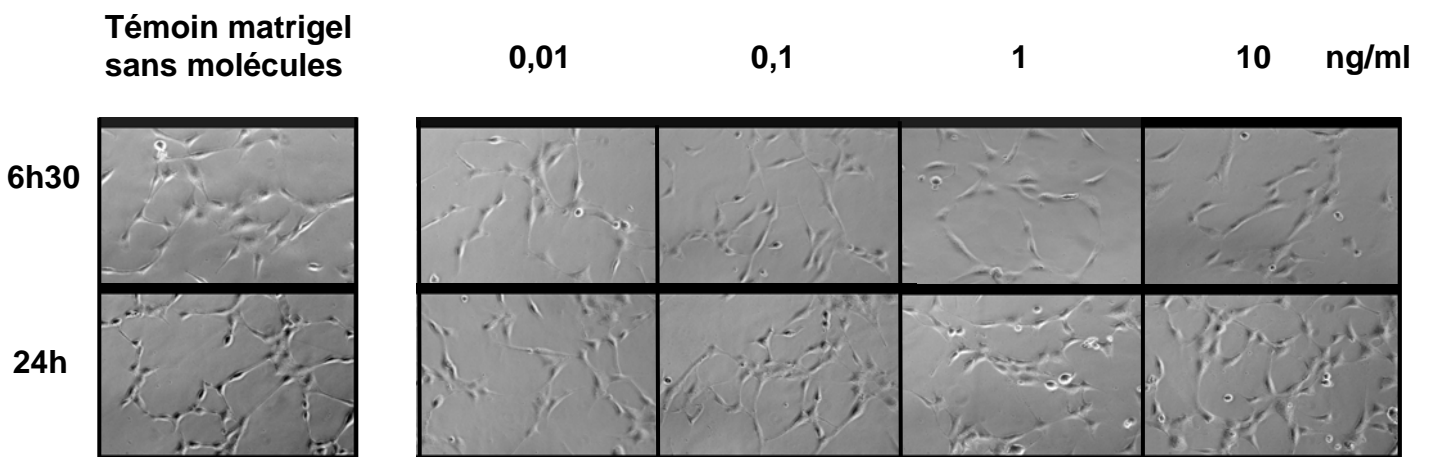


Fiche 5.

Oligosaccharides 1645 5 kDa

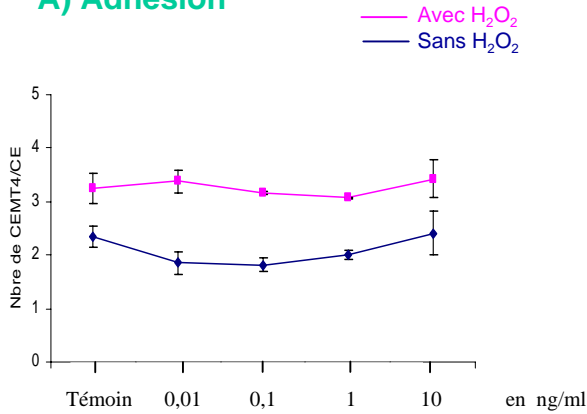


E) Angiogénèse

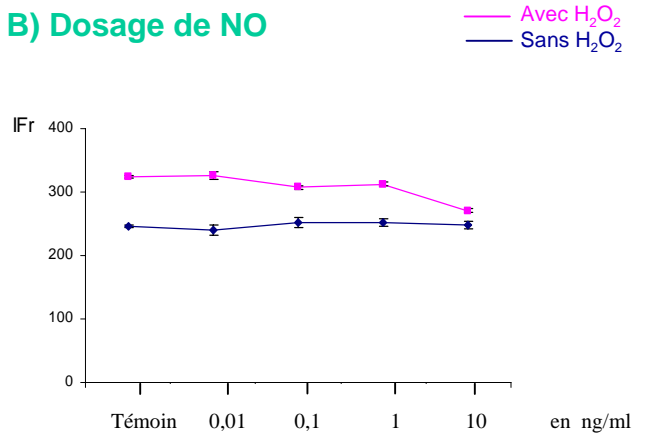


Polysaccharides BEC 1615

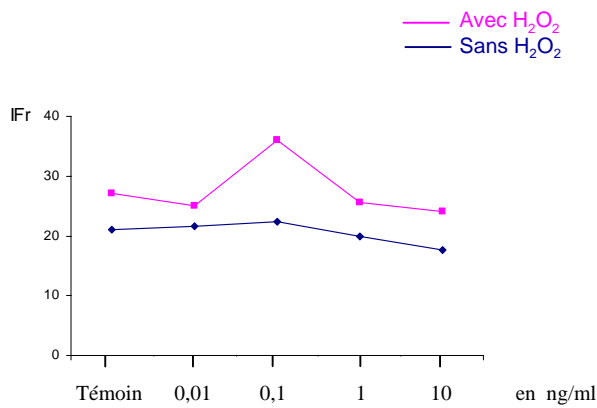
A) Adhésion



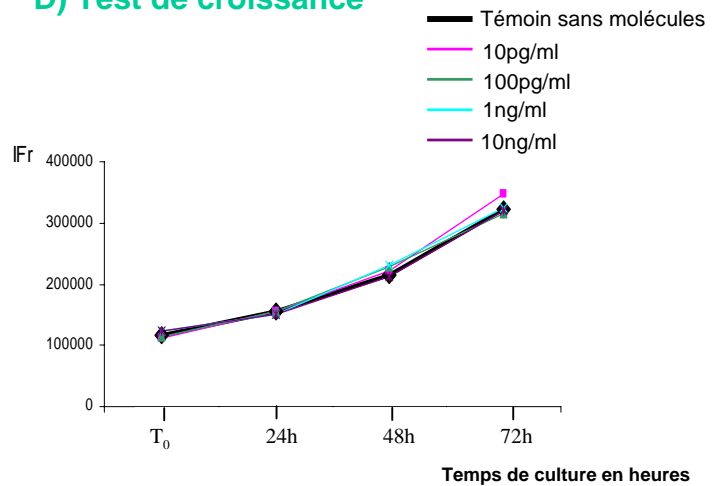
B) Dosage de NO



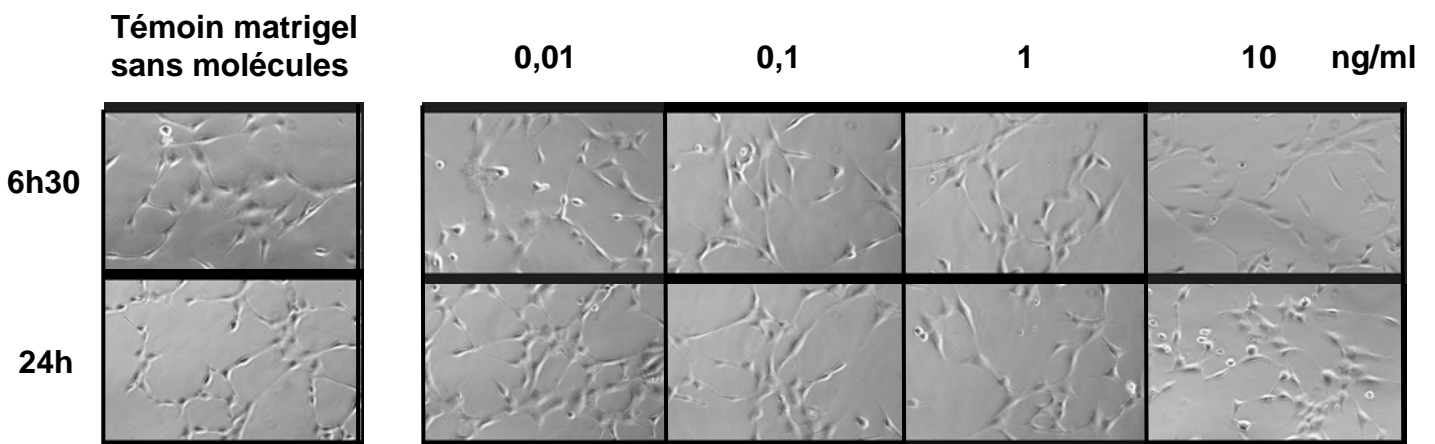
C) Marquage de iNOS



D) Test de croissance



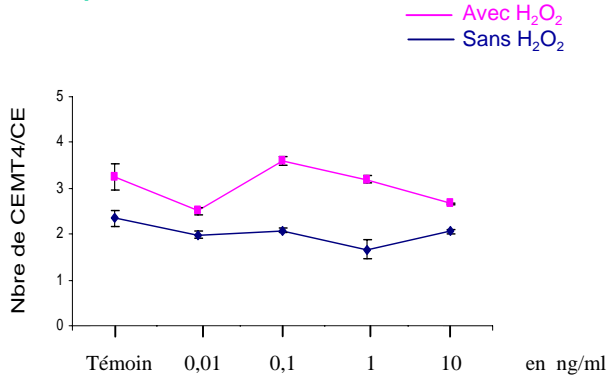
E) Angiogenèse



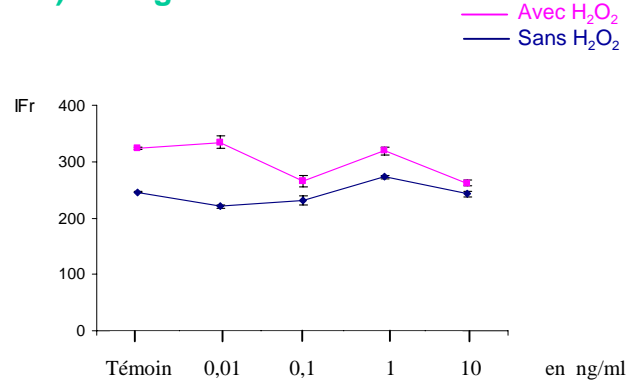
Fiche 7.

Oligosaccharides 1615 15kDa

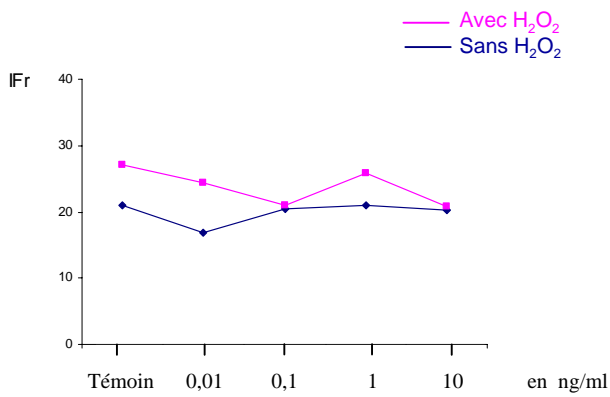
A) Adhésion



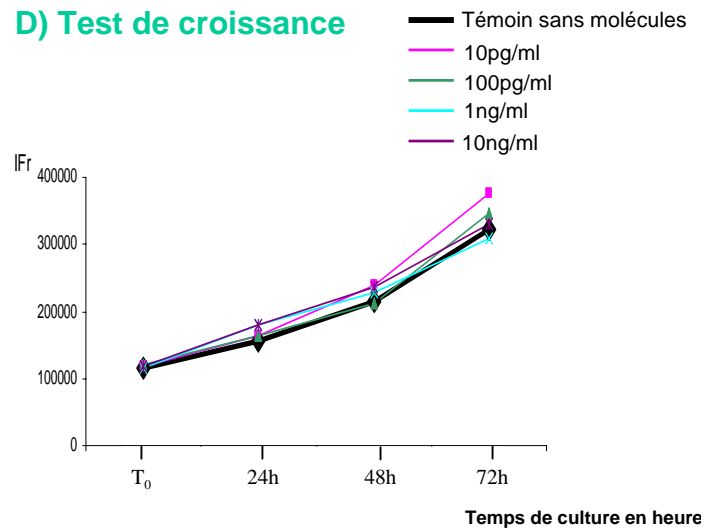
B) Dosage de NO



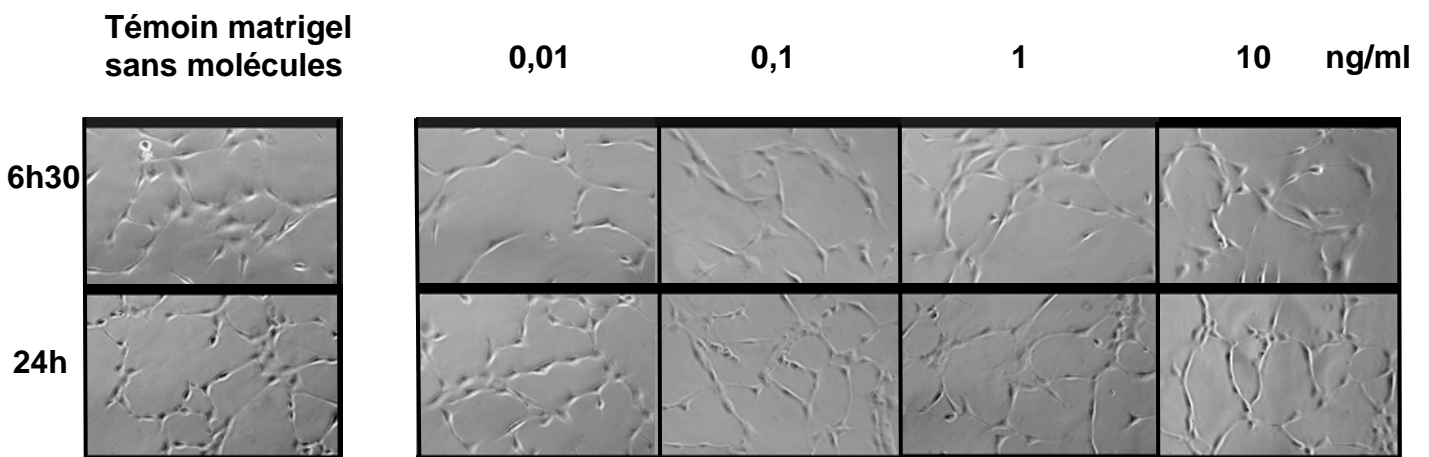
C) Marquage de iNOS



D) Test de croissance



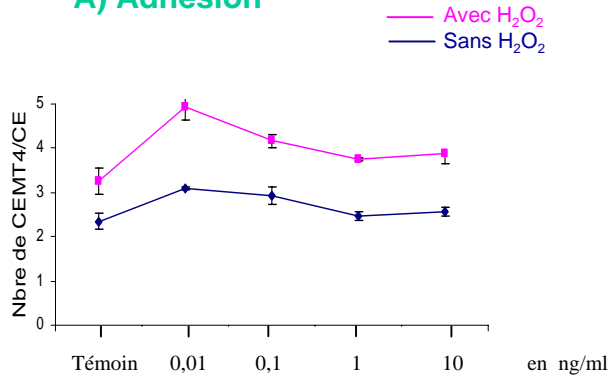
E) Angiogénèse



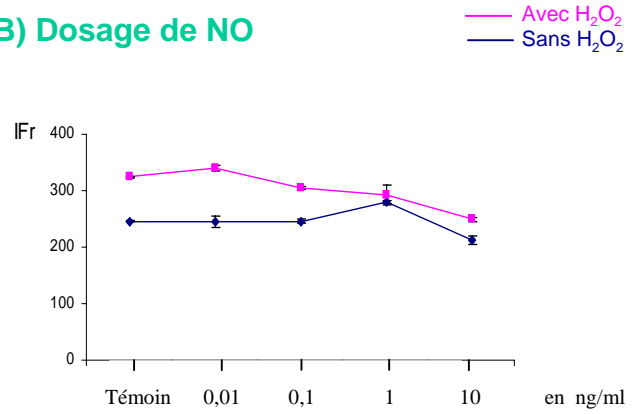
Fiche 8.

Oligosaccharides 1615 5kDa

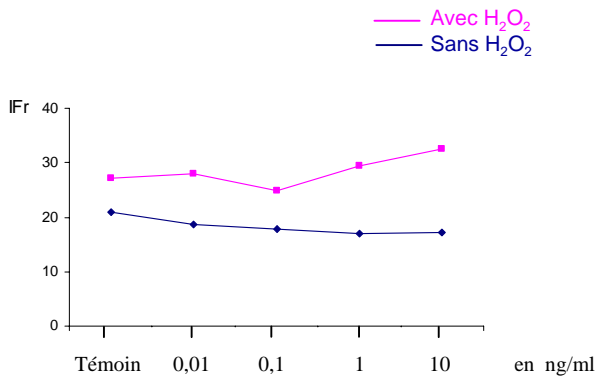
A) Adhésion



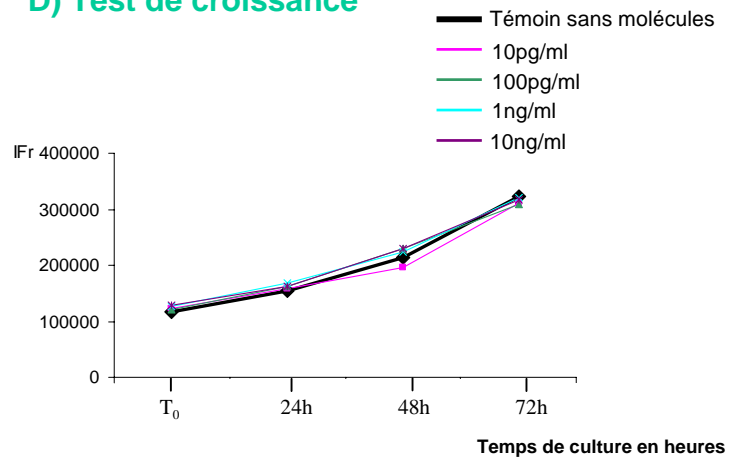
B) Dosage de NO



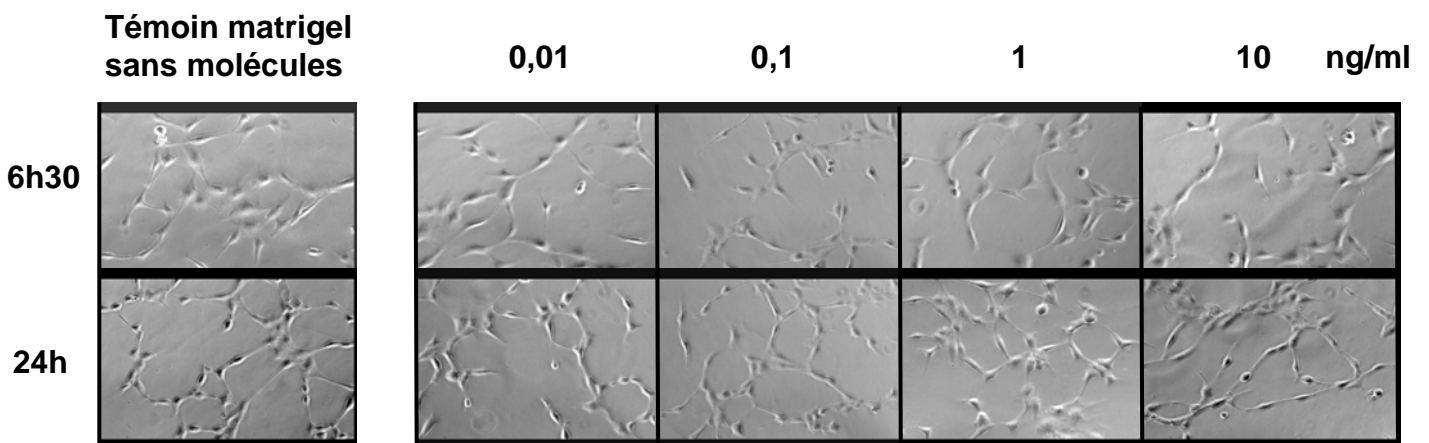
C) Marquage de iNOS



D) Test de croissance



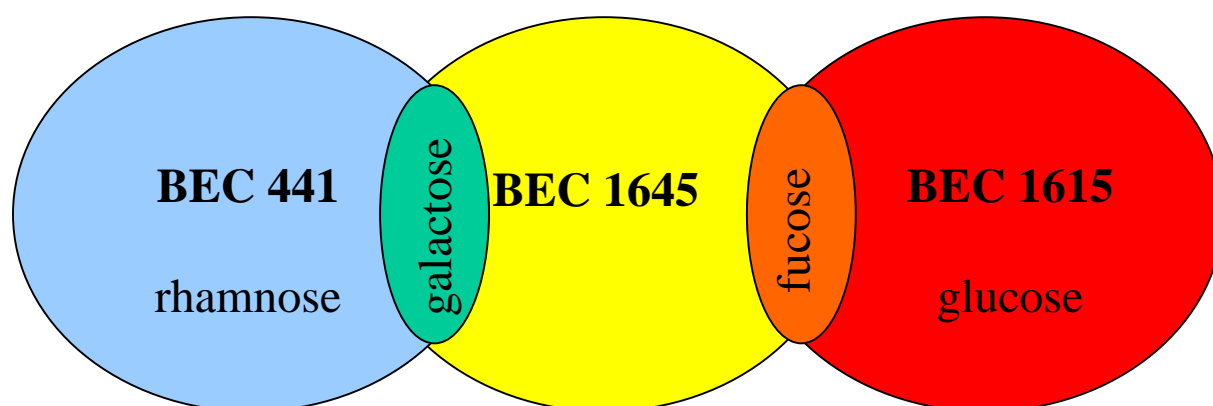
E) Angiogénèse



3 Discussion et perspectives

Les polysaccharides BEC 441 et BEC 1645 ont des effets similaires sur l'adhésion cellulaire, les taux de NO et iNOS bien qu'ils présentent des comportements différents dans les expériences d'angiogénèse et de croissance cellulaire. Tandis que les polysaccharides BEC 441 favorisent significativement l'angiogénèse et la croissance des cellules endothéliales de la peau, les polysaccharides BEC 1645 n'ont aucun effet sur ces deux paramètres. Les polysaccharides BEC 1615 diminuent uniquement le taux de NO et présentent par conséquent, une action limitée comparativement aux deux autres polysaccharides.

