



Rôle des chimiokines dans la mobilisation monocytaire au cours de l'athérosclérose

Lucie Poupel

► To cite this version:

Lucie Poupel. Rôle des chimiokines dans la mobilisation monocytaire au cours de l'athérosclérose. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T032 . tel-01089535

HAL Id: tel-01089535

<https://theses.hal.science/tel-01089535>

Submitted on 2 Dec 2014

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 DE DOCTORAT

UNIVERSITE PARIS XI - FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

ECOLE DOCTORALE BIOSIGNE – Signalisations et réseaux intégratifs en biologie

Présentée par **Lucie Poupel**

Le 18 Juin 2013

Sujet :

Rôle des chimiokines dans la mobilisation monocyttaire au cours de l'athérosclérose.

JURY

Dr Stéphane Mélik Parsadaniantz

Rapporteur

Dr Annie Schmid-Alliana

Rapporteur

Dr Jean Sébastien Silvestre

Examineur

Dr Philippe Lesnik

Examineur

Dr Anne-Marie Cassard-Doulcier

Examineur

Dr Christophe Combadière

Directeur de thèse

Sommaire

I CHIMIOKINES ET RECEPTEURS : PRINCIPAUX ACTEURS DU TRAFIC MONOCYTAIRE.....	10
1 LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS.....	10
1.1 <i>Classification et nomenclature</i>	11
1.2 <i>Structure protéique</i>	15
1.3 <i>Reconnaissance ligand-récepteur et transduction du signal</i>	17
1.4 <i>Rôles physiologiques du réseau chimiokinique</i>	19
1.5 <i>Antagonistes</i>	26
2 LA LIGNEE MONOCYTAIRE.....	30
2.1 <i>Définition des sous-populations monocytaires</i>	30
2.2 <i>Origine des MO</i>	35
2.3 <i>Le devenir des monocytes : Les macrophages</i>	37
2.3 <i>Rôle des monocytes</i>	41
II ATHEROSCLEROSE.....	43
1. GENERALITES.....	43
1.1 <i>Définition et épidémiologie</i>	43
1.2 <i>Facteurs de risques et prédisposition</i>	44
2. PATHOGENESE.....	46
2.1 <i>Complications de l'athérosclérose</i>	48
2.2 <i>Modèles murins</i>	49
3 MONOCYTES ET ATHEROSCLEROSE.....	51
4 ATHEROCLEROSE : INFLAMMATION ET CHIMIOKINES.....	53
III OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE.....	60
IV ARTICLE.....	63
V RESUME DES RESULTATS OBTENUS.....	87
VI DISCUSSION.....	88
VII CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	95

Remerciements

Tout le monde dit que la chose la plus lue dans une thèse est la partie des remerciements. Donc pour toi, qui ne lira que cette partie de ce manuscrit de thèse, sache qu'elle parle d'une molécule antagoniste d'un récepteur aux chimiokines. Développée par Karim, alias le super ingénieur de recherche de la mort qui tue tout, en collaboration avec PhD le penseur aux bons conseils.

Mon directeur de thèse, avisé et téméraire, eut l'idée de me proposer comme projet de thèse d'utiliser cet antagoniste comme outil thérapeutique contre l'athérosclérose.

Décision précise, il ne me restait plus qu'à...

Je tiens naturellement à remercier tous les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de juger et d'examiner mon travail.

Soutenue par une formidable équipe, la CHIPI team, ce projet se révéla être un succès soumis, comme pour chaque thèse, à de rudes épreuves. Merci à vous tous.

Une immense merci à toi Christophe pour m'avoir poussé à faire cette thèse et m'avoir permis de m'épanouir dans mon métier d'ingénieur d'étude. Merci pour ton humanité et ta confiance.

Constance et Mat, la old generation. On était 3 et maintenant nous sommes 10 sans compter le rassemblement de la PhD team.

Mat tu m'as tout appris quand je suis arrivée, je te dois beaucoup et plus encore... Grâce à toi, Léa et Babychou sont entrés dans ma vie.

Constance, tu as un don pour communiquer et partager, tu m'as apporté beaucoup de ton expérience.

Patricia la rigoureuse, ta droiture et tes principes permettent d'avancer plus droit, plus vite et sans tortiller.

Virginie la pile, ton énergie et tes bizarreries font de toi une thésarde extraordinaire qui vaut le détour. Merci pour ta gentillesse.

Ludo le « lourdo », ta maniaquerie et ta gentillesse font que tu n'es pas si fermé comme mec!

Choust le magnifique, tu es un moteur dans le perfectionnement et l'ambition. Ne nous abandonne pas trop vite.

La bébé 2photon team à base de bigou, de bigoudi et de sony ! Merci Fabrice pour ta bonne humeur et le soutien que tu as pu m'apporter lors de moments difficiles.

Alex mon double, je serais incapable de trouver les mots justes pour exprimer ma reconnaissance pour ta patience et ton attention dans ma vie professionnelle et privée. Ton regard avisé est une véritable mine d'or pour moi.

Merci à la BC team toujours prête à échanger des rires, des idées et bien sur quelques anticorps.

Merci à la Appay team pour votre dévouement à la cytométrie, votre disponibilité et vos conseils.

Sans oublier la sympathique Arnaud Moris team!

Parce qu'ils ont tous compté à un moment merci à tous les électrons libres qui sont passés dans le labo. Je pense particulièrement à Laurent, Emmeline, Mariano, Julie, Elodie, chacha. Sans oublier Betty et Flora qui m'ont beaucoup appris sur l'athérosclérose. La Sennlaub team et particulièrement William, parce que finalement c'est un peu grâce à toi tout ça.

Sans oublier les petites nouvelles, Audrey, Amélie et Camille.

Un énorme merci à Pascale et Marie-Ange, nos gestionnaires en or. Vous abattez une somme de travail incroyable et grâce à vous tout est plus facile.

Pour tous vos conseils scientifiques et pour la vraie bonne humeur que vous créez au quotidien. Je réalise chaque jour la chance que j'ai d'avoir travaillé dans un domaine qui me passionne avec des personnes passionnées et passionnantes.

Enfin, je souhaiterais remercier mes amis pour votre présence et votre soutien indéfectibles. Elizabeth, Simon, Laura, Lea, vous êtes ma lumière.

Papa, maman, Claire, PB et Antoine. Sans vous, je ne suis rien. Cette thèse, c'est la nôtre.

Thèse: Check.

Abréviations

ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
Apo	apolipoprotéine
CD	cellule dendritique
CK	chimiokine
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CRP	protéine C réactive
CSH	cellule souche hématopoïétique
DAG	diacylglycérol
DRY	aspartate-arginine-tyrosine
ELR	glutamine-leucine-arginine
GAG	glycosaminoglycane
GFP	green fluorescent protein
HDL	high density lipoprotein
ICAM	inter-cellular adhesion molecule
IFN	interféron
IL	interleukine
IP3	inositol triphosphate
JAK/STAT	Janus Kinase/signal transducers and activators of transcription
KO	Knock-out

LDL	low density lipoproteins
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	lipopolysaccharide
MAP kinase	mitogen-activated protein kinase
MO	monocyte
MP	macrophage
OMS	organisation mondiale de la santé
ORO	oil red O
PiP2	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PLC	phospholipase C
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTX	pertussis toxin
RCK	récepteur de chimiokines
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4	very late antigen-4
VLDL	very low density lipoprotein

Résumé

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des grosses artères à localisation intimale. Elle est probablement la résultante d'une réaction inflammatoire mal contrôlée ayant pour but initial d'éliminer l'accumulation anormale de lipides au niveau de l'intima. Cette élimination est exercée par les monocytes/macrophages, dont l'infiltration et l'accumulation au niveau des lésions sont une étape cruciale de l'inflammation chronique locale provoquant en particulier la production de cytokines.

Les mécanismes moléculaires responsables de cette accumulation monocyttaire impliquent notamment les chimiokines et leurs récepteurs, acteurs clés de la mobilisation des leucocytes. Les souris génétiquement invalidées pour certaines chimiokines comme CCL2 et CX3CL1 ou pour leurs récepteurs respectifs sont partiellement protégées de l'athérosclérose. Par ailleurs, chez l'homme, des variations génétiques de CX3CR1 sont associées à une réduction du risque d'accidents cardiovasculaires. L'ensemble de ces résultats indiquent un rôle clé des chimiokines inflammatoires dans l'athérogenèse.

L'objectif de cette thèse était de tester l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs de chimiokines comme outils thérapeutiques contre l'athérosclérose. Dans ce but, notre laboratoire a développé une molécule aux propriétés antagonistes du récepteur CX3CR1, marqueur utilisé pour la caractérisation phénotypique des monocytes.

Nos travaux sur deux modèles murins d'athérosclérose mettent en évidence que le blocage de CX3CR1 par notre antagoniste réduit la taille des plaques d'athérosclérose formées sans modifier leur composition cellulaire ni le taux de cholestérol plasmatique circulant. Cette diminution est corrélée à une diminution du nombre d'une sous-population monocyttaire circulante spécifique, ainsi qu'à une diminution de leurs propriétés d'adhérence et de survie. D'un point de vue curatif, l'antagoniste de CX3CR1 est capable de limiter la progression des plaques d'athérosclérose sans la prévenir totalement.

L'utilisation d'un outil ciblant spécifiquement le récepteur CX3CR1 nous a permis d'une part de mieux comprendre le rôle de ce dernier dans les processus de monocytose et d'athérogenèse et d'autre part d'évaluer la faisabilité d'approches thérapeutiques visant à limiter le nombre de monocytes infiltrant les lésions d'athérosclérose. Les perspectives de ces travaux consistent d'une part à approfondir encore le rôle de CX3CR1 dans la mobilisation monocyttaire, notamment au niveau de la moelle osseuse, et d'autre à utiliser l'antagoniste testé en association avec d'autres drogues ciblant les récepteurs de chimiokines impliqués dans l'athérogenèse, tels que CCR2 et CCR5.

Abstract

Atherosclerosis account for nearly 30% of death in industrialized countries. It is a chronic inflammatory disease of the large arteries intima. It has been suggested that it is the result of an uncontrolled inflammatory reaction secondary to an abnormal accumulation of lipids in the intima. The lipid clearance is performed by monocytes / macrophages, Their infiltration and accumulation in atherosclerotic lesions is a critical step of a local chronic inflammation associated with an increased production of cytokines.

The molecular mechanisms of the generation of atherosclerotic lesions involve monocytes, chemokines and their receptors which are key players controlling leukocytes mobilization. Mice genetically invalidated for chemokines such as CCL2 and/or CX3CL1 or their respective receptors are partially protected from atherosclerosis. Furthermore, in humans, genetic polymorphisms of CX3CR1 are associated with a reduced risk of cardiovascular events. Taken together, these results highlight a key role for inflammatory chemokines in atherogenesis.

The aim of this thesis was to investigate whether inhibitors of chemokine receptors could play a role as therapeutic tools against atherosclerosis. To this end, our laboratory had developed an antagonist of CX3CR1, a crucial phenotypic and functional marker of monocytes.

Our work, on two murine models of atherosclerosis, demonstrates that blocking CX3CR1 by our antagonist reduces the size of atherosclerotic lesions. This decrease is correlated with a lower number of circulating inflammatory monocytes, as well as a decrease in their adhesion and survival properties. Therefore, CX3CR1 antagonist could be able to limit the progression of atherosclerotic plaques.

Targeting CX3CR1 allowed us to understand the role of this receptor in the pathophysiology of atherogenesis by its effects on circulating inflammatory monocytes and to evaluate the feasibility of the use of this antagonist as a therapeutic tool to reduce atherosclerotic lesions. Perspectives of this work are firstly to deepen the role of CX3CR1 in monocyte mobilization, especially from the bone marrow, and secondly to test this antagonist in combination with others drugs targeting chemokine receptors involved in atherogenesis, such as CCR2 and CCR5 in order to better control the evolution of atherosclerotic lesions.

Préambule

Il était une fois des cellules spécialisées du système immunitaire appelées leucocytes. Leur mobilisation stratégique au niveau des sites d'inflammation ou d'infection est l'étape décisive dans la mise en place de la réponse immunitaire. Tapiés au plus profond des limbes moléculaires, les chimiokines et leurs récepteurs sont connus pour être les plus importants régulateurs de la migration leucocytaire mais ils possèdent également de nombreuses autres fonctions (surveillance immunitaire, angiogenèse, prolifération). De part leurs multiples fonctionnalités, ces molécules sont impliquées dans de nombreuses batailles contre de multiples envahisseurs (virus, bactéries, parasites...). Notamment, le couple unique et légendaire CX3CR1-CX3CL1, est impliqué dans l'athérosclérose, le développement tumoral, le sepsis et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Jouant selon le cas le rôle de justicier ou de brigand, ses motivations profondes restent à déterminer. Les chimiokines et leurs récepteurs se présentent naturellement comme des cibles thérapeutiques pour lutter contre les multiples pathologies qui menacent l'humanité et l'univers en particulier.

Notre histoire commence le jour où un antagoniste de CX3CR1 a été mis au point dans notre laboratoire, le chevalier F1 était né. Le projet consistait à utiliser cette arme dans un modèle murin d'athérosclérose, pathologie dont la progression est liée à la mobilisation leucocytaire. La quête ainsi perçue se résume à tenter de libérer la princesse monocyte prisonnière, malgré elle, de la méchante plaque d'athérome. C'est ainsi que ma thèse vit le jour. Son but ultime : envoyer le chevalier F1 sauver la princesse monocyte de son destin pro-athérogène et de sa métamorphose en macrophage spumeux afin de détruire l'infâme plaque d'athérome.

Avant toute chose, il est d'usage de présenter les principaux protagonistes. Après un premier point généraliste et descriptif sur les chimiokines, leurs récepteurs et leurs rôles physiopathologiques, je décrirai la complexité et le rôle des monocytes ainsi que leurs devenir. Je présenterai ensuite des généralités sur la pathologie de l'athérosclérose et les liens connus entre elle et les acteurs susmentionnés.

Enfin arriveront l'intrigue principale de ce combat, les objectifs, les moyens mis en œuvre et les résultats sous forme d'article. S'ensuivra une discussion sur l'ensemble de cette étude jusqu'à arriver à sa conclusion et ses perspectives. Afin que meurt la bête !

Introduction

I Chimioamines et Récepteurs : principaux acteurs du trafic monocyttaire

1 Les chimioamines et leurs récepteurs.

La réponse immunitaire implique la migration et le recrutement approprié de cellules de l'immunité innée et adaptative au niveau du tissu affecté afin qu'elles y effectuent leurs fonctions de défense de l'organisme. Le mécanisme consensuel propose que les cellules s'orientent et se déplacent en réponse à des gradients moléculaires de protéines chimioattractantes et par une expression différentielle de molécules d'adhérence, vers un site donné. Ce phénomène appelé chimiotactisme est très largement caractérisé *in vitro* mais sa relevance *in vivo* est nettement moins évidente. Outre ce rôle dans la défense de l'organisme, la migration cellulaire est un phénomène essentiel à l'homéostasie du système immunitaire et d'une façon plus générale au développement tissulaire ainsi qu'à l'organogenèse (Raman et al., 2011; Schall and Proudfoot, 2011).

De nombreuses molécules gouvernent le chimiotactisme des cellules eucaryotes. Chez les mammifères, les signaux extracellulaires principalement impliqués dans la migration des leucocytes sont les cytokines. Ce sont des protéines de petite taille spécialisées dans la communication cellulaire. Certaines sont destinées à promouvoir la migration cellulaire et sont regroupées dans la famille des cytokines chimioattractantes ou chimioamines (CK).

Les CK se distinguent des autres cytokines par leur taille, leur structure, leur composition, la nature de leurs récepteurs et par leurs fonctions. Depuis leur clonage dans les années 1980-1990, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence leur rôle dans l'orchestration des mouvements cellulaires, l'activité des leucocytes, le maintien et le contrôle de l'intégrité du soi et également au cours de la réponse immunitaire dans la reconnaissance du non-soi (Charo and Ransohoff, 2006; Richmond, 2011). Cependant, leur activité ne se limite pas à ces domaines puisqu'on leur attribue aussi d'autres rôles notamment dans l'angiogenèse (Heidemann et al., 2003), et dans l'apoptose des cellules immunitaires (Landsman et al., 2009).

1.1 Classification et nomenclature

Les CK sont donc de petites molécules polypeptidiques de 70 à 130 AA soit de 8 à 14 kDa. Elles exercent leurs actions en se fixant sur un récepteur membranaire (RCK). On compte chez l'homme plus de 50 chimiokines différentes (Zlotnik and Yoshie, 2012).

Les chimiokines :

Le nom des CK n'était initialement soumis à aucune nomenclature ce qui a eu pour conséquence la description d'une même molécule sous différents noms. Par exemple une même molécule pouvait être nommée RANTES, D17C136E, SCYA5, SISd, TCP228 et est à présent référencée sous le nom unique CCL5.

En 2000, il a été décidé d'établir une nomenclature des membres de la famille des CK basée sur la présence et l'espacement des deux premiers résidus cystéines conservées en position N-terminale, (Zlotnik and Yoshie, 2000). Quatre sous-familles ont été ainsi proposées (**figure 1**) :

- La sous-famille des CC CK pour lesquelles les deux cystéines sont adjacentes, composée de 28 membres.
- La sous-famille des CXC CK pour lesquelles les deux cystéines sont séparées par un acide aminé, composée de 17 membres.
- La sous-famille des C CK ne présente qu'une seule cystéine en N-Terminale. Cette sous-famille ne compte que deux membres : XCL1 (lymphotactine alpha) et XCL2 (lymphotactine beta).
- La sous-famille CX3C CK : pour laquelle les deux cystéines en N-terminale, sont séparées par 3 acides aminés. Il n'existe actuellement qu'un seul membre dans cette sous-famille : la fractalkine ou CX3CL1.

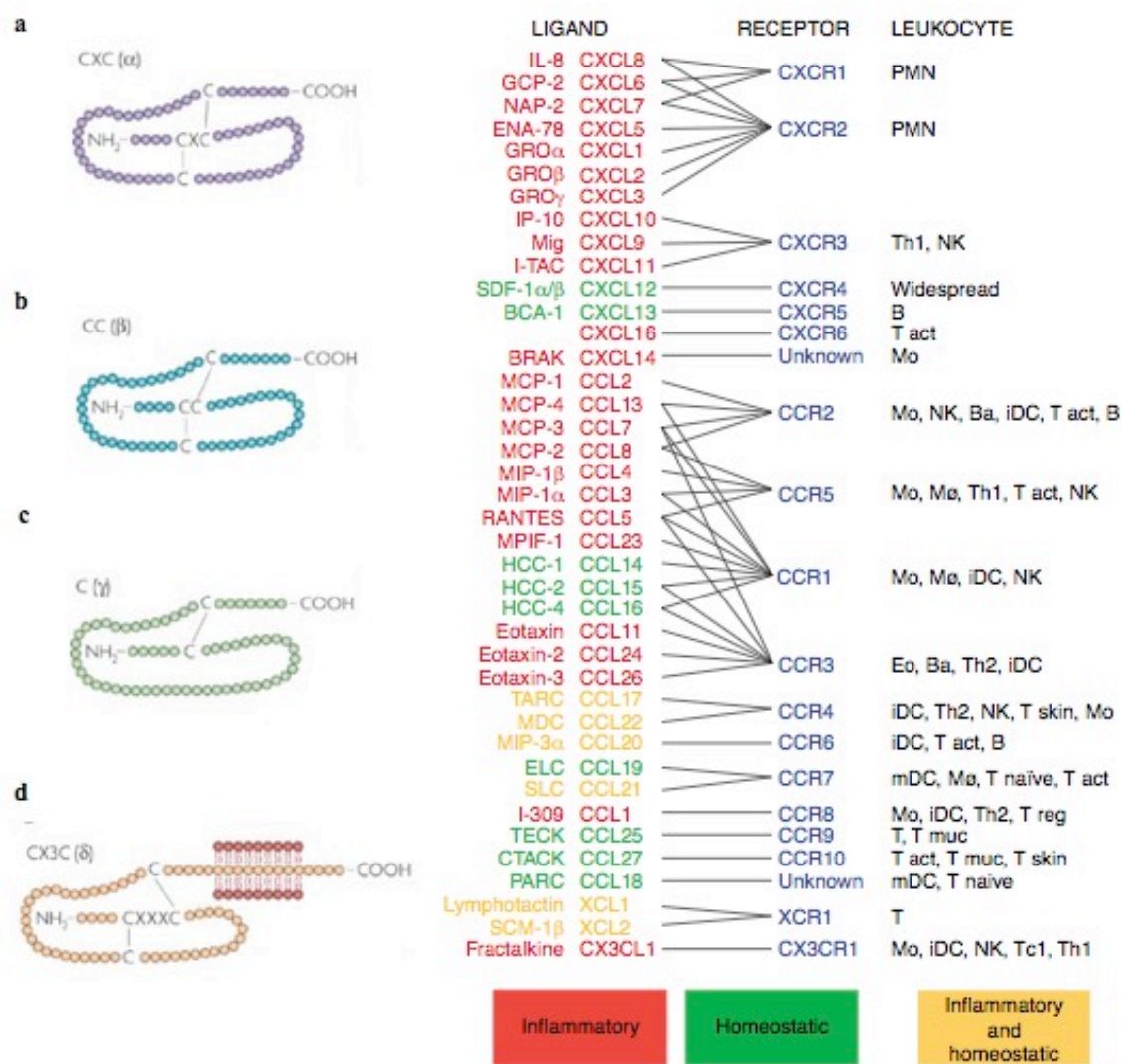


Figure 1 : Les 4 familles de CK/RCK, leur classification et leurs expressions leucocytaires
(D'après Rostène et al, *Nature Reviews* 2007 et Montovoni et al, *Trends Immunol* 2004)

Les récepteurs de chimiokines :

Si les cellules productrices des CK sont multiples et diverses (cellules endothéliales, épithéliales, stromales, hématopoïétiques, neurales ...), les cibles cellulaires sont plus restreintes et sont principalement des cellules issues de la lignée hématopoïétique. Les récepteurs sont exprimés à la surface de la plus part des leucocytes (Mantovani et al., 2004). Les RCK appartiennent à la super famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La classification des RCK est basée sur leur spécificité à se lier aux CK. Ainsi on distingue 10 CC récepteurs (CCRs) qui se lient aux CC CK, 7 CXC récepteurs

(CXCRs), XCR1 qui reconnaît spécifiquement XCL1 et enfin CX3CR1 qui fixe CX3CL1 (**figure 1**).

Des récepteurs capables de lier des CK de toutes les classes ont plus récemment été identifiés mais ceux-ci ne semblent pas déclencher de signaux classiques d'activation telle la libération de calcium (ou le flux calcique). Ainsi les récepteurs D6 et Duffy ne possèdent pas le motif DRY (Asp-Arg-Tyr), motif commun aux RCPG de classe A nécessaire au couplage de la protéine G. Non-couplés aux protéines G, ils ne sont pas pour autant silencieux comme initialement décrit. Il a été mis en évidence que ces récepteurs utilisent des voies de signalisation passant par les arrestines ou l'ubiquitine et Mdm2 (Rajagopal et al., 2010).

Les CK possèdent un peptide signal permettant leur transport et leur sécrétion dans le milieu extra cellulaire sous forme de molécules solubles. De façon intéressante, CX3CL1 et CXCL16 sont les seules CK connues à ce jour retrouvées sous les formes membranaires et solubles.

Classification fonctionnelle :

Les CK et leurs récepteurs peuvent également être classés selon certaines fonctions. En effet, 4 grandes fonctions ont été distinguées (**figure 2**) :

- Les CK dites inflammatoires sont inductibles et sont produites en cas d'inflammation ou d'infection, par le tissu lui-même (endothélium vasculaire, épithélium) ou par les leucocytes (macrophages, polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T...) (Baggiolini, 1998; Mahalingam and Karupiah, 1999).
- Les CK dites homéostatiques sont impliquées dans le développement et la physiologie normale. Elles sont produites au niveau des organes lymphoïdes mais aussi de la peau et des muqueuses. Elles sont impliquées dans la circulation des cellules essentielles à l'hématopoïèse et la surveillance immunitaire.
- Les RCK atypiques, généralement «silencieux», agissent comme des régulateurs négatifs en réduisant le niveau de concentration locale des CK.
- Les CK « virales » peuvent être reconnues par des récepteurs viraux et permettent au pathogène de contrôler et de détourner la réponse immunitaire liée à l'infection. Par exemple dans ce but, le virus de l'herpès HHV8 produit 3 chimiokines virales de type

CC (viral Macrophage Inflammatory Proteins) capables de se fixer sur un grand nombre de RCK (Murphy, 2001). Réciproquement, certains virus possèdent également des gènes codant des RCK (Rosenkilde et al., 2008; Vischer et al., 2006)

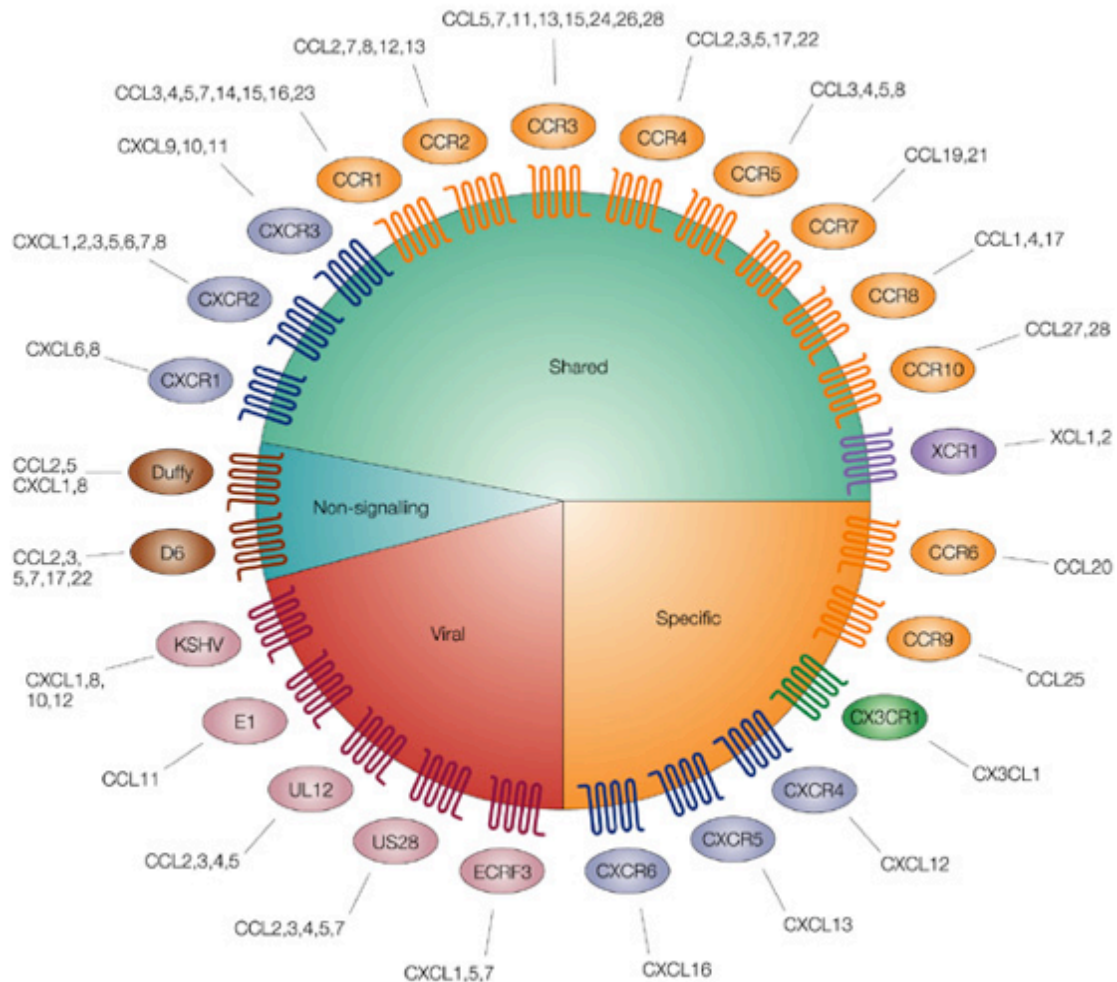


Figure 2: Classification fonctionnelle des CK et RCK (D'après Fran Balkwill, *Nature Reviews* 2004)

La diversité des CK et des RCK forme un réseau complexe de molécules capables de moduler finement les interactions cellulaires. Au sein d'une sous-famille, une CK peut se lier à différents récepteurs et un récepteur à plusieurs CK. Cette propriété porte le nom de « redondance ». Par exemple, les récepteurs CCR1 et CCR3 sont capables de reconnaître chacun 8 ligands différents. À l'inverse, il existe également des récepteurs spécifiques capables de se lier à une seule CK ; c'est le cas des récepteurs CCR6, CCR9, CX3CR1,

CXCR4 et CXCR6 ; ils sont dit monogames. Cette redondance peut expliquer que l'absence de gène codant pour des CK ou leurs récepteurs ne se traduisent pas nécessairement par des anomalies dans les modèles de délétion génétique.

Cependant cette caractéristique n'est pas bien comprise. La sensibilité d'un RCK à ses différents ligands chimiokines est variable ; en outre, la nature et le niveau d'expression des chimiokines sont dépendants du tissu, ce qui implique une régulation plus fine et spécifique du recrutement leucocytaire. D'autre part, certaines CK peuvent avoir une activité agoniste sur un récepteur donné et antagoniste pour un autre (Loetscher and Clark-Lewis, 2001). Par exemple, CCL7 est agoniste pour les récepteurs CCR2 et CCR1 et antagoniste pour le CCR5. Ces notions complexifient le réseau fonctionnel des CK et leur apparente redondance. Les raisons avancées pour ce phénomène sont multiples mais une hypothèse est que le système des CK a dû évoluer pour lutter contre les récepteurs « leurre » développés par de nombreux pathogènes pour contrôler la réponse de l'hôte (Alcami, 2007).

1.2 Structure protéique

Les Chimiokines :

En 1995, Clore et Gronenborn proposèrent la première résolution tridimensionnelle des CK révélant ainsi les similarités structurales entre les différentes sous-familles des CK (Clore and Gronenborn, 1995). Il est établi depuis que les sous familles de CK possèdent une structure commune. Les CK sont formées d'une partie N-terminale non-structurée précédant la première cystéine, de trois brins β séparés par de petites boucles et d'une partie C-terminale en forme d'hélice après la dernière cystéine (Crump et al., 1997). Cette structure est maintenue par deux ponts disulfures (**figure 3a**). Les CC-CK et les CXC-CK présentent de fortes similarités au niveau de leur structure secondaire et tertiaire en raison de la forte conservation de leur composition en acides aminés. Cependant CX3CL1 et CXCL16 possèdent une forme particulière avec un long prolongement à leur extrémité C-terminale, une hélice transmembranaire et un petit domaine intra-cytoplasmique leur permettant d'être produites à la membrane.

Les récepteurs de chimiokines :

Les RCK sont composés de 7 domaines transmembranaires organisés en hélices α , de 3 boucles hydrophiles extracellulaires, de 3 boucles intracytoplasmiques, d'un court domaine

N-terminale extracellulaire et d'une queue C-terminale intracellulaire (Lodowski and Palczewski, 2009). La structure tertiaire des RCK n'est pas réellement élucidée, ce qui est principalement due à la difficulté de cristalliser des protéines membranaires. A ce jour, seule la structure tridimensionnelle du CXCR4 est connue (Wu et al., 2010) (**figure 3b**).

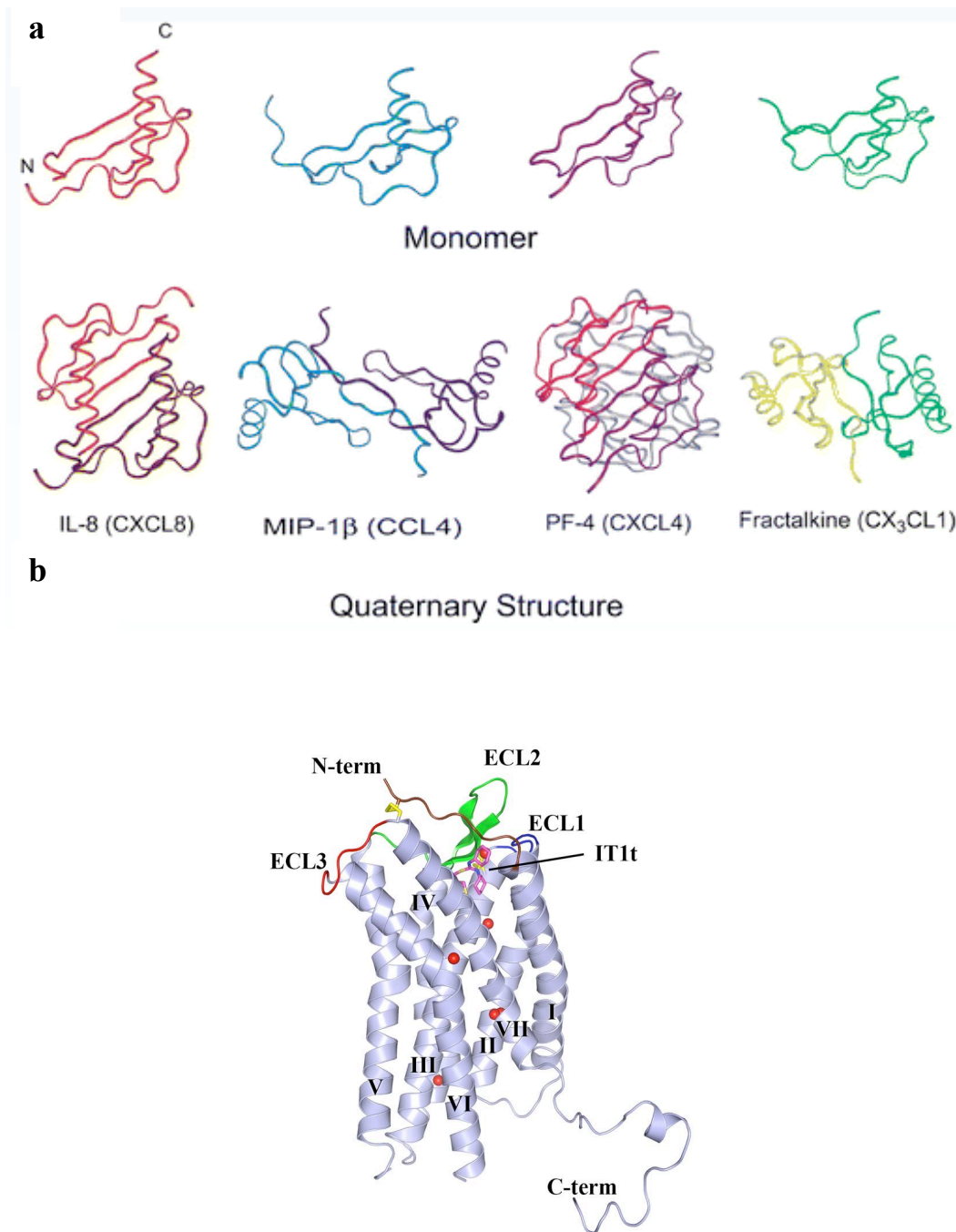


Figure 3 : Exemples de structure tertiaire et quaternaire de chimiokines (a). Structure tertiaire de CXCR4 (b). (D'après Fernandez EJ and Lolis E, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002 et Wu B et al, *Science* 2010)

Oligomérisation :

Les CK et les RCK semblent exercer leur fonction sous forme de monomère ; néanmoins, en fonction de leur concentration, du pH et de la force ionique, ils sont capables de s'oligomériser.

Les RCK peuvent former des dimères ou des oligomères non-covalents. Ainsi CCR2, CCR5, CXCR4 et CX3CR1 formeraient des homodimères (Benkirane et al., 1997; Darbandi-Tehrani et al., 2010; Lapham et al., 1999; Rodriguez-Frade et al., 1999; Vila-Coro et al., 2000). La fonction de ces oligomères reste obscure. Il a été montré que l'hétérodimérisation CCR2/CCR5 entraînerait l'inhibition de la fixation de CCL2 sur CCR2 (Springael et al., 2006).

Dans le cas des CK, des études sur CXCL8 ont montré que sa forme dimère est capable de se fixer au récepteur montrant ainsi que la région d'interface du dimère ne joue pas de rôle dans l'activation du récepteur (Paolini et al., 1994). Handel et al. ont mis en évidence l'importance de l'oligomérisation des chimiokines pour leur activité *in vivo*. Ainsi, ils montrent que leur variant de CCL2, P8A-CCL2, tirerait son activité anti inflammatoire de son incapacité à s'oligomériser (Handel et al., 2008).

L'impact physiologique de l'oligomérisation des CK et des RCK n'est pas encore clairement défini et finalement la structure de ces protéines, plus particulièrement des CK, se différencie les unes des autres principalement par cette capacité à s'oligomériser.

1.3 Reconnaissance ligand-récepteur et transduction du signal

Les CK se lient à leur RCK avec des affinités différentes selon le couple considéré, mais elle est généralement de l'ordre du nanomolaire. L'interaction RCK-CK met en jeu deux sites de liaison : le premier site est une boucle située au niveau du deuxième et du troisième résidu cystéine de la CK, région d'interaction de faible affinité, qui se lie à l'extrémité amino-terminale extracellulaire du RCK. Le second site de liaison met en oeuvre la partie N-terminale de la CK, situé avant le premier résidu cystéine, qui interagit avec les premières et secondes boucles extracellulaires du récepteur. La région N-terminale est la partie la plus variable des CK et est déterminante pour l'affinité et la spécificité de la liaison ligand-récepteur (**figure 4**). Elle est également indispensable à l'induction d'un signal de transduction (Moser and Willmann, 2004).

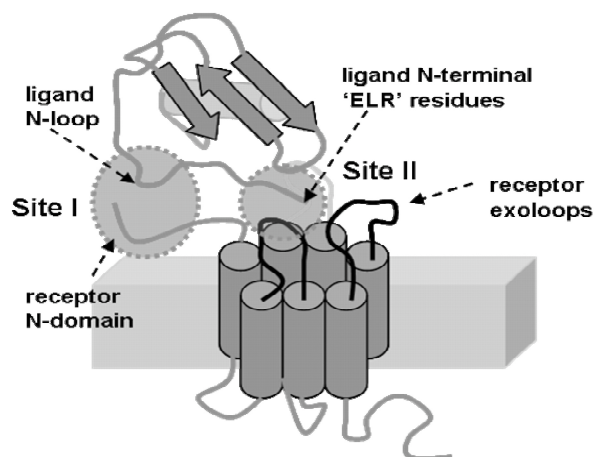


Figure 4 : Représentation schématique générale du modèle d'interaction CK-RCK
(D'après Rajagopalan L, *J Biol Chem* 2004)

La fixation du ligand sur son récepteur spécifique entraîne une cascade de signalisation dépendante de la nature de la protéine G et des effecteurs activés (**figure 5**). Il existe différents types de protéine G mais les RCK sont principalement associés aux protéines de type Go/i qui sont sensibles à la toxine pertussique (PTX) (Damaj et al., 1996; Thelen, 2001). Les voies de transduction du signal sont différentes selon le type cellulaire (Locati et al., 2001) et selon la CK activatrice (Mueller et al., 2006). La majorité des CK active la voie de la phospholipase C (PLC). La PLC produit de l'inositol trisphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) à partir du phosphatidylinositol 4.5-bisphosphate (PIP2). L'IP3 mobilise le calcium des stocks intracellulaires. Cette réponse calcique est d'ailleurs couramment utilisée dans l'étude de l'activation des RCK. Ces activations déclenchent d'autres éléments de signalisation, comme l'inhibition de l'adénylate-cyclase, l'activation de la voie des MAP kinases, qui participent aux réponses cellulaires comme la dégranulation, la libération d'anions superoxydes et le chimiotactisme. (Murdoch and Finn, 2000).

Certaines études avancent que dans des cas particuliers, la signalisation des RCK ne passe pas par les protéines G, la transduction serait insensible à la PTX et conduirait au recrutement et à l'activation de la voie Jak-Stat (Vila-Coro et al., 1999). Ces signaux indépendants des protéines G feraient intervenir les arrestines et joueraient un rôle particulièrement important dans la fonction chimiotactique. Cela reste à approfondir (Kraft et al., 2001; Sun et al., 2002).

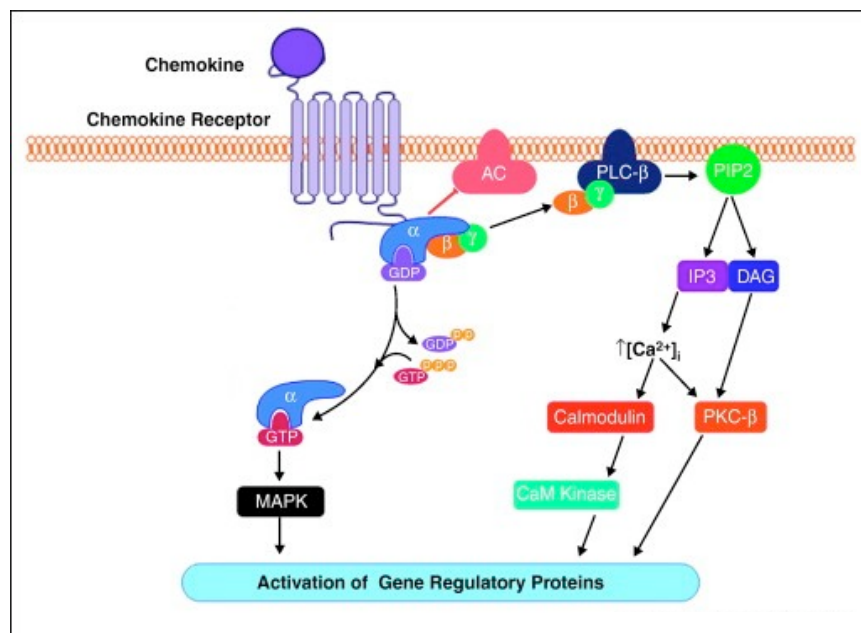


Figure 5: Représentation simplifiée des cascades de signalisations induites par la fixation d'une CK sur son récepteur.

Le chimiotactisme est associé à des changements rapides dans la morphologie cellulaire. Ces modifications résultent de la formation de lamellipodes, l'activation des cycles de polymérisation / dépolymérisation des filaments d'actine, l'expression en surface des intégrines leucocytaires ainsi que l'interaction de ces dernières aux molécules d'adhérence cellulaire (Parsey and Lewis, 1993; Yan and Jin, 2012). Après son activation, le récepteur est internalisé et la cellule subit une période réfractaire pendant laquelle elle ne peut plus répondre à une CK par le même récepteur. Ce mécanisme joue certainement un rôle déterminant dans le contrôle du trafic, de la migration et de la rétention des leucocytes au niveau des tissus (Neel et al., 2005).