Ces différences s'expliquent par leur composition en sucres et par la position des sucres dans la chaîne saccharidique.



Les polysaccharides BEC 441 sont riches en résidus rhamnose mais contiennent également du galactose, sucre commun avec les polysaccharides BEC 1645. Ces deux polysaccharides montrent des activités similaires sur le recrutement lymphocytaire et la modulation du système NO/iNOS mais seuls les polysaccharides BEC 441 favorisent la croissance des cellules endothéliales de la peau ainsi que le processus d'angiogénèse par ces cellules. Ces dernières activités peuvent être attribuées à la présence de rhamnose dans le BEC 441.

La présence de fucose est le point commun entre les polysaccharides BEC 1645 et BEC 1615. Les polysaccharides BEC 1615 ont une faible activité comparativement aux deux autres polysaccharides. Ils agissent uniquement sur les taux de iNOS et NO. La présence de fucose peut leur conférer ces propriétés communes avec BEC 1645 mais la présence de glucose ne semble pas avoir d'influence sur l'activité globale des polysaccharides BEC 1615.

Concernant les oligosaccharides dérivés obtenus par hydrolyse des polysaccharides, leurs réponses varient en fonction de la composition en sucres mais aussi en fonction de la taille des molécules.

Si on compare les oligosaccharides des deux familles différentes BEC 1645 et BEC 1615 de masse moléculaire moyenne de 15 kDa, ils montrent une nette différence d'activité attribuable à la différence de composition. Les oligosaccharides 1615 15 kDa présentent des effets dans toutes les expériences tandis que les oligosaccharides 1645 15 kDa montrent des effets moindres. Les oligosaccharides de masse moléculaire égale à 5 kDa, qu'ils soient dérivés de BEC 1645 et BEC 1615, montrent une activité modérée vis-à-vis des cellules endothéliales de la peau dans les expériences réalisées dans cette étude. A concentration molaire égale, les oligosaccharides de 15 kDa sont plus actifs que ceux de 5 kDa. Cet effet est observé dans les deux familles 1645 et 1615.

L'hydrolyse des polysaccharides est aléatoire, les oligosaccharides résultants sont de masse moyenne identique mais les coupures dans la chaîne principale libèrent probablement des résidus sucres jusqu'alors masqués et indisponibles. Ces résidus peuvent être alors présentés aux récepteurs de sucre présents sur les cellules endothéliales. La coupure libre des résidus fucose ou acide glucuronique pour les oligosaccharides 1645 et 1615. La combinaison des résidus fucose-galactose ou fucose-glucose expliquerait la différence de réponse entre les deux familles de sucres, et la libération des résidus après hydrolyse augmenterait l'effet des oligosaccharides par rapport aux polysaccharides en permettant une meilleure présentation au récepteur.

Afin de rétablir la cascade cellulaire se produisant *in vivo* (cf. chapitre II § 13.1.2), des milieux conditionnés de kératinocytes incubés au préalable avec les oligo/polysaccharides seront testés sur les cellules endothéliales de la peau afin de comparer les effets directs et indirects de ces sucres sur l'inflammation cutanée. De plus, de nouveaux polysaccharides pourront être produits afin d'identifier et de comparer les effets des différents sucres les constituant dans le but d'essayer de leur attribuer une activité spécifique (ex, rhamnose sur angiogénèse).

Ces études illustrent l'intérêt de lignées spécifiques humaines, plus particulièrement l'endothélium de la peau, permettant des études appliquées de molécules potentiellement actives dans l'inflammation cutanée.

V Conclusion Générale

Ce travail a mis en évidence la participation des chimiokines à l'organo-spécificité de l'endothélium grâce à l'utilisation de lignées cellulaires spécifiques d'organes humains.

Ce travail s'inscrit à long terme dans les nouvelles stratégies de thérapie cellulaire.

En effet, les cellules cancéreuses utilisent les mêmes moyens de reconnaissance pour envahir de nouveaux tissus que les leucocytes pour l'immunosurveillance. Comprendre les signaux d'adressage des leucocytes à des sites particuliers c'est également, s'approcher de la compréhension des mécanismes d'adressage des métastases dans les tissus cibles.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux rôles joués par des chimiokines dans la spécificité de l'endothélium. Aujourd'hui les fonctions des chimiokines dépassent la fonction première qui leur a été attribuée et qui leur a valu leur nom, c'est à dire leur capacité à attirer spécifiquement certaines populations de cellules circulantes. En effet, elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques et agissent à différents niveaux de la réponse cellulaire.

Ainsi, nous avons montré que la seule présence du récepteur ne justifie pas la spécificité d'action de la chimiokine et démontré l'importance du microenvironnement pour la spécificité. Cependant, même si d'autres structures sont fondamentales pour la biologie des chimiokines (GAGs), les chimiokines produisent leurs effets biologiques par signal via leurs récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ainsi, le blocage de l'interaction chimiokine/récepteur par un anticorps ou une molécule antagoniste pourrait constituer un nouveau moyen d'inhiber la réponse cellulaire induite par la liaison de la chimiokine à son récepteur ou encore enrayer l'invasion des cellules tumorales dans les tissus sains. Ceci a un impact pour le ciblage de thérapies puisque nous avons pu mettre en évidence la spécificité d'action de certaines chimiokines vis à vis de lignées endothéliales particulières. En effet, cette spécificité d'action a été démontrée au niveau de phénomènes biologiques reflétant les fonctions premières des cellules endothéliales tels que le recrutement de lymphocytes ou leur capacité à former de nouveaux vaisseaux.

Par conséquent, d'après ces premiers résultats, il est envisageable de considérer certaines chimiokines comme un moyen de cibler une cellule ou un tissu.

Puisque la fixation d'une chimiokine à une cellule endothéliale n'est pas directement corrélée à l'expression du récepteur à la surface, nous avons examiné les possibilités de présentation des chimiokines par les cellules endothéliales via les ligands putatifs de la surface cellulaire et en particulier les GAGs. De nombreux travaux montrent que ces structures participent pleinement à la biologie des chimiokines en favorisant leur interaction avec leur récepteur spécifique. De plus, les GAGs participent à l'organo-spécificité de l'endothélium car leur

composition varie en fonction de l'organe considéré. Les chimiokines, leurs récepteurs et les GAGs forment un système complexe et hautement régulé avec des associations bien spécifiques conférant des propriétés particulières à l'endothélium. Cette piste de recherche doit être explorée afin de mieux comprendre comment de multiples acteurs peuvent opérer ensemble pour donner la spécificité à un endothélium donné.

Comme nous l'avons vu, les chimiokines agissent également sur le processus d'angiogénèse. L'utilisation de chimiokines anti-angiogéniques pourrait permettre de déstabiliser le réseau vasculaire tumoral et ainsi asphyxier localement la tumeur. Au contraire, les chimiokines pro-angiogéniques pourraient participer à la réparation de tissus lésés en favorisant la revascularisation de ces derniers.

En outre, les chimiokines stimulent les cellules effectrices du système immunitaire. Elles attirent spécifiquement les leucocytes dont les cellules tueuses NK. Les NK présentent à leur surface des récepteurs de chimiokines (ex : CX₃CR1), leur recrutement pourrait donc être favorisé dans un site particulier, comme une tumeur. Ils exerceraient alors leur activité cytolytique en détruisant soit les cellules tumorales, soit les cellules endothéliales des vaisseaux irriguant la tumeur. Les résultats de l'article intitulé «**Human natural killer cells kill organo-specific endothelial cells: analysis of the adhesion and cytotoxic mechanisms**» présenté en annexe 2 et accepté pour publication dans le journal «Journal of Immunology», montrent que les NK peuvent adhérer et tuer les cellules endothéliales. Les cellules NK activées par l'interleukine 2 sont capables de se lier préférentiellement aux cellules endothéliales dérivées d'organes lymphoïdes tels que les cellules de ganglions lymphatiques périphériques ou mésentériques. Ces résultats montrent que l'action des NK peut être spécifique de l'organe et peut donc constituer une nouvelle voie d'investigation pour de nouveaux traitements anti-cancéreux.

La deuxième partie du manuscrit montre que nous disposons d'un outil de choix pour des études plus appliquées, notamment dans le domaine de la cosmétologie ou pharmacologie. La lignée de cellules endothéliales de la peau a permis d'évaluer les propriétés potentiellement anti-inflammatoires et anti-oxydantes des molécules produites par la société BioEurope. Cette approche permet de pré-sélectionner des molécules potentiellement actives *in vitro* dans des modèles d'études variés comme leur action sur le recrutement de lymphocytes ou encore leur rôle sur le taux de NO et iNOS intracellulaire. Ce modèle permet donc un criblage de molécules permettant d'envisager le développement de médicaments et de mener des essais *in vivo* puis cliniques. Ainsi nous avons mis en évidence et sélectionné 3 molécules dont les

propriétés se révèlent intéressantes mais nécessitant cependant de plus amples investigations pour le développement futur.

Bibliographie

- Abitorabi, M.A., Mackay, C.R., Jerome, E.H., Osorio, O., Butcher, E.C., et Erle, D.J. 1996. Differential expression of homing molecules on recirculating lymphocytes from sheep gut, peripheral, and lung lymph. *J Immunol* **156**: 3111-3117.
- Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T., et Gutierrez-Ramos, J.C. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* **185**: 111-120.
- Alfano, M., et Poli, G. 2005. Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol* **42**: 161-182.
- Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J.L., Delepiepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., et al. 1999. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem* **274**: 23916-23925.
- Anderson, J.M., Balda, M.S., et Fanning, A.S. 1993. The structure and regulation of tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 772-778.
- Anderson, N.D., Anderson, A.O., et Wyllie, R.G. 1976. Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunology* **31**: 455-473.
- Asojo, O.A., Boulegue, C., Hoover, D.M., Lu, W., et Lubkowski, J. 2003. Structures of thymus and activation-regulated chemokine (TARC). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 1165-1173.
- Baekkevold, E.S., Yamanaka, T., Palframan, R.T., Carlsen, H.S., Reinholt, F.P., von Andrian, U.H., Brandtzaeg, P., et Haraldsen, G. 2001. The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* **193**: 1105-1112.
- Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**: 565-568.
- Baird, J.W., Nibbs, R.J., Komai-Koma, M., Connolly, J.A., Ottersbach, K., Clark-Lewis, I., Liew, F.Y., et Graham, G.J. 1999. ESkin, a novel beta-chemokine, is differentially spliced to produce secretable and nuclear targeted isoforms. *J Biol Chem* **274**: 33496-33503.
- Baldwin, E.T., Weber, I.T., St Charles, R., Xuan, J.C., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., Edwards, B.F., Clore, G.M., et Gronenborn, A.M. 1991. Crystal structure of

- interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 502-506.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., et Schall, T.J. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**: 640-644.
- Berg, E.L., Goldstein, L.A., Jutila, M.A., Nakache, M., Picker, L.J., Streeter, P.R., Wu, N.W., Zhou, D., et Butcher, E.C. 1989. Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev* **108**: 5-18.
- Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F., et Butcher, E.C. 1993. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* **366**: 695-698.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., et Gimbrone, M.A., Jr. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9238-9242.
- Beyer, E.C. 1993. Gap junctions. *Int Rev Cytol* **137C**: 1-37.
- Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., et Springer, T.A. 1996a. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**: 829-833.
- Bleul, C.C., Fuhlbrigge, R.C., Casasnovas, J.M., Aiuti, A., et Springer, T.A. 1996b. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* **184**: 1101-1109.
- Briskin, M.J., McEvoy, L.M., et Butcher, E.C. 1993. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* **363**: 461-464.
- Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., et Kolb-Bachofen, V. 1998a. Nitric oxide and its implications in skin homeostasis and disease - a review. *Arch Dermatol Res* **290**: 643-651.
- Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., et Kolb-Bachofen, V. 1998b. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J Invest Dermatol* **110**: 1-7.
- Burns, J.M., Gallo, R.C., DeVico, A.L., et Lewis, G.K. 1998. A new monoclonal antibody, mAb 4A12, identifies a role for the glycosaminoglycan (GAG) binding domain of RANTES in the antiviral effect against HIV-1 and intracellular Ca²⁺ signaling. *J Exp Med* **188**: 1917-1927.
- Burns, J.M., Lewis, G.K., et DeVico, A.L. 1999. Soluble complexes of regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted (RANTES) and glycosaminoglycans

- suppress HIV-1 infection but do not induce Ca(2+) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14499-14504.
- Butcher, E.C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**: 1033-1036.
- Butcher, E.C., Scollay, R.G., et Weissman, I.L. 1980. Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* **10**: 556-561.
- Cahill, R.N., Poskitt, D.C., Frost, D.C., et Trnka, Z. 1977. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J Exp Med* **145**: 420-428.
- Campbell, J.J., et Butcher, E.C. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* **12**: 336-341.
- Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., et al. 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* **400**: 776-780.
- Carrino, D.A., Sorrell, J.M., et Caplan, A.I. 2000. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* **373**: 91-101.
- Chappell, D.C., Varner, S.E., Nerem, R.M., Medford, R.M., et Alexander, R.W. 1998. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res* **82**: 532-539.
- Chaudhuri, A., Zbrzezna, V., Polyakova, J., Pogo, A.O., Hesselgesser, J., et Horuk, R. 1994. Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* **269**: 7835-7838.
- Clore, G.M., Appella, E., Yamada, M., Matsushima, K., et Gronenborn, A.M. 1990. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution. *Biochemistry* **29**: 1689-1696.
- Combadiere, C., Ahuja, S.K., et Murphy, P.M. 1995. Cloning and functional expression of a human eosinophil CC chemokine receptor. *J Biol Chem* **270**: 16491-16494.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Gao, J.L., Esposito, B., Casanova, S., Lee, E.J., Debre, P., Tedgui, A., Murphy, P.M., et Mallat, Z. 2003. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* **107**: 1009-1016.
- Combadiere, C., Salzwedel, K., Smith, E.D., Tiffany, H.L., Berger, E.A., et Murphy, P.M. 1998. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C

- chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* **273**: 23799-23804.
- Cook, D.N., Chen, S.C., Sullivan, L.M., Manfra, D.J., Wiekowski, M.T., Prosser, D.M., Vassileva, G., et Lira, S.A. 2001. Generation and analysis of mice lacking the chemokine fractalkine. *Mol Cell Biol* **21**: 3159-3165.
- Crump, M.P., Gong, J.H., Loetscher, P., Rajarathnam, K., Amara, A., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Baggiolini, M., Sykes, B.D., et Clark-Lewis, I. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo J* **16**: 6996-7007.
- D'Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J.A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., et Moser, B. 1997. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur J Immunol* **27**: 1788-1793.
- Dejana, E., Corada, M., et Lampugnani, M.G. 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J* **9**: 910-918.
- Dejana, E., et Del Maschio, A. 1995. Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb Haemost* **74**: 309-312.
- Dieterlen-Lievre, F., et Le Douarin, N.M. 2004. From the hemangioblast to self-tolerance: a series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mech Dev* **121**: 1117-1128.
- Ding, Z., Xiong, K., et Issekutz, T.B. 2000. Regulation of chemokine-induced transendothelial migration of T lymphocytes by endothelial activation: differential effects on naive and memory T cells. *J Leukoc Biol* **67**: 825-833.
- Drayson, M.T., et Ford, W.L. 1984. Afferent lymph and lymph borne cells: their influence on lymph node function. *Immunobiology* **168**: 362-379.
- Echigo, T., Hasegawa, M., Shimada, Y., Takehara, K., et Sato, S. 2004. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **113**: 940-948.
- Feil, C., et Augustin, H.G. 1998. Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 38-45.
- Fidler, I.J., et Ellis, L.M. 1994. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79**: 185-188.

- Flamme, I., Frolich, T., et Risau, W. 1997. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* **173**: 206-210.
- Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**: 27-31.
- Fong, A.M., Erickson, H.P., Zachariah, J.P., Poon, S., Schamberg, N.J., Imai, T., et Patel, D.D. 2000. Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX(3)C chemokine domain presentation. *J Biol Chem* **275**: 3781-3786.
- Fong, A.M., Robinson, L.A., Steeber, D.A., Tedder, T.F., Yoshie, O., Imai, T., et Patel, D.D. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* **188**: 1413-1419.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., et Lipp, M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**: 23-33.
- Fratice, P., Sironi, M., Bianchi, G., D'Ambrosio, D., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Chieppa, M., Allavena, P., Ruco, L., Girolomoni, G., et al. 2001. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* **107**: 1173-1181.
- Frederick, M.J., et Clayman, G.L. 2001. Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* **2001**: 1-18.
- Freemont, A.J., et Jones, C.J. 1983. Light microscopic, histochemical and ultrastructural studies of human lymph node paracortical venules. *J Anat* **136**: 349-362.
- Fukuoka, M., Ogino, Y., Sato, H., Ohta, T., Komoriya, K., Nishioka, K., et Katayama, I. 1998. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D3 (tacalcitol). *Br J Dermatol* **138**: 63-70.
- Gallatin, M., St John, T.P., Siegelman, M., Reichert, R., Butcher, E.C., et Weissman, I.L. 1986. Lymphocyte homing receptors. *Cell* **44**: 673-680.
- Gallatin, W.M., Weissman, I.L., et Butcher, E.C. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**: 30-34.
- Garin, A., Tarantino, N., Faure, S., Daoudi, M., Lecureuil, C., Bourdais, A., Debre, P., Deterre, P., et Combadiere, C. 2003. Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. *J Immunol* **171**: 5305-5312.
- Girard, J.P., et Springer, T.A. 1995. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* **16**: 449-457.

- Gleichmann, M., Gillen, C., Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter, R., Auer, J., et Muller, H.W. 2000. Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* **12**: 1857-1866.
- Goldschneider, I., et McGregor, D.D. 1968. Migration of lymphocytes and thymocytes in the rat. I. The route of migration from blood to spleen and lymph nodes. *J Exp Med* **127**: 155-168.
- Gowans, J.L. 1959. The recirculation of lymphocytes from blood to lymph in the rat. *J Physiol* **146**: 54-69.
- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T., et Nakano, H. 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* **189**: 451-460.
- Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., et Williams, L.T. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 258-263.
- Gupta, S.K., et Pillarisetti, K. 1999. Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J Immunol* **163**: 2368-2372.
- Guy-Grand, D., Griscelli, C., et Vassalli, P. 1978. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J Exp Med* **148**: 1661-1677.
- Halstead, T.E., et Hall, J.G. 1972. The homing of lymph-borne immunoblasts to the small gut of neonatal rats. *Transplantation* **14**: 339-346.
- Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., et al. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10896-10901.
- Haskell, C.A., Cleary, M.D., et Charo, I.F. 2000. Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion. *J Biol Chem* **275**: 34183-34189.
- Haskell, C.A., Hancock, W.W., Salant, D.J., Gao, W., Csizmadia, V., Peters, W., Faia, K., Fituri, O., Rottman, J.B., et Charo, I.F. 2001. Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest* **108**: 679-688.