1.4 Rôles physiologiques du réseau chimiokinique

Le rôle le plus reconnu du système CK est de coordonner le trafic leucocytaire, mais il est également impliqué dans le développement embryonnaire et dans le maintien et la régulation d'un grand nombre de processus physiologiques notamment la surveillance immunitaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse.

a. Homéostasie/ Surveillance immunitaire

Au-delà de l'orchestration de la migration des leucocytes, les CK homéostatiques possèdent de nombreuses autres fonctions (**figure 6**) (Zlotnik and Yoshie, 2000). Elles sont

par exemple impliquées dans l'organogenèse. En effet, les chimiokines possèdent un rôle clé dans la migration des cellules souches à travers le corps : elles dirigent la migration des cellules souches engagées à l'endroit où l'organe se développe (Doitsidou et al., 2002), favorisent l'angiogenèse et ont un rôle direct sur la prolifération cellulaire (cf. ci-dessous). Des études menées chez le poisson zèbre ont ainsi révélé que la présence de CXCR4 est vitale pour la mise en place du cœur, de la moelle osseuse et du système nerveux centrale (Zou et al., 1998).

Les chimiokines homéostatiques sont également impliquées dans la mise en place des organes lymphoïdes secondaires et dans l'homéostasie des monocytes circulants qui participent à la surveillance immunitaire. Le couple CCR7-CCL21 est nécessaire pour l'entrée et le recrutement des cellules T naïves dans les ganglions lymphatiques, et CXCR5 régit l'entrée et le recrutement des cellules B dans les ganglions lymphatiques (Hardtke et al., 2005). Dans la moelle osseuse, le couple CCR2-CCL2 gouverne la sortie des monocytes vers le sang en condition inflammatoire ou non (Serbina and Pamer, 2006) (Combadiere et al., 2008).

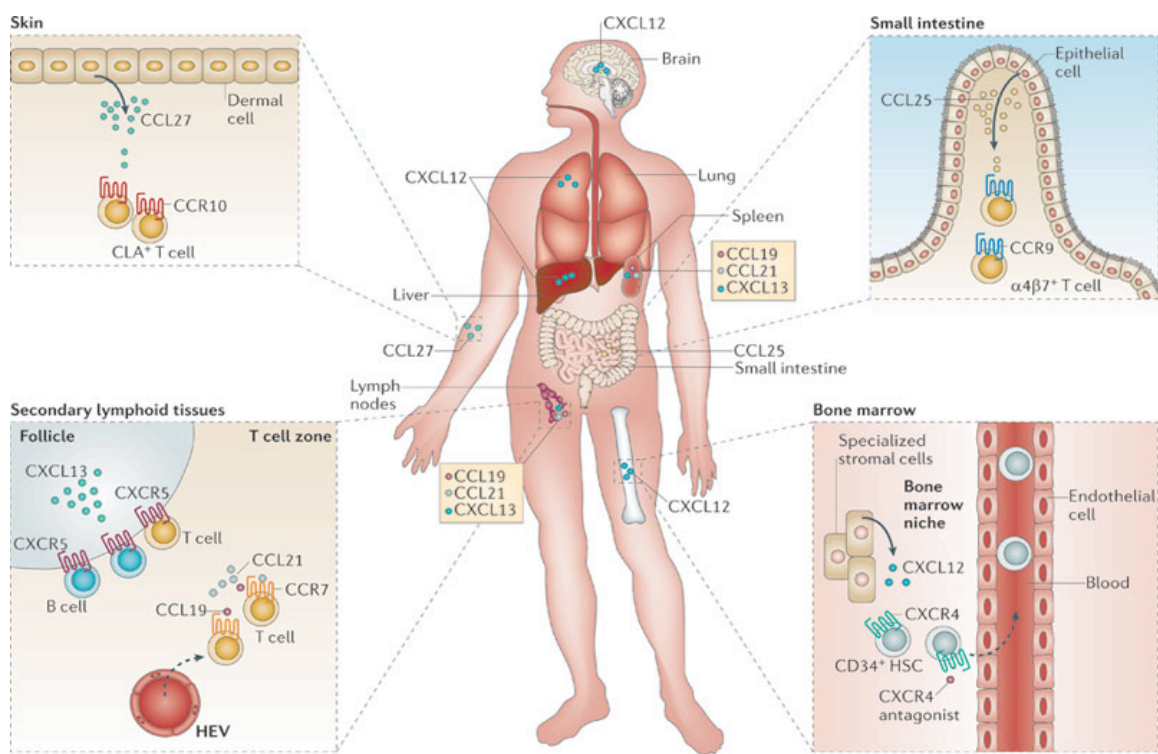


Figure 6 : Illustration des principaux axes de circulations cellulaires régies par les chimiokines homéostatique en condition normale. (D'après Zlotnik A et al, Nature Reviews Immunol 2011)

b. Migration et recrutement au site inflammatoire

Dans les années 90, le modèle proposé pour le recrutement des leucocytes au site spécifique comportait 3 étapes : 1-le « rolling » des leucocytes dépendant des sélectines, 2-leur activation par les CK et 3- leur arrêt au niveau de l'endothélium par l'intermédiaire des intégrines (Butcher, 1991; Springer, 1995). Depuis de nombreuses études ont permis de mieux définir les étapes décrites par le modèle original, et d'identifier un certain nombre d'étapes supplémentaires, qui sont décrites de manière synthétique ci-dessous.

1 : Les leucocytes « roulent » sur les cellules endothéliales activées. Cela est possible par l'action des récepteurs PSGL (P selectin glycosylated ligand) exprimés sur les leucocytes qui reconnaissent les sélectines endothéliales (plus particulièrement les E- et P- selectines) (Kansas, 1996 ; Lawrence and Springer, 1991). Ces liaisons se forment et se rompent continuellement faisant ainsi ramper les monocytes au niveau de la paroi endothéliale. On distingue plus précisément deux phases de « rolling ». Lors de la première phase, les leucocytes voient leur vitesse diminuer de 50 à 100 fois par rapport aux leucocytes circulants : leur vitesse tombe à 10-20 mm/sec (E-selectin). Lors de la seconde phase, leur vitesse va encore ralentir et passer à 5 mm/sec (P-selectin), on parle alors de « slow rolling » (**figure 7a**).

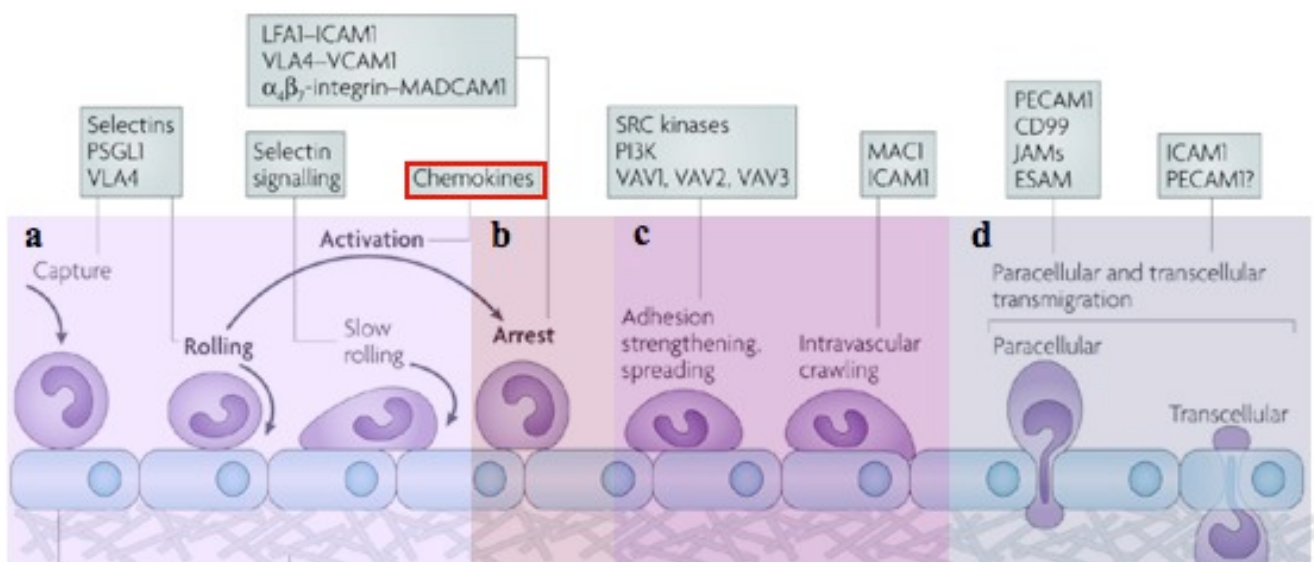


Figure 7: Représentation du recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium. (a) Capture et slow rolling, (b) arrêt (c) adhésion, diffusion et crawling intravasculaire, (e) transmigration paracellulaire et transcellulaire. (D'après Ley K et, Nature Reviews 2007)

2 : Cette suite de ralentissements préalables des leucocytes permet l'activation d'autres molécules de reconnaissance de l'endothélium et conduit à une adhérence ferme des leucocytes sur la paroi.

Au cours de l'inflammation, les cellules endothéliales activées par des cytokines inflammatoires, expriment des molécules d'adhésion et secrètent des CK. Les intégrines, plus particulièrement CD18, LFA-1 et VLA-4, semblent être les plus impliquées (Evans et al., 2009; Springer, 1990). En outre, certaines CK peuvent provenir du clivage protéolytique au niveau des mastocytes activés et des plaquettes circulantes (**figure 7b**). Ces CK sont ensuite présentées à la surface luminale de l'endothélium par l'intermédiaire des glycosaminoglycanes (GAG) et participent à l'efficacité du recrutement des leucocytes. Ainsi, les plaquettes déposent CCL5, CXCL4 et CXCL5, sur l'endothélium enflammé et déclenchent l'arrêt du roulement des MO (Huo et al., 2003; von Hundelshausen et al., 2001). Les CK sont de puissants activateurs des intégrines, elles favorisent leur activation et régulent leur affinité pour un type cellulaire donné en augmentant leur valence (Constantin et al., 2000; Laudanna et al., 2002).

3 : Le signal déclenché par la fixation des CK sur leurs récepteurs conduit à une activation rapide des intégrines présentes à la surface des leucocytes et donc à l'arrêt de ces derniers. D'autres molécules sont également impliquées dans ce mécanisme comme les molécules de la super famille des immunoglobulines (VCAM-1, ICAM-1, MadCAM-1) qui permettent l'arrêt des lymphocytes, des monocytes (MO) et des neutrophiles au niveau de la paroi vasculaire (Lefort and Ley, 2012; Long, 2011).

4 : La migration transendothéliale des leucocytes est la dernière étape du processus de migration vers les tissus enflammés et peut se produire avec un minimum de perturbations structurelles pour la cellule. Avant de traverser la barrière endothéliale, les neutrophiles et les MO « scannent » l'intérieur des vaisseaux sanguins, sous l'action des intégrines MAC1- et de ICAM1 (Phillipson et al., 2006), à la recherche d'un site de transmigration. On parle alors de « crawling » intraluminal (**figure 7c**). Dans cette étape encore, les CK pourraient avoir un rôle dans le déclenchement de la transmigration des leucocytes (Cinamon et al., 2004) (**figure 7d**). Ces observations mettent en évidence une nouvelle complexité du recrutement des leucocytes au niveau du tissu enflammé qui ne dépend pas uniquement du réseau des molécules d'adhérence cellulaires mais également du réseau CK, dont le niveau d'expression et

d'affinité régule l'activation des intégrines et donc l'adhérence des sous-populations leucocytaires.

c. Prolifération cellulaire et apoptose

Outre leur rôle dans le recrutement cellulaire, les CK sont impliquées aussi dans la régulation de la prolifération cellulaire et le contrôle de la mort cellulaire programmée ou apoptose. Ces implications ont une grande importance au niveau de l'hématopoïèse.

L'importance des CK dans la prolifération cellulaire est particulièrement mise en évidence par le rôle de CXCL12 dans le trafic des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cette CK dont le récepteur est CXCR4 est synthétisée par les cellules stromales de la moelle. L'invalidation de son gène dans la souris est létale : elle provoque un déficit majeur de l'hématopoïèse médullaire alors que l'hématopoïèse du foie fœtal est normale (Tachibana et al., 1998). En l'absence de CXCR4, les CSH gardent leur fonction hématopoïétique mais les précurseurs dérivés de leur différenciation migrent prématurément dans le sang. En effet, le couple CXCR4-CXCL12 participe à la rétention des précurseurs hématopoïétiques au niveau des niches médullaires et régule ainsi la prolifération cellulaire des cellules hématopoïétiques. A l'inverse, des CK telle que CCL3 (dont le récepteur est CCR5) sont capables d'inhiber directement la prolifération des CSH en agissant sur le récepteur CCR5 (Loetscher and Clark-Lewis, 2001).

L'invalidation chez la souris du gène codant pour CCR7 entraîne un défaut de migration vers les sous-compartiments du thymus et de ce fait un défaut de prolifération et de production de lymphocytes matures (cortex et médulla) (Misslitz et al., 2004; Ueno et al., 2004).

Des études récentes ont montré l'implication de CCR5 et CX3CR1 dans l'apoptose cellulaire. Ainsi le récepteur CCR5 est à la fois impliqué dans l'apoptose et la prolifération. Ces deux fonctions apparemment contradictoires d'un même RCK s'expliqueraient par un effet dépendant de la concentration : il y aurait prolifération en réponse à des quantités nanomolaires de CCL5 et apoptose en réponse à des quantités micromolaires (Murooka et al., 2006). Par ailleurs, CX3CL1 agit sur la prolifération des cellules musculaires lisses humaines (White et al., 2010) et possède, un effet anti-apoptotique sur les MO lui conférant un rôle important dans la survie monocyttaire (Landsman et al., 2009).

d. Angiogenèse

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont générés et mis en place. C'est un phénomène fondamental lors du développement embryonnaire, lors des processus cicatriciels, mais aussi lors de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique. De nombreuses études ont mis en évidence les interactions complexes entre les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire telles que les macrophages (MP) dans le contrôle de ce processus. Les CK jouent un rôle important dans la coordination de ces interactions via des mécanismes directs au niveau des cellules endothéliales ou indirects en déclenchant la sécrétion des facteurs pro angiogéniques comme VEGF.

En 1990, Maione et al découvraient que CXCL4 inhibe la prolifération des vaisseaux sanguins dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (Maione et al., 1990). En 1992 Strieter et al ont découvert l'effet angiogénique de CXCL8. Suite à ces découvertes, de nombreuses études se sont concentrées sur la famille des CK « CXC ». Celles-ci peuvent être subdivisées en deux sous catégories selon la présence ou non des acides aminés Glu(E)-Leu(L)-Arg(R) à leur extrémité N terminale. Les CK ELR+, comme CXCL8, ont des propriétés pro-angiogéniques alors que les ELR-, comme CXCL4, possèdent des propriétés angiostatiques (Strieter et al., 2005) (**Tableau I**). La suite a révélé que cette classification n'est pas absolue. En effet, par exemple CXCL12, qui est une CXC CK ELR- agit comme facteur angiogénique in vivo (Salcedo et al., 1999).

Les CK peuvent agir sur l'angiogenèse en activant la production de facteurs pro-angiogéniques, comme les métalloprotéinases, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, ensemble des molécules extracellulaire du tissu conjonctif ou des autres tissus, (Parks et al., 2004) ou en induisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Middleton et al., 2004).

Systematic name	Human ligand	Mouse ligand	Receptor
Angiogenic			
CXCL1	Gro- α	KC	CXCR2
CXCL2	Gro- β	MIP-2	CXCR2
CXCL3	Gro- γ	MIP-2	CXCR2
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	-	CXCR2
CXCL7	NAP-2	-	CXCR2
CXCL8	IL-8	-	CXCR2
CCL2	MCP-1	JE	CCR2
Angiostatic			
CXCL4	PF-4	PF-4	CXCR3B, *
CXCL9	Mig	Mig	CXCR3B
CXCL10	IP-10	IP-10	CXCR3B
CXCL11	I-TAC	I-TAC	CXCR3B
CXCL12	SDF-1	SDF-1	CXCR4
CXCL14	BRAK	BRAK	?
*, additional receptors may be involved (see text); ?, undefined receptor.			

Tableau I : Classification des CK impliquées dans l'angiogénèse. (D'après Mehrad B et al, *Thromb Haemost* 2007)

L'inactivation de CXCR2, récepteur d'une CK ELR+ (CXCL8), a mis en évidence le rôle de ce RCK dans l'angiogénèse et le développement tumoral dans le cancer du poumon, de l'œsophage (Keane et al., 2004; Wang et al., 2006; Wislez et al., 2006) et du carcinome rénal (Mestas et al., 2005). CXCR2 est également nécessaire au processus cicatriciel en participant à la reconstruction de l'épithélium et à la néovascularisation (Devalaraja et al., 2000) via le recrutement des neutrophiles et des MP au niveau de la plaie. À l'inverse, les ligands de CXCR3 (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11) ont des propriétés angiostatiques *in vivo* (Angiolillo et al., 1995; Strieter et al., 1995). Ainsi, la surexpression de CXCL4 bloque la progression tumorale et la formation des métastases (Tanaka et al., 1997).

La régulation de l'angiogénèse est aujourd'hui un axe thérapeutique de première importance dans la lutte contre les pathologies vasculaires comme les ischémies ou l'athérosclérose. L'utilisation de facteurs de croissance endothéliaux, comme le VEGF pourrait faciliter la revascularisation des territoires occlus. Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours (Tie and Desai, 2012) et l'utilisation des CK dans le contrôle de ce processus fait l'objet de nombreuses études prometteuses.

Ainsi le réseau CK est un système complexe impliqué dans de nombreux processus pathologiques, offrant ainsi une grande source de nouvelles cibles thérapeutiques. De nombreuses études portent actuellement sur des antagonistes du réseau CK-RCK.

1.5 Antagonistes

De nombreuses compagnies pharmaceutiques et biotechnologiques déploient depuis des années de grands efforts de recherche pour identifier de nouveaux médicaments luttant contre le dysfonctionnement du système immunitaire. Les GPCRs sont la cible de prédilection des industries pharmaceutiques : en effet 30% des médicaments commercialisés sur le marché américain agissent sur ces GPCRs et ils font parti des meilleures ventes de médicaments. Les RCK de part leur implication dans de nombreuses pathologies et leur expression à la surface des cellules de l'immunité (Horuk, 2009) (**Tableau II**) ne sont pas des cibles inconnues pour l'industrie pharmaceutique. Le principal axe de recherche est basé sur l'inhibition des récepteurs aux CK. Les molécules antagonistes des RCK jusqu'ici étudiées peuvent être classées en deux catégories, les agents anti-rétroviraux d'une part et les agents anti-inflammatoires ou auto-immuns d'autre part.

Receptor	Immune-cell expression	Disease involvement
CCR1	T cell, NK cell, eosinophil, basophil, neutrophil, monocyte/macrophage, dendritic cell	MS, RA, psoriasis, organ transplant, renal fibrosis, multiple myeloma, endometriosis
CCR2	NK cell, basophil, neutrophil, B cell, monocyte/macrophage	MS, RA, atherosclerosis, type 2 diabetes and obesity, lupus
CCR3	Eosinophil, basophil, T cell, monocyte/macrophage	Asthma and allergic rhinitis
CCR4	Dendritic cell, NK cell, basophil, monocyte/macrophage	Asthma and atopic dermatitis
CCR5	T cell, NK cell, B cell, monocyte/macrophage, dendritic cell	MS, RA, organ transplant, nephritis, IBD, HIV
CCR8	T cell, monocyte/macrophage, dendritic cell, B cell	Asthma, atopic dermatitis, psoriasis
CCR9	T cell	IBD, Crohn's
CCR10	T cell	Atopic dermatitis and cancer
CXCR2	Neutrophil, eosinophil, mast cell, monocyte/macrophage	COPD, emphysema, ischaemia, psoriasis
CXCR3	T cell, monocyte/macrophage, NK cell, B cell	MS, RA, organ transplant, asthma, diabetes, psoriasis
CXCR4	T cell, neutrophil, mast cell, eosinophil, basophil, monocyte/macrophage, dendritic cell, B cell	HIV, cancer
CX ₃ CR1	T cell, NK cell, monocyte/macrophage	MS, atherosclerosis, macular degeneration

*Information in this table was compiled from REFS 26,70. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; IBD, irritable bowel syndrome; MS, multiple sclerosis; NK, natural killer; RA, rheumatoid arthritis.

Tableau II : Expression des RCK sur les cellules immunitaires et leurs implications dans les pathologies inflammatoires. (D'après Horuk R, Nat Rev Drug Discov 2009)
Légende : COPD : la maladie pulmonaire obstructive chronique; IBD : syndrome du côlon irritable; MS : sclérose en plaques; RA : arthrite rhumatoïde.

Malgré toutes les recherches et les moyens mis en œuvre, il n'existe actuellement que deux antagonistes des RCK approuvés et mis sur le marché ; le maraviroc (Celsentri® Pfizer), le plus connu, antagoniste du récepteur CCR5 (Fatkenheuer et al., 2005) et le plerixafor (Mozobil® Genzyme) antagoniste du récepteur CXCR4 (De Clercq Antimicrob Agents Chemother 1994). Le maraviroc est une petite molécule qui inhibe l'entrée du VIH-1 dans la cellule en bloquant l'interaction entre le virus et le récepteur CCR5 des cellules hôtes. C'est le premier médicament à cibler la cellule hôte et non pas le virus. Après de nombreuses études cliniques, il a été approuvé par les autorités sanitaires aux États-Unis pour le traitement des patients infectés par le virus VIH-1 à tropisme CCR5, en combinaison avec des agents anti-rétroviraux, depuis Août 2007 et en Europe en Septembre 2007. Peu de temps après, en 2008 aux États-Unis et en 2009 en France, le plerixafor fut accepté sur le marché à son tour. C'est une petite molécule utilisée dans le traitement des lymphomes et des myélomes multiples. En association avec du G-CSF, il permet la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique en vue d'une collecte pour une autogreffe (Uy et al., 2008). De nombreuses études sont actuellement en cours pour déterminer si ces molécules pourraient être utilisées dans d'autres pathologies inflammatoires.