- Hatori, K., Nagai, A., Heisel, R., Ryu, J.K., et Kim, S.U. 2002. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J Neurosci Res* **69**: 418-426.
- Hedrick, J.A., Saylor, V., Figueroa, D., Mizoue, L., Xu, Y., Menon, S., Abrams, J., Handel, T., et Zlotnik, A. 1997. Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* **158**: 1533-1540.
- Hedrick, J.A., et Zlotnik, A. 1996. Chemokines and lymphocyte biology. *Curr Opin Immunol* **8**: 343-347.
- Hedrick, J.A., et Zlotnik, A. 1997. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol* **159**: 1589-1593.
- Hesselgesser, J., Liang, M., Hoxie, J., Greenberg, M., Brass, L.F., Orsini, M.J., Taub, D., et Horuk, R. 1998. Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. *J Immunol* **160**: 877-883.
- Homey, B., Alenius, H., Muller, A., Soto, H., Bowman, E.P., Yuan, W., McEvoy, L., Lauerma, A.I., Assmann, T., Bunemann, E., et al. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* **8**: 157-165.
- Homey, B., Wang, W., Soto, H., Buchanan, M.E., Wiesenborn, A., Catron, D., Muller, A., McClanahan, T.K., Dieu-Nosjean, M.C., Orozco, R., et al. 2000. Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* **164**: 3465-3470.
- Hoover, D.M., Mizoue, L.S., Handel, T.M., et Lubkowski, J. 2000. The crystal structure of the chemokine domain of fractalkine shows a novel quaternary arrangement. *J Biol Chem* **275**: 23187-23193.
- Horuk, R. 2001. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 313-335.
- Horuk, R., Chitnis, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J., et Miller, L.H. 1993a. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* **261**: 1182-1184.
- Horuk, R., Colby, T.J., Darbonne, W.C., Schall, T.J., et Neote, K. 1993b. The human erythrocyte inflammatory peptide (chemokine) receptor. Biochemical characterization, solubilization, and development of a binding assay for the soluble receptor. *Biochemistry* **32**: 5733-5738.
- Houck, J.C., et Chang, C.M. 1977. The purification and characterization of a lymphokine chemotactic for lymphocytes--lymphotactin. *Inflammation* **2**: 105-113.

- Hromas, R., Gray, P.W., Chantry, D., Godiska, R., Krathwohl, M., Fife, K., Bell, G.I., Takeda, J., Aronica, S., Gordon, M., *et al.* 1997. Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood* **89**: 3315-3322.
- Hu, M.C., Crowe, D.T., Weissman, I.L., et Holzmann, B. 1992. Cloning and expression of mouse integrin beta p(beta 7): a functional role in Peyer's patch-specific lymphocyte homing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 8254-8258.
- Husband, A.J., et Gowans, J.L. 1978. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med* **148**: 1146-1160.
- Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T.J., *et al.* 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* **91**: 521-530.
- Imaizumi, T., Yoshida, H., et Satoh, K. 2004. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **11**: 15-21.
- Isnard, N., Peterszegi, G., Robert, A.M., et Robert, L. 2002. Regulation of elastase-type endopeptidase activity, MMP-2 and MMP-9 expression and activation in human dermal fibroblasts by fucose and a fucose-rich polysaccharide. *Biomed Pharmacother* **56**: 258-264.
- Jenh, C.H., Cox, M.A., Kaminski, H., Zhang, M., Byrnes, H., Fine, J., Lundell, D., Chou, C.C., Narula, S.K., et Zavodny, P.J. 1999. Cutting edge: species specificity of the CC chemokine 6Ckine signaling through the CXC chemokine receptor CXCR3: human 6Ckine is not a ligand for the human or mouse CXCR3 receptors. *J Immunol* **162**: 3765-3769.
- Jenkins, G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev* **123**: 801-810.
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M., et Imhof, B.A. 2000. The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* **113 (Pt 6)**: 921-933.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., et Littman, D.R. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* **20**: 4106-4114.
- Kakinuma, T., Saeki, H., Tsunemi, Y., Fujita, H., Asano, N., Mitsui, H., Tada, Y., Wakugawa, M., Watanabe, T., Torii, H., *et al.* 2003. Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J Allergy Clin Immunol* **111**: 592-597.

- Keane, M.P., Arenberg, D.A., Moore, B.B., Addison, C.L., et Strieter, R.M. 1998. CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. *Proc Assoc Am Physicians* **110**: 288-296.
- Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., et al. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**: 1395-1399.
- Kieda, C., Paprocka, M., Krawczenko, A., Zalecki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C., et Dus, D. 2002. New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium* **9**: 247-261.
- Kim, C.H., et Broxmeyer, H.E. 1999. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* **65**: 6-15.
- Kunkel, E.J., et Butcher, E.C. 2002. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* **16**: 1-4.
- Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., et Wells, T.N. 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* **38**: 12959-12968.
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W.J., Grimley, C., Fennie, C., Gillett, N., Watson, S.R., et Rosen, S.D. 1992. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* **69**: 927-938.
- Lavi, E., Kolson, D.L., Ulrich, A.M., Fu, L., et Gonzalez-Scarano, F. 1998. Chemokine receptors in the human brain and their relationship to HIV infection. *J Neurovirol* **4**: 301-311.
- Lesnik, P., Haskell, C.A., et Charo, I.F. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* **111**: 333-340.
- Ley, K., et Tedder, T.F. 1995. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol* **155**: 525-528.
- Lucas, A.D., Chadwick, N., Warren, B.F., Jewell, D.P., Gordon, S., Powrie, F., et Greaves, D.R. 2001. The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol* **158**: 855-866.
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., et Springer, T.A. 1998. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4⁻ and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9448-9453.
- Mack, M., Kleinschmidt, A., Bruhl, H., Klier, C., Nelson, P.J., Cihak, J., Plachy, J., Stangassinger, M., Erfle, V., et Schlondorff, D. 2000. Transfer of the chemokine

- receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* **6**: 769-775.
- Makino, Y., Cook, D.N., Smithies, O., Hwang, O.Y., Neilson, E.G., Turka, L.A., Sato, H., Wells, A.D., et Danoff, T.M. 2002. Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin Immunol* **102**: 302-309.
- Marchesi, V.T., et Gowans, J.L. 1964. The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: An Electron Microscope Study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **159**: 283-290.
- Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M., et Vita, C. 2001. Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. *Biochemistry* **40**: 6303-6318.
- Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J.E., et Cyster, J.G. 2000. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* **1**: 298-304.
- McGrath, K.E., Koniski, A.D., Maltby, K.M., McGann, J.K., et Palis, J. 1999. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol* **213**: 442-456.
- Meager, A. 1999. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* **10**: 27-39.
- Michie, S.A., Streeter, P.R., Bolt, P.A., Butcher, E.C., et Picker, L.J. 1993. The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *Am J Pathol* **143**: 1688-1698.
- Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N.P., Risau, W., et Ullrich, A. 1993. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**: 835-846.
- Miller, L.H., Mason, S.J., Dvorak, J.A., McGinniss, M.H., et Rothman, I.K. 1975. Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* **189**: 561-563.
- Mizoue, L.S., Bazan, J.F., Johnson, E.C., et Handel, T.M. 1999. Solution structure and dynamics of the CX3C chemokine domain of fractalkine and its interaction with an N-terminal fragment of CX3CR1. *Biochemistry* **38**: 1402-1414.
- Mohle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A., Brugger, W., et Kanz, L. 1998. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* **91**: 4523-4530.

- Moore, B.B., Keane, M.P., Addison, C.L., Arenberg, D.A., et Strieter, R.M. 1998. CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Investig Med* **46**: 113-120.
- Morales, J., Homey, B., Vicari, A.P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., McEvoy, L.M., *et al.* 1999. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14470-14475.
- Morris, B. 1968. [Migration of sheep lymphocytes in the tissues]. *Nouv Rev Fr Hematol* **8**: 525-534.
- Muehlhoefer, A., Saubermann, L.J., Gu, X., Luedtke-Heckenkamp, K., Xavier, R., Blumberg, R.S., Podolsky, D.K., MacDermott, R.P., et Reinecker, H.C. 2000. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* **164**: 3368-3376.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**: 50-56.
- Murakami, T., Nakajima, T., Koyanagi, Y., Tachibana, K., Fujii, N., Tamamura, H., Yoshida, N., Waki, M., Matsumoto, A., Yoshie, O., *et al.* 1997. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* **186**: 1389-1393.
- Murray, P.D.F. 1932. The development *in vitro* of the blood of the early chick embryo. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **11**: 497-521.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., et Kishimoto, T. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**: 635-638.
- Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F., Jr., et Gimbrone, M.A., Jr. 1994. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **94**: 885-891.
- Nagira, M., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Ridanpaa, M., Takagi, S., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., et Yoshie, O. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem* **272**: 19518-19524.
- Nagira, M., Imai, T., Yoshida, R., Takagi, S., Iwasaki, M., Baba, M., Tabira, Y., Akagi, J., Nomiyama, H., et Yoshie, O. 1998. A lymphocyte-specific CC chemokine, secondary

- lymphoid tissue chemokine (SLC), is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol* **28**: 1516-1523.
- Nardese, V., Longhi, R., Polo, S., Sironi, F., Arcelloni, C., Paroni, R., DeSantis, C., Sarmientos, P., Rizzi, M., Bolognesi, M., *et al.* 2001. Structural determinants of CCR5 recognition and HIV-1 blockade in RANTES. *Nat Struct Biol* **8**: 611-615.
- Neote, K., Darbonne, W., Ogez, J., Horuk, R., et Schall, T.J. 1993a. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem* **268**: 12247-12249.
- Neote, K., DiGregorio, D., Mak, J.Y., Horuk, R., et Schall, T.J. 1993b. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* **72**: 415-425.
- Netelenbos, T., Drager, A.M., van het Hof, B., Kessler, F.L., Delouis, C., Huijgens, P.C., van den Born, J., et van Dijk, W. 2001. Differences in sulfation patterns of heparan sulfate derived from human bone marrow and umbilical vein endothelial cells. *Exp Hematol* **29**: 884-893.
- Netelenbos, T., Zuijderduijn, S., Van Den Born, J., Kessler, F.L., Zweegman, S., Huijgens, P.C., et Drager, A.M. 2002. Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol* **72**: 353-362.
- Nomura, I., Gao, B., Boguniewicz, M., Darst, M.A., Travers, J.B., et Leung, D.Y. 2003. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *J Allergy Clin Immunol* **112**: 1195-1202.
- Nomura, T., et Hasegawa, H. 2000. Chemokines and anti-cancer immunotherapy: anti-tumor effect of EBI1-ligand chemokine (ELC) and secondary lymphoid tissue chemokine (SLC). *Anticancer Res* **20**: 4073-4080.
- Ohnishi, Y., Senda, T., Nandhagopal, N., Sugimoto, K., Shioda, T., Nagal, Y., et Mitsui, Y. 2000. Crystal structure of recombinant native SDF-1alpha with additional mutagenesis studies: an attempt at a more comprehensive interpretation of accumulated structure-activity relationship data. *J Interferon Cytokine Res* **20**: 691-700.
- Opdenakker, G., et Van Damme, J. 2004. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. *Int J Dev Biol* **48**: 519-527.
- Opdenakker, G., Van den Steen, P.E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., et Van Damme, J. 2001. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* **69**: 851-859.

- Oppenheim, J., et Fujiwara, H. 1996. The role of cytokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**: 279-288.
- Pan, J., Kunkel, E.J., Gossler, U., Lazarus, N., Langdon, P., Broadwell, K., Vierra, M.A., Genovese, M.C., Butcher, E.C., et Soler, D. 2000. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol* **165**: 2943-2949.
- Patel, D.D., Koopmann, W., Imai, T., Whichard, L.P., Yoshie, O., et Krangel, M.S. 2001. Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clin Immunol* **99**: 43-52.
- Picker, L.J., Kishimoto, T.K., Smith, C.W., Warnock, R.A., et Butcher, E.C. 1991. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature* **349**: 796-799.
- Power, C.A., Meyer, A., Nemeth, K., Bacon, K.B., Hoogewerf, A.J., Proudfoot, A.E., et Wells, T.N. 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J Biol Chem* **270**: 19495-19500.
- Proudfoot, A.E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., et Wells, T.N. 2001. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem* **276**: 10620-10626.
- Raychaudhuri, S.P., Jiang, W.Y., et Farber, E.M. 2001. Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine. *Br J Dermatol* **144**: 1105-1113.
- Raychaudhuri, S.P., Jiang, W.Y., Farber, E.M., Schall, T.J., Ruff, M.R., et Pert, C.B. 1999. Upregulation of RANTES in psoriatic keratinocytes: a possible pathogenic mechanism for psoriasis. *Acta Derm Venereol* **79**: 9-11.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**: 671-674.
- Robinson, L.A., Nataraj, C., Thomas, D.W., Cosby, J.M., Griffiths, R., Bautch, V.L., Patel, D.D., et Coffman, T.M. 2003. The chemokine CX3CL1 regulates NK cell activity in vivo. *Cell Immunol* **225**: 122-130.
- Rosen, S.D., et Bertozzi, C.R. 1994. The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 663-673.
- Rosen, S.D., et Yednock, T.A. 1986. Lymphocyte attachment to high endothelial venules during recirculation: a possible role for carbohydrates as recognition determinants. *Mol Cell Biochem* **72**: 153-164.

- Sabin, F.R. 1917. Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.* **6**: 61.
- Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., et Goeddel, D.V. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**: 669-671.
- Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., et Krensky, A.M. 1988. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol* **141**: 1018-1025.
- Schoefl, G.I. 1972. The migration of lymphocytes across the vascular endothelium in lymphoid tissue. A reexamination. *J Exp Med* **136**: 568-588.
- Schols, D., Este, J.A., Henson, G., et De Clercq, E. 1997. Bicyclams, a class of potent anti-HIV agents, are targeted at the HIV coreceptor fusin/CXCR-4. *Antiviral Res* **35**: 147-156.
- Schweickart, V.L., Raport, C.J., Godiska, R., Byers, M.G., Eddy, R.L., Jr., Shows, T.B., et Gray, P.W. 1994. Cloning of human and mouse EB11, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics* **23**: 643-650.
- Sharma, S., Stolina, M., Luo, J., Strieter, R.M., Burdick, M., Zhu, L.X., Batra, R.K., et Dubinett, S.M. 2000. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses in vivo. *J Immunol* **164**: 4558-4563.
- Shimizu, Y., Rose, D.M., et Ginsberg, M.H. 1999. Integrins in the immune system. *Adv Immunol* **72**: 325-380.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., et Honjo, T. 1995. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **28**: 495-500.
- Siveke, J.T., et Hamann, A. 1998. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol* **160**: 550-554.
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kershaw, M.H., et Hayakawa, Y. 2004. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev* **202**: 275-293.
- Soriano, S.G., Amaravadi, L.S., Wang, Y.F., Zhou, H., Yu, G.X., Tonra, J.R., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Dunmore, J.H., Huszar, D., et al. 2002. Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Neuroimmunol* **125**: 59-65.

- Soto, H., Wang, W., Strieter, R.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hedrick, J., et Zlotnik, A. 1998. The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8205-8210.
- Stojanovic, T., Bedke, J., Grone, H.J., Proudfoot, A.E., Becker, H., Markus, P., et Hecker, M. 2002. Met-RANTES inhibition of mucosal perfusion failure in acute intestinal transplant rejection - role of endothelial cell-leukocyte interaction. *J Vasc Res* **39**: 51-58.
- Stoolman, L.M., Tenforde, T.S., et Rosen, S.D. 1984. Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules. *J Cell Biol* **99**: 1535-1540.
- Stoolman, L.M., Yednock, T.A., et Rosen, S.D. 1987. Homing receptors on human and rodent lymphocytes--evidence for a conserved carbohydrate-binding specificity. *Blood* **70**: 1842-1850.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Arenberg, D.A., et Kunkel, S.L. 1995a. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock* **4**: 155-160.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., et Marriott, D. 1995b. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* **270**: 27348-27357.
- Sugaya, M., Nakamura, K., Mitsui, H., Takekoshi, T., Saeki, H., et Tamaki, K. 2003. Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci* **31**: 179-187.
- Suschek, C.V., Bruch-Gerharz, D., Kleinert, H., Forstermann, U., et Kolb-Bachofen, V. 2001. Ultraviolet A1 radiation induces nitric oxide synthase-2 expression in human skin endothelial cells in the absence of proinflammatory cytokines. *J Invest Dermatol* **117**: 1200-1205.
- Tachibana, K., Hirota, S., Iizasa, H., Yoshida, H., Kawabata, K., Kataoka, Y., Kitamura, Y., Matsushima, K., Yoshida, N., Nishikawa, S., et al. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**: 591-594.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., et Shaw, S. 1993a. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* **361**: 79-82.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., et Shaw, S. 1993b. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* **14**: 111-115.

- Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., et Honjo, T. 1993. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* **261**: 600-603.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., et Engel, P. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* **9**: 866-873.
- Valacchi, G., van der Vliet, A., Schock, B.C., Okamoto, T., Obermuller-Jevic, U., Cross, C.E., et Packer, L. 2002. Ozone exposure activates oxidative stress responses in murine skin. *Toxicology* **179**: 163-170.
- Vestweber, D., et Blanks, J.E. 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**: 181-213.
- Vicari, A.P., Ait-Yahia, S., Chemin, K., Mueller, A., Zlotnik, A., et Caux, C. 2000. Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J Immunol* **165**: 1992-2000.
- Volin, M.V., Joseph, L., Shockley, M.S., et Davies, P.F. 1998. Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* **242**: 46-53.
- Wang, W., Soto, H., Oldham, E.R., Buchanan, M.E., Homey, B., Catron, D., Jenkins, N., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Nguyen, N., et al. 2000. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* **275**: 22313-22323.
- Warnock, R.A., Campbell, J.J., Dorf, M.E., Matsuzawa, A., McEvoy, L.M., et Butcher, E.C. 2000. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* **191**: 77-88.
- Weninger, W., Carlsen, H.S., Goodarzi, M., Moazed, F., Crowley, M.A., Baekkevold, E.S., Cavanagh, L.L., et von Andrian, U.H. 2003. Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: a role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis. *J Immunol* **170**: 4638-4648.
- Wenk, E.J., Orlic, D., Reith, E.J., et Rhodin, J.A. 1974. The ultrastructure of mouse lymph node venules and the passage of lymphocytes across their walls. *J Ultrastruct Res* **47**: 214-241.
- Williams, M.B., et Butcher, E.C. 1997. Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen. *J Immunol* **159**: 1746-1752.
- Willmann, K., Legler, D.F., Loetscher, M., Roos, R.S., Delgado, M.B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., et Moser, B. 1998. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* **28**: 2025-2034.

- Wurbel, M.A., Philippe, J.M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M.G., Malissen, M., Jordan, B.R., *et al.* 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* **30**: 262-271.
- Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A., Okazaki, T., Imai, H., Yoshie, O., Bloom, E.T., Domae, N., *et al.* 2000. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* **164**: 4055-4062.
- Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., *et al.* 1998a. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* **273**: 7118-7122.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., *et al.* 1998b. Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J Biol Chem* **273**: 16551-16554.
- Yoshiji, H., Gomez, D.E., Shibuya, M., *et al.* 1996. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* **56**: 2013-2016.
- Zabel, B.A., Agace, W.W., Campbell, J.J., Heath, H.M., Parent, D., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., *et al.* 1999. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* **190**: 1241-1256.
- Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., *et al.* 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**: 595-599.

ANNEXES

ANNEXE 1

Tumor and host endothelial cell selective interactions and modulation
by microenvironmental chemokines

Tumor and host endothelial cell selective interactions and modulation by microenvironmental chemokines

Tumor-endothelial cell cross talk specificity

N. Lamerant-Fayel, C. Crola and C. Kieda

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS, Glycobiology of Cell Recognition, 45071, Orléans, France

E mail : kieda@cnrs-orleans.fr

Abstract

The variability and adaptability of tumor cells allow their tissue escape despite the efficient body defence. Tumor cells use vessels 1) for nutrition 2) for routing through blood and lymph circulation 3) to invade selected secondary sites. The molecular mechanisms that regulate both 1) endothelial cell growth under tumor induction and 2) reciprocal recognition between endothelial cells and blood borne tumor cells are crucial to elucidate.

Tumor cells use normal cells properties to be recognized by normal endothelial cells but endothelium is highly organo specific; it is further modulated by the microenvironmental factors, as it reflects the biological state.

This will be particularly illustrated by the adhesion/invasion molecules and the early signals of recruitment as achieved by the local expression and the presentation's ways of chemokines to actively attract circulating partners. Refined cell and molecular interactions are insured by sugar-mediated recognitions since glycosylation is the post-translational transformation that confers to glycoconjugates their structural specific identity as recognitions signals. Advantage could be taken of such specific characters as a way to design targeted anti tumor therapy strategies.

Introduction

Vascular endothelial cells (ECs) play a key role in numerous physiological processes as lymphocyte trafficking, angiogenesis but also in pathological processes as inflammation (1), autoimmune diseases (2) or metastasis (3). Tumour cell migration and metastasis share many similarities with leukocyte trafficking : blood circulating cells are recognised by endothelial cells which allow them to enter in the surrounding tissue, this is achieved in a tissue-specific manner. For example, naive T cells extravasate better in peripheral lymph nodes and naive B cells, in Peyer's patches (4). In the same way, metastasis is not a random process and some tumors show specific metastatic sites (5). Breast cancer secondary localisation favours regional lymph nodes, bone marrow, lung and liver. Malignant melanoma has a similar pattern but also has a high incidence in skin metastasis. Prostate cancer metastases also favour the bone marrow.

A better understanding of the mechanisms which control the organo-selectivity would give keys to immunotherapy (6,7), targeted drug therapy (8) and cell therapy designs.