De multiples études cliniques portant sur des antagonistes ont été menées mais la grande majorité a échoué en phase II des tests cliniques. Trois antagonistes non-peptidiques de CCR1 ont été développés ; l'un par Pfizer (CP-481,715), un autre par Millenium (MLN3897) et le dernier par Berlex/Shering (BX471) pour tenter de lutter contre l'arthrite rhumatoïde. Ces trois molécules avaient des résultats prometteurs sur des modèles de rongeurs, mais n'ont pas montré d'efficacité significative en essais cliniques de phase II. Pour les mêmes raisons, Merck a échoué dans l'essai clinique de son antagoniste de CCR2, MK-0812 contre l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque et également Amgen/Tularik avec l'antagoniste de CXCR3, AMG-487, contre le psoriasis. Ces échecs ne démotivent pas pour autant les chercheurs et les compagnies pharmaceutiques qui continuent à mettre au point des antagonistes des RCK. Deux antagonistes, un contre CCR9 de Chemocentrix et un contre CXCR4 de Genzyme sont actuellement en attente de résultats en essai clinique de phase III. (**Tableau III**).

Du côté préclinique, de nombreuses recherches ont abouti à la découverte de nouveaux antagonistes qui pourront éventuellement faire l'objet d'étude clinique. Ainsi l'AMD11070 antagoniste de CXCR4, est la première molécule pharmacologique biodisponible oralement

pour lutter contre le VIH (Mosi et al., 2012). On attend aussi le développement des études sur les premiers antagonistes de CCR8 (Connolly et al., 2012) et de CXCR7 (Sartina et al., 2012). Les échecs des essais cliniques mettent une fois de plus en évidence la grande limite entre les recherches précliniques menées principalement sur des rongeurs et les essais menés chez l'homme. Les cellules humaines et murines ont des profils d'expression des RCK différents et ne présentent pas nécessairement la même affinité pour l'antagoniste. Cela peut entraîner des problèmes de cible, d'affinité et de dosage lors du passage aux essais sur l'homme. De plus, la multitude de RCK impliquées simultanément dans une pathologie, par exemple CCR5, CCR2, CCR1 et CX3CR1 dans l'athérosclérose, peut expliquer à elle seule pourquoi un antagoniste unique pour un récepteur spécifique ne peut pas induire une réponse efficace et suffisante. L'alternative serait d'utiliser des antagonistes ayant des cibles multiples spécifiques, ce qui fait actuellement l'objet de recherches pré-cliniques (Kakuta et al., 2012).

Receptor	Company	Highest clinical phase	Compound	Indication	Status
CCR1	Berlex/Schering	II	BX471	MS, psoriasis, endometriosis	No efficacy, trials halted
CCR1	Millennium	II	MLN 3701, MLN 3897	RA, MS	MLN 3897, no efficacy in RA
CCR1	Pfizer	II	CP 481,715	RA	No efficacy, trials halted
CCR1	ChemoCentryx	I	CCX354	RA	Ongoing
CCR2	Millennium	II	MLN 1202 [†]	Atherosclerosis, MS, RA	No efficacy in RA, ongoing in atherosclerosis and MS
CCR2	Incyte	I	INCB8696	MS, lupus	Ongoing
CCR2	ChemoCentryx	I	CCX140	MS, restenosis	Ongoing
CCR2	Merck	II	MK-0812	RA, MS	No efficacy
CCR2	Pfizer	II	PF-4136309	Pain	Ongoing
CCR3	Topigen	II	TPI ASM8 [†]	Asthma	Ongoing
CCR3	GlaxoSmithKline	I	776994	Asthma, allergic rhinitis	No longer reported
CCR3	Bristol-Myers Squibb	I	DPC-168	Asthma	No longer reported
CCR4	Amgen	I	KW-0761 [†]	Oncology	Ongoing
CCR5	Pfizer	Approved	Maraviroc	HIV	Approved
CCR5	Pfizer	II	Maraviroc	RA	Ongoing
CCR5	Schering-Plough	II	Vicriviroc	HIV	Ongoing
CCR5	GlaxoSmithKline	III	Aplaviroc	HIV	Toxicity, development uncertain
CCR5	Incyte	II	INCB9471	HIV	Ongoing
CCR5	Progenics	I	Pro 140 [†]	HIV	Ongoing
CCR9	ChemoCentryx	III	CCX-282	IBD, Crohn's disease	Ongoing
CXCR1/ CXCR2	Schering-Plough	II	SCH 527123	COPD	Ongoing
CXCR1/ CXCR2	Dompé	II	Reparixin	Reperfusion injury	Ongoing
CXCR2	GlaxoSmithKline	I	SB 656933	COPD, cystic fibrosis	Ongoing
CXCR3	Amgen/Tularik	II	T-487/ AMG-487	Psoriasis	No efficacy, trial halted
CXCR4	Genzyme	III	Plerixafor	Multiple myeloma, NHL	Ongoing

*All programmes are non-peptide in approach except where indicated otherwise with [†]. Data were obtained from the Investigational Drugs Database from Thomson Reuters. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; IBD, irritable bowel syndrome; MS, multiple sclerosis; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; RA, rheumatoid arthritis.

Tableau III : Listes non exhaustive des antagonistes des chimiokines faisant l'étude d'essai clinique. (D'après Horuk R, Nat Rev Drug Discov 2009)

2 La lignée monocyttaire

2.1 Définition des sous-populations monocytaires

Ces 20 dernières années de nombreuses études ont permis de découvrir la diversité et l'hétérogénéité de ces populations myéloïdes ainsi que leurs rôles spécifiques. Bien que les plaquettes, les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles fassent partie de la lignée myéloïde, ce chapitre sera exclusivement dédié aux monocytes (MO) et à leur devenir en tant que macrophages (MP), acteurs cellulaires ciblés au cours de mon travail de thèse. Les MO et les MP sont en effet les piliers de la réponse inflammatoire et de la réponse immunitaire innée.

Les MO représentent 5 à 10% des leucocytes circulants dans le sang humain et 2 % chez la souris. La maturation des MO s'effectue chez l'adulte dans la moelle osseuse, ils sont libérés dans le sang et s'implantent dans tous les tissus ou ils se différencient en macrophage ou en cellules dendritiques. En condition pathologique, la migration et la différenciation des MO dépendent de la nature du tissu agressé et du type d'agression (Serbina et al., 2008). Dans les tissus, les MP exercent une fonction d'élimination des agents pathogènes, bactéries, virus et parasites mais aussi de diverses molécules comme par exemple les lipides dans le cas de l'athérosclérose.

Chez l'homme comme chez la souris, ils peuvent être divisés en deux sous-populations principales en fonction du profil d'expression des marqueurs présents à leur surface (**Table IV**). En 1989, Passlick et al ont classé les MO humains en MO « classiques », et MO « non classiques » (Passlick et al., 1989). L'étude des MO murins est plus récente, avec la définition des MO « inflammatoires » ou « classiques » et les MO « résidents » ou « non classiques ». Cette nomenclature proposée par F.Geissman (Auffray et al., 2009) est basée sur l'expression du récepteur au facteur de croissance myéloïde « Myeloid Colony Stimulating –Factor » (CD115) et celle des RCK CX3CR1 et CCR2.

Subset	Markers	Chemokine receptors	Functions
Mouse			
LY6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Pro-inflammatory ⁷ and antimicrobial ³ roles
LY6C ^{low}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{low}	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹¹ ; early responses ¹¹ ; tissue repair
Human			
Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Resemble LY6C ^{hi} monocytes based on gene-expression arrays ^{7,17,140}
Intermediate	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Pro-inflammatory roles ^{12,15}
Non-classical	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹⁴ ; antiviral roles ¹⁴

CCR2, CC-chemokine receptor 2; CX₃CR1, CX₃C-chemokine receptor 1.

Tableau IV : Classification des sous familles de monocytes murins et de monocytes humains. (D'après Shi C, Pamer EG Nat Rev Immunol 2011)

a. Les MO humains :

Les MO « classiques » représentent 90 à 95 % des MO circulants. Il s'agit de cellules de grande taille, d'environ 18,5 µm de diamètre, identifiées par une forte expression du marqueur de surface CD14 (récepteur du lipopolysaccharide) et une faible expression de CD16 (récepteur IIIγ) (**figure 8**). Ils sont également caractérisés par le profil d'expression d'autres marqueurs tels que les RCK. Ainsi, les MO CD14⁺⁺CD16⁻ sont également CCR2⁺ CX3CR1^{+/-} CD62⁺ CD64⁺ (FCγR1). Par comparaison, les MO « classiques » sont de faibles producteurs de cytokines pro-inflammatoires, mais ont par contre une forte activité de phagocytose et une bonne capacité à développer une réponse cytotoxique dépendante des anticorps ou ADCC pour « Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity » importante (Connor et al., 1990; Passlick et al., 1989).

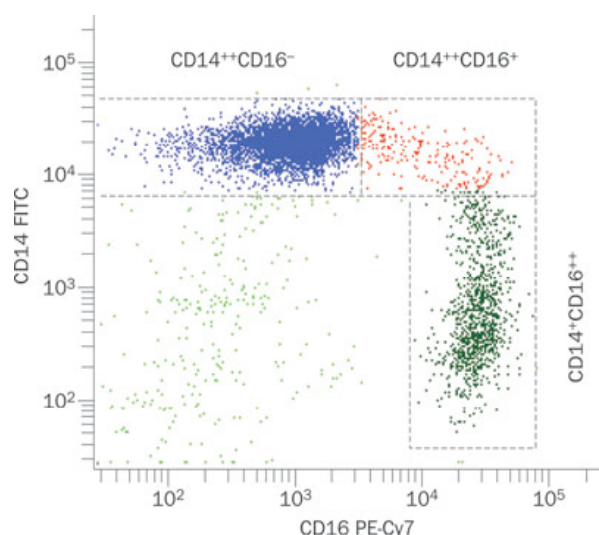


Figure 8 : Analyse de cytométrie en flux illustrant l'hétérogénéité des monocytes humain. (D'après Heine GH, Nature Reviews 2012)

Les MO « non classiques » caractérisés en 1988 (Ziegler-Heitbrock et al., 1988), sont de petite taille, d'environ 13,8 µm de diamètre et sont CD14⁺ CD16⁺⁺. À l'inverse des MO « classiques », ils sont CCR2⁻ CX3CR1⁺⁺ CD62⁻ CD64⁻. Les MO « non classiques » ont un niveau d'expression du complexe majeur d'histo-compatibilité de classe 2 (MHC II) plus important que celui des MO « classiques ». Cela induit qu'ils donnent des cellules dendritiques (CD) meilleures présentatrices d'antigènes que celles issues des MO « classiques » (Krutzik et al., 2005; Randolph et al., 2002). Sous stimulation LPS, les MO « non classiques » sont capable de produire des quantités importantes de cytokines inflammatoires, comme le TNFα, Il6 ou CCL2 (Ancuta et al., 2003; Belge et al., 2002; Frankenberger et al., 1996). Les MO « non classiques » migrent en réponse à CXCL12 ou à CX3CL1 (Ancuta et al., 2006) tandis que les « classiques » répondent plutôt à CCL2.

Les MO « non classiques » CD16⁺ ont été également appelés MO « inflammatoires » en raison de l'augmentation de leur nombre dans la circulation de patients en conditions inflammatoires comme dans l'athérosclérose (Schlitt et al., 2004), l'arthrite rhumatoïde (Baeten et al., 2004), le cancer (Saleh et al., 1995) ou plus récemment la glomérulonéphrite (Yoshimoto et al., 2007). Cependant, ce terme de monocyte inflammatoire reste controversé car l'équivalent murin des MO CD16⁺ est la population monocyttaire dite « résidente » qui a de faibles potentialités à sécréter des cytokines inflammatoires (Geissmann et al., 2003).

b. Les MO murins:

Les MO « inflammatoires » sont de petites tailles (8-12 µm de diamètre) et représentent environ 50% des MO circulants. Ils sont caractérisés par une forte expression du marqueur Ly6C et par l'absence d'expression du marqueur Ly6G (marqueur des neutrophiles). Ces cellules sont CCR2⁺, CX3CR1 intermédiaire et CD62L⁺ (**Tableau V**). Comme leur nom l'indique, ils sont rapidement recrutés sur les sites d'inflammation, notamment via CCR2, et ce dans de nombreux modèles inflammatoires, comme l'infection péritonéale (Geissmann et al., 2003), l'inflammation de la rétine (Xu et al., 2005), ou des modèles d'infection bactérienne (Robben et al., 2005). Grâce à des modèles de reconstitution, il a été montré que dans des conditions inflammatoires, les MO inflammatoires peuvent se différencier en CD (apparition du marqueur CD11c) capables d'activer les lymphocytes T naïfs (Geissmann et al., 2003).

Les MO « résidents » sont un peu plus grands que les MO inflammatoires (10-14µm de diamètre) et sont caractérisés par une faible expression du marqueur Ly6C. Ils expriment

fortement CX3CR1, mais pas le CCR2 ni le CD62L (**Tableau V**). Ils ont été nommés ainsi car lors de greffe monocyttaire, ils restent plusieurs jours dans les organes des souris hôtes. Tout comme les MO humains CD16+, ils ont initialement été décrits comme n'étant pas recrutés au stade précoce vers les sites inflammatoires (Geissmann et al., 2003). Cependant récemment, la même équipe a observé une infiltration des MO résidents dans les premières heures qui suivent une lésion tissulaire, 5 fois supérieures à celle des MO inflammatoires et qu'ils produisent du TNF α à un stade très précoce et de façon transitoire (Auffray et al., 2007). Dans ce travail, les auteurs mettent en évidence des MO CX3CR1+ qui « patrouillent » à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Ces mouvements de patrouille sont différents du mouvement de « rolling » décrit précédemment car ils se font dans des directions indépendantes du sens du flux sanguin. La vitesse des MO en « patrouille » (12 μ m/min) reste en outre très inférieure à celle que l'on observe dans le phénomène de roulement (40 μ m/sec) (Ley et al., 2007).

	Ly6C ^{high}	Ly6C ^{low}
MHC II	-	-
Ly6G	-	-
CD11b	+	+
CD115 (M-CSF-R)	+	+
CX ₃ CR1	Intermediate	High
CCR2	+	-
CD62L (L-selectin)	+	-
CCR5	-	+
CD11c	-	+
CD43	-	+
MBR	-	+
VLA-4	-	+
LFA-1	Intermediate	High
ICAM-1	Intermediate	High
F4/80	Intermediate	High

Tableau V : Profil d'expression de protéines membranaire des deux sous populations monocytaires.
(D'après Dominguez PM, Ardavin C, Immunol Rev 2010)

Ces résultats remettent en cause la pertinence de la classification des MO murins Ly6C high comme inflammatoires et Ly6C low comme résidents et suggèrent la nécessité de proposer une nomenclature qui ne soit pas basée sur les fonctions de ces populations tant que celles ci n'auront pas été parfaitement élucidée. D'autre part, la classification établie ne met pas en évidence la réelle hétérogénéité des sous populations monocytaires.

Notamment, depuis 2003 de nombreuses études menées chez l'homme ont mis en évidence l'existence d'une troisième sous population monocyttaire : les **MO intermédiaires** CD14+ CD16+. Bien qu'encore mal caractérisées, des études ont déjà montré l'implication de cette population dans des pathologies majeures telles que l'athérosclérose associée aux maladies

rénales (Heine et al., 2008; Rogacev et al., 2010) et l'infection VIH (Ellery et al., 2007; Jaworowski et al., 2007).

Ces MO présentent également un phénotype intermédiaire pour l'expression de nombreux RCK (par exemple CCR2 et CX3CR1), mais ils se distinguent clairement par leur expression de CCR5 et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE,CD143) (Ulrich C et al., 2006). Des expériences de différenciation des MO « classiques » en MO non « classiques » induite par des cytokines, confortent l'hypothèse selon laquelle ils représentent un stade intermédiaire de différenciation entre ces deux populations (Skinner et al., 2005).

En 2011, A.M. Zawada et al ont analysé l'expression génique de cette population et révélé des marqueurs uniques de cette sous-population lui conférant des fonctions immunologiques distinctes des deux autres populations. Ainsi les MO CD14 + + CD16 + sont impliqués dans la présentation de l'antigène via CD74, HLA-DR, IFI30, CTSB, dans l'activation de l'inflammation via TGFB1, AIF1, PTPN6 et dans l'angiogenèse via TIE2 et CD105(Zawada et al., 2011).

Chez la souris, l'existence des MO « intermédiaires » n'est pas clairement établie. Ils se caractériseraient comme étant Ly6C low, CCR2-, CX3CR1++. Comme chez l'homme, les MO « intermédiaires » murins pourraient correspondre à un stade de maturation intermédiaire entre les MO Ly6C high et les MO Ly6C low (Sunderkotter et al., 2004; Tacke et al., 2006).

Bien qu'il semble aujourd'hui évident que les MO murins intermédiaires représentent un stade transitoire dans la différenciation des Ly6C high en Ly6C low, aucune étude n'a montré que la différenciation inverse n'existait pas.

En conclusion, la population monocyttaire est hétérogène et se divise principalement en deux sous-populations ayant entre elles des relations étroites de fonctions et de différenciations. Leur différence phénotypique et fonctionnelle notamment au niveau de leur recrutement est importante pour la compréhension des mécanismes pathologiques et permet d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'implication de chacune de ces sous-populations en conditions normale et inflammatoire reste à élucider ainsi que l'analogie partielle entre les populations monocytaires humaines et murines. La ressemblance des sous-populations dans les deux espèces est principalement basée sur l'expression de molécules de surface (CCR2, CX3CR1, CD62L). Ces caractéristiques communes sont à mettre en opposition avec la différence des proportions initiales de ces deux sous-populations et leurs différences de recrutement en cas d'inflammation. Les MO humains CCR2- sont les premiers à être recrutés

tandis que chez la souris se sont les MO CCR2+. En effet, bien qu'il existe de nombreuses similitudes entre les MO humains et murins, les homologues fonctionnelles entre ces deux espèces restent à établir avec précision.

2.2 Origine des MO

Les MO circulants sont issus de progéniteurs granulocytaires/monocytaires communs (PGM) dérivés des progéniteurs myéloïdes communs (PMC) provenant de la différenciation initiale des cellules souches hématopoïétiques. Les PGM constituent les CFU-GM, puis donnent naissance aux CFU-G et CFU-M. C'est à partir des CFU-M que prennent naissance les précurseurs monocytaires. De nombreuses molécules, telles que les cytokines, déterminent ces différentes étapes de la différenciation monocyttaire. Des études *in vitro* ont montré que sous l'influence d'IL3 et de GM-CSF, les cellules souches s'engagent dans la voie de différenciation de la lignée granulo-macrophagique jusqu'à produire des MO immatures sous l'effet du M-CSF (**figure 9**). Le rôle du M-CSF dans le développement de la lignée monocyttaire a été confirmé avec l'utilisation des souris déficientes en M-CSF (op/op), partiellement déficientes en macrophages. Les MO immatures se multiplient ensuite tout en continuant leur différenciation. Lorsque la maturation cellulaire est suffisante, les MO quittent la moelle osseuse et se retrouvent dans le sang.

Jusqu'à présent, l'origine des MO « inflammatoires » semble limitée à la moelle osseuse, lieu de leur développement. Par contre, l'origine de la population monocyttaire Ly6C low CCR2-CX3CR1high a toujours été très controversée. Il n'est toujours pas établi si cette population n'est que le produit d'une différenciation des MO inflammatoires ou s'ils ont une production propre ou si les deux processus co-existent. (Varol et al., 2007). En effet, il serait possible que seuls les MO Ly6C high, CCR2+, CX3CR1low sortent de la moelle osseuse et qu'ils se différencient ensuite en périphérie en Ly6C low. Sunderkotter et al proposent ainsi que les MO circulants inflammatoires peuvent voir diminuer leur expression de ce marqueur et devenir des MO Ly6C low, aussi bien en conditions homéostatique qu'inflammatoire (Sunderkotter et al., 2004). Notons que la sortie de la moelle serait en partie régie par l'axe CCR2-CCL2. En effet les souris déficientes pour CCR2 ont une forte diminution des MO inflammatoires circulants et une augmentation de leur nombre dans la moelle osseuse.

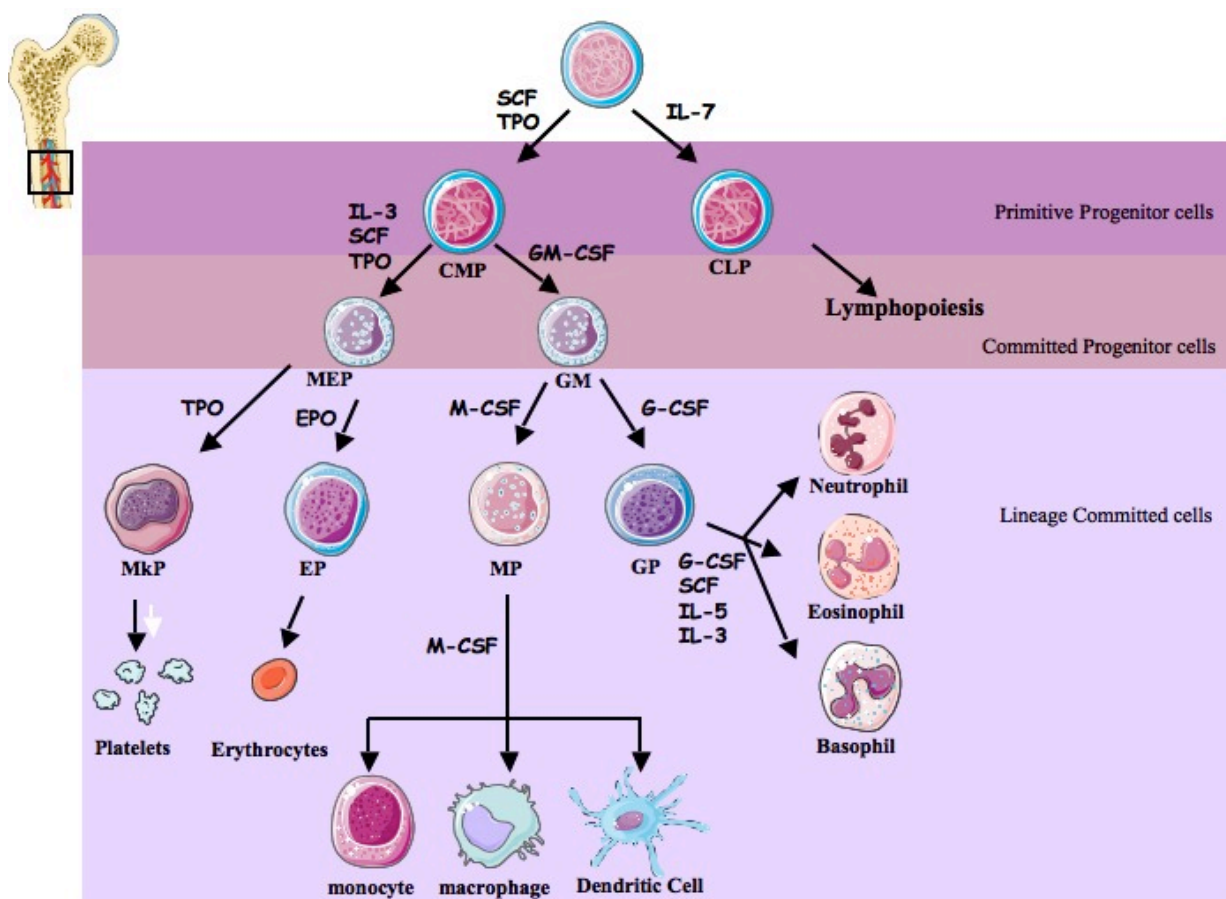


Figure 9 : Schéma simplifié de la myélopoïèse (D'après Robb L, *Oncogene* 2007) BCP : B-cell progenitor; CLP : common lymphoid progenitor; CMP : common myeloid progenitor; EP : erythroid progenitor; HSC : hematopoietic stem cell; GMP : granulocyte–macrophage progenitor; MEP : megakaryocyte erythroid progenitor; MkP : megakaryocyte progenitor

Depuis 2009, le dogme de la moelle osseuse comme unique source des MO est remis en question. Dans un modèle d'infarctus du myocarde, Swirski et al ont montré qu'il existait également un réservoir splénique de MO (Swirski et al., 2009). Ils sont d'un point de vue morphologique et transcriptionnel complètement indifférenciables des MO du sang. Les sous-populations monocytaires sont d'ailleurs retrouvées dans les mêmes proportions dans le réservoir splénique que dans le sang. Il semble en outre que les MO spléniques soient générés dans la moelle osseuse. Dans un modèle d'athérosclérose, la même équipe a mis en évidence des souches hématopoïétiques et des cellules progénitrices provenant de la moelle osseuse au niveau de la pulpe rouge de la rate. Les MO nés dans des niches extramédullaires circulent et s'accumulent en abondance dans les plaques d'athéromes (Swirski et al., 2012). Cette découverte est cohérente avec le fait que les cellules souches hématopoïétiques, localisées au niveau du foie pendant la vie fœtale se relocalisent dans la moelle osseuse et la rate à l'âge adulte. Ces résultats indiquent que les sites extramédullaires complètent la fonction

hématopoïétique de la moelle osseuse par la production de cellules circulantes inflammatoires qui infiltrent les lésions d'athérosclérose. La fonction de ce second réservoir serait d'assurer une mobilisation dans le sang très rapide et donc un recrutement précoce au niveau du site inflammatoire (Shi and Pamer, 2011).

2.3 Le devenir des monocytes : Les macrophages

Les MP constituent l'ultime étape de différenciation des MO, qui intervient après l'infiltration des MO dans les tissus. Cette différenciation en CD ou en MP est notamment contrôlée par l'environnement cytokinique.

Les MP sont des cellules plus grosses que les MO, faisant jusqu'à 50µm de diamètre. Comparés aux MO, les organites cellulaires des MP comme les lysosomes, l'appareil de Golgi et les vacuoles de phagocytoses sont plus développés et leur confèrent des capacités de migration, de phagocytose et de production de cytokines plus élevées. Les MP constituent une population cellulaire hétérogène très plastique capable de répondre efficacement aux modifications d'environnement. Ainsi, ils peuvent se classer en trois grandes sous populations, les MP « M1 » qui activent une réponse cellulaire, les MP « M2 » qui activent plutôt une réponse humorale (**figure 10**) et les MP résidents impliqués dans l'homéostasie tissulaire.

a. Les MP résidents

Ces derniers par opposition aux MP issus de l'infiltration des MO sanguins peupleraient les organes au cours de l'embryogenèse et seraient capables, en conditions non pathologiques, de se renouveler sans recrutement monocyttaire (Gordon and Taylor, 2005). Selon leur localisation anatomique, les macrophages résidents ont un nom et une fonction spécifique. Dans la moelle osseuse, ils sont appelés ostéoclastes et participent à son remodelage ; dans le foie ils sont appelés cellules de Kupffer et ont pour rôle de phagocyter des particules étrangères ; dans le cerveau on parle de microglies : leur fonction est d'assurer l'homéostasie, la protection du milieu neurale...etc.

De récentes études se sont concentrées sur la provenance et l'origine des macrophages. Ginhoux et al. mettent en évidence que les microglies sont une population ontogénétiquement distincte des cellules mononuclées (Ginhoux et al., 2010). Jenkins et al montrent que lors

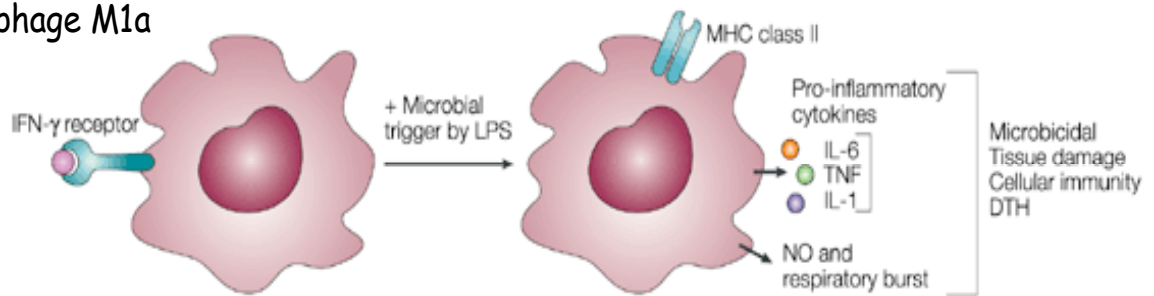
d'une d'inflammation, l'augmentation locale du nombre de macrophage de type Th2 n'est pas due à un recrutement des MO sanguins mais à une prolifération locale (Jenkins et al., 2011). Ces résultats remettent en cause la fonction de cette population et révèlent la nécessité de ne plus limiter les stratégies de contrôle de l'inflammation au seul recrutement des MO du sang.

b. Les M1

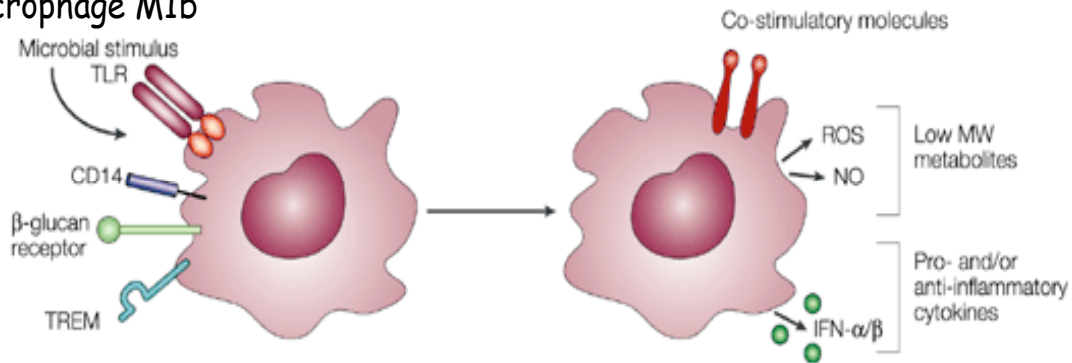
Sur le plan fonctionnel, les MP M1 sont des cellules effectrices spécialisées dans la destruction des microorganismes. Ils se caractérisent par une forte capacité d'endocytose et de destruction des pathogènes intracellulaires (Mosser and Handman, 1992). Ils ont la capacité de sécréter une quantité importante de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-18, le TNF α et l'IL-12 (Trinchieri et al., 1993) et de CK telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Les MP M1 expriment à leur surface un niveau élevé de molécules du CMH II ainsi que des molécules de co-stimulation comme CD80 et CD86. La différenciation des MP en M1 ou MP « pro-inflammatoires » se fait classiquement en réponse à une stimulation par l'IFN γ , le TNF α et/ou par des produits microbiens tel que le LPS.

L'IFN γ est abondamment produit par les lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques et les lymphocytes CD4⁺ de type Th1. L'activation des MP en type M1 est dépendante de l'immunité acquise et innée. Cette différence d'activation conduit à une variation de fonction. Seule l'activation par l'immunité acquise déclenche la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et d'IL-12, augmentant ainsi la capacité de phagocytoses des MP. Ainsi selon la voie d'activation, Martinez et collaborateurs proposent de subdiviser les M1 en deux sous classes, M1a et M1b (Martinez et al., 2009).

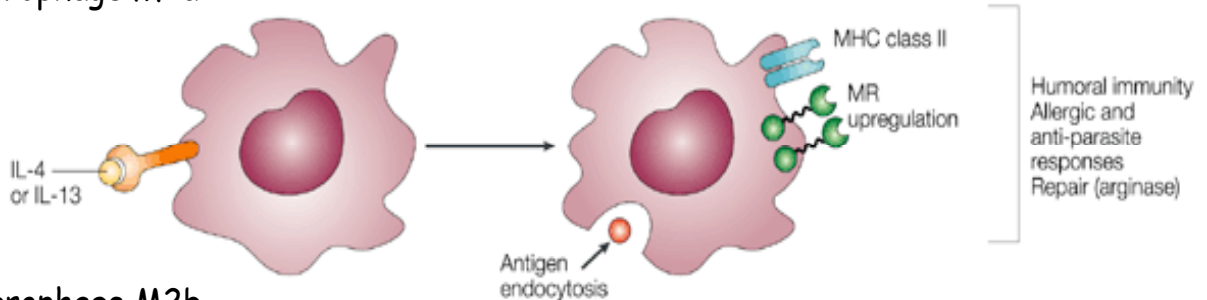
Macrophage M1a



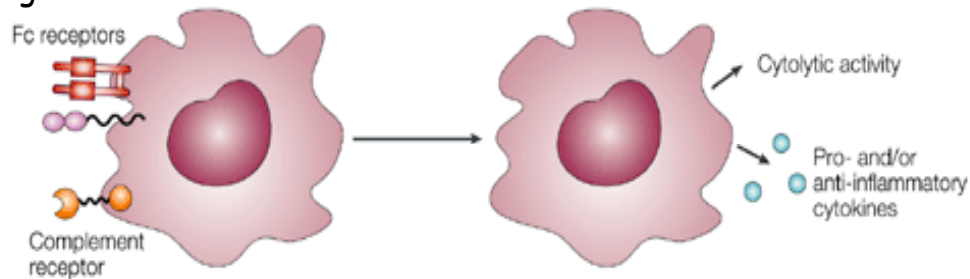
Macrophage M1b



Macrophage M2a



Macrophage M2b



Macrophage M2c

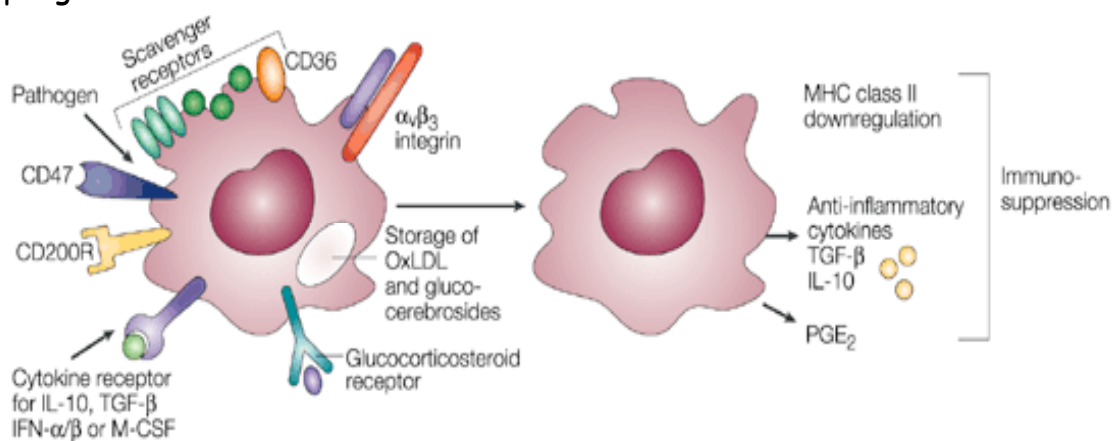


Figure 10 : Représentations des mécanismes d'activation des différentes sous population de macrophage. (D'après Gordon S, Nature Rev Immunol 2003)

c. Les M2

Les MP **M2** ou MP « **anti-inflammatoires** » sont divisés en 3 sous-populations fonctionnellement et phénotypiquement proches. Ils jouent un rôle important dans la mise en place d'une réponse de type Th2 et sont impliqués dans l'angiogenèse, dans la réparation et le remodelage des tissus endommagés. Les trois populations de MP M2 sont classées en fonction des signaux inducteurs nécessaires à leurs différenciations (Mantovani et al., 2004; Mosser and Zhang, 2008).

- Les MP M2a, ou MP cicatriciels, sont différenciés in vitro à partir de MO par la présence d'IL-4 ou IL-13. L'IL4 est massivement produite par les basophiles et les mastocytes lorsqu'il y a une dégradation tissulaire mais également par les cellules de type Th2. Ces cytokines ont sur les MP un effet anti-inflammatoire. Elles réduisent la sécrétion des médiateurs inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF α , l'IL2, le GM-CSF, le CCL2 et l'IFN γ . Les MP M2a présentent une diminution de l'expression des marqueurs de surface CD14, CCR5 et du CMH II, et une augmentation de l'expression des récepteurs dits « scavengers » comme CD163, SRBI. Ils participent au processus de réparation tissulaire en produisant de la Fibronectin-1, du facteur XIII de coagulation et de l'IGF-1 (Insuline like growth factor).

- Les MP M2b, ou MP de type II, sont des MP activés par le LPS ou l'IL-1 β et par la reconnaissance du fragment Fc des immunoglobulines. Ils se caractérisent par une faible production d'IL-12 et une forte production d'IL-10, ce qui favorise la production d'anticorps, essentiellement des IgG1. Les MP M2b se distinguent des M2a par une plus forte production d'IL-10 reconnu pour ses capacités immunomodulatrices. Ces MP se distinguent également par une production significative de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α qui vont activer la réponse humorale. Enfin, les MP M2b sont décrits comme producteurs du CCL1, la seule CK agoniste de CCR8, ce qui pourrait jouer un rôle dans le recrutement de cellules T régulatrices. En 2010, L Lefèvre et al ont mis en évidence la plasticité de cette population. En effet sous régime hyperlipidique, le ligand PPAR γ est capable de convertir les MP M2b en M2a ce qui a pour conséquence de faciliter l'élimination intestinale de *Candida Albicans* (Lefevre et al., 2010).

- Les MP M2c, ou « regulatory MP » sont les MP issus de stimulation avec de l'IL-10, du TGF β ou des glucocorticoïdes. Bien que ces trois molécules agissent sur les MP par

différentes voies, elles déclenchent une réponse comparable. Ce sont de mauvaises cellules présentatrices d'antigène notamment à cause de la production d'IL-10 qui réduit l'expression du CMH-II. Le TGF β induit chez les MP une diminution de l'expression du récepteur « scavengers » CD163 et inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (Bogdan et al., 1992). Les glucocorticoïdes, en se fixant sur leurs récepteurs membranaires, vont inhiber la sécrétion de nombreuses cytokines inflammatoires tel TNF α , l'IL-1, -4, -5, -6, -8, -12, ainsi qu'une diminution de la production de radicaux libres.

Les MP constituent donc une population cellulaire hétérogène sur le plan fonctionnel. La plasticité des MP leur permet d'adapter la réponse inflammatoire à leur micro-environnement et participe aussi à la polarisation de la réponse immune. L'existence même de cette hétérogénéité soulève des interrogations quand à la spécificité fonctionnelle et l'implication des MP dans le développement de pathologies. Par exemple, la découverte récente de la présence des MP M2 dans les lésions athérosclérotiques humaines, démontre pour la première fois l'existence d'une population hétérogène de MP au sein des plaques d'athérosclérose et met en évidence une nouvelle complexité du processus (Bouhlef et al., 2007).

2.3 Rôle des monocytes

La fonction des MO en condition homéostatique est de fournir aux tissus une source de repeuplement en MP résidents et en CD. En réponse aux signaux inflammatoires les MO se déplacent rapidement au site enflammé et s'y différencient en MP ou en CD. Les MO ont une demi-vie courte dans la circulation, estimée à 1 jour chez la souris (Liu and Nussenzweig, 2010). Leur rôle ne se limite pas à celui de surveillance et de réservoir. En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence que les MO circulants pouvaient avoir directement des fonctions effectrices dans le sang. Les MO participent par exemple à la « clairance » de micro-organismes : chez la souris, c'est CCR2, qui en contrôlant l'émigration des MO de la moelle osseuse vers la circulation sanguine, est essentiel au recrutement des MO pour la défense contre *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* et *Cryptococcus neoformans* (Serbina et al., 2008).

Les MO sont également impliqués dans la clairance de débris apoptotiques (Peng et al., 2009) et la prise en charge des lipides circulants. Les MO chargés en lipide sont activés avant même

qu'ils ne pénètrent dans l'endothélium au niveau des sites de formation des plaques d'athérosclérose. (Swirski et al., 2009).

Le mode de recrutement des sous-populations monocytaires inflammatoires et résidentes au site inflammatoire n'est pas encore clairement établie. Certains avancent l'hypothèse d'un recrutement spécifique et séquentiel. Ainsi lors d'une infection péritonéale à *Listeria Monocytogenes*, Auffray et al. montrent que les premiers MO recrutés sont les Ly6C low (Auffray et al., 2007). En sécrétant du TNF α et des CK ils vont ensuite permettre le recrutement des MO Ly6C high pour créer une réaction inflammatoire. Puis intervient une deuxième vague de recrutement de MO Ly6C low pour la réparation tissulaire. A l'inverse dans un modèle d'infarctus du myocarde, Nahrendorf et al. mettent en évidence un premier recrutement rapide des MO Ly6C high puis dans un deuxième temps celui des MO Ly6C low pour réguler l'inflammation, stimuler l'angiogenèse et l'activité cicatricielle (Leuschner et al., 2012). D'autres, comme Arnold et al dans un modèle de régénération musculaire, proposent l'hypothèse d'une différenciation sur site des MO Ly6C high recrutés en Ly6C low afin d'assurer la réparation tissulaire (Arnold et al., 2007).

Ainsi le rôle des sous populations monocytaires et le type d'agression semblent déterminer leur recrutement et des travaux complémentaires sont attendus afin de clarifier ce processus. Sa compréhension est très importante car elle permettra de donner des pistes de nouveaux traitements pour moduler le nombre et la répartition des MO au site d'inflammation.

II Athérosclérose

L'athérosclérose est la première cause de mortalité dans le monde. Avec 36.5% de la mortalité globale, c'est le premier problème de santé publique du monde industrialisé. Son épidémiologie est très variable suivant les régions du monde, avec une situation particulièrement inquiétante dans les pays de l'hémisphère Nord comme les Etats-Unis mais aussi dans des pays émergents comme le Mexique. L'athérosclérose n'est pas pour autant une pathologie des temps modernes. Le plus vieux cas d'athérosclérose a été diagnostiqué sur une momie datée de plus de 1500 ans avant J.-C.

1. Généralités

1.1 Définition et épidémiologie

L'athérosclérose est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères, *tunique regroupant l'endothélium et l'espace sous endothélial*, conduisant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média »(World Health Organization 1958) (**figure 11**).

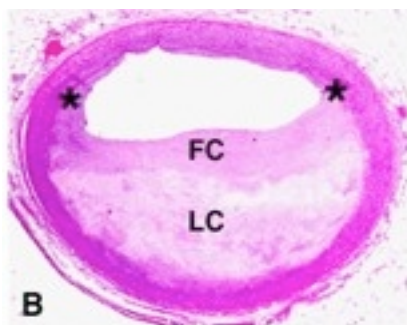


Figure 11 : Photographie d'une plaque d'athérosclérose humaine au niveau des artères coronaires. (Robert G. Micheletti et al, Cardiovascular Pathology 2009.)
LC : Coeur lipidique ; FC : Chape fibreuse ;
* : Limite de la plaque

Les accidents ischémiques aigus sont la traduction clinique de l'athérosclérose, consécutifs à une rupture ou une érosion de la plaque d'athérosclérose. En tête des pathologies associées, on retrouve les coronaropathies avec 115 000 infarctus/an en France suivie des accidents vasculaires cérébraux avec 100 000 par an dont 50% sont liées à l'athérosclérose. C'est l'une des maladies la plus fréquente chez l'homme adulte.