Although all vascular endothelial cells share certain common functions, it has become clear that considerable heterogeneity exists both structurally and functionally (9,10) along the length of the vascular tree and in the microvascular beds of various organs (11-14). The structural heterogeneity of ECs is a perfect example of their adaptation to the unique demands of the surrounding tissue (15). ECs can form a tight continuous monolayer in organs such as the brain or the lungs, where they perform important barrier functions. Alternatively, they can form a discontinuous layer with intercellular gaps or fenestrae in organs such as kidney, spleen, or bone marrow, where rapid exchange of fluid, particles, and cells takes place. According to this, secondary lymphoid organs (with the exception of spleen) have high endothelial cells (HECs) walled venules that are specialized postcapillaries supporting high levels of lymphocyte extravasation from the blood (16).

ECs from diverse tissues are also heterogeneous with respect to their surface phenotype and protein expression. (13) (17) (18) (19). However, one of the clearest examples of EC heterogeneity lies in the expression of homing receptors involved in cell trafficking. As these properties are used in a comparable way in pathological situations and, in particular, for the cancer cells dissemination. This chapter will review the normal homing selectivity conferred by the endothelium organospecificity and its microenvironment dependency provided by the chemokine modulation, presentation and activities.

1. The multiple steps of the homing process cooperate to provide specificity

Successful defense of the body against foreign invasion is critically dependent on the presence of lymphocyte clones with the right antigen specificity at the right position at the right time. For this, naive and mature T and B cells recirculate continuously through the body, going from blood to tissue and back to the bloodstream again (20). In contrast to naive lymphocytes, memory effector lymphocytes can access to non-lymphoid effector sites and display restricted, often tissue-selective, migration behaviour (21). Distinct subsets of memory-effector cells exist with tissue-selective patterns of migration (22) (23). The recirculation is guided by lymphocyte-endothelial cells recognition and subsequent diapedesis, directing lymphocyte homing (4) (21) (24). Thus, lymphocyte- endothelial cells interaction is a central regulatory point in the immune system, controlling the access of specialized lymphocyte subsets to particular tissues and influencing the nature of local immune and inflammatory responses. At the molecular level, this process is regulated by spatio-temporarily expressed adhesion molecules (25), present on both circulating leukocytes and on endothelial cells and in concert with chemokines.

A multi-step model of leukocyte adhesion to vascular endothelium was first provided (21) (26) (27) and is broadly applicable in different tissues, although the details of the signals involved differ. Recirculation begins with blood lymphocytes interacting transiently and reversibly with the vascular endothelium through villous-

expressed adhesion receptors in a process called rolling. These receptors can be either selectins (28), which interact with carbohydrate epitopes of addressins, or, less commonly, members of the immunoglobulin (Ig) superfamily, which bind leukocyte integrins (29) (30) (31). Rolling brings lymphocytes into contact with the endothelium where they can sample the surface for activating factors. Activating factors (often chemokines for lymphocytes) bind to specific G protein-coupled receptors on the rolling lymphocytes (32) (33) and trigger rapid activation of integrin receptors on the leukocyte surface. These activated integrins promote the leukocytes arrest and firm adhesion by binding their Ig-family ligands on the endothelium (34) (35). In the presence of the appropriate migratory signals, the leukocyte will then migrate across the endothelium into tissue, where tissue-associated chemokine gradients may also direct localisation.

As illustrated by the following examples, the homing organo-selectivity is due to the expression of specific molecules.

1.1 The adhesion molecules, selectins and addressins

For blood lymphocytes early interaction with the vascular endothelium, a decisive contact between circulating cell and microvascular endothelial cell, is described to be mediated by both inducible E-selectin and P-selectin on the endothelial cells (36) (37) (38,39) (40-43) and L-selectin on circulating cell (44).

The selectins : E-selectin and P-selectin are quite generally distributed among endothelial cells and consequently can participate to a regio selective reaction through the modulation of their degree and time of expression. This prompted the search for distinctive signals that were evidenced by help of an *in vitro* model for endothelial cell comparisons (45) (9).

A particular E-selectin ligand is the cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) (46) (43). The CLA ligand defines a skin-associated population of memory T cells that preferentially extravasate at normal (47) and chronically inflamed cutaneous sites (48) and has been shown to be involved in local immunity and inflammatory cutaneous reactions (49). The first evidence that a skin-homing subset exists came with the observation that a majority (40–90%) of the T lymphocytes in normal and inflammatory skin lesions express the CLA (48) (47) (50). In contrast, CLA T cells constitute only 10–15% of the pool of circulating T cells and never exceed 5% of lymphocytes within non-cutaneous inflamed sites (48) (51). CLA is a carbohydrate antigen that is closely related to the sialyl Lewis x antigen (sLex) (4) (52) (48). Interestingly, mycosis fungoides and other subtypes of cutaneous lymphomas express CLA (48) (53) (54) but not the mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$. The highly selective expression of CLA on cutaneous T-cell lymphomas suggests that CLA mediates the skin-specific dissemination of these lymphomas *in vivo*. However, CLA E-selectin binding cannot fully explain the skin-specific homing of CLA memory T cells. Neutrophils express CLA (55) but they do not preferentially migrate to skin and E-selectin is induced on inflamed endothelium in both cutaneous and non-cutaneous sites (28). As we will see later, another step in the homing cascade is necessary to reach the specificity of skin homing and implies the chemokines CTACK and TARC.

Specific recognitions due to the leukocyte L-selectin (56) (57) (58) gets to be regio-selective despite its large distribution. This is attributed to its ligands (vascular addressins) of which expression is restricted among endothelial cells according to the tissues and the vessels. Addressins are mucin-type or mixed mucin/immunoglobulin-type glycoproteins (59) (60) (61) (62) (63) (64).

The addressins provide the regio-selectivity to selectin recognition because they are differentially expressed on the endothelium, depending upon its tissue origin (65) (62,66,67). Furthermore, their structure is highly modulated by the microenvironment at the post-translational level (15). To become high affinity L-selectin ligands, they must undergo proper glycosylation, especially the most common sugar epitopes recognized by L-

selectin : sialyl Lewis x (CD15s) and its sulphated form, presented by appropriate mucin-type proteins (GlyCAM-1, MadCAM-1 or CD34). In the mouse, typical peripheral lymph node addressins (PNAds) are GlyCAM-1 (65,68), CD34 and Sgp200 (sulphated glycoprotein of 200 kD) (25) (65,69). Typical mucosal addressin is MAdCAM-1, which has been found first in mouse (25) (15,70) (71) and further in human endothelial cells (72). MAdCAM-1 is almost completely confined to mucosal and related vessels and is thus one of the few examples of endothelial adhesion molecules that is restricted to a particular tissue. In addition to being recognized by L-selectin through its sialomucin sugar residues (60,72,73), MAdCAM-1 molecule possesses an immunoglobulin-like domain which interacts with the $\alpha 4\beta 7$ -integrin homing receptor of lymphocytes (30) and thus can mediate both rolling and stable adhesion. Consequently, lymphocytes homing to gut is critically dependent on interaction between the lymphocyte $\alpha 4\beta 7$ -integrin and its receptor MAdCAM-1 expressed on mucosal vessels (30). Lymphocytes interactions with MAdCAM-1 are particularly complex, because they depend upon its glycosylation state. Thus, Peyer's patches HEC- MAdCAM-1 is decorated with unique oligosaccharide determinants that allow it to serve as a ligand for L-selectin and thereby to mediate rolling of naive lymphocytes. In contrast, in the lamina propria, initial rolling interactions between activated lymphocytes and endothelial cells are apparently mediated by binding of the $\alpha 4\beta 7$ -integrin to immunoglobulin-like domains of MAdCAM-1. At both locations, $\alpha 4\beta 7$ -integrin-MAdCAM1 interaction and possibly LFA-1 secure firm lymphocyte adhesion. The predominant role proposed for $\alpha 4\beta 7$ -integrin in mucosal homing has gained further support from the observation that cell trafficking to mucosal lymphatic tissues is dramatically reduced in $\beta 7$ -knockout animals (74). Moreover, gastrointestinal T-cell lymphomas express the mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$ (75) but not CLA.

1.2 The chemokines

In the second step of the cascade, chemokines and their receptors also help to control the homing specificity.

The chemokines (*chemotactic cytokines*) are a large and growing family of nearly 50 6–14-kD proteins that mediate a wide range of biological functions (76). The chemokines are divided into four families (**CXC**, **CC**, **C** and **CX₃C**) based on the position of four cysteine residues that form two disulfide bonds. Chemokine receptors are consequently divided into four families based on the type of chemokine they bind, although no clear structural differences could be identified that would distinguish the receptor subfamilies (77). Chemokines play a vital role in leukocyte adhesion and extravasation. In various *in vitro* assays, chemokines support the chemotaxis or transendothelial migration of leukocytes (76), while *in vivo* injection (78) or over-expression of chemokines (79) results in leukocyte accumulation at the site of chemokine expression. Antagonists of chemokines prevent leukocyte trafficking (80) and have beneficial effects in several acute and chronic inflammatory models (81) (82). Chemokines also modulate angiogenesis (83), hematopoiesis (76), and T lymphocyte activation (84) (85), and several act as co-receptors with CD4 for entry of M-tropic and T-tropic HIV-1 (86) (87).

Interestingly, apart of their receptors, chemokines also interact with **glycosaminoglycans (GAGs)** on cell surfaces. Chemokines have been shown to bind to purified subfractions of heparin *in vitro* (88), as well as to naturally occurring GAGs such as heparan sulfate and chondroitin sulfate on the surface of endothelial cells both *in vitro* (89) (90) (91) and *in vivo* (92). The ability of chemokines to bind to GAGs is thought to be critical for chemokine biology. It has been proposed that the immobilization of chemokines by GAGs forms stable, solid-phase chemokine foci and gradients necessary to direct leukocyte trafficking *in vivo* (93) (94). Binding of chemokines to cell surface GAGs may also serve to increase their effective local concentration, and consequently increase their binding to cell surface receptors (91). Additionally, GAG binding could potentially influence chemokine *t*_{1/2} *in vivo*. Chemokines display specific affinity according to GAGs families (88), consequently, a detailed understanding of chemokine-GAG interactions may be critical to appreciate functional distinctions among chemokines.

Recent studies have shown that certain constitutively expressed chemokines play, in conjunction with adhesion receptors, an important role in regulating homeostatic lymphocyte recirculation through secondary lymphoid organs, whereas others may help control tissue-specific targeting of lymphocytes to extralymphoid organs (34,95) (96) (97) (98) (99) (100).

2. Chemokines as regio-specific chemoattractants

The CC chemokines and their receptors interplay

One example is the *secondary lymphoid-tissue chemokine SLC, (6-CKine, CCL21)* which is expressed in the high endothelial venules (HEV) of lymph nodes and Peyer's patches, in the T cell areas of spleen, lymph nodes, and Peyer's patches, and in the lymphatic endothelium of multiple organs (101) (102). SLC acts through the receptor **CCR7** (103). SLC is a highly efficacious chemoattractant for lymphocytes with preferential activity toward naive T cells (101). Moreover, SLC induces firm adhesion of naive T lymphocytes via β 2-integrin binding to the counter receptor, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), a necessary step for lymphocyte recruitment. The only other molecule that has been demonstrated to activate lymphocyte β 2 integrin is GlyCAM-1, the L-selectin ligand expressed by endothelial cells in HEVs and secreted (104). It is possible that SLC and GlyCAM-1 act cooperatively to stimulate the firm adhesion of lymphocytes to HEV. The importance of SLC in T cell homing to secondary lymphoid organs is supported by the relative absence of T cells in the lymph nodes and Peyer's patches of *plt* mice (105) a spontaneous mutant strain deficient in the SLC gene expressed in high endothelium (106) (107). Interestingly, when SLC is injected subcutaneously into *plt* mice, afferent lymph apparently carries it into the draining node, where it is ultimately presented on the luminal surface of HEVs. In such reconstituted *plt* mice, the ability of T cells to adhere to HEVs and enter the organ is restored (96). Additionally, T cells homing *in vivo* in normal mice adhere almost exclusively to HEV sites presenting SLC protein (95).

Moreover as described in the later paragraphs, this chemokine is highly significant in cancer because CCR7 and its ligands CCL21 and CCL19 were shown recently to be involved in the metastasis process (108) (109) (110).

Another *tissue-selective chemokine is the thymus-expressed chemokine –TECK (CCL25)*. TECK is highly expressed in the small intestine (111-113) but not in other epithelia such as the digestive tract (including stomach and colon), skin, lung, or salivary gland (98). The TECK receptor, CCR9 is expressed by discrete subsets of circulating memory CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing the intestinal homing receptor α 4 β 7, but not by other systemic memory lymphocyte subsets (111). This suggesting that CCR9 may be a receptor used preferentially by lymphocytes involved in aspects of gut immunity. Moreover, CCR9 is expressed on lymphocytes isolated from human small intestine (111). Together, this suggests a role for TECK and CCR9 in the intestinal immune compartment, but the extent to which this chemokine receptor–ligand pair is specifically associated with the intestinal versus other mucosal and epithelial sites remains to be deeper explored.

In the skin, two different chemokines play a critical part in homing specificity, *Thymus and activation-regulated chemokine TARC (CCL17)* and *Cutaneous T cell-attracting chemokine CTACK (CCL27)*. The CC-chemokine receptor **CCR4** on T lymphocytes and its ligand, TARC are implicated in lymphocyte–endothelial cells interactions during lymphocyte recruitment to normal and inflamed cutaneous sites (99). Immunohistochemistry suggests that TARC is constitutively expressed and inducible on cutaneous venules and some other systemic venules, but is absent from vessels at sites of lymphocyte recruitment into the intestines. Moreover, its receptor CCR4 is highly expressed by CLA⁺ circulating skin memory lymphocytes, but not by the other memory cells, consistent with a role in tissue selective trafficking. In addition to lymphocyte arrest on endothelium, CCR4 supports diapedesis and chemotaxis.

The CTACK chemokine is constitutively expressed by skin keratinocytes, also attracts cutaneous memory T cells (100). CTACK binds to the receptor CCR10 which is also specifically expressed on circulating skin-homing CLA⁺ T lymphocytes. CTACK may be transcytosed and presented on the endothelium (92). CTACK

can be induced by the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . CTACK and TARC can both support homing of T cells to skin, and either one or the other is required for lymphocyte recruitment in cutaneous delayed type hypersensitivity (114).

Malignancies (see below) as melanoma, which has a similar metastatic pattern as breast cancer but also a high incidence of skin metastases, show high expression levels of CCR10 in addition to CXCR4 and CCR7 (109).

The **mucosa-associated epithelial chemokine MEC (CCL28)** seems to have an important role in lymphocyte homing in extracutaneous epithelial tissues, including diverse mucosal organs. MEC mRNA is most abundant in salivary gland, with strong expression in other mucosal sites (colon, trachea, and mammary gland). Constitutively expressed by epithelial cells, MEC supports lymphocyte chemotaxis through CCR10 (97,115), a known CTACK receptor but also through CCR3 (97).

Consequently, CC chemokines are a family of locally produced molecules that together with their receptors expression and modulation and due to the various presentations modes they use to anchor themselves to the cell surface can participate to define local specific characteristics.

The fractalkine (CX3CL1)

Compared to other chemokines, fractalkine has at least three unique features that make it to function as a cell adhesion molecule : unique CX3C chemokine to date, its three-dimensional structure differs from other chemokines (116), it is a transmembrane molecule with a cytoplasmic tail that may transduce signal and has a mucin domain.

Fractalkine and its receptor CX3CR1 are currently the only known members of the CX3C family (117) (118) (119) (120).

Only **CXCL16** (121) and fractalkine are membrane-anchored protein. The chemokine module is attached to the cell membrane via a mucin-like stalk as a presentation vehicle (122) which extends the CX3C chemokine domain to present it to flowing leukocytes.

Fractalkine induces chemotaxis of monocytes, T cells and natural killer cells (123) where the CX3CR1 receptor is expressed (120) (119). Fractalkine and CX3CR1 function as cell adhesion molecules under both static and dynamic conditions (120) (123).

Unlike other chemokine/G-protein coupled receptor interactions that require signal transduction and integrin activation for cell adhesion to occur, the adhesive interaction between fractalkine and CX3CR1 is independent of signal transduction or integrin function (123) (124). Therefore, *fractalkine and CX3CR1 provide an integrin-independent mechanism for leukocyte migration.*

Constitutively expressed in several lymphoid or peripheral tissues, mainly by endothelial cells (125) (126) (127) it is mainly induced in reactive lymph nodes in the high endothelial venule (HEV) cells, dendritic cells (DCs), follicular DCs, and a few germinal center lymphocytes (127). Fractalkine was expressed also in the skin (128) and the brain (129) where it participate to the intercellular communication.

Fractalkine mediates natural killer-dependent **antitumor** responses in vivo (130) and induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of *in vivo* dendritic cells (131) (see below).

3 Chemokine-mediated endothelium activation participate to tumor cell dissemination.

3.1 The angiogenic response

The formation of vascular system is controlled by vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis is the vessel formation from angioblast , the progenitor of endothelial cell lineage (132). Angiogenesis is the development of a vascular system which requires degradation of basement membrane by proteases and invasion of the surrounding extracellular matrix by proliferation, migration and differentiation of ECs (133). In normal

conditions, angiogenesis is a restricted phenomenon such as wound healing and menstruation. This process depends on the balance of proangiogenic and antiangiogenic factors (134,135). If the regulation of this balance happens to be disrupted, angiogenesis can become a pathological process as it appears in cancers and/or other diseases (136).

Some chemokines are angiogenic factors for ECs. Together with their receptors, chemokines regulate angiogenesis in physiopathological processes (137) such as cancer progression (138), atherosclerosis (139) and ischemia. Tumoral cells produce angiogenic factors like VEGF (140,141) which is able to activate ECs by VEGF-receptor (142) to induce angiogenesis. The formation of new vessels to bring oxygen and nutrients is required for tumor progression. Chemokines and their receptors act in cancer progression at several levels: by the regulation of tumor invasion and cancer metastasis, by activation/suppression of a host tumor-specific immunological response, by the stimulation of tumor cell proliferation in an autocrine fashion and by regulation of tumor-associated angiogenesis.

3.2 Chemokine and their receptors as determinants for tumor invasion and cancer metastasis

The angiogenesis/metastasis relationship and the importance of the balance of angiostatic/angiogenic factors were well documented (115,143,144).

In lymphocyte homing, chemokines partly control the good destination and non-random recirculation of lymphocytes (145). Tumor cells also use chemokines and their receptors to determine metastatic destination. The **CXCR4 and CCR7 receptors** are involved in breast cancer metastasis (109). Their respective ligands, **CXCL12/SDF-1 α (Stromal derived factor 1 α)** and **CCL21/SLC** are highly expressed in organs representing the main destinations of breast cancer metastases CCR7 and its ligands CCL21 and CCL19/MIP-3 β were shown recently to be involved in metastasis (108-110). The chemokine receptor CCR7 was found highly expressed in human breast cancer cells, malignant breast tumours and metastases (109). Breast cancer is characterized by a distinct metastatic pattern involving the regional lymph nodes, bone marrow, lung and liver. The CCR7 ligands, MIP-3 β and SLC, exhibit peak levels of expression in organs representing the first destinations of breast cancer metastasis. Wiley et al., (110) showed that expression of CCR7 enhanced metastasis of murine melanoma cells to draining lymph nodes in mouse models and that inhibition of SLC blocked the metastasis to draining lymph nodes. Malignant melanoma, which have a similar metastatic pattern as breast cancer but also a high incidence of skin metastases, show high expression levels of CCR10 in addition to CXCR4 and CCR7 (109).

The **IL8** chemokine is up-regulated by inflammatory stimuli or by reduced microenvironmental oxygen pressure in glioblastomas and modulate different metastatic phenotypes associated with metastasis progression of colon carcinoma (146). The CXCR4 receptor is up-regulated by microenvironment of colon carcinoma and participate to proliferation and migration of micrometastases (147).

Taking into account their organospecificity (9,148), ECs express distinct chemokine receptors according to the line or organ origin (149). The combination of chemokine/chemokine receptors distribution, and cross-talk could in part explain the organo-specificity and open new ways for antitumor therapy.

3.3 Chemokines act as autocrine tumor growth factors

Some chemokines are able to stimulate proliferation of tumor cells by binding to cell surface specific receptors. IL8 is an autocrine factor in numerous types of cancers: malignant melanoma (150) colon carcinoma (151) neuroblastoma (152). It was shown *in vitro* that the CXC **chemokine Growth regulated-oncogene GRO** is mitogenic for malignant melanoma cell lines (153,154).

Furthermore, they can act as angiogenic factors interacting with specific receptors on ECs or by recruiting cells that produce angiogenic and mitogenic factors.

3.4 Chemokines in tumor angiogenesis

The presence of physiologic and pathological angiogenesis is usually associated with inflammatory cell infiltrate. The relationship between angiogenesis and leukocyte infiltration in tumor growth, cardiovascular disease, chronic inflammation and wound healing is largely documented. The coordination of angiogenesis and inflammation is achieved by the ability of both ECs and leukocytes to respond to chemokines.