Les mécanismes de formation des plaques d'athérosclérose sont complexes : les facteurs clefs de cette formation sont les dyslipidémies et l'inflammation. En 1989, les études de Schwenke et Carew ont mis en évidence que les premiers stades de formation de la plaque sont dus à une accumulation pré-lésionnelle de lipoprotéines de basse densité (LDL) riches en cholestérol athérogène. Ces lipoprotéines se lient aux protéoglycanes de la matrice, au niveau des sites de prédilection de formation des plaques d'athérome (Schwenke and Carew, 1989). Depuis, Sary a proposé en 1995 une classification détaillée des événements pathologiques en sept stades de gravité croissante, basée sur la description anatomopathologique d'un grand nombre d'artères d'enfants et de jeunes adultes. Cette classification suggère que les lésions évoluent avec l'âge du sujet en passant successivement d'un type lésionnel au type immédiatement supérieur (Sary et al., 1995). Il existe trois sites de localisation préférentielle de dépôt des plaques : les branches principales de l'aorte ascendante et de la crosse aortique, les branches viscérales de l'aorte abdominale et les branches de division de la même aorte abdominale.

1.2 Facteurs de risques et prédisposition

On distingue deux types de facteurs prédisposant à l'athérosclérose : les facteurs constitutionnels génétiques et les facteurs environnementaux pouvant être évités ou traités. (Tableau VI)

a. Facteurs constitutionnels

L'incidence de l'athérosclérose croît avec l'âge et varie en fonction du sexe. En effet, l'incidence est plus élevée chez l'homme que chez la femme jusqu'à la ménopause où l'effet protecteur des œstrogènes disparaît. L'effet de l'œstradiol sur l'athérosclérose est ambigu et dépend du stade de développement de la plaque, de la prédominance de l'effet endothélial protecteur ou de l'effet pro-inflammatoire, néfaste pour la stabilité de la plaque par la production d'INF γ (Gourdy et al., 2003).

Certaines familles semblent prédisposées à cette maladie avec un risque élevé indépendamment d'autres facteurs de risque. Ceci révèle l'implication de facteurs génétiques dans le développement de l'athérosclérose. Des études épidémiologiques chez l'homme ont mis en évidence des polymorphismes de gènes codant pour les molécules impliquées dans l'inflammation liée à l'athérosclérose. Ainsi deux polymorphismes du récepteur CX3CR1 ont été identifiés, V249I et T280M et associés à une diminution du risque d'accidents

cardiovasculaires (Moatti et al., 2001). Des études ont porté également sur le polymorphisme des molécules liées à l'inflammation. Un polymorphisme de CD14 semble augmenter le risque d'infarctus du myocarde. À ce jour de nombreuses études sont en cours sur le rôle du polymorphisme des CK ainsi que des autres molécules de l'inflammation dans les maladies cardio-vasculaires.

b. Facteurs environnementaux

On distingue deux sous types de facteurs environnementaux ; les facteurs de risques majeurs souvent pathologiques et les facteurs mineurs liés au mode de vie. L'athérosclérose est fortement corrélée à plusieurs facteurs pathologiques comme l'obésité, l'hypertension, l'hyperglycémie et les infections bactériennes. Dans le cas de l'obésité, - l'excès de LDL, transporteur circulant de cholestérol et de molécules liposolubles, est responsable de la mise en place d'une réaction inflammatoire qui permet le développement de plaques d'athéromes (Yudkin et al., 1999). L'hyperglycémie associée aux diabètes entraîne l'augmentation de la production des cytokines et d'autres voies de l'inflammation (Schmidt et al., 1999). Certains agents infectieux peuvent de la même manière être des stimuli de la réaction inflammatoire de l'athérosclérose (Libby et al., 1997). Dans ce sens, il a été établi une relation entre les maladies parodontales et cardio-vasculaires. Une mesure directe de la charge bactérienne présente sur la plaque dentaire sous-gingivale rapporte un lien entre la charge bactérienne et l'épaisseur intima média carotidienne. Ce lien n'existe qu'avec 4 souches de bactéries causant des parodontites. Il y a donc une certaine spécificité des germes à l'origine de l'athérosclérose (Desvarieux et al., 2005). Le cytomégalovirus (CMV) et la *Chlamydia pneumoniae* sont les principaux pathogènes associés à l'athérosclérose (Ibrahim et al., 2005; Kwon et al., 2004). Cependant les nombreuses études menées sur ce sujet ainsi que leurs résultats disparates n'ont pas permis d'établir un lien définitif entre les pathologies.

Les facteurs de risques mineurs incluent 1) le tabagisme, entraînant une modification de la viscosité plasmatique, l'agrégation plaquettaire et une diminution de la vasodilatation, 2) la sédentarité favorisant l'obésité, 3) un mode de vie stressant conduisant à une hypertension artérielle qui fragilise le système artériel. Ces différents facteurs influent sur l'initiation et le développement de la maladie et peuvent aisément être corrigés.

Facteurs génétiques	Facteurs environnementaux
Taux plasmatiques élevés de LDL/VLDL	Régime alimentaire riche en graisses
Taux plasmatiques réduits de HDL	tabagisme
Taux plasmatiques élevés de lipoprotéines (a)	manque d'activité physique
Taux plasmatique élevés de facteurs hémostatiques	Agents infectieux
Tension artérielle élevée	
Antécédants familiaux de maladies cardiovasculaires	
Diabète et obésité	
Sexe masculin	
Marqueur de l'inflammation plasmatiques élevés (CRP)	
Syndrome métabolique	

Tableau VI : Facteurs de risque génétiques et environnementaux associés à l'athérosclérose
(D'après Lusis, Nature 2000).

2. Pathogénèse

Le point initiateur de l'athérogenèse est une altération de l'homéostasie de l'endothélium par des contraintes hémodynamiques, telles que des turbulences au niveau des coudures/bifurcations, conduisant à une modification de la perméabilité vis-à-vis des éléments constitutifs du sang. Cette perméabilisation permet la formation de la plaque et l'accumulation de LDL dans l'intima. Les LDL infiltrent l'espace sous endothélial et subissent des modifications oxydatives entraînant l'activation des cellules endothéliales. Ces dernières expriment alors des protéines d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1 qui vont permettre le

recrutement des MO ar adhérence à l'endothélium. Les MO infiltrent à leur tour l'endothélium par diapédèse et se différencient en MP dans l'intima. Ces MP expriment divers récepteurs qui reconnaissent les LDL oxydées permettant leur internalisation et leur accumulation intracellulaire : on parle alors de MP spumeux. A ce stade, les cytokines sécrétées par l'endothélium activé et les MO entraînent la migration des cellules musculaires lisses au niveau de la lésion. C'est la formation de stries lipidiques. Les MP produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui favorisent le recrutement de nouveaux MO ainsi que des facteurs pro-thrombogènes. Cette boucle d'amplification génère une réaction inflammatoire chronique locale qui favorise le développement de la plaque (**figure 12**). Les cellules musculaires lisses mobilisées synthétisent alors une matrice de tissu conjonctif à base de collagène, de fibres élastiques et de protéoglycanes pour former une plaque fibreuse. Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées, comme le TNF α et l'IL-1 peuvent induire dans les cellules de la plaque l'expression de métalloprotéinases qui ont une activité de dégradation de cette matrice extra-cellulaire ayant pour conséquence la fragilisation des plaques. (Ross, 1999; Steinberg and Gotto, 1999). A ce stade, la plaque d'athérome est constituée d'un noyau nécrotique (débris cellulaires, cristaux de cholestérol et de calcium), entouré d'une couche fibreuse (cellules musculaires lisses, cellules spumeuses, cristaux de cholestérol). Bien que déterminant, le cholestérol n'occupe que 10% du volume total de la plaque. Il existe deux types de plaques fibreuses, les stables qui évoluent très progressivement et les instables qui contiennent un noyau lipidique important et qui présentent un risque évolutif aigu à savoir la rupture de la chape fibreuse.

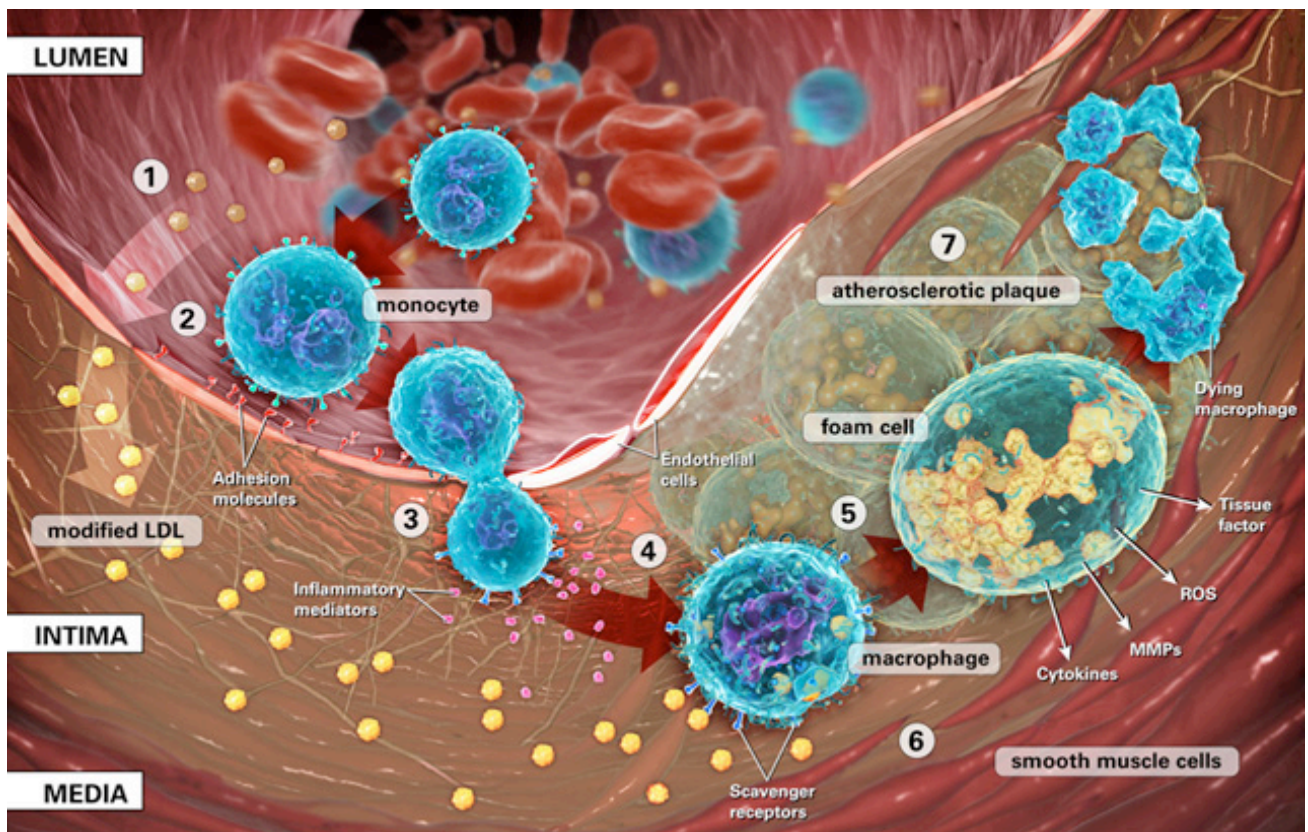


Figure 12 : Schéma simplifié des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des plaques d'athérosclérose. (D'après 2012 InViVo Communications™ Inc.)
 1 : Mobilisation des monocytes au niveau de la lésion ; 2 : Adhésion des monocytes au niveau de l'endothélium ; 3 : Diapédèse ; 4 : Recrutement des macrophages au niveau de la plaque ; 5 : Internalisation des LDL, formation des macrophages spumeux, 6 : migration des cellules musculaires lisses au niveau de la lésion, formation de la chape fibreuse. (MMPs : Métalloprotéinase, ROS : espèce réactive oxygénée)

2.1 Complications de l'athérosclérose

L'évolution de la plaque d'athérosclérose est souvent asymptomatique jusqu'à la rupture de la chape fibreuse recouvrant la plaque. Cet événement est à l'origine de la survenue des complications de l'athérosclérose et conduit à l'apparition des manifestations cliniques, du fait qu'elle expose à la thrombose artérielle. Les causes de cette rupture peuvent être extrinsèques, comme une poussée d'hypertension artérielle qui engendre des pressions mécaniques sur la plaque ou intrinsèques liées à la vulnérabilité de la plaque. Les principaux facteurs de cette vulnérabilité sont l'ampleur du cœur lipidique et le niveau d'inflammation de la chape fibreuse. Les manifestations cliniques les plus répandues de la maladie sont les ischémies coronariennes, cérébrales ou des membres inférieurs dus à la sténose ou à la thrombose des vaisseaux.

a. La sténose

En réponse à l'augmentation de la tailles des plaques d'athéromes, les vaisseaux ont la capacité d'élargir leur diamètre jusqu'à un certain point (Glagov et al., 1987). Lorsque celui-ci est dépassé, la plaque entraîne un rétrécissement de la lumière artérielle, c'est la sténose. L'écoulement et le débit du sang se retrouvent perturbés, ce qui a pour conséquence de diminuer l'apport sanguin artériel vers les organes.

b. La thrombose

La taille du noyau athéromateux détermine la vulnérabilité de la plaque et la susceptibilité à se rompre. La rupture des plaques instables met le sang circulant et le noyau en contact. La rupture peut être reconnue comme une plaie entraînant une activation des plaquettes qui vont s'agréger à ce niveau et sécréter des substances qui contractent le muscle artériel. Cette contraction ajoutée à l'agrégation plaquettaire entraînent la formation d'un thrombus qui obstrue l'artère et freine l'irrigation de l'organe. C'est l'ischémie aigue thrombotique, complication la plus fréquente de l'athérosclérose. Également, le thrombus peut se détacher pour former un embolie capable d'occlure d'autres artères et provoquer ainsi une ischémie par embolie (Lucas and Greaves, 2001).

2.2 Modèles murins

Au cours de la dernière décennie, la souris est devenue le spécimen le plus utilisé pour modéliser l'athérosclérose. L'intérêt initial de ce modèle animal était fondé sur la grande diversité des souches consanguines à fond génétique défini et la capacité à modifier génétiquement les souris, offrant ainsi un moyen facile de relier les gènes à l'apparition de l'athérosclérose. La quasi-totalité des modèles d'athérosclérose chez la souris est basé sur les perturbations du métabolisme lipidique. À ce jour, aucune lignée de souris sauvage connue ne développe spontanément de l'athérosclérose. Afin d'accélérer le développement de la maladie, les souris sont soumises à un régime alimentaire modifié enrichi en graisses saturées, en cholestérol et en cholate. Il est à noter que l'utilisation du cholate est controversée car il est soupçonné d'induire des réactions inflammatoires. Ces régimes gras augmentent la concentration plasmatique de cholestérol en amplifiant la fraction VLDL tandis que sous régime normal, le cholestérol est principalement pris en charge par la fraction HDL.

Les souris C57BL/6 sont les plus susceptibles de développer de l'athérosclérose sous régime modifié tandis que les souris BALB/c ont une susceptibilité intermédiaire. Cependant les souris C57BL/6 offrent un modèle limité car même après une longue période sous régime hyperlipidique, ces souris présentent des lésions simples uniquement localisées au niveau du sinus aortique. La souche C57BL/6 a été par la suite délaissée au profit d'autres modèles murins d'athérosclérose capables de développer spontanément des plaques sous régime normal et enrichie (Paigen et al., 1987).

On distingue deux types de manipulation génétique pour l'élaboration de modèles murins : les modèles transgéniques basés sur la surexpression de gènes spécifiques et les modèles d'inactivation génétique. Dans les deux cas les gènes ciblés dans l'athérosclérose sont ceux impliqués dans la régulation du métabolisme des lipoprotéines. Les souris transgéniques pour l'apolipoprotéine B, protéine majoritairement impliquée dans le métabolisme des VLDL et des LDL, développent des lésions d'athéroscléroses simples essentiellement constituées de macrophage spumeux (Purcell-Huynh et al., 1995). Les souris transgéniques pour l'Apolipoprotéine E (ApoE), transporteur de cholestérol et de lipides présent à la surface de la plupart des lipoprotéines, développent des plaques d'athérosclérose plus complexes principalement constituées de MP spumeux et d'une petite cape fibreuse. Sous régime hyperlipidique les plaques d'athéromes formées deviennent encore plus complexes avec une cape fibreuse plus grande, avec d'importantes zones lipidiques et des zones nécrotiques (Fazio et al., 1994; Zhang et al., 1992).

La délétion du gène codant pour l'ApoE conduit à une hyperlipidémie associée à une augmentation de la taille des particules VLDL. Les plaques formées sont principalement constituées de MP spumeux et d'importantes lésions fibro-lipidiques évoluant avec l'âge de la souris. Ce processus peut-être accéléré sous régime hyperlipidique. Ces souris déficientes pour le gène ApoE présentent des plaques complexes localisées à différents sites de prédisposition tels que le sinus aortique et l'aorte. Ce modèle est le plus utilisé pour l'étude des effets génétiques et pharmacologiques sur le développement des plaques d'athéromes. L'inactivation du gène codant pour le récepteur aux LDL offre un répertoire plus limité que le précédent car cette déficience conduit à un effet modeste sur l'hypercholestérolémie et sur le développement des plaques sous régime alimentaire classique. Sous régime alimentaire hyperlipidique, ces souris développent des plaques plus grosses et plus complexes avec l'apparition de calcification et de coeurs nécrotiques (Ishibashi et al., 1994).

L'utilisation des souris est un avantage considérable dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'athérosclérose et pour l'étude de nouvelles molécules pharmacologiques. Cependant, aucun modèle murin n'est capable de reproduire la rupture ou l'érosion de la lésion aboutissant aux complications de l'athérosclérose observée chez l'homme..

3 Monocytes et athérosclérose

Les MO et les MP sont les premières cellules inflammatoires à avoir été associées au développement de l'athérosclérose. En 1979, Gerrity et al identifiaient, dans un modèle porcin, les MO comme étant la population cellulaire prédominante dans les plaques d'athérosclérose. Chez l'homme, les MO sont présents dès le stade de la strie lipidique, premier stade visible de la lésion (Napoli et al., 1997).

Chez la souris, l'importance des MO dans le développement de la plaque d'athérome a été mise en évidence par l'étude des souris ostéopérotiques op/op qui sont déficientes en un facteur de croissance de la lignée myéloïde, le M-CSF. Son absence chez la souris entraîne un effondrement du nombre de MO sanguins, de MP tissulaires et d'ostéoclastes (responsable de l'ostéopétrose de ces souris). Lorsque ces souris op/op sont placées dans un contexte génétique propice à l'athérosclérose (croisement avec des souris déficientes pour le gène d'ApoE), elles développent des lésions aortiques dix fois plus petites que les souris sauvages malgré une augmentation du taux de cholestérol plasmatique (Qiao et al., 1997).

Plus récemment, une approche par déplétion des MO circulants a confirmé le rôle clé des MO-MP dans le développement des lésions d'athérosclérose chez la souris (Stoneman et al., 2007). L'athérosclérose est associée à un profond changement du nombre de MO circulants. Dans un contexte d'hypercholestérolémie, le nombre de MO est augmenté de manière drastique, leur survie et leur prolifération étant favorisées (Swirski et al., 2007). Des études rapportent que seule la population de MO inflammatoires Ly6C high subit cette monocytose tandis que le nombre de MO résidents reste inchangé (Swirski et al., 2007; Tacke et al., 2007). Ces études montrent également que les MO inflammatoires sont capables d'adhérer à l'endothélium activé, d'infiltrer la lésion et de devenir des MP constitutifs de la plaque (Swirski et al., 2007). Il existe de nombreuses études sur le recrutement des MO

inflammatoires dans la plaque d'athérosclérose et très peu sur celui des MO résidents. D'ailleurs l'origine des MP spumeux de la plaque n'est pas encore complètement déterminée mais ils semblent provenir indifféremment des deux sous-populations monocytaires.

L'étude des sélectines et des intégrines, molécules impliquées à différents stades de l'adhésion et du recrutement des MO au niveau de l'endothélium, a permis aussi de mettre en évidence l'association étroite entre le recrutement des MO et le développement de l'athérosclérose. En effet, les souris déficientes en P-sélectine présentent moins de MP infiltrés dans les plaques et développent moins de lésions que les souris sauvages (Johnson et al., 1997). De la même manière, les souris déficientes en E-sélectine présentent des plaques d'athérome moins importantes (Collins et al., 2000). L'association de ces deux déficiences conduit à une protection de 80% à un stade précoce et de 40% à un stade tardif du développement des plaques (Dong et al., 1998). Par ailleurs,, un niveau plasmatique élevé de P-selectine est associé à un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires chez l'homme (Woollard et al., 2006).

An et al apportent une distinction dans le recrutement des sous-populations monocytaires et décrit que les MO inflammatoires Ly6C high sont préférentiellement accumulés aux sites où l'endothélium est activé. Ils montrent que l'expression de PSGL-1 est corrélée à celle du marqueur Ly6C, concluant que la P-sélectine recrute préférentiellement cette sous- population monocyttaire aux sites inflammatoires associés à une dysfonction de l'endothélium (An et al., 2008). La modulation de l'activité des intégrines par l'utilisation d'anticorps dirigés contre ICAM-1 et VCAM-1 révèle que ces dernières molécules sont impliqués dans l'infiltration des MO au niveau de la plaque (Cybulsky et al., 2001; Patel et al., 1998) ; en effet, leur inhibition conduit à une réduction de leur infiltration et à une réduction de la taille des plaques d'athérosclérose.

Pour conclure, le recrutement des sous-populations monocytaires au niveau de la plaque est directement lié à son développement et est orchestré par différentes familles de molécules qui agissent de façon synergique : les sélectines, les intégrines et les CK. Chez l'homme, le nombre de MO circulants est un facteur de risque de l'athérosclérose indépendant des autres marqueurs conventionnels tel que la protéine C réactive (CRP, cf. ci dessous) (Chapman et al., 2004; Nozawa et al., 2010) et pourrait être utilisé pour le diagnostic de la progression des plaques d'athérome. Cependant, malgré des propriétés migratoires et d'adhésions distinctes, la

fonction spécifique des sous-populations monocytaires, leur recrutement, leur migration et leur interaction avec les autres cellules de la plaque restent à déterminer.

4 Athérocclérose : inflammation et chimiokines

L'inflammation est un facteur présent à tous les stades du processus de développement de l'athérosclérose. Elle se caractérise par l'expression de marqueurs à la surface des cellules impliquées et la sécrétion de cytokines inflammatoires. Elle favorise le développement et la progression des lésions d'athérosclérose en mettant en place des boucles d'auto-amplification (cf pathogénèse). De récentes observations cliniques ont montré que l'inflammation chronique passe d'un phénomène local à un phénomène inflammatoire systémique au cours de l'évolution de la pathologie. De nombreux marqueurs d'inflammation apparaissent dans le sérum des patients atteints d'athérosclérose comme la Protéine C Réactive (CRP), l'interleukine 6 et des molécules d'adhésion (Laframboise et al., 2012).

La CRP est l'un des meilleurs marqueurs de la réaction inflammatoire. Dans l'athérosclérose, elle est connue pour favoriser et accélérer le développement de la maladie en activant le complément et en augmentant l'expression de molécules d'adhésion et des cytokines. Notamment des CK, comme CCL2, qui sont les cytokines les plus impliquées dans l'athérosclérose.

Très tôt après leur découverte, les CK inflammatoires comme le CCL2 et CXCL2 ont été associées à l'athérosclérose du fait de leur production par les cellules endothéliales en réponse à une stimulation lipidique (Liao et al., 1991; Wang et al., 1990) et de leur expression au niveau des lésions aortiques (Koch et al., 1993; Yu et al., 1992). Un nombre important de travaux rapportent maintenant le rôle central des CK dans les pathologies cardiovasculaires, que ce soit au niveau du recrutement de cellules circulantes, dans l'activation des cellules musculaires lisses, au niveau de la stabilité des plaques, ou encore dans la coagulation liée à la thrombose (Moreau et al., 1999; Schechter et al., 1997; Valente et al., 1992).

Cette partie faisant l'objet d'une revue que j'ai rédigée avec Christophe Combadière je la restitue ici (Poupel and Combadiere, 2010). Cette revue détaille une sélection de travaux s'intéressant aux CK impliquées dans la mobilisation des MO au niveau de la plaque et plus particulièrement aux RCK utilisés pour la caractérisation phénotypique des MO.

4.1 Axe CCR2/CCL2

Cet axe fût, dès sa caractérisation, suspecté d'être responsable du signal de recrutement des MO circulants dans la lésion athéromateuse car CCL2 est fortement exprimée au niveau des zones riches en MP dans les lésions inflammatoires et a pour cible majoritaire les MO (Ikeda et al., 2002; Rollins, 1996; Yla-Herttuala et al., 1991). Dès 1998, l'équipe du Dr Charo montrait que l'inactivation de CCR2 dans la souris prédisposée à l'athérosclérose entraînait une réduction de 50% de la taille des plaques et de 60% de leur infiltrat macrophagique sans affecter les taux des lipides et des lipoprotéines plasmatiques (Boring et al., 1998). Une étude similaire menée sur des souris invalidées pour CCL2 montrait une diminution de 80% de la taille des plaques et de 55% de l'infiltrat macrophagique (Gu et al., 1998). Des études par transfert de cellules hématopoïétiques dans des souris irradiées ont permis de déterminer que CCR2 semblait crucial dans les étapes initiales de l'athérogenèse (Guo et al., 2003) mais pas dans les étapes de progression (Guo et al., 2005). À l'inverse, la surexpression de CCL2 par les cellules hématopoïétiques accélèrent le développement des lésions athéromateuse (Aiello et al., 1999). Des études plus récentes menées chez l'homme suggèrent que les effets pro-athérogènes de CCR2 ne peuvent être restreint à l'interaction avec son ligand CCL2 et pourrait également impliquer une activation par d'autres ligands de CCR2 tel CCL13 (Breland et al., 2010). Ces différentes études mettent en avant le rôle crucial de l'axe CCR2/CCL2 dans l'athérogenèse mais l'inhibition partielle observée dans ces souris invalidées indiquent l'existence d'autres mécanismes responsables du recrutement des MO aux stades précoces et tardifs du développement des lésions.

4.2 Axe CX3CR1/CX3CL1

Un autre axe de recrutement des MO est le couple CX3CR1/CX3CL1 impliqué plus récemment dans l'athérosclérose. CX3CR1 est présent sur tous les MO et caractérise plus spécifiquement les MO « patrouilleurs ». Il est également présent sur les cellules endothéliales qui produisent de large quantité de son unique ligand CX3CL1 dans les conditions inflammatoires (Greaves and Gordon, 2001). CX3CL1 est aussi produite par de nombreux types cellulaires dont les MO et les cellules musculaires lisses (Ludwig et al., 2002). La forme membranaire de CX3CL1 exprimée par les cellules endothéliales renforcerait l'adhésion des MO et ainsi limiterait la migration de ces cellules à travers la barrière endothéliale (Umehara et al., 2001). Le rôle du couple CX3CR1/CX3CL1 dans les maladies cardiovasculaires est également soutenu par l'étude de l'athérosclérose chez la souris. Ainsi, les souris CX3CR1-/-

développent moins de plaques d'athérosclérose, au niveau de l'aorte thoracique et du sinus aortique et les lésions sont moins infiltrées de MP (Combadiere et al., 2003; Lesnik et al., 2003). Parallèlement, l'athérogenèse est réduite chez les souris déficientes en CX3CL1 (Teupser et al., 2004). Mais, de nouveau, dans ces modèles, l'invalidation du récepteur ou de son unique ligand n'aboutit qu'à une inhibition partielle de l'athérogenèse suggérant un mécanisme concerté de différents axes de mobilisation des MO. Ainsi, la combinaison des déficiences du récepteur ou du ligand de ces couples, par invalidation génétique ou pharmacologique dans des modèles murins prône à l'athérosclérose, a permis de mettre en évidence que trois axes (CCR2/CCL2 ; CX3CL1/CX3CR1, CRP) interagissent de façon indépendante sur l'athérosclérose, ce qui révèle ainsi un mécanisme complexe (Combadiere et al., 2008; Saederup et al., 2008; Tacke et al., 2007).

4.3 Autres axes CK/récepteurs

D'autres CK inflammatoires comme celles du sous-groupe des CK CCL3, 4 et 5 qui interagissent principalement avec les récepteurs CCR1 et CCR5, sont impliquées dans la redistribution monocytaire (**Tableau VII**) . L'expression de CCR1 et de CCR5 sur différents types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose comme les MO/MP, les lymphocytes T, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et l'expression de CCL5 au niveau des lésions athéromateuses suggèrent un rôle de ce couple dans l'athérogenèse. Si les premiers travaux n'ont pas pu montrer de rôle pour CCR5 dans les phases initiales de développement des plaques d'athérosclérose (Kuziel et al., 2003), des études plus récentes indiquent que CCR5 participerait aux phases tardives de l'athérogenèse (Quinones et al., 2007) en contrôlant l'accumulation macrophagique et le taux circulant de cytokines et CK inflammatoires (Potteaux et al., 2006). À l'inverse, le transfert adoptif de cellules de moelle osseuse de souris déficientes pour CCR1 dans des souris hypercholestérolémiques entraîne une augmentation de 70% de la taille des plaques d'athérosclérose (Potteaux et al., 2005) associée à une activation lymphocytaire excessive. Ces études révèlent que l'engagement de récepteurs distincts mais répondant aux mêmes CK peut produire des effets opposés sur l'athérogenèse, révélant ainsi la complexité et la sélectivité des phénomènes mis en jeu.

Récepteurs	CCR2	CCR5	CX3CR1	CCR1	CCR3	CCR7	CCR8	CCR9	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR6
Ligands	CCL2,7, 8,13	Rantes/C CL5 CCL3,4	CX3CL1	CCL1, 5	CCL5,11, 13	CCL19,2 1	CCL1	CCL25	CXCL8/I L8	CXCL8/I L8	CXCL10/ IP-10	CXCL12/ SDF-1	CXCL16
Phénotype- athérogène	Pro	Pro	Pro	Anti	Pro	Anti	ND	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro

Tableau VII : Synthèses des différents axes CK/RCK et leur implication dans l'athérosclérose.

De nombreux autres couples CK/CKR ont été étudiés pour leur rôle éventuel dans le développement de l'athérosclérose. En plus de ses propriétés chimioattractantes pour les cellules mononuclées myéloïdes qui expriment son unique récepteur CXCR6, le CXCL16 agit lui-même comme un récepteur « scavenger » et reconnaît les cellules apoptotiques et les lipides oxydés pour les engager dans une voie d'élimination. CXCL16 est retrouvée dans les plaques d'athéromes (Wuttge et al., 2004), elle est produite par les MP, les cellules dendritiques et les cellules T, elle active les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Ludwig and Weber, 2007) et son taux plasmatique est corrélé aux maladies coronariennes (Sheikine et al., 2006). La déficience de CXCL16 chez la souris se traduit par une athérogenèse accélérée, une accumulation massive des MP dans les zones lésionnelles et une forte production de cytokines inflammatoires (Aslanian and Charo, 2006). A l'inverse, l'absence de CXCR6 ralentit le développement des plaques et l'infiltration macrophagique des lésions (Galkina et al., 2007). Ces travaux ont donc mis en évidence le rôle ambigu de cet axe chimiokinique ; CXCR6 serait proathérogène par sa capacité à favoriser le recrutement de leucocytes et CXCL16 serait athéroprotecteur en facilitant l'élimination des cellules apoptotiques et les lipides oxydés.

Le récepteur CXCR2 et ses multiples ligands sont également des acteurs importants de l'accumulation macrophagique au niveau de la strie lipidique et de la progression des lésions athéromateuses (Boisvert et al., 2006; Boisvert et al., 1998).

D'une manière différente, l'axe CXCL12/CXCR4 aurait un rôle important dans la réparation et le remodelage vasculaire. Toutefois, la fonction de CXCL12 et de son récepteur CXCR4 n'a été que récemment étudiée dans les modèles murins en raison de la létalité embryonnaire des souris dont le gène a été invalidé. Ainsi, le blocage chronique de CXCR4 dans des souris hypercholestérolémiques aggrave le développement de l'athérosclérose en provoquant une leucocytose avec une expansion de neutrophiles immatures et en augmentant le nombre de

neutrophiles recrutés dans les plaques. Ainsi, en perturbant l'homéostasie des neutrophiles l'axe CXCL12/CXCR4 révèle l'importante contribution des neutrophiles dans la genèse de l'athérosclérose chez la souris et montre un axe athéroprotecteur (Zernecke et al., 2008).

Ces travaux indiquent que de nombreux axes chimiokines sont impliqués dans l'athérogenèse, principalement en contrôlant le recrutement et l'activation des cellules mononuclées circulantes. Cependant de nombreuses questions restent sans réponses notamment comment ces axes interagissent entre eux, s'ils suivent une séquence précise ou s'ils se combinent et surtout comment les cellules intègrent les différents signaux d'activation et de recrutement. De plus, longtemps ces CK n'ont été perçus que comme des axes de recrutement des cellules circulantes, cependant, des études récentes rapportent que les signaux médiés par les CK régulent l'homéostasie des MO dans le sang et la moelle osseuse (Serbina and Pamer, 2006). Ainsi, l'inhibition combinée des axes CX3CR1, CCR2 et CCR5 inhibent la monocytose de la moelle osseuse réduisant ainsi le nombre de MO circulants et limitant le développement de l'athérosclérose (Combadiere et al., 2008; Tacke et al., 2007). La capacité des CK à moduler l'initiation et la progression des plaques d'athérosclérose n'est donc pas exclusivement liée à leur propriété de recrutement au niveau de la lésion mais aussi à agir en amont sur l'homéostasie des cellules myéloïdes.

4.4 Pertinence biologique des CK dans les pathologies cardiovasculaires humaines

Des études épidémiologiques chez l'homme ont mis en évidence le rôle important des couples CK/RCK précédemment présentés dans les pathologies cardiovasculaires. Ainsi, deux variations génétiques du récepteur de CX3CR1 situées dans le cadre de lecture, substituant une valine en position 249 en une isoleucine et une thréonine en position 280 en une méthionine, sont associées à une diminution du risque d'accidents cardiovasculaires (McDermott et al., 2003; McDermott et al., 2001; Moatti et al., 2001). Une étude plus récente indique que ces allèles ne sont pas associés avec la survenue des accidents cardiovasculaires mais avec une réponse inflammatoire plus importante (Niessner et al., 2005).

Si le rôle de l'axe CCR2/CCL2 dans l'athérogenèse est bien établi dans les modèles murins, les études génétiques de cet axe chez l'homme sont plus ambiguës. Bien qu'une première étude ait rapporté une association entre la substitution de la valine 64 en isoleucine du CCR2 et une diminution du risque de maladies cardiovasculaires (Szalai et al., 2001), les études

suivantes sont moins concluantes (Ortlepp et al., 2003; Petrкова et al., 2003). Cette confusion est probablement liée à la proximité avec le gène CCR5, également polymorphe. Ainsi, certains variants génétiques de l'axe CCR5/CCL5 comme CCR5Δ32 et CCL5-403A sont associés avec un risque réduit d'accidents cardiovasculaires (Boger et al., 2005; Gonzalez et al., 2001; Simeoni et al., 2004) mais d'autres études n'ont pas pu le confirmer (Kuziel et al., 2003; Petrкова et al., 2005). Plus récemment, des études d'association pan-génomique ont mis en évidence une association entre le gène codant pour CXCL12 et le risque de développer des maladies coronariennes. Ce polymorphisme serait impliqué dans l'inflammation en atténuant la migration des neutrophiles et en favorisant la génération endothéliale.

Bien que souvent difficile à interpréter, ces études associant le polymorphisme des CK et de leurs récepteurs avec les maladies cardiovasculaires renforcent l'hypothèse du rôle déterminant des CK dans ces pathologies et pointent ces molécules comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

4.5 CK : Cibles thérapeutiques contre l'athérosclérose

Les traitements actuels contre l'athérosclérose utilisent les antiagrégants plaquettaires, les statines qui visent à diminuer la cholestérolémie, les vasodilatateurs et encore trop souvent des interventions chirurgicales en cas d'ischémie majeure. La capacité des CK à moduler la mobilisation des cellules inflammatoires est cruciale pour le recrutement des MO au niveau de la plaque d'athérosclérose et de ce fait les CK sont envisagées comme de possibles outils thérapeutiques. Différentes approches ont été développées pour moduler pharmacologiquement le réseau d'interactions chimiokines mais les antagonistes des récepteurs restent actuellement les plus prometteurs.

Les antagonistes les plus étudiés sont les variants de CCL5, Met-CCL5 et amino-oxypentane-CCL5, qui bloquent les récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5 (Proudfoot et al., 1999; Proudfoot et al., 1995). Bien que développé à l'origine pour bloquer l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ces antagonistes se sont avérés efficaces dans des modèles animaux de maladies inflammatoires (Grone et al., 1999; Panzer et al., 1999). Dans l'athérosclérose, l'administration de Met-CCL5 permet de limiter la formation des plaques et diminue l'infiltration de cellules T et des MO (Combadiere et al., 2008; Veillard et al., 2004). De façon surprenante, le traitement de souris hypercholestérolémiques par un antagoniste de CCR2 n'a aucun effet sur le développement des lésions athéromateuses et se traduit par une

monocytose (Aiello et al., 2010) indiquant que le rôle des CK va bien au delà du simple recrutement de leucocytes sur un site inflammatoire.

Les CK ouvrent donc de nouvelles perspectives dans le traitement de l'athérosclérose. Cependant, aucune molécule n'a encore été testée cliniquement dans l'athérosclérose. Le problème majeur de ces cibles est leur pléiotropisme laissant la possibilité à l'antagoniste d'altérer d'autres phénomènes que ceux qui sont impliqués dans l'athérosclérose et notamment l'homéostasie du système immunitaire.

L'implication des MO et des CK et de leurs récepteurs dans la mise en place et le développement des maladies cardiovasculaires n'est plus à démontrer mais les mécanismes moléculaires et cellulaires de leur participation restent à clarifier. Ces protagonistes représentent un intérêt majeur en terme médical, en tant qu'outils de diagnostic, d'une part, permettant soit d'identifier des sujets à risque avant l'apparition de symptômes cliniques, soit de prédire l'évolution pathologique et d'adapter en conséquence le traitement. D'autre part ils représentent un grand potentiel thérapeutique.

Objectifs

III Objectifs du travail de thèse

L'athérosclérose est un long processus complexe et asymptomatique qui fait intervenir quatre principaux acteurs cellulaires : les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les lymphocytes et les monocytes-macrophages, tous étant capables d'être mobilisés au niveau de la lésion. Leur recrutement, leur accumulation et leur prolifération sont des étapes clés du processus de développement de la plaque. La première partie de ce mémoire de thèse a permis de mettre en relief les différents acteurs moléculaires et cellulaires que nous ciblons dans notre étude.

A la suite de différentes études menées au laboratoire, le travail de recherche de cette thèse a porté sur l'utilisation d'un antagoniste du récepteur de chimiokine CX3CR1, appelé F1, pour contrôler le développement des lésions athéromateuses et le recrutement spécifique des monocytes/macrophages dans des modèles murins. Notre hypothèse était que cet antagoniste devait permettre de limiter le développement des plaques en diminuant le recrutement et l'accumulation de cellules inflammatoires additionnelles. Le but final de ce travail de thèse est d'identifier et de tester une nouvelle cible pharmacologique contre l'athérosclérose. Plus précisément, mon travail avait trois objectifs et tentait de répondre à trois groupes de questions associées à ces objectifs:

A/ Déterminer le rôle de CX3CR1 dans le développement de l'athérosclérose.

Les souris déficientes pour le gène codant pour le récepteur CX3CR1 sont partiellement protégées contre l'athérosclérose. Cependant, cette invalidation congénitale peut entraîner des mécanismes de compensation pouvant biaiser l'étude. L'invalidation pharmacologique contrôlée de CX3CR1 permet d'une part de s'affranchir de ce biais technique et d'autre part d'affiner son rôle temporel pour le recrutement des MO au niveau de la plaque. L'utilisation de l'antagoniste devait ainsi permettre de savoir si ce récepteur est impliqué dans les phases précoces, tardives ou tout au long du processus.

Questions associées :

- F1 peut-il reproduire les résultats obtenus avec les souris transgéniques CX3CR1 KO ?
- F1 peut-il contrôler et limiter le développement de la plaque d'athérosclérose à un stade avancé.

B/ Evaluer l'implication de CX3CR1 dans la mobilisation des monocytes au niveau de la plaque d'athérosclérose.

Comme nous l'avons vu précédemment, CX3CR1 est impliqué dans la migration et le recrutement des MO au niveau du site inflammé. Par ailleurs le niveau d'expression de CX3CR1 à la surface des MO permet d'identifier deux sous-populations cellulaires phénotypiquement et fonctionnellement différentes. L'utilisation de notre antagoniste nous permet donc, d'une façon plus large, d'étudier la mobilisation des MO CX3CR1-dépendants dans un contexte d'inflammation chronique et de déterminer son implication dans le recrutement des MO au niveau de la plaque.

Questions associées :

- F1 peut-il modifier la mobilisation et la production des différentes sous-populations monocytaires ?
- F1 modifie-t-il la composition cellulaire de la plaque ?
- F1 conduit-il à un recrutement différentiel des sous-populations monocytaires ? Le défaut de mobilisation et de recrutement des monocytes LyC low est-il plus important ?

C/ Déterminer les mécanismes mis en jeu par l'utilisation de F1

Il s'agit ici de comprendre en détail les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu par l'utilisation *in vivo* de F1.

Questions associées :

- Comment F1 modifie la mobilisation monocyttaire ? Perturbe-t-il la migration cellulaire en saturant et en noyant le système des chimiokines.
- F1 perturbe-t-il l'environnement chimiokinique ?
- CX3CR1 peut-il être impliqué dans la sortie des MO au niveau de la moelle osseuse ?
- CX3CR1 est-il impliqué dans la survie des MO ?

Afin de répondre à toutes ces questions, notre stratégie a consisté à tester l'antagoniste F1 sur deux modèles murins d'athérosclérose, d'une part les souris déficientes pour le gène codant pour l'ApoE et d'autre part les souris déficientes pour les gènes codant pour le récepteur des LDL (LDLR). Ces deux modèles permettent un développement des plaques d'athérosclérose d'autant plus rapide qu'ils sont soumis à un régime hyperlipidique. Ces deux

modèles se différencient notamment par leur susceptibilité à développer la maladie, puisque le modèle de souris LDLR^{-/-} étant moins propice à développer des plaques d'athérosclérose. Ces deux modèles nous permettaient donc de tester notre antagoniste dans deux contextes d'athérosclérose différents.

De façon classique les animaux sont traités avec l'antagoniste 3 fois par semaine avec 50 microgrammes de protéine F1, quantité usuelle, en injection intrapéritonéale pendant 10 semaines. Au terme, les animaux sont sacrifiés et les paramètres suivants sont analysés :

- Mesure de la taille et la composition des plaques d'athérome ; études morphométriques et immunohistochimiques au niveau du sinus aortique des cœurs de souris.
- Mesure des paramètres métaboliques (quantité plasmatique des LDL, des triglycérides et de cholestérol) pour contrôler l'effet de F1 sur le métabolisme lipidique.
- Numération cellulaire des différents compartiments organiques par cytométrie de flux.
- Mesure des concentrations de cytokines inflammatoires plasmatiques
- Etudes mécanistiques *in vitro* : Test d'apoptose et d'adhésion.