Chemokines are especially expressed by ECs in a timely and spatially restricted fashion (145) in order to regulate the recruitment of specific leukocytes and cell homing. Moreover, ECs express chemokine receptors. The role of a specific chemokine/chemokine receptor couple in the modulation of angiogenesis has been illustrated (155).

Among the chemokine families, some CXC chemokines are identified as regulators of angiogenesis, acting either as angiogenic or angiostatic factors (156). It seems that the presence of ELR motif correlates with an angiogenic activity (157,158). The CXC chemokines are divided in two groups: ELR+ and ELR- (Glu-Leu-Arg). The involvement of this motif in angiogenesis was shown by mutagenesis experiments with an ELR+ chemokine, IL8 and an ELR- chemokine, Mig.

The Pro-angiogenic chemokines

The CXC chemokines :

-ELR+ chemokines as IL8 which was the first chemokine shown to stimulate endothelial cell chemotaxis, proliferation and *in vivo* angiogenesis (159).

-ELR – chemokines . SDF-1 α (CXCL12) and GRO- β (CXCL2) (160) are the few some exceptions which possess angiogenic activity without ELR motif.

The CC chemokines : CCL2 (MCP-1) is positive mediator of angiogenesis and can directly contribute to tumor progression (161).

The CX3C chemokines : fractalkine has a positive effect on angiogenesis in rheumatoid arthritis (162).

The anti-angiogenic chemokines

The IP-10, Mig, PF4 chemokines inhibit endothelial cell proliferation and angiogenesis, by specific inhibition of growth factor-stimulated endothelial cell proliferation (163). SLC has an anti-tumoral effect by its angiostatic activity and chemoattraction of CD8⁺ T and NK cells.

Hypoxia is a prevalent parameter in many tumors, it contributes to aggressiveness and is one of the major reasons for treatment failure. In the hypoxic tumoral environment, cells must adapt a strategy to activate expression of genes involved in oxygen delivery (angiogenesis) and metabolic adaptation. The cellular response to hypoxia is controlled in part by the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor (164) so this factor is an important target for cancer chemotherapy (165). In this environment, the balance of angiogenic and angiostatic factors is disturbed.

Chemokine receptors and chemokines act in order to restore locally angiogenesis because low oxygen level induces high expression of the receptors.

This was described for CXCL12 receptor: CXCR4 (166) and RANTES contribution to the growth of murine mammary carcinoma (167).

4. Conclusion : Perspectives for Cancer therapy designs

Activation/suppression of tumor-specific immunological response:

Immunotherapy research is developing of tumor vaccines. Some chemokines, especially from the CC family are able to activate a tumor-specific immune response because of their chemotactic properties towards monocytes, dendritic cells and T-cells, the specific cells of immunity. Immuno-modulating factors produced in the microenvironment of a tumor could potentially determine whether or not an immune response can take place and what kind of immune cells will be recruited. Dendritic cells according to their maturation state, respond to

different chemokines (168). So, the local production of one chemokine can influence the class of the immune response initiated as for example, CCL21/SLC was shown to mediate T-cell-dependent antitumor responses *in vivo* (169).

Inhibition of angiogenesis

A major focus of angiogenesis research has been the control of tumor growth in order to develop new therapeutic tools (170). One strategy consist to asphyxiation of tumor by inhibiting the role of angiogenic factors. Some reviews discuss applications of inhibitors of angiogenesis (171,172). An anti-cancer therapy is illustrated by the anti-tumor effect of some chemokines , acting as anti-angiogenic factors and attracting immune effector cells to the tumor site, as SLC-ELC (173,174).

Block interaction chemokine-chemokine receptor

A way is to inhibit the interaction of a chemokine receptor with its ligand with antibody or antagonist peptides. As such, CXCR4 antagonists inhibit primary brain tumor growth (175). Recent cancer immunotherapy uses cytokine-and chemokine-based gene therapy (176). Chemokine-cytokine fusion proteins are new therapeutic tools, designed to suppress growth and dissemination of metastases (177,178).

References

1. Duijvestijn, A. M., Kerkhove, M., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1987) *J Immunol* **138**, 713-719
2. Jalkanen, S., Steere, A. C., Fox, R. I., and Butcher, E. C. (1986) *Science* **233**, 556-558
3. Sher, B. T., Bargatze, R., Holzmann, B., Gallatin, W. M., Matthews, D., Wu, N., Picker, L., Butcher, E. C., and Weissman, I. L. (1988) *Adv Cancer Res* **51**, 361-390
4. Picker, L. J., and Butcher, E. C. (1992) *Annu Rev Immunol* **10**, 561-591
5. Nicolson, G. L. (1993) *Cancer Metastasis Rev* **12**, 325-343
6. Li, Y., Wang, M. N., Li, H., King, K. D., Bassi, R., Sun, H., Santiago, A., Hooper, A. T., Bohlen, P., and Hicklin, D. J. (2002) *J Exp Med* **195**, 1575-1584
7. Wei, Y. Q., Wang, Q. R., Zhao, X., Yang, L., Tian, L., Lu, Y., Kang, B., Lu, C. J., Huang, M. J., Lou, Y. Y., Xiao, F., He, Q. M., Shu, J. M., Xie, X. J., Mao, Y. Q., Lei, S., Luo, F., Zhou, L. Q., Liu, C. E., Zhou, H., Jiang, Y., Peng, F., Yuan, L. P., Li, Q., Wu, Y., and Liu, J. Y. (2000) *Nat Med* **6**, 1160-1166
8. Staroselsky, A. N., Mahlin, T., Savion, N., Klein, O., Nordenberg, J., Donin, N., Michowitz, M., and Leibovici, J. (1996) *J Exp Ther Oncol* **1**, 251-259
9. Kieda, C., Paprocka, M., Krawczenko, A., Zalecki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C., and Dus, D. (2002) *Endothelium* **9**, 247-261
10. Bizouarne, N., Mitterrand, M., Monsigny, M., and Kieda, C. (1993) *Biol Cell* **79**, 27-35
11. Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G. E. (1975) *J Cell Biol* **67**, 863-885
12. Risau, W. (1995) *Faseb J* **9**, 926-933.
13. Garlanda, C., and Dejana, E. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1193-1202.
14. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., and Stern, D. M. (1998) *Blood* **91**, 3527-3561
15. Denis, V., Dupuis, P., Bizouarne, N., de, O. S. S., Hong, L., Leuret, M., Monsigny, M., Nakache, M., and Kieda, C. (1996) *J Leukoc Biol* **60**, 744-752
16. Girard, J. P., and Springer, T. A. (1995) *Immunol Today* **16**, 449-457.
17. Augustin, H. G., Kozian, D. H., and Johnson, R. C. (1994) *Bioessays* **16**, 901-906
18. Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M., Koivunen, E., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1998) *J Clin Invest* **102**, 430-437.
19. Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1996) *Nature* **380**, 364-366.
20. Gowans, J., and Knight, E. (1964) *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **159**, 257-282
21. Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996) *Science* **272**, 60-66.
22. Picker, L. J., Martin, R. J., Trumble, A., Newman, L. S., Collins, P. A., Bergstresser, P. R., and Leung, D. Y. (1994) *Eur J Immunol* **24**, 1269-1277
23. Picker, L. J. (1994) *Curr Opin Immunol* **6**, 394-406
24. Salmi, M., and Jalkanen, S. (1997) *Adv Immunol* **64**, 139-218
25. Berg, E. L., Goldstein, L. A., Jutila, M. A., Nakache, M., Picker, L. J., Streeter, P. R., Wu, N. W., Zhou, D., and Butcher, E. C. (1989) *Immunol Rev* **108**, 5-18
26. Adams, D. H., and Shaw, S. (1994) *Lancet* **343**, 831-836
27. Springer, T. A. (1994) *Cell* **76**, 301-314.
28. Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., and Engel, P. (1995) *Faseb J* **9**, 866-873
29. Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E., and Springer, T. A. (1995) *J Cell Biol* **128**, 1243-1253
30. Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L., and Butcher, E. C. (1995) *Cell* **80**, 413-422
31. Lalor, P. F., Clements, J. M., Pigott, R., Humphries, M. J., Spragg, J. H., and Nash, G. B. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 1422-1426
32. Campbell, J. J., Qin, S., Bacon, K. B., Mackay, C. R., and Butcher, E. C. (1996) *J Cell Biol* **134**, 255-266

33. Luster, A. D. (1998) *N Engl J Med* **338**, 436-445
34. Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 336-341
35. Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998) *Science* **279**, 381-384.
36. Berg, E. L., Magnani, J., Warnock, R. A., Robinson, M. K., and Butcher, E. C. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 1048-1055
37. Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., and Seed, B. (1989) *Science* **243**, 1160-1165
38. Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., and Briskin, M. (1999) *Adv Immunol* **72**, 209-253
39. Cummings, R. D., and Smith, D. F. (1992) *Bioessays* **14**, 849-856
40. Fieger, C. B., Emig-Vollmer, S., Petri, T., Grafe, M., Gohlke, M., Debus, N., Semmler, W., Tauber, R., and Volz, B. (2001) *Biochim Biophys Acta* **1524**, 75-85
41. Gulubova, M. V. (2002) *Histochem J* **34**, 67-77
42. Li, L., Short, H. J., Qian, K. X., Elhammer, A. P., and Geng, J. G. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 637-644
43. Picker, L. J., Kishimoto, T. K., Smith, C. W., Warnock, R. A., and Butcher, E. C. (1991) *Nature* **349**, 796-799
44. Tedder, T. F., Penta, A. C., Levine, H. B., and Freedman, A. S. (1990) *J Immunol* **144**, 532-540
45. Bizouarne, N., Denis, V., Legrand, A., Monsigny, M., and Kieda, C. (1993) *Biol Cell* **79**, 209-218
46. Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A., Kishimoto, T. K., Picker, L. J., and Butcher, E. C. (1991) *J Exp Med* **174**, 1461-1466
47. Bos, J. D., de Boer, O. J., Tibosch, E., Das, P. K., and Pals, S. T. (1993) *Arch Dermatol Res* **285**, 179-183
48. Picker, L. J., Michie, S. A., Rott, L. S., and Butcher, E. C. (1990) *Am J Pathol* **136**, 1053-1068
49. Santamaria Babi, L. F., Perez Soler, M. T., Hauser, C., and Blaser, K. (1995) *Immunol Res* **14**, 317-324
50. de Boer, O. J., Wakelkamp, I. M., Pals, S. T., Claessen, N., Bos, J. D., and Das, P. K. (1994) *Arch Dermatol Res* **286**, 304-311
51. Schweighoffer, T., Tanaka, Y., Tidswell, M., Erle, D. J., Horgan, K. J., Luce, G. E., Lazarovits, A. I., Buck, D., and Shaw, S. (1993) *J Immunol* **151**, 717-729
52. Duijvestijn, A. M., Horst, E., Pals, S. T., Rouse, B. N., Steere, A. C., Picker, L. J., Meijer, C. J., and Butcher, E. C. (1988) *Am J Pathol* **130**, 147-155
53. Meijer, C., Beljaards, F., Horst, E., Willemze, R., Van der Valk, P., and Pals, S. (1989) *J Invest Dermatol* **92**, 479
54. Noorduyn, L. A., Beljaards, R. C., Pals, S. T., van Heerde, P., Radaszkiewicz, T., Willemze, R., and Meijer, C. J. (1992) *Histopathology* **21**, 59-64
55. De Boer, O. J., Horst, E., Pals, S. T., Bos, J. D., and Das, P. K. (1994) *Immunology* **81**, 359-365
56. Bargatze, R. F., Kurk, S., Butcher, E. C., and Jutila, M. A. (1994) *J Exp Med* **180**, 1785-1792
57. Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993) *Nature* **366**, 695-698
58. Hasslen, S. R., von Andrian, U. H., Butcher, E. C., Nelson, R. D., and Erlandsen, S. L. (1995) *Histochem J* **27**, 547-554
59. Shimizu, Y., and Shaw, S. (1993) *Nature* **366**, 630-631
60. Berg, E. L., Mullaney, A. T., Andrew, D. P., Goldberg, J. E., and Butcher, E. C. (1998) *Am J Pathol* **152**, 469-477
61. Hemmerich, S., Butcher, E. C., and Rosen, S. D. (1994) *J Exp Med* **180**, 2219-2226
62. Michie, S. A., Streeter, P. R., Butcher, E. C., and Rouse, R. V. (1995) *Am J Pathol* **147**, 412-421
63. von Andrian, U. H., Chambers, J. D., Berg, E. L., Michie, S. A., Brown, D. A., Karolak, D., Ramezani, L., Berger, E. M., Arfors, K. E., and Butcher, E. C. (1993) *Blood* **82**, 182-191
64. Yednock, T. A., Butcher, E. C., Stoolman, L. M., and Rosen, S. D. (1987) *J Cell Biol* **104**, 725-731
65. Streeter, P. R., Berg, E. L., Rouse, B. T., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1988) *Nature* **331**, 41-46.

66. Michie, S. A., Streeter, P. R., Bolt, P. A., Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1993) *Am J Pathol* **143**, 1688-1698
67. Vestweber, D., and Blanks, J. E. (1999) *Physiol Rev* **79**, 181-213
68. Imai, Y., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1992) *Glycobiology* **2**, 373-381
69. Berg, E. L., Robinson, M. K., Mansson, O., Butcher, E. C., and Magnani, J. L. (1991) *J Biol Chem* **266**, 14869-14872
70. Nakache, M., Berg, E. L., Streeter, P. R., and Butcher, E. C. (1989) *Nature* **337**, 179-181
71. Picker, L. J., Nakache, M., and Butcher, E. C. (1989) *J Cell Biol* **109**, 927-937
72. Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., Cochran, N., Bloom, S., Wilson, J., McEvoy, L. M., Butcher, E. C., Kassam, N., Mackay, C. R., Newman, W., and Ringler, D. J. (1997) *Am J Pathol* **151**, 97-110
73. Morgan, S. M., Samulowitz, U., Darley, L., Simmons, D. L., and Vestweber, D. (1999) *Blood* **93**, 165-175
74. Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K., and Muller, W. (1996) *Nature* **382**, 366-370
75. Drillenburg, P., van der Voort, R., Koopman, G., Dragosics, B., van Krieken, J. H., Kluin, P., Meenan, J., Lazarovits, A. I., Radaszkiewicz, T., and Pals, S. T. (1997) *Am J Pathol* **150**, 919-927
76. Taub, D. D., and Oppenheim, J. J. (1994) *Ther Immunol* **1**, 229-246
77. Mackay, C. R. (1996) *J Exp Med* **184**, 799-802
78. Taub, D. D., Anver, M., Oppenheim, J. J., Longo, D. L., and Murphy, W. J. (1996) *J Clin Invest* **97**, 1931-1941
79. Fuentes, M. E., Durham, S. K., Swerdel, M. R., Lewin, A. C., Barton, D. S., Megill, J. R., Bravo, R., and Lira, S. A. (1995) *J Immunol* **155**, 5769-5776
80. Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993) *J Exp Med* **178**, 367-372
81. Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., and Matsushima, K. (1993) *Nature* **365**, 654-657
82. Karpus, W. J., Lukacs, N. W., McRae, B. L., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., and Miller, S. D. (1995) *J Immunol* **155**, 5003-5010
83. Gupta, S. K., Hassel, T., and Singh, J. P. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7799-7803
84. Zhou, Z., Kim, Y. J., Pollok, K., Hurtado, J., Lee, J. K., Broxmeyer, H. E., and Kwon, B. S. (1993) *J Immunol* **151**, 4333-4341
85. Taub, D. D., Turcovski-Corrales, S. M., Key, M. L., Longo, D. L., and Murphy, W. J. (1996) *J Immunol* **156**, 2095-2103
86. Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996) *Cell* **85**, 1135-1148
87. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996) *Science* **272**, 872-877
88. Witt, D. P., and Lander, A. D. (1994) *Curr Biol* **4**, 394-400
89. Rybak, M. E., Gimbrone, M. A., Jr., Davies, P. F., and Handin, R. I. (1989) *Blood* **73**, 1534-1539
90. Luster, A. D., Greenberg, S. M., and Leder, P. (1995) *J Exp Med* **182**, 219-231
91. Hoogewerf, A. J., Kuscher, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A., and Wells, T. N. (1997) *Biochemistry* **36**, 13570-13578
92. Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997) *Cell* **91**, 385-395
93. Rot, A. (1992) *Immunol Today* **13**, 291-294
94. Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993) *Nature* **361**, 79-82
95. Warnock, R. A., Campbell, J. J., Dorf, M. E., Matsuzawa, A., McEvoy, L. M., and Butcher, E. C. (2000) *J Exp Med* **191**, 77-88.
96. Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E., and von Andrian, U. H. (2000) *J Exp Med* **191**, 61-76.

97. Pan, J., Kunkel, E. J., Gossler, U., Lazarus, N., Langdon, P., Broadwell, K., Vierra, M. A., Genovese, M. C., Butcher, E. C., and Soler, D. (2000) *J Immunol* **165**, 2943-2949
98. Kunkel, E. J., Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Vierra, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Greenberg, H. B., Parker, C. M., Butcher, E. C., Andrew, D. P., and Agace, W. W. (2000) *J Exp Med* **192**, 761-768
99. Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., and Butcher, E. C. (1999) *Nature* **400**, 776-780
100. Morales, J., Homey, B., Vicari, A. P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McEvoy, L. M., and Zlotnik, A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14470-14475
101. Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., and Williams, L. T. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 258-263.
102. Nagira, M., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Ridanpaa, M., Takagi, S., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997) *J Biol Chem* **272**, 19518-19524
103. Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., and Yoshie, O. (1998) *J Biol Chem* **273**, 7118-7122
104. Hwang, S. T., Singer, M. S., Giblin, P. A., Yednock, T. A., Bacon, K. B., Simon, S. I., and Rosen, S. D. (1996) *J Exp Med* **184**, 1343-1348
105. Nakano, H., Tamura, T., Yoshimoto, T., Yagita, H., Miyasaka, M., Butcher, E. C., Nariuchi, H., Kakiuchi, T., and Matsuzawa, A. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 215-221
106. Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999) *J Exp Med* **189**, 451-460
107. Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J. A., and Lira, S. A. (1999) *J Exp Med* **190**, 1183-1188
108. Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H., and Mori, M. (2002) *Cancer Res* **62**, 2937-2941
109. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001) *Nature* **410**, 50-56
110. Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T., and Hwang, S. T. (2001) *J Natl Cancer Inst* **93**, 1638-1643
111. Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L. L., Soler, D., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M., and Andrew, D. P. (1999) *J Exp Med* **190**, 1241-1256
112. Vicari, A. P., Figueroa, D. J., Hedrick, J. A., Foster, J. S., Singh, K. P., Menon, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Bacon, K. B., and Zlotnik, A. (1997) *Immunity* **7**, 291-301
113. Wurbel, M. A., Philippe, J. M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M. G., Malissen, M., Jordan, B. R., Malissen, B., Carrier, A., and Naquet, P. (2000) *Eur J Immunol* **30**, 262-271
114. Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2001) *J Exp Med* **194**, 1541-1547
115. Wang, J. M., Deng, X., Gong, W., and Su, S. (1998) *J Immunol Methods* **220**, 1-17
116. Mizoue, L. S., Bazan, J. F., Johnson, E. C., and Handel, T. M. (1999) *Biochemistry* **38**, 1402-1414
117. Bazan, J. F., Bacon, K. B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D. R., Zlotnik, A., and Schall, T. J. (1997) *Nature* **385**, 640-644
118. Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J. A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J. C., and Gearing, D. (1997) *Nature* **387**, 611-617
119. Combadiere, C., Salzwedel, K., Smith, E. D., Tiffany, H. L., Berger, E. A., and Murphy, P. M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 23799-23804

120. Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T. J., and Yoshie, O. (1997) *Cell* **91**, 521-530
121. Wilbanks, A., Zondlo, S. C., Murphy, K., Mak, S., Soler, D., Langdon, P., Andrew, D. P., Wu, L., and Briskin, M. (2001) *J Immunol* **166**, 5145-5154
122. Fong, A. M., Erickson, H. P., Zachariah, J. P., Poon, S., Schamberg, N. J., Imai, T., and Patel, D. D. (2000) *J Biol Chem* **275**, 3781-3786
123. Fong, A. M., Robinson, L. A., Steeber, D. A., Tedder, T. F., Yoshie, O., Imai, T., and Patel, D. D. (1998) *J Exp Med* **188**, 1413-1419
124. Haskell, C. A., Cleary, M. D., and Charo, I. F. (1999) *J Biol Chem* **274**, 10053-10058
125. Papadopoulos, E. J., Sasseti, C., Saeki, H., Yamada, N., Kawamura, T., Fitzhugh, D. J., Saraf, M. A., Schall, T., Blauvelt, A., Rosen, S. D., and Hwang, S. T. (1999) *Eur J Immunol* **29**, 2551-2559
126. Harrison, J. K., Jiang, Y., Wees, E. A., Salafraanca, M. N., Liang, H. X., Feng, L., and Belardinelli, L. (1999) *J Leukoc Biol* **66**, 937-944
127. Foussat, A., Coulomb-L'Hermine, A., Gosling, J., Krzysiek, R., Durand-Gasselien, I., Schall, T., Balian, A., Richard, Y., Galanaud, P., and Emilie, D. (2000) *Eur J Immunol* **30**, 87-97
128. Sugaya, M., Nakamura, K., Mitsui, H., Takekoshi, T., Saeki, H., and Tamaki, K. (2003) *J Dermatol Sci* **31**, 179-187
129. Harrison, J. K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R. K., Streit, W. J., Salafraanca, M. N., Adhikari, S., Thompson, D. A., Botti, P., Bacon, K. B., and Feng, L. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10896-10901
130. Lavergne, E., Combadiere, B., Bonduelle, O., Iga, M., Gao, J. L., Maho, M., Boissonnas, A., Murphy, P. M., Debre, P., and Combadiere, C. (2003) *Cancer Res* **63**, 7468-7474
131. Guo, J., Zhang, M., Wang, B., Yuan, Z., Guo, Z., Chen, T., Yu, Y., Qin, Z., and Cao, X. (2003) *Int J Cancer* **103**, 212-220
132. Flamme, I., Frolich, T., and Risau, W. (1997) *J Cell Physiol* **173**, 206-210
133. Risau, W. (1997) *Nature* **386**, 671-674
134. Keane, M. P., Arenberg, D. A., Moore, B. B., Addison, C. L., and Strieter, R. M. (1998) *Proc Assoc Am Physicians* **110**, 288-296
135. Moore, B. B., Keane, M. P., Addison, C. L., Arenberg, D. A., and Strieter, R. M. (1998) *J Investig Med* **46**, 113-120
136. Folkman, J. (1995) *Nat Med* **1**, 27-31
137. Murdoch, C., and Finn, A. (2000) *Blood* **95**, 3032-3043
138. Frederick, M. J., and Clayman, G. L. (2001) *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1-18
139. Lucas, A. D., and Greaves, D. R. (2001) *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1-18
140. Fidler, I. J., and Ellis, L. M. (1994) *Cell* **79**, 185-188
141. Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M., and Thorgeirsson, U. P. (1996) *Cancer Res* **56**, 2013-2016
142. Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., and Ullrich, A. (1993) *Cell* **72**, 835-846
143. Ellis, L. M., and Fidler, I. J. (1996) *Eur J Cancer* **32A**, 2451-2460
144. Moore, B. B., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Keane, M. P., and Strieter, R. M. (1998) *J Lab Clin Med* **132**, 97-103
145. Kunkel, E., and Butcher, E. (2002) *Adv Exp Med Biol* **512**, 65-72
146. Li, A., Varney, M. L., and Singh, R. K. (2001) *Clin Cancer Res* **7**, 3298-3304
147. Zeelenberg, I. S., Ruuls-Van Stalle, L., and Roos, E. (2003) *Cancer Res* **63**, 3833-3839
148. Kieda, C., and Dus, D. (2003) *Adv Exp Med Biol* **535**, 79-94
149. Horuk, R. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 313-335
150. Schadendorf, D., Moller, A., Algermissen, B., Worm, M., Sticherling, M., and Czarnetzki, B. M. (1993) *J Immunol* **151**, 2667-2675
151. Brew, R., Erikson, J. S., West, D. C., Kinsella, A. R., Slavin, J., and Christmas, S. E. (2000) *Cytokine* **12**, 78-85

152. Ferrer, F. A., Pantschenko, A. G., Miller, L. J., Anderson, K., Grunnet, M., McKenna, P. H., and Kreutzer, D. (2000) *J Urol* **164**, 1016-1020
153. Luan, J., Shattuck-Brandt, R., Haghnegahdar, H., Owen, J. D., Strieter, R., Burdick, M., Nirodi, C., Beauchamp, D., Johnson, K. N., and Richmond, A. (1997) *J Leukoc Biol* **62**, 588-597
154. Fujisawa, N., Sakao, Y., Hayashi, S., Hadden, W. A., 3rd, Harmon, C. L., and Miller, E. J. (2000) *J Cancer Res Clin Oncol* **126**, 19-26
155. Bernardini, G., Ribatti, D., Spinetti, G., Morbidelli, L., Ziche, M., Santoni, A., Capogrossi, M. C., and Napolitano, M. (2003) *J Immunol Methods* **273**, 83-101
156. Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2000) *J Leukoc Biol* **68**, 1-8
157. Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A., and Kunkel, S. L. (1995) *Shock* **4**, 155-160
158. Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., and et al. (1995) *J Biol Chem* **270**, 27348-27357
159. Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G., and Strieter, R. M. (1992) *Science* **258**, 1798-1801
160. Salcedo, R., and Oppenheim, J. J. (2003) *Microcirculation* **10**, 359-370
161. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., and Murphy, W. J. (2000) *Blood* **96**, 34-40
162. Volin, M. V., Woods, J. M., Amin, M. A., Connors, M. A., Harlow, L. A., and Koch, A. E. (2001) *Am J Pathol* **159**, 1521-1530
163. Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., and Sharpe, R. J. (1990) *Science* **247**, 77-79
164. Pugh, C. W. (2003) *Ann Med* **35**, 380-390
165. Welsh, S. J., and Powis, G. (2003) *Curr Cancer Drug Targets* **3**, 391-405
166. Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., and Sica, A. (2003) *J Exp Med* **198**, 1391-1402
167. Adler, E. P., Lemken, C. A., Katchen, N. S., and Kurt, R. A. (2003) *Immunol Lett* **90**, 187-194
168. Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., and Vicari, A. (2000) *Springer Semin Immunopathol* **22**, 345-369
169. Sharma, S., Stolina, M., Luo, J., Strieter, R. M., Burdick, M., Zhu, L. X., Batra, R. K., and Dubinett, S. M. (2000) *J Immunol* **164**, 4558-4563
170. Van Der Bilt, J. D., and Borel Rinkes, I. H. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1654**, 95-104
171. Voest, E. E. (1996) *Anticancer Drugs* **7**, 723-727
172. Folkman, J., and Ingber, D. (1992) *Semin Cancer Biol* **3**, 89-96
173. Nomura, T., and Hasegawa, H. (2000) *Anticancer Res* **20**, 4073-4080
174. Arenberg, D. A., Zlotnick, A., Strom, S. R., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2001) *Cancer Immunol Immunother* **49**, 587-592
175. Rubin, J. B., Kung, A. L., Klein, R. S., Chan, J. A., Sun, Y., Schmidt, K., Kieran, M. W., Luster, A. D., and Segal, R. A. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13513-13518
176. Chada, S., Ramesh, R., and Mhashilkar, A. M. (2003) *Curr Opin Mol Ther* **5**, 463-474
177. Ruehlmann, J. M., Xiang, R., Niethammer, A. G., Ba, Y., Pertl, U., Dolman, C. S., Gillies, S. D., and Reisfeld, R. A. (2001) *Cancer Res* **61**, 8498-8503
178. Nakahara, K., and Sakata, T. (2003) *J Gene Med* **5**, 463-471

ANNEXE 2

**Human natural killer cells kill organo-specific endothelial cells :
analysis of the adhesion and cytotoxic mechanisms**

Human natural killer cells kill organo-specific endothelial cells : analysis of the adhesion and cytotoxic mechanisms

Aleksandra Bielawska-Pohl+*, Claire Crola*, Anne Caignard+, Catherine Gaudin+, Danuta Dus Claudine Kieda* §, Salem Chouaib+ §

+ INSERM U487, U, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

* CNRS, Centre Biophysique Moléculaire UPR 4301 CNRS, Orléans, France

° Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland

§ Co-senior authors

Abstract

Human organo-specific microvascular endothelial cells were established and used in the present study in order to investigate their susceptibility to NK-induced lysis. Our data indicate that although IL-2-stimulated NK cells quite differently adhered to human peripheral (HPLNEC.B3), mesenteric lymph node (HMLNEC), brain (HBrMEC), lung (HLMEC) and skin (HskMEC-1) endothelial cells, they significantly killed these cells. However, no direct correlation was observed between adhesion pattern and the differential susceptibility to NK-mediated killing. Using different chelators, we could demonstrate that the necessary adhesion step was governed by an Mg²⁺ dependent but Ca²⁺ independent mechanism as opposed to the subsequent Ca²⁺ dependent killing.

In order to identify the cytotoxic pathway used by NK cells, the involvement of the classical and alternate pathways was approached. Blocking Ca²⁺ dependent cytotoxicity pathway by EGTA/MgCl₂ resulted in a significant inhibition of endothelial target cell killing suggesting a predominant role of perforin/granzyme pathway. Furthermore, using confocal microscopy, we demonstrated that the interaction between NK effectors and endothelial cells induced cytochrome *c* release and BID translocation in target cells indicating an involvement of the mitochondrial pathway in NK-induced endothelial cell death. In addition, while all tested cells were sensitive to the cytotoxic action of TNF, no susceptibility to TRAIL and to anti-Fas mAb (7C11) was observed. These studies emphasize that human NK-cell cytotoxicity towards endothelial cells may be a potential therapeutical tool to induce vascular injury in various diseases.

Key words: endothelial cells, natural killer cells, cytotoxicity, adhesion.

Introduction

Natural killer cells are innate effector cells playing a critical role in the early defence against viral infection and malignant transformation¹⁻³. Their activity is characterized as non adaptive, major histocompatibility complex (MHC) unrestricted and it is now well established that the lytic function of these cells is regulated by a network of cytokines acting either independently or synergistically⁴⁻⁶. The cytolytic and cytokine functions of NK cells are regulated by a complex balance between inhibitory and activating signals that are triggered via the engagement of NK cell-surface receptors with their specific ligands^{7,8}. It is well established that the functions of NK cells are regulated by the integration of signals from inhibitory and activating

receptors^{9,10}. Inhibitory receptors specific for MHC class I molecules can provide protection for target cells that express normal levels of class I molecules on their surface. Although inhibitory receptors play a key role in regulating NK cells, stimulatory receptors are believed to be necessary for the initial activation of NK cells. Several different classes of activating NK cell receptors have been described and these are specific for either classical MHC class I molecules, non classical MHC class I molecules, or MHC class I-related molecules of host or pathogen origin^{7,11,12}. NK cell destruction of target cells involves exocytosis of granules containing perforin and serine esterases (granzymes). These are believed to be the primary mediators of the cellular cytotoxicity exhibited by NK cells^{13,14}. Additional studies demonstrated a granule-independent alternative killing pathway

involving death receptor ligands including Fas ligand and TRAIL^{14,15}).

Besides their important role in the cellular immune response against viral infections and tumours^{1-3,8}, NK cells have been reported to lyse porcine endothelial cells *in vitro*¹⁶. In addition, NK cell infiltrates into pig organs perfused with human blood *ex vivo*¹⁷ as well as pig-to-non human primate xenografts¹⁸. This evidenced a potential role for NK cell in the endothelial cells recognition and damage of porcine tissues. Since the endothelium plays an important role in the recruitment and emigration of circulating effector cells into sites of inflammation¹⁹ and immune responses, the endothelial cells can then be the primary target of immunological injury. Endothelial cell injury occurs in a variety of pathologic infections, autoimmunity, transplantation, graft-versus-host disease and following immunotherapy with cytokines. Such injury may result from cytotoxicity towards EC mediated by effector lymphocytes²⁰⁻²³.

More importantly, it is becoming increasingly clear that NK cells may play a role in the control of angiogenesis^{24,25}. In this context, it has been shown that NK cells bind to angiogenic microvessels in established cancer metastases and that VEGF-A165 appears to stimulate NK cell adhesion to the microvasculature within established cancer metastases²⁶.

The cross-talk between NK cells and the endothelial system was basically investigated using porcine or HUVEC cells^{18,21}. Despite a series of studies, showing the selectivity of the endothelium and the high degree of microenvironmental control of the endothelial cell, the interaction between human NK cells and organo-specific endothelial cells remains unknown. The primary aim of the present study was to examine whether a human NK clone²⁷ adhere and kill organo-specific human endothelial cells²⁸. To decipher the way NK cells are recruited and bind the endothelial layer to enter the underneath tissue, we undertook the study of the adhesion mechanism occurring between NK and ECs. This can provide new means to induce the destruction of the vessels which are necessary for the development of invasive pathologies as cancer²⁹. In this paper we show that NK-mediated endothelial cell killing is organo-specific and occurs in an IL-2 activation dependent manner.

Materials and Methods

Cells and culture conditions

All organospecific endothelial cell lines²⁸ (OSECs) were established in the laboratory (Kieda *et al.* CNRS patent N° 99-16169). OSECs were cultured in Optimem 1 with Glutamax-I (Invitrogen, U.K.) supplemented with 3% FBS (Biochrom KG, Berlin, Germany), 40 mg/ml Gentamycine (Panpharma, Fougères, France) and 0,5 mg/ml Fungizone (Gibco, United Kingdom). OSECs were passaged using 0.05%/0.02% w/v Trypsin/EDTA solution (Biochrom AG, Berlin, Germany).

NKL. NKL cell line was established from the peripheral blood of a patient with large granular lymphocyte (LGL) leukemia as described elsewhere²⁷.

NKL1 were maintained in culture with Optimem 1 with Glutamax-I (Invitrogen, U.K.) supplemented with 2% FBS (Gibco, United Kingdom), 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany) and 0,2 % Fungizone (Gibco, United Kingdom).

NKL2 were maintained in culture with Optimem 1 with Glutamax-I (Invitrogen, U.K.) supplemented with 4% human AB serum (Institut Jacques Boy S.A., Reims, France), 200 U/ml rIL-2 (Aventis Pharma, France), 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Germany) and 1% Sodium Pyruvate (Biochrom AG, Berlin, Germany).

Monoclonal antibodies and reagents

Anti-cytochrome *c*, a mouse IgG₁ mAb was purchased from BD Pharmingen (Grenoble, France), anti-BID (FL-195), a rabbit polyclonal antibody against the recombinant protein corresponding to amino acids 1-195 representing full length BID of human origin was from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany), Alexa 488 conjugated goat anti-mouse IgG, and Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit IgG, antibodies were from Molecular Probes (Sigma, France). The mouse IgM agonistic anti-Fas mAb (7C11) was from Immunotech, (France) and the isotype control mouse IgM was from Sigma Aldrich (France).

The fluorescent lipophilic dye 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide DIOC6(3) was from Molecular Probes and propidium iodide (PI) from Sigma Aldrich (France).

The PKH26GL Red Fluorescent Cell Linker Kit was purchased from Sigma Aldrich (France), while Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) was from Molecular Probes (Sigma, France). Gelatin 2% solution Type B from bovine skin was from Sigma (France).

Cytotoxicity assay

OSECs or K562 (NK-sensitive cells) (6×10^5) were incubated for 45 min with $100 \mu\text{Ci Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham, Biosciences, UK). After labeling, cells were washed three times with cold medium (10% FBS/RPMI 1640, Gibco, France) and placed in 96 well microtiter plates (Falcon, Becton Dickinson, Grenoble, France). Various numbers of effector cells were added to a final volume of 0.2 ml. After a 4-h incubation at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere, the plate was centrifuged at $2000g$ for 2 min, the supernatants were harvested and radioactivities were counted by γ -counter. Maximal or spontaneous release from target cells was obtained by mixing target cells in 0.2 ml medium (10% FBS/RPMI 1640, vol:vol) with or without 1N HCl. The spontaneous release was usually less than 25% of the total release. The percentage of lysis was calculated by using the following equation:

$$\text{lysis (\%)} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

In the blocking experiments - EGTA (4mM) and MgCl_2 (2mM) were added just before the incubation of ^{51}Cr labeled target cells with effector cells.

Apoptosis detection

Apoptosis was detected by two-colour fluorescence staining. Trypsin detached ECs (3×10^5) or control cell lines were incubated with 3,3' dihexyloxycarbocyanine iodide $\text{DIOC}_6(3)$ ($50 \mu\text{M}$, from Sigma, France) for 30 min at 37°C to assess mitochondrial membrane potential³⁰. After two washings in c-PBS, propidium iodide (from Sigma, France) was added ($1 \mu\text{g/ml}$). The samples were read in one hour time on FACS-Sort (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) flow cytometer (FL1 (DIOC_6) $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 501 \text{ nm}$ and FL2 (PI) $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$). Data were processed using Cell Quest Software (BD Biosciences, San Jose, CA).

Adhesion test

Static conditions: The endothelial cells were seeded into 24-well plate (Falcon) at the desired

concentration and cultured for 48h before the adhesion assay. NKL cells were labeled with PKH26GL red dye³¹ and were overlaid onto the endothelial cells monolayer in a 5 lymphoid cells to 1 endothelial cell ratio. The cells were allowed to adhere at 37°C for defined time periods under static conditions. Non adherent cells were removed by at least three gentle washings. The adhesion was detected either by fluorescence microscopy Axiovert 200M (Zeiss) and then the results were analyzed using AxioVision 3.1 software or quantified by flow cytometry (FACS LSR, Becton Dickinson, Sunnyvale CA, USA). Before analysis by flow cytometry, the cells were detached using 0.05%/0.02% w/v Trypsin/EDTA solution (Biochrom AG, Berlin, Germany). Data were processed using Cell Quest Pro Software (BD Biosciences, San Jose, CA). When indicated, divalent cations chelators : EDTA (4mM, Sigma, France) or EGTA (4mM, Polysciences Inc, USA)/ MgCl_2 (2mM, Sigma, France) were added to the medium just before incubating NKL cells with endothelial cells.

Flow conditions: The endothelial cells were seeded onto polystyrene tissue culture slides (Nalge Nunc Inc, Belgium) at the desired concentration in normal culture medium. In co-culture experiments, one of the endothelial cell line was first labeled with CFSE . Briefly, trypsin detached endothelial cells (2×10^6) were washed with c-PBS and incubated in CFSE ($5 \mu\text{M}$) solution in c-PBS for 10 min at 37°C . After three washings with 0,5% (w/v) BSA in c-PBS cells were mixed in the desired proportion to be seeded with non labeled endothelial cells from another line and co-cultured in medium for 72 h.

The cell adhesion flow chamber (Immunetics, USA) was used to perform dynamic cell adhesion assays in a laminar flow environment (under shear stress). Previously labeled with PKH26GL red³¹, NKL cells (1×10^6) were injected in a laminar flow at the fixed flow rate $50 \mu\text{l/min}$ for 5 min. Recognition, rolling and adhesion of the NKL cells to endothelial cells were allowed for 5 min, then washing was achieved for another 5 min with medium (under the same flow conditions). During acquisition phase contrast microscopy (Zeiss, Axiovert 200, Le Pecq, France) with Axio Vision software (Zeiss) and image processing camera (Hamamatsu, France) were used. Images were analysed with Axio Vision Image Analysis program (Zeiss).

Confocal microscopy analysis

The endothelial cells were seeded onto gelatin coated (0,2 % in distilled water) micro cover glasses (Erie Scientific Portsmouth, USA) at the desired concentration and allowed to grow in culture conditions for 48 hours. PKH26GL labeled, NKL cells³¹ were overlaid onto the endothelial cells in a 10 lymphoid cells to 1 endothelial cell ratio. After a 4h incubation, the cover glasses were washed once with c-PBS and fixed with paraformaldehyde 4% (w/v) solution (Sigma, France) in c-PBS for 60 min at RT. Cells were washed three times with c-PBS. Sodium dodecylsulfate (0,1 % in c-PBS) (Bio-Rad, France) was used to permeabilize the cells for 10 min at room temperature. After three washings with c-PBS free aldehyde residues were blocked by incubation with a 10% FBS solution (v/v) in c-PBS for 20 min. Then cells were allowed to react with antibody against cytochrome *c* (BD Pharmingen) or BID (Santa Cruz Biotechnology) for 60 min, at RT. Cells were washed three times with c-PBS and incubated with Alexa 488 ($\lambda_{ex} = 495$ nm, $\lambda_{em} = 519$ nm) conjugated goat anti-mouse IgG, or goat anti-rabbit IgG, secondary antibodies (Molecular Probes). Micro cover glasses were washed and mounted on slides using a drop of Vectashield antiphotobleaching reagent (Vector Laboratories, USA). Cells were analyzed with a confocal microscope imaging system (MRC-1024; Bio-Rad, Oxfordshire, UK) equipped with a Nikon Optiphot epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a Planapo objective (numerical aperture 1.4). A krypton/argon laser was tuned to produce both 488 nm (fluorescein excitation) and 568 nm (rhodamine excitation) wavelengths. The images were recorded under a Kalman filter (an average of 7 images) and treated with Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Results

Adhesion of NKL cells to the organo-specific endothelial cell lines

We have used in the course of these studies, the human natural killer cell line, NKL, in order to overcome variability between fresh NK cells obtained from healthy donors. We have first investigated the capacity of IL-2 starved (NKL1) or IL-2 stimulated NKL (NKL2) to adhere to organo-specific endothelial cells (OSEC) from distinct origins. Data depicted in figure 1A indicate that, under static conditions, IL-2

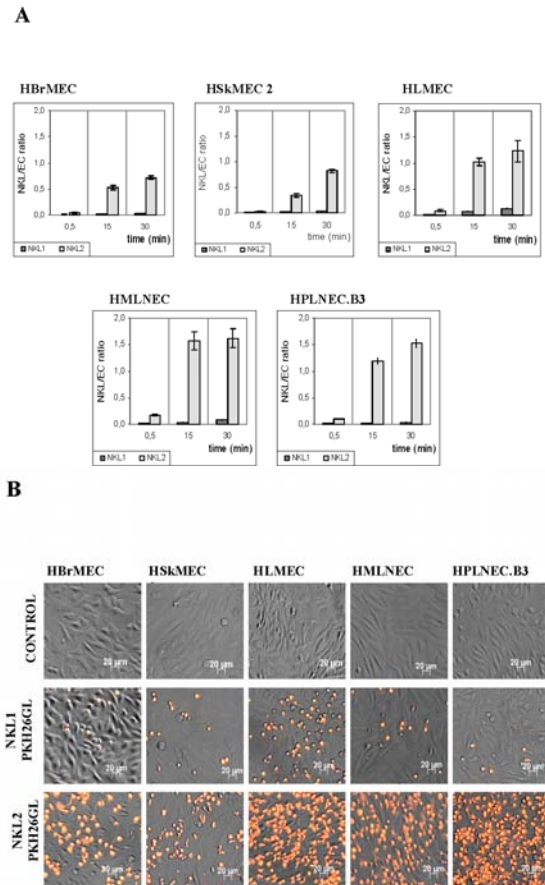


Figure 1: Selectivity and activation dependency of NKL cells adhesion to OSEC lines.

A - Adhesion of NKL cells to the endothelial cell lines as a function of time. PKH26GL labeled NKL cells either stimulated with IL-2 (NKL2) or nonstimulated (NKL1) were incubated with endothelial cells at the ratio 5:1 during indicated time. After washings with c-PBS cells were trypsin detached and analyzed on a FACS LSR and the results plotted as a number of NKL cells per one EC. Results are expressed as the means SDs from 1 representative experiment.

B - Microscopic analysis of NKL cells adhesion towards OSEC lines. PKH26GL labeled NKL cells were incubated with endothelial cells for 30 min at the ratio 5:1 in static conditions. After washing to eliminate non adherent lymphocytes, the samples were analyzed under a Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope.

enhanced dramatically NKL cell adhesion towards OSEC. As shown in this figure, in the absence of IL-2 stimulation, the adhesion of NKL remained very low over the whole incubation period (from 0.5 to 30 min) suggesting that the mutual NKL1/OSEC recognition did not trigger the adhesion molecule cascade.

This phenomenon appeared to be organo-specific since lymphoid organs derived ECs (from peripheral-

HPLNEC.B3 and mesenteric-HMLNEC lymph nodes) were more efficient NK1.1 binders (three fold) than peripheral tissue derived ECs. NK1.1 adhered very poorly but preferentially towards lung derived ECs (HLMEC). The selectivity of NK1.1 cells as compared to NK1.1 (figure 1A), demonstrates the role of IL-2 and the activation dependency of NK1.1 cells to confer them the ability to recognize and bind efficiently the endothelium. The above observations concerning the cytokine activation and organo-specificity of the NK1.1/endothelium recognitions were confirmed using fluorescence microscopy, as shown in figure 1B.

Specificity of the endothelial cell recognition by NK1.1 demonstrated in flow conditions

Figure 2, shows the NK1.1 adhesion performed under controlled flow conditions on a co-culture of two endothelial cell lines from distinct origins. In the provided instance HSkMEC-2 and HMLNEC were used and cells from one of the lines were fluorescently labelled.

As evidenced, NK1.1 were able to discriminate the mesenteric derived cells from the skin derived ones (figure 2B and 2D), confirming the static adhesion assay data. The possible influence of the fluorescent labeling on the results of the final adhesion could be excluded as shown by the complementary control experiment (figure 2C and 2D) in which the second endothelial cell type was labeled. Such conditions did not only confirm the selectivity above observed in static adhesion assays but further enlighten the discriminative character of the organo-specific endothelial cells towards circulating leukocytes.

Human IL-2-stimulated NK1.1 kill organo-specific endothelial cells

Based on the observed adhesion between NK1.1 cells and OSEC, the sensitivity of the latter to IL-2 activated NK1.1-induced cytotoxicity was examined using the standard chromium release assay. As shown in figure 3, all endothelial cells were significantly but differently killed by NK1.1 as compared to K562 control cell line. However, no direct correlation between the adhesion and the differential susceptibility to cytolytic effect of NK1.1 was observed. It should also be underlined that a similar lysis profile was obtained using IL-2 stimulated freshly isolated NK cells (data not shown).

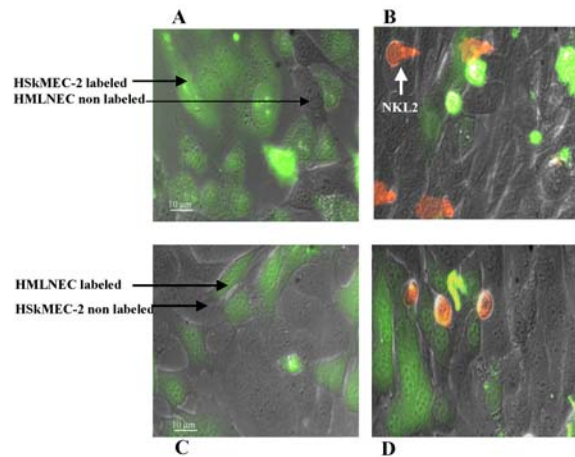


Figure 2: Specificity of the endothelial cell to NK1.1 recognition by flow adhesion experiments.

PKH26GL labeled NK1.1 cells (1×10^6 cells/ml) were pumped over the co-cultured HSkMEC and HMLNEC endothelial cells ($50 \mu\text{l}/\text{min}$ for 5 min). After the next 5 min of washing with medium to eliminate non adherent lymphocytes pictures were taken using Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope. Panels A and C : OSEC alone after flow experiment (medium). Panels B and D : endothelial cells with NK1.1 (see above conditions).

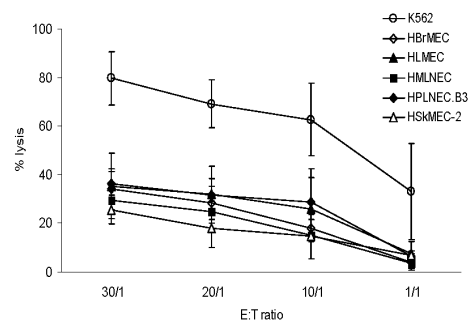


Figure 3: Killing of endothelial cell lines by NK1.1 cells.

^{51}Cr -Chromium labeled endothelial cells were incubated at 37°C with NK1.1 cells at different ratios. After 4h, the supernatants were collected and analyzed by γ -counter. The results are expressed as the means SDs from 4 independent experiments.

Susceptibility of organo-specific endothelial cells to death receptor ligands

It is clearly established that NK cells use perforin and granzyme pathway to kill their targets but also the alternate pathway involving death receptors and their ligands. Therefore, we have examined the expression of these receptors by the OSECs and the susceptibility of these cells to killing by death receptor ligands. Figure 4 illustrates the typical death observed after TNF, TRAIL and anti-Fas treatments. Using DIOC/PI staining and flow cytometry assessment, a selective susceptibility towards TNF α

cytotoxic action was detected as compared to Apo2TRAIL and anti-Fas effects. While all cells were killed following a 72 hours TNF α treatment, they were resistant to anti-Fas or TRAIL dependent apoptosis (after 24 hours and 48 hours). This result corroborates the expression of death receptors presented by OSECs. Indeed, flow cytometry analysis revealed the expression of TNFR1 by all tested lines, while Apo2TRAIL and Fas receptor were not detected.

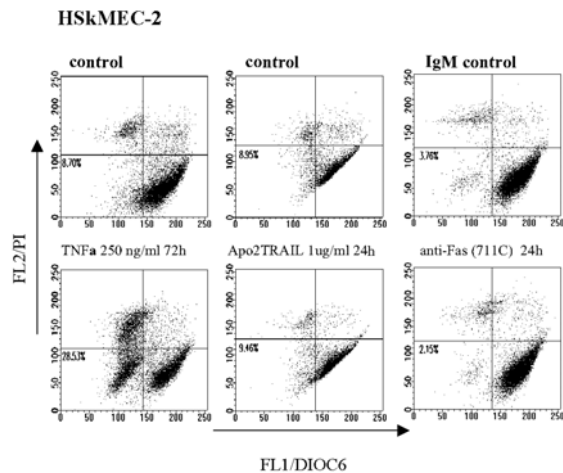


Figure 4: Effect of TNF, TRAIL and anti-Fas on endothelial cells viability.

Apoptosis was assessed using DIOC6/PI staining by flow cytometry. Endothelial cells (HSkMEC-2) were incubated with TNF α , Apo2TRAIL and anti-FAS for the indicated period of time. After 30 min incubation with DIOC₆ (50 μ M) at 37°C, the samples were washed with c-PBS. PI (1 μ g/ml) was added just before acquisition by FACS-Sort. Similar results were obtained with all tested endothelial cell lines.

Triggering of cytochrome c release in OSEC targets upon conjugation with NK2 cells

Although Granzyme B can directly activate caspases, it induces apoptosis predominantly via Bid cleavage, mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release. In addition, evidence has been provided indicating that activation of the apoptotic machinery through activation of caspase 8 and mitochondria were directly connected by truncated-Bid protein to induce the release of apoptotic factors from mitochondria. To determine the possible involvement of mitochondria in OSECs-induced NK killing, we assessed the subcellular localization of Bid and cytochrome c by confocal microscopy. For this purpose, OSECs were incubated with NK2 (4h incubation at the ratio 10 NK2:1 EC) and subjected

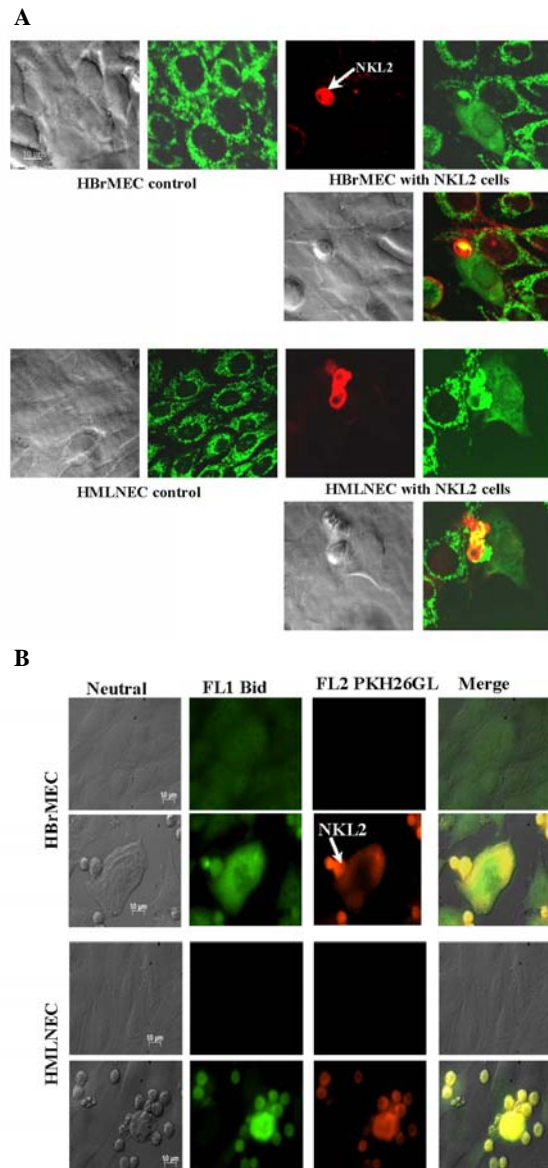


Figure 5: NK2 binding triggers mitochondrial pathway in OSEC target cell.

A - cytochrome c release by endothelial cells following interaction with NK2. The endothelial cell lines (HBrMEC, HMLNEC) were seeded onto gelatin coated glass and cultured for 72h, PKH26GL labeled NK2 (ratio 10:1) were overlaid and incubated for 4h at 37°C. After washing and fixation, cells were stained with antibody against cytochrome c and secondary FITC-conjugated antibodies. The images were collected using confocal microscope imaging system (MRC-1024; Bio-Rad). Similar results were observed with all tested endothelial cells.

B - Bid translocation in endothelial cells upon interaction with NK2. incubation conditions (see above). Staining was achieved with anti-Bid antibody and secondary FITC-conjugated antibodies. The images were collected using Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope. Similar results were observed with all tested endothelial cells.

to an immunostaining for Bid and cytochrome *c*. Since a punctuated cytoplasmic staining pattern showed mitochondrial localization of the cytochrome *c*, a diffuse staining pattern indicated the mitochondrial release of cytochrome *c*. Data depicted in figure 5A, show that cytochrome *c* was released from the mitochondria intermembrane space to the cytoplasm in endothelial cells upon coculture with NKL2 cells. Figure 5B, shows that in the two OSEC tested (HBrMEC and HMLNEC), Bid was cleaved and translocated from the cytosol to the mitochondria when those cells were incubated with NKL2. These data clearly indicate that NKL2 cells are able to activate the mitochondrial pathway to kill OSEC targets.

The killing of OSEC is predominantly mediated by granzyme B

In order to examine the mechanisms used by NKL2 to mediate their cytotoxic activity toward OSECs, blocking experiments were performed in the presence of EGTA/MgCl₂ (used to inhibit the Ca²⁺-dependent perforin/granzyme-mediated lysis). Results presented in figure 6 clearly showed that the cytotoxicity induced by NKL2 was largely inhibited after Ca²⁺ chelation indicating that these killer cells use the granule exocytosis pathway to kill OSEC targets.

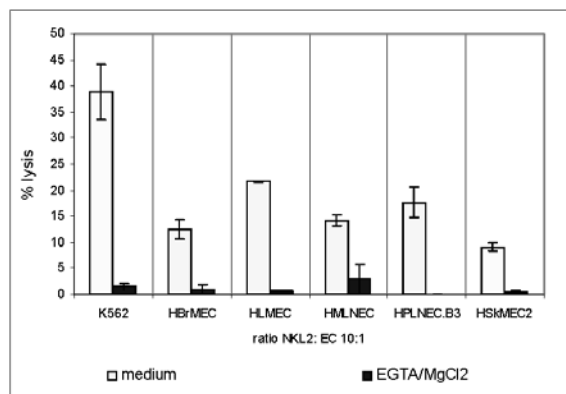


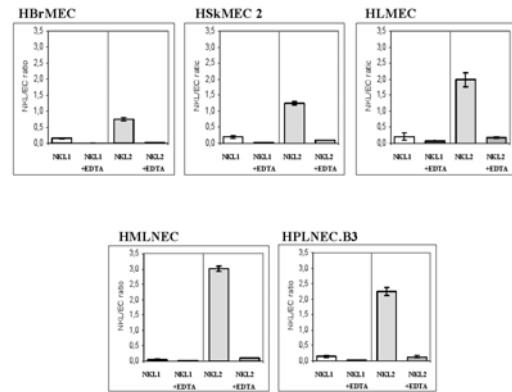
Figure 6: The NKL2- induced cytotoxicity of endothelial cells is Ca²⁺ dependent.

Cytolytic activity was assessed by ⁵¹Cr-release assay (see legend under figure 3) in the presence or absence of EGTA/MgCl₂ (4mM/2mM) at E:T ratio of 10:1. Experiments were done in triplicate.

Distinct divalent cations requirement for NKL2 adhesion and subsequent triggering of OSEC lysis

The comparative analysis of the distinct chelating effects of EDTA/EGTA, MgCl₂ on NKL2 adhesion to OSECs, was performed to approach the molecular

A



B

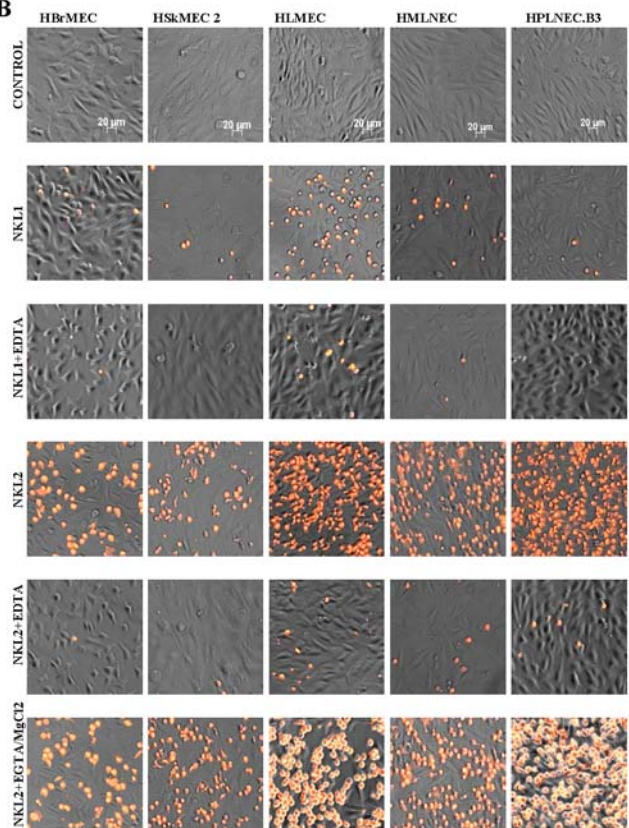


Figure 7: Divalent cations requirement for NKL adhesion.

A- Inhibition of of NKL cell adhesion towards endothelial cell lines by EDTA. PKH26GL labeled NKL cells either stimulated with IL-2 (NKL2) or non stimulated (NKL1) were incubated with endothelial cells at the ratio 5:1 for 30 min in the presence or absence of EDTA (4mM), detached and analyzed on a FACS LSR. The results are the number of NKL cells per one EC and expressed as the means SDs from 1 representative experiment.

B- Distinct effects of Ca²⁺ versus Mg²⁺ in the adhesion process.

PKH26GL labeled NKL cells were incubated with endothelial cells for 30 min at the ratio 5:1 in presence or absence of EDTA (4mM) or EGTA(4mM)/MgCl₂(2mM), data were analyzed by the Zeiss Axiovert 200 inverted fluorescence microscope.

mechanisms which control adhesion and lysis. Using EGTA/MgCl₂, we could demonstrate that the calcium dependent pathway was associated with the promotion of the lytic effect. As this cannot be achieved without the prior adhesion/recognition step, we attempted to distinguish the two steps on the basis of their divalent cations susceptibility. Adhesion tests were performed, during which the effect of EDTA (Ca²⁺ and Mg²⁺ chelating agent) as compared to EGTA/MgCl₂ (highly preferentially Ca²⁺ chelating agent) was examined. Data shown in figure 7 indicated that, EDTA strongly inhibited the NKL cell adhesion to OSECs as revealed by flow cytometry (figure 7A) and evidenced by inverted and fluorescence microscopy (figure 7B). This is true for both NKL2 efficient adhesion and low NKL1 adhesion, which were sensitive to EDTA.

EDTA is known as a chelator of different divalent cations^{16,32}, it is able to bind calcium and magnesium ions with almost the same affinity at neutral pH: log K=7.27 and log K=5.37 respectively; whereas EGTA in the presence of Mg²⁺ is suitable for evidencing calcium cations involvement (due to its higher association constant for calcium: log K=6.68, as compared to magnesium log K=1.61 at pH=7 as published by Schmid *et al.* Anal. Chem. 29:264–268, 1957).

Figure 7B, shows that, as opposed to killing, incubation with EGTA/MgCl₂ did not inhibit the adhesion. Consequently Ca²⁺ chelation did not affect the adhesion as opposed to Mg²⁺ chelation. This indicates that selectins and other (Ca²⁺ dependent lectins) were not involved in NKL2/OSEC recognition, while integrins which are the main adhesion molecules the activity of which is Mg²⁺ dependent, might participate to NKL2 adhesion to organo-selective endothelial cells.

Discussion

It is well established that endothelial cells are primary targets of immunological attack, and the study of the interactions between the endothelium and immune cells has significantly expanded during the past decade. In this regard, xenograft rejection studies showed that several human leukocyte subsets including NK, cytotoxic T lymphocytes, polymorphonuclear neutrophils participate in cellular immune response directed against vascularized pig-to-human xenografts. It was further shown that NK

cells are important mediators in the xenogenic immune responses. They were reported to adhere to xenogenic porcine endothelial cells and, evidences from *in vitro* studies as well animal models, suggest their role in the recognition and damage of porcine xenogenic tissues³³.

Most of the *in vitro* models which provided informations about NK cells and endothelial cell interactions involved HUVEC^{21,22,34} but were shown to be limited because it is now clear that the endothelium reflects the organo-specificity and depends on the microenvironmental factors³⁵⁻³⁷; The objective of this study is to elucidate the adhesive interactions that govern human NK cells and organo-specific endothelial cells and to dissect the NK-mediated killing process of endothelial cells. Initial experiments were therefore aimed at investigating the adhesion process in our experimental model.

The present studies indicate that only IL-2 activated NK were able to adhere to endothelial cells, thus IL-2 may promote NK cells towards endothelial cells adhesive capacity. This confirms the relevance of such model in which endothelium killing by NK cells is activation state dependant³⁸. This further, corroborates with previous reports demonstrating that IL-2 stimulation is necessary for proper activity of NK cells³⁹⁻⁴¹ and is confirmed in this work by the clearcut selectivity of the NKL2 recognition process using flow adhesion methods. Although, previous work reproducing the blood flow shear stresses showed that IL-12 stimulation of NK cells promotes their adhesion to endothelial P selectin⁴², Shnneider *et al.*³³ described the further role played by integrins in that dynamic process. Here we could show using a NK clone (NKL2) and, immortalised endothelial cell lines as a model for organo-specific barriers^{19,28,36,37} by stable and flow adhesion assays, that the recognition and adhesion is highly selective and correlates with the killing process. In this regard, flow conditions appeared to be more discriminative than static adhesion assay. Because the recognition was clearly independent of Ca²⁺, it did not involve selectins but the Mg²⁺ requirement clearly indicates integrins/receptors involvement.

To determine whether such interactions may result in the killing of organo-specific endothelial targets, cytotoxic assays were performed. We provide experimental data indicating that indeed human NK cells efficiently kill organo-specific endothelial cells. This killing occurs only when NK cells are stimulated

with IL-2 suggesting that adhesion and killing require NK stimulation to increase their adhesive features and their lytic potential.

Current evidence supports the idea that endothelial cells present at the vascular walls as well as specialized endothelial venules, play not only a critical role in the homing and recruitment of immune cells but also influence the outcome of the immune response. In this regard, porcine aortic endothelial cells were shown to activate human dendritic cells and subsequently transactivate naïve T cells through costimulation and cytokine generation⁴³. In addition, EC play a critical immune regulatory role in the course of antigen presentation by major histocompatibility complex class II to transmigrating T cells⁴⁴. In the same context, Waldman *et al*⁴⁵ have shown that allograft endothelium harbouring cytomegalovirus has the potential to activate host T cells resulting in cytokine production and increased allo-immunogenicity. These observations support the view that endothelial cells do not play only a role in the homing and recruitment of immune cells but can also influence the immune response through the factors they release and the physical interaction with immunocompetent cells. IL-2-stimulated NK cells have been used in immunotherapy of cancer⁴⁶. In most cases, the activation of NK resulted in the induction of vascular leak syndrome⁴⁷ VLS. The mechanism of IL-2 induced (VLS) is still poorly understood. Cells of both innate and adaptive immune systems have been implicated but no definitive conclusions have been reached concerning their respective roles. Recently, NK cells have been shown to be critical for IL-15-induced pulmonary vascular leak syndrome in murine model [Assier, 2004 #44].

We have shown in the course of these studies, that organo-specific endothelial cells were not sensitive to Fas and TRAIL pathways but exhibit a significant sensitivity to the cytotoxic action of TNF confirming the known effect of this cytokine on vascular destruction⁴⁸ and its possible antiangiogenic effect⁴⁹. Whether NK kill organo-specific endothelial cells through TNF release has to be determined. Our studies implicate however the major cytotoxic pathway involving Granzyme B as a potential component associated with the execution of the NK lytic program. This is in agreement with the report of Matter *et al* indicating that the xenogenic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent⁵⁰. It has been shown

that fractalkine plays an important role not only in the binding of NK cells to endothelial cells but also in NK cell-mediated endothelium damage²². How endothelial cells activate NK cells and, particularly, the role of chemokines in the cross-talk between NK and endothelial cells remains an issue that will be addressed in a future investigation.

Given the fact that through their interactions, endothelial cells and NK cells modulate each other through cytokine release, it is tempting to speculate that the NK/endothelial cell interaction may play a role in modulating endothelial cell function and influence the outcome of both adaptive and innate immunity as well. It should be underlined therefore that NK may have complex effects including the damage of normal vessel (leak syndrome), the damage of pathological vessels and a cytotoxic activity towards transformed cells. It is important to take these parameters into account as well as their influence on the angiogenesis process because of the influence of the latter on activated NK cells recruitment. This was shown to involve comparable adhesion processes⁵¹ as the mechanisms described in the present work which consequently, may help new cell therapy designs.

Acknowledgments: This work was supported by a European Communities Marie Curie fellowship (A.B-P was a recipient of Marie Curie fellowship 5th PCRD, contract QLGA-1999-50406), the Conseil Régional du Centre support for Polish French exchanges (CK) and grants from the Jérôme Lejeune Foundation (CK), the ARC grant 1117 (CK, DD, Jumelage ARC/CNRS/PAN), INSERM Progres 4P009F (CK), and KBN, Grants N° 0641/P2/94/07 ; 4 P05A 143 18 (DD, AK).

We thank G. Trinchieri, A. Moretta for helpful discussion, Jalil Abdel Ali, A.C. Roche and M.T. Bousser for their help in confocal microscopy analyses, Michèle Mitterrand for skilful help and technical assistance

References

1. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol.* 1997;9:24-34.
2. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187-376.

3. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:41-49.
4. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:189-220.
5. Salvucci O, Mami-Chouaib F, Moreau JL, Theze J, Chehimi J, Chouaib S. Differential regulation of interleukin-12- and interleukin-15-induced natural killer cell activation by interleukin-4. *Eur J Immunol.* 1996;26:2736-2741.
6. Salvucci O, Kolb JP, Dugas B, Dugas N, Chouaib S. The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity. *Blood.* 1998;92:2093-2102.
7. Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta A. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol Immunol.* 2004;41:569-575.
8. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC. Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;263:7-27.
9. Biassoni R, Cantoni C, Marras D, et al. Human natural killer cell receptors: insights into their molecular function and structure. *J Cell Mol Med.* 2003;7:376-387.
10. Westgaard IH, Dissen E, Torgersen KM, et al. The lectin-like receptor KLRE1 inhibits natural killer cell cytotoxicity. *J Exp Med.* 2003;197:1551-1561.
11. Hayakawa Y, Kelly JM, Westwood JA, et al. Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J Immunol.* 2002;169:5377-5381.
12. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett.* 2004;92:11-13.
13. Young JD, Hengartner H, Podack ER, Cohn ZA. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. *Cell.* 1986;44:849-859.
14. Kagi D, Ledermann B, Burki K, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature.* 1994;369:31-37.
15. Wallin RP, Screpanti V, Michaelsson J, Grandien A, Ljunggren HG. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 2003;33:2727-2735.
16. Kwiatkowski B, Artrip JH, Michler RE, Itescu S. Human NK cells demonstrate increased adherence and lysis of porcine endothelium following activation with IL-2. *Ann Transplant.* 1997;2:21-25.
17. Kirk AD, Heinle JS, Mault JR, Sanfilippo F. Ex vivo characterization of human anti-porcine hyperacute cardiac rejection. *Transplantation.* 1993;56:785-793.
18. Horvath-Arcidiacono JA, Tsuyuki S, Mostowski H, Bloom ET. Human natural killer cell activity against porcine targets: modulation by control of the oxidation-reduction environment and role of adhesion molecule interactions. *Cell Immunol.* 2003;222:35-44.
19. Kieda C. How endothelial cell organo-specificity mediates circulating cell homing. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51:81-89.
20. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188:1413-1419.
21. Kitayama J, Tsuno N, Yasuhara H, et al. Lysis of endothelial cells by autologous lymphokine-activated killer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1994;38:317-322.
22. Yoneda O, Imai T, Goda S, et al. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol.* 2000;164:4055-4062.
23. Damle NK, Doyle LV, Bender JR, Bradley EC. Interleukin 2-activated human lymphocytes exhibit enhanced adhesion to normal vascular endothelial cells and cause their lysis. *J Immunol.* 1987;138:1779-1785.
24. Giron-Michel J, Fogli M, Gaggero A, et al. Detection of a functional hybrid receptor gamma/c/GM-CSFRbeta in human hematopoietic CD34+ cells. *J Exp Med.* 2003;197:763-775.
25. Strasly M, Cavallo F, Geuna M, et al. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol.* 2001;166:3890-3899.
26. Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH. Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo.* 2002;16:439-445.

27. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol.* 1996;24:406-415.
28. Kieda C, Paprocka M, Krawczenko A, et al. New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium.* 2002;9:247-261.
29. Jahroudi N, Greenberger JS. The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis. *J Neurooncol.* 1995;23:99-108.
30. Ozgen U, Savasan S, Buck S, Ravindranath Y. Comparison of DiOC(6)(3) uptake and annexin V labeling for quantification of apoptosis in leukemia cells and non-malignant T lymphocytes from children. *Cytometry.* 2000;42:74-78.
31. Horan PK, Slezak SE. Stable cell membrane labelling. *Nature.* 1989;340:167-168.
32. Brockdorff J, Kanner SB, Nielsen M, et al. Interleukin-2 induces beta2-integrin-dependent signal transduction involving the focal adhesion kinase-related protein B (fakB). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6959-6964.
33. Schneider MK, Forte P, Seebach JD. Adhesive interactions between human NK cells and porcine endothelial cells. *Scand J Immunol.* 2001;54:70-75.
34. Pfau S, Leitenberg D, Rinder H, Smith BR, Pardi R, Bender JR. Lymphocyte adhesion-dependent calcium signaling in human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1995;128:969-978.
35. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol.* 1998;161:400-408.
36. Bizouarne N, Denis V, Legrand A, Monsigny M, Kieda C. A SV-40 immortalized murine endothelial cell line from peripheral lymph node high endothelium expresses a new alpha-L-fucose binding protein. *Biol Cell.* 1993;79:209-218.
37. Bizouarne N, Mitterrand M, Monsigny M, Kieda C. Characterization of membrane sugar-specific receptors in cultured high endothelial cells from mouse peripheral lymph nodes. *Biol Cell.* 1993;79:27-35.
38. Aronson FR, Libby P, Brandon EP, Janicka MW, Mier JW. IL-2 rapidly induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J Immunol.* 1988;141:158-163.
39. Timonen T, Jaaskelainen J, Maenpaa A, Helander T, Malygin A, Kovanen P. Growth requirements, binding and migration of human natural killer cells. *Immunol Ser.* 1994;61:63-73.
40. Maenpaa A, Jaaskelainen J, Carpen O, Patarroyo M, Timonen T. Expression of integrins and other adhesion molecules on NK cells; impact of IL-2 on short- and long-term cultures. *Int J Cancer.* 1993;53:850-855.
41. Jaaskelainen J, Maenpaa A, Patarroyo M, et al. Migration of recombinant IL-2-activated T and natural killer cells in the intercellular space of human H-2 glioma spheroids in vitro. A study on adhesion molecules involved. *J Immunol.* 1992;149:260-268.
42. Yago T, Tsukuda M, Fukushima H, et al. IL-12 promotes the adhesion of NK cells to endothelial selectins under flow conditions. *J Immunol.* 1998;161:1140-1145.
43. Manna PP, Duffy B, Olack B, Lowell J, Mohanakumar T. Activation of human dendritic cells by porcine aortic endothelial cells: transactivation of naive T cells through costimulation and cytokine generation. *Transplantation.* 2001;72:1563-1571.
44. Kawai T, Seki M, Watanabe H, Eastcott JW, Smith DJ, Taubman MA. T(h)1 transmigratory anergy: a new concept of endothelial cell-T cell regulatory interaction. *Int Immunol.* 2000;12:937-948.
45. Waldman WJ, Knight DA. Cytokine-mediated induction of endothelial adhesion molecule and histocompatibility leukocyte antigen expression by cytomegalovirus-activated T cells. *Am J Pathol.* 1996;148:105-119.
46. Stein RC, Malkovska V, Morgan S, et al. The clinical effects of prolonged treatment of patients with advanced cancer with low-dose subcutaneous interleukin-2 [corrected]. *Br J Cancer.* 1991;63:275-278.
47. Vial T, Descotes J. Clinical toxicity of cytokines used as haemopoietic growth factors. *Drug Saf.* 1995;13:371-406.
48. Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:573-580.
49. Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1996;98:490-496.

50. Matter-Reissmann UB, Forte P, Schneider MK, Filgueira L, Groscurth P, Seebach JD. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression. *Xenotransplantation*. 2002;9:325-337.
51. Assier E, Jullien V, Lefort J, et al. NK cells and polymorphonuclear neutrophils are both critical for IL-2-induced pulmonary vascular leak syndrome. *J Immunol*. 2004;172:7661-7668.

ANNEXE 3

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES DES LIGNEE DE CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES

Milieu OptiMEM base (Invitrogen, 51985-026) complété par :

- 2% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) décomplémenté (Invitrogen, 16000-03)
- 1% d'une solution de Pénicilline-Streptomycine à 4mg/mL (Invitrogen, 15140-122)
- 0,2 % de Fungizone à 250µg/mL (Invitrogen, 15290-026)

COMPOSITION DU TAMPON PHOSPHATE SALIN (PBS : PHOSPHATE BUFFER SALINE SOLUTION)

Pour 1 litre de solution mère concentrée 10 fois :

♦ Chlorure de sodium (NaCl)	80 g
♦ Chlorure de potassium (KCl)	2 g
♦ Phosphate de sodium ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$)	28,9 g
♦ Phosphate de potassium (KH_2PO_4)	2 g
♦ Eau distillée qsp	1 L

Conserver la solution à température ambiante.

Pour 1 litre de PBS complet :

♦ Eau distillée	898 mL
♦ Chlorure de magnésium (MgCl_2) à 0,5M	1 mL
♦ Chlorure de calcium (CaCl_2) à 1M	1 mL
♦ Solution mère concentrée 10 fois	100 ml

Conserver cette solution à 4°C.

ANNEXE 4

MARQUAGE MEMBRANAIRE DES CELLULES AU PKH26-GL

Kit utilisé : PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma, PKH26-GL)

Protocole :

1. Trypsiner, compter et pipeter la quantité de cellules à marquer.
2. Effectuer deux lavages avec une solution de PBS complet (Annexe 1) en centrifugeant les cellules pendant 5 minutes à 25 °C (400g).
3. Préparer une solution de PKH diluée au 1/250 (4 µL de PKH / mL de diluant / 2 X 10⁷ cellules).
5. Vider le surnageant et resuspendre délicatement le culot cellulaire dans le diluant (1 mL pour 2 X 10⁷ cellules).
6. Ajouter rapidement la suspension cellulaire dans la solution de colorant et homogénéiser. Incuber le tout au bain-marie à 37°C pendant 3 minutes sous agitation douce.
7. Stopper la réaction en ajoutant 10 mL d'une solution de PBS-SAB 0,5%. Centrifuger pendant 5 minutes à 25 °C (400 g).
8. Effectuer trois lavages en centrifugeant les cellules pendant 5 minutes à 25°C (400g) avec une solution de PBS complet.
9. Resuspendre le culot cellulaire à la concentration souhaitée dans du PBS complet pour la suspension cellulaire préparée pour l'adhésion en condition de flux ou dans du PBS-SAB 0,1% pour l'adhésion en conditions statiques.

ANNEXE 5

Western blot : Mise en évidence d'une protéine d'intérêt

Lyse cellulaire : à partir d'une boîte de 10 cm de diamètre à semi confluence:

Après avoir éliminé le milieu de culture et lavé les cellules avec du PBS_c, la lyse s'effectue avec un tampon Tris/HCl 10mM PH 7.5, SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) 1% à 95°C pendant 10 minutes. Les lysats sont récupérés avec une spatule en caoutchouc et transvaser dans un tube Eppendorf. Ils sont congelés une première fois puis décongelés et passés aux ultrasons pendant 10 minutes pour une meilleure homogénéisation. Les échantillons répartis en aliquotes sont conservés à -20°C.

Dosage des protéines à l'acide bicinchoninique : réaction colorimétrique

Il est important de ramener les échantillons à la même concentration pour déposer la même quantité de protéines dans chaque puits d'électrophorèse.

Cette méthode est basée sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin et la capacité de l'acide bicinchoninique à former des complexes coloré avec les ions cuivreux ainsi réduits.

Réactifs :

- BCA-A : BCA-Na ₂	1%	
2CO ₃ .H ₂ O	2%	
Tartrate de Na ₂	0.16%	
NaOH	0.4%	
NaHCO ₃	0.95%	qsp 1L eau bidistillée
Ajuster à pH 11.25 avec NaOH		
- BCA-B : CuSO ₄ .5H ₂ O	4%	qsp 1L eau bidistillée

BCA-R : 100 vol BCA-A + 2 vol BCA-B, stable une semaine.

Gamme étalon : SAB de 10µg/ml à 1000µg/ml dans du tampon de lyse

Protocole du dosage des protéines

Dans une plaque 96 puits, mettre 10 µl de lysat cellulaire par puits ou 10µl final pour la gamme étalon. Rajouter 250µl de BCA-R par puits et incuber 30 minutes à 37°C.

Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 562nm

Préparation du gel d'acrylamide à 10%

Resolving gel : pour 15ml (deux gels)

-H2O	5.9 ml
-acrylamide 30%	5 ml
-1.5M Tris (pH 8.8)	3.8 ml
-10% SDS	0.15 ml
-10% persulfate d'ammonium	0.15 ml
- TEMED	0.006 ml

Stacking gel : pour 6 ml (deux gels)

-H2O	4.1ml
-acrylamide 30%	1 ml
-1M Tris (pH 6.8)	0.75 ml
-10% SDS	0.06 ml
-10% persulfate d'ammonium	0.06 ml
-TEMED	0.006 ml

Tampons de migration et transfert

TBS (Tris Buffered Salin) 1X

- Tris-HCl pH 8 10mM
- NaCl 150mM

Tris-Glycine-SDS 1X

- Tris HCl pH 8 25mM
- glycine 192mM
- SDS 0.1% (w/v)

Étapes de migration et transfert

Les échantillons sont déposés à raison de 30 µl par puits (25µl de lysat équivalent à 15µg de protéines + 5µl de bleu de charge). La migration dure 2 heures à 100V dans du tampon Tris-glycine-SDS 1X.

Le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose pendant 1 heure à 80mA dans du tampon Tris-glycine-SDS 1X. La membrane est ensuite lavée avec une solution de TBS-tween 0.5% avant d'être incubée avec l'anticorps primaire.

ANNEXE 6

MARQUAGE DES CELLULES ENDOTHELIALES PAR LE CFDA,SE (MOLECULAR PROBES)

Les cellules endothéliales sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA puis lavées avec une solution de PBSc. Une solution de CFDA,SE est préparée à 5 μ M dans 1ml de PBSc. Après centrifugation, le culot cellulaire est repris dans la solution de CFDA, SE préalablement préparée. Les cellules sont incubées 10 minutes à 37°C à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution de PBSc-SAB 0.5%. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec de l'OptiMEM puis sontensemencées à raison de 2 X 10⁴ / cm² (mono-culture) ou 1 X 10⁴ / cm² (co-culture) dans de l'OptiMEM.

FIXATION DE CHIMIOKINES SUR DES BILLES DE LATEX (FLUOROSPHERES LATEX MICROSPHERES 2 μ m, MOLECULAR PROBES)

Préparation de 50 μ l de billes au final (20 μ l de billes-chimiokines, 20 μ l de billes-témoins dénaturées, 10 μ l pour réaliser un test permettant de vérifier la fixation de la chimiokine sur la bille par un anticorps)

1. Préparer une solution de tampon MES (2 N-Morpholino ethanesulfonic acid) 50mM, pH 6
2. Mélanger 10 μ l de billes + 10 μ l de la solution de fractalkine ou CTACK (25 μ g/ml) + 30 μ l de tampon MES ([chimiokine] finale : 5 μ g/ml)
3. Incuber à température ambiante (TA) pendant 15 minutes
4. Ajouter 4 μ l d'une solution d'EDAC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide) à 100ng/ml préparée extemporanément. Vortexer et soniquer 5 minutes.
5. Incuber minimum 2heures à TA
6. Ajouter 5.4 μ l de glycine 1M (100mM final) et incuber 30 minutes à TA.
7. Centrifuger pendant 15 minutes à 6000rpm à 4°C.

8. Laver deux fois au PBSc
9. Conserver la préparation à 4°C dans 50µl de PBS-azide (1g/l)

Les billes sont diluées au 1/250 dans du PBSc lors des expériences en conditions de flux

Note : Des billes des billes dénaturées à 60°C pendant 15 minutes serviront de billes-témoins. La fixation de la chimiokine est contrôlée par marquage des billes avec un anticorps anti-chimiokine révélé par un anticorps secondaire couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine : FITC. Le contrôle se fait sous microscope.