Cela a donné lieu à une publication soumise qui est reportée ci-après.

Article

IV Article

En révision au journal Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology

Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 reduces atherosclerosis in mice

Lucie Poupel^{1,2}, Alexandre Boissonnas^{1,2}, Patricia Hermand^{1,2}, Karim Dorgham^{1,2}, Elodie Guyon^{1,2},
Constance Auvynet^{1,2}, Flora Saint Charles^{3,4}, Philippe Lesnik^{3,4}, Philippe Deterre^{1,2} and Christophe
Combadiere^{1,2,5}

¹Inserm UMR_S 945, Laboratoire “Immunité et Infection”, Paris, 75013, France.

²Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 945, Paris, 75006, France.

³Inserm UMR_S 939, Laboratoire “Dyslipidémies, Inflammation et Athérosclérose”, Paris, 75013, France.

⁴Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 939, Paris, 75006, France.

⁵AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d’Immunologie, Paris, 75651, France.

To whom correspondence should be addressed: Dr Christophe Combadière, Inserm UMR_945, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91 Boulevard de l’Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: (33) 1 40 77 98 92, Fax: (33) 1 40 77 97 34, Email : christophe.combadiere@upmc.fr

Short title: CX3CR1 antagonist limits atherogenesis

Word count : 6037 Abstract : 210 Figures: 6

Abstract

Background- Alterations of the chemokine receptor CX3CR1 gene were associated with a reduced risk of myocardial infarction in human and limited atherosclerosis in mice. Therefore, CX3CR1 antagonists are potential therapeutic tools to limit acute and chronic inflammatory processes in atherosclerosis.

Methods and Results- Treatment with F1, an amino terminus-modified CX3CL1 endowed with CX3CR1 antagonist activity, reduced the extent of atherosclerotic lesions in both APOE^{-/-} and LDLR^{-/-} proatherogenic mouse models. Macrophage accumulation in the aortic sinus was reduced in F1-treated APOE^{-/-} mice but the macrophage density of the lesions was similar in F1-treated and control mice. F1 treatment inhibited CX3CR1-dependent adhesion of monocytes, potentially limiting their recruitment. In addition, F1-treated APOE^{-/-} mice displayed reduced numbers of blood inflammatory monocytes while resident monocyte numbers remained unchanged. Both *in vitro* and *ex vivo* F1 treatment reduced CX3CR1-dependent inflammatory monocyte survival. Finally, F1 treatment of APOE^{-/-} mice with advanced atherosclerosis led to smaller lesions than untreated mice but without reverting to the initial phenotype.

Conclusion- The CX3CR1 antagonist F1 is a potent inhibitor of the progression of atherosclerotic lesions by means of its selective impact on inflammatory monocyte functions. Controlling monocyte trafficking and survival may be an alternative or complementary therapy to lipid-lowering drugs classically used in the treatment of atherosclerosis.

Key words: atherogenesis, monocyte, migration, chemokine receptor, CX3CR1 antagonist

Introduction

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial wall that develops in a setting combining lipid metabolism and immune response disturbances (Ross, 1999). The hallmark feature of atherosclerosis is the formation of atherosclerotic lesions that result from the accumulation of fatty materials such as cholesterol and lipid-rich lipoprotein (LDL) and of inflammatory leukocytes (mostly macrophages) in the subendothelial space of the vessel wall (Glass and Witztum, 2001; Lusis, 2000). The proposed pathological mechanisms leading to plaque formation rely on the recruitment of intimal macrophages that accumulate modified LDL and convert them into lipid-rich foam cells, releasing proinflammatory and cytotoxic molecules. The proinflammatory environment further promotes plaque progression to more advanced and complex lesions, which are prone to rupture.

Most current therapeutic drugs target the best-documented atherogenesis-promoting risk factors. Examples of this include the treatment of dyslipidemia with inhibitors of HMG-CoA reductase such as statins (Baigent et al., 2005) and the regulation of high blood pressure with inhibitors of angiotensin-converting enzyme (Jamerson et al., 2008). Even though statins have a pronounced anti-inflammatory activity by reducing the plasma level of the inflammation marker C reactive protein (CRP) (Ridker et al., 2008), they are not designed to control inflammation. In fact, these drugs do not specifically or directly target recruitment of leukocytes into the lesions. Among the many different leukocyte populations that infiltrate atherosclerotic lesions (Galkina and Ley, 2009), macrophages appeared to be the main cellular species (Gerrity et al., 1979). The pathogenic role of macrophages was mostly inferred from animal models. Osteopetrotic mice with spontaneous deficiency in monocyte colony-stimulating factor (M-CSF) and circulating monocytes showed a profound reduction in atherosclerosis resulting from a marked decrease in macrophage accumulation within lesions (Smith et al., 1995). Similarly, monocyte depletion using toxic agents such as clodronate (Danenberg et al., 2002) and diphtheria toxin in CD11b-DTR transgenic mice (Stoneman et al., 2007) led to reduced atherosclerosis.

Two major monocyte subsets can be distinguished in the blood based on differential expression of the chemokine receptors CCR2 and CX3CR1. The “inflammatory” monocytes express high levels of CCR2 but low levels of CX3CR1 (CCR2⁺ CX3CR1^{lo}), while the “resident” monocytes have a reciprocal marker expression profile (CCR2⁻ CX3CR1^{hi}). Inflammatory monocytes rapidly enter sites of inflammation where they give rise to macrophages or antigen-presenting cells (Geissmann et al., 2003; Sunderkotter et al., 2004; Tacke et al., 2007). Resident monocytes enter lymphoid and non-lymphoid organs under homeostatic conditions, and patrol the vascular endothelium in a CX3CR1-dependent manner (Auffray et al., 2007). The former subset dominates hypercholesterolemia-associated monocytosis (Swirski et al., 2007; Tacke et al., 2007) and appears to be recruited into atherosclerotic arteries primarily through CCR2 (Tacke et al., 2007). The main CCR2 ligand (CCL2) appears to be important during early atherogenesis whereas the unique CX3CR1 ligand (CX3CL1) is thought to be involved in the progression of the disease. Atherosclerosis is attenuated in CCR2^{-/-} (Boring et al., 1998), CCL2^{-/-} (Gu et al., 1998), CX3CL1^{-/-} (Teupser et al., 2004) and in CX3CR1^{-/-} mice (Combadiere et al., 2003; Lesnik et al., 2003) but combined deficiencies of these axes lead to an even more drastic reduction in atherosclerotic lesions (Combadiere et al., 2008; Saederup et al., 2008) confirming a non-redundant role of these chemokine axes in atherosclerosis. In addition, pharmacological inhibition of CCR5, another chemokine receptor involved in leukocyte recruitment, resulted in an almost entire abrogation of atherosclerosis in CX3CR1^{-/-}CCL2^{-/-}ApoE^{-/-} mice (Combadiere et al., 2008). Targeting the chemokine system to prevent or to reduce atherosclerosis seems to be of great interest. However, blocking CCR2 with antagonists was poorly efficient on aortic lesions (Aiello et al., 2010; Olzinski et al., 2010) but led to a significant reduction in monocytosis. Blocking CCR5 limits the progression of atherosclerosis (Braunersreuther et al., 2008; Veillard et al., 2004) probably by regulating leukocyte recruitment and systemic inflammation. To date, no CX3CR1 antagonist has been tested in atherosclerosis. We recently developed an amino terminus-modified CX3CL1 endowed with CX3CR1 antagonist activity (Dorgham et al., 2009) and evaluated its efficacy in murine models of atherosclerosis.

Methods

Mouse model of atherosclerosis

APOE-deficient (APOE^{-/-}) mice (B6-*ApoE*^{tm1Unc}/Crl from Charles River, Belgium) and LDLR-deficient (LDLR^{-/-}) mice (B6-*Ldlr*^{tm1Her}/J from Charles River, Wilmington, MA, USA), were maintained under pathogen-free conditions at the « Centre d'Exploration Fonctionnelle » animal facility (Pitié-Salpêtrière, Paris, France). At 5 weeks of age, mice were fed on high fat diet (HFD) containing 24% fat (D12451, Research Diets by Broogarden, Denmark) for the time indicated. The CX3CR1^{GFP/+} APOE^{-/-} mice were generated by crossing CX3CR1^{GFP/+} mice (B6.129P-Cx3cr1^{tm1Litt}/J from Charles River, Wilmington, MA, USA) with APOE^{-/-} mice. Treatment with CX3CR1 antagonist called F1 (produced as previously described (Dorgham et al., 2009) and kindly provided by A. Proudfoot, Merck-Serono) was performed by intraperitoneal injection (50µg in phosphate buffered saline) three times a week for 10 weeks starting at 5 weeks of diet. The amount of F1 injected was based on previous experiments using altered chemokines (Veillard et al., 2004). For the advanced atherosclerotic lesion model, the mice were maintained for a longer period (8 weeks) on HFD before the beginning of the F1 treatment. Animal experiments were approved by the local institutional animal care and use committee of the “faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière” (Paris).

Analysis of atherosclerotic lesions in the aortic sinus

Mice were euthanized at 20 weeks of age. Atherosclerotic lesions were quantified using oil red O (ORO) staining on 25 sections, 10µm thick, cut through the proximal aorta as previously described (Huby et al., 2006). Briefly, the heart was taken out, fixed in 10% formalin for 2 hours, and placed in 10% sucrose-PBS overnight at 4°C before being embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) and frozen at -80°C. The extent of atherosclerotic lesions was delimited manually following ORO staining and their surface was calculated using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). The volume of the lesion was calculated on the length of the

vessel displaying detectable ORO staining typically ranging from 400 to 600 μm . Plaque composition was determined using immunohistochemistry with monoclonal rat anti-mouse macrophage antibody (clone MOMA-2 MAB1852 Chemicon, AbCys, Paris, France) and with polyclonal rabbit anti-rat CX3CR1 (TP501, Torrey Pines Biolabs, East Orange, NJ, USA). The specificity of antibodies was tested with their isotype controls.

Plasma lipid analyses

Blood samples were collected and analyzed as previously described (Huby et al., 2006). Briefly, plasma total cholesterol, free cholesterol and triglyceride concentrations were measured by enzymatic colorimetric assays respectively from Roche Diagnostics (Saint-Egrève, France), Wako Chemicals GmbH (Neuss, Germany) and Biomérieux (Marcy l'Etoile, France) using the automatic system Konelab (Thermo Scientific, Brebieres, France).

Mouse organ cell isolation

Blood was drawn via retroorbital puncture with heparin as anticoagulant. Bone marrow cells were collected by flushing thighbone and shinbone with PBS. Splenocytes were obtained by mashing the spleen on a 70 μm pored cell strainer (Becton Dickison, Rungis, France). Following tissue homogenization, erythrocytes were lysed using buffer containing 0.15 M NH_4Cl , 0.01 mM KHCO_3 and 0.1 mM EDTA and resuspended in PBS complemented with 0.5% foetal calf serum (FCS).

Cell Adhesion Assays

Full length CX3CL1-His at 25 nM from R&D Systems (Lille, France) was adsorbed over-night to flat bottom 96 well microtiter plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) at 4°C in 50 μL of 25 mM Tris pH=8, 150 mM NaCl. Wells were saturated for 2 h at room temperature with 1% non-fat milk in the same buffer. Bone marrow cells from CX3CR1^{GFP/+} mice were resuspended in calcium- and magnesium-free PBS and 5×10^5 total cells were added per well and incubated at room temperature. Before adhesion, cells from CX3CR1^{GFP/+} mice were treated for 15 min at room temperature with F1 or PBS. After 45 min, wells were washed to remove non-adherent cells as described previously

(Hermand et al., 2008). A wide field picture of each well was captured using a Nikon AZ100 macroscope (Champigny Sur Marne, France). The percent of GFP⁺ adherent cells was calculated as a ratio of the total number of GFP⁺ adherent cells to the total number of GFP⁺ cells loaded in each well.

Apoptosis Assay

For *in vitro* assays, mononuclear cells from the bone marrow of C57bl/6 mice were incubated for 4 hours in supplemented or FCS-free RPMI in the presence or absence of F1. In addition, APOE^{-/-} mice were treated with F1 or left untreated for 24 hours. Myeloid cells were isolated from the blood and the bone marrow and incubated for 4 hr in RPMI supplemented with 100 U/mL Penicillin, 2 mM Streptomycin, 2 mM L-glutamine, 10% FCS, 20 ng/mL GM-CSF, 50 μ M 2 β -Mercaptoethanol. Propidium iodide (5 μ g/mL) was added in each sample 30 minutes before sample acquisition to identify dead cells.

Flow cytometry

Cells were incubated in 0.5% FCS-PBS in the presence of appropriate dilution of specific antibodies. The following panel of antibodies was used: anti- CD11b (clone M1/70), anti-Ly-6G (clone 1A8), anti-NK1.1 (clone PK136) from Becton Dickinson (Franklin lakes, NJ, USA) and anti-neutrophil (clone 7/4) from Serotec (Düsseldorf, Germany). Samples were acquired on a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, Franklin lakes, NJ, USA) using Cell Quest Pro and analyzed using FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) software. Calculation of absolute number was performed by using a fixed number of non-fluorescent 10 μ m polystyrene carboxylate microspheres (Polysciences, Niles, IL, USA) as a reference.

Statistical Analysis

Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) was used for data analysis and graphic representation. Data are presented as the mean $\pm$ sem (standard error of the mean) of each group of mice. Statistical significance was determined using unpaired Student's t tests to compare Gaussian-like

distributions for flow cytometry analysis and immunohistological analysis. Symbols used were * for p values <0.05, ** for p values <0.01, *** for p values <0.001 and ns when not significant.

Results

Pharmacological inhibition of CX3CR1 reduces atherosclerotic plaque development

To assess the therapeutic potential of the CX3CR1 antagonist (F1) on atherosclerotic lesion development, APOE^{-/-} mice were fed on HFD for 15 weeks (Figure 1) and treated for the last 10 weeks of the HFD, three times a week by intraperitoneal injection of 50μg of F1 or saline solution. Lipid staining with oil Red O (ORO) of aortic sinus sections revealed a marked reduction in atherosclerotic lesions in mice treated with F1 compared to saline-treated mice (Figure 1a). Quantitative computer-assisted image analysis showed a 30% decrease in the extent of aortic sinus positively stained with ORO (Figure 1b; with lesion volumes of $0.32 \pm 0.03 \text{ mm}^3$ and $0.22 \pm 0.02 \text{ mm}^3$ for saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively). In order to reduce errors induced by sectioning angle, results were expressed as the percentage of the cross-sectional vessel volume stained with ORO. About a 25% reduction was still observed in the F1-treated group compared to controls after normalizing the lesion size volume to the lumen size volume (p<0.05, $16.0 \pm 1.3 \%$ for the saline APOE^{-/-} mice versus $11.9 \pm 1.2 \%$ for the F1-treated APOE^{-/-} mice) confirming a specific effect of F1 on the atherosclerotic lesion volume. In order to confirm that the F1 anti-atherosclerotic effect was not model-dependent, the LDLR^{-/-} mice were fed with HFD and treated with the same regimen. F1 treatment in LDLR^{-/-} mice decreased by 27% the extent of the lesion according to ORO staining (Figure 1c; with lesions volumes of $0.03 \pm 0.002 \text{ mm}^3$ and $0.02 \pm 0.003 \text{ mm}^3$ for saline- and F1-treated LDLR^{-/-} mice, respectively). After normalization of the lesion volume against the lumen volume, the F1 anti-atherosclerotic effect was about 40% (p<0.01, $2.3 \pm 0.3\%$ and $1.3 \pm 0.2\%$ for the saline- and F1-treated LDLR^{-/-} mice, respectively). Lesion size is correlated with dyslipidemia and we therefore evaluated the effect of F1 on lipidemia. F1 treatment had no or only a minor effect on the seric total cholesterol (p=ns, $6.9 \pm 0.7 \text{ g/l}$ and $5.4 \pm 0.5 \text{ g/l}$ for the saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively), the free cholesterol (p=ns, $2.7 \pm 0.2 \text{ g/l}$ and $2.1 \pm 0.2 \text{ g/l}$ for the saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively) and the

triglycerides ($p < 0.05$, $2.0 \pm 0.3 \text{ g/l}$ and $1.2 \pm 0.1 \text{ g/l}$ for the saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively). Globally, these results indicate that F1 limited the atherosclerotic lesion development in two different models of atherogenesis and suggest that the F1 anti-atherosclerotic effect may be independent of dyslipidemia regulation.

Pharmacological inhibition of CX3CR1 attenuates macrophage lesion infiltration

Assuming a role of CX3CL1 on monocyte recruitment, we assessed the effect of F1 on the macrophage content of the lesions in the APOE^{-/-} model (Figure 2). Total macrophage accumulation, assessed by MOMA-2 staining, was reduced in F1-treated APOE^{-/-} mice compared to saline-treated APOE^{-/-} mice (Figure 2a and 2b). The inhibition reached approximately 40% (Figure 2c). However, the macrophage density within the lesion, evaluated by the ratio of the MOMA-2 staining to the ORO staining, was not affected by F1 (Figure 2d). Similar results were observed using CX3CR1 staining to assess CX3CR1-positive macrophages (Figure 2e to 2h) with an absolute reduction of the CX3CR1-stained surface by 40% in F1-treated mice (Figures 2e and 2f with quantification in 2g) and no change when expressed as a ratio to the lesion area (Figure 2h). These results indicate that F1 limited macrophage accumulation in the aortic sinus without altering macrophage density.

Both *in vitro* and *in vivo* F1 treatment inhibits CX3CR1-dependent monocyte adhesion.

The CX3CR1 ligand is strongly produced by atherosclerotic lesions and participates in the capture of blood monocytes. Thus, a CX3CR1 antagonist may inhibit CX3CR1-positive cell adhesion to CX3CL1-expressing surfaces. Bone marrow cells from CX3CR1^{GFP/+} mice with the GFP being expressed under the control of the CX3CR1 promoter (Jung et al., 2000) were treated with increasing concentrations of F1 and exposed to a CX3CL1-coated surface (Figure 3). F1 almost abrogated CX3CR1-dependent adhesion to coated CX3CL1 at concentrations ranging from 10 to 100 nM (Figure 3a). In addition, bone marrow cells from F1-treated CX3CR1^{GFP/+} APOE^{-/-} mice were about 50% less

adherent to CX3CL1-coated surface than those from saline-treated CX3CR1^{GFP/+} APOE^{-/-} mice (Figure 3b). We conclude that both *in vitro* and *in vivo* F1 treatments attenuated CX3CR1-dependent cell adhesion, thus limiting monocyte recruitment to the lesion site.

F1 reduces monocytosis in APOE^{-/-} mice.

Because F1 treatment reduced monocyte adhesion, long-term treatment in mice may lead to increased monocytosis by preventing monocytes to infiltrate the atherosclerotic lesions. We therefore decided to investigate the F1 effect on blood monocytes (Figure 4). The inflammatory and resident monocyte subpopulations were identified by flow cytometry as low side scatter, high forward scatter-cells, expressing high level of CD11b and either high or low levels of the myeloid antigen 7/4 (Figure 4a, right panel). Polymorphonuclear neutrophils (PMN) and NK cells were excluded based on the expression of specific markers, Ly6G and NK1.1, respectively (Figure 4a, left panel). Surprisingly, F1 treatment reduced by 50% the absolute numbers of 7/4^{hi} or inflammatory monocytes in APOE^{-/-} mice (Figure 4b; with 7/4^{hi} numbers of $12.55 \pm 1.9 \times 10^3$ /mL and $6.9 \pm 1.7 \times 10^3$ /mL for saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively) while the number of 7/4^{lo} or resident monocytes was not altered (Figure 4c; with 7/4^{lo} numbers of $36.2 \pm 4.7 \times 10^3$ /mL and $33.3 \pm 4.4 \times 10^3$ m/L for saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively). Accordingly, the frequency of 7/4^{hi} monocytes was reduced ($p < 0.05$, 2.4 ± 0.3 % vs $1.3\% \pm 0.2$ for saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively) whereas the frequency of 7/4^{lo} monocytes was unaltered ($p = \text{ns}$, 6.6 ± 0.9 % vs 5.8 ± 0.7 % for saline- and F1-treated APOE^{-/-} mice, respectively). In the LDLR^{-/-} mice, similar results were observed with F1 limiting monocytosis of 7/4^{hi} monocytes ($p < 0.005$, $10.4 \pm 0.1 \times 10^3$ /mL vs $5.9 \pm 0.7 \times 10^3$ /mL monocytes for saline- and F1-treated LDLR^{-/-} mice, respectively) without any significant effect on 7/4^{lo} monocytes ($p = \text{ns}$, $20.2 \pm 0.3 \times 10^3$ /mL vs $16.4 \pm 0.3 \times 10^3$ /mL for saline- and F1-treated LDLR^{-/-} mice, respectively). In addition, neither the frequency nor the number of monocyte subpopulations was significantly affected by F1 treatment in the bone marrow and in the spleen (data not shown). Interestingly, the atherosclerotic lesion size was correlated with circulating 7/4^{hi} monocyte numbers in the saline-treated APOE^{-/-} mice as

previously shown (Combadiere et al., 2008). Nevertheless, this correlation was not found in F1-treated mice (Figure 4d). In addition, there was no correlation between atherosclerotic lesion size and the number of circulating 7/4^{lo} monocytes in F1- and saline-treated APOE^{-/-} mice (data not shown). Taken together our data show that F1 treatment specifically decreased the size of the blood 7/4^{hi} monocyte population and dissociated the monocytosis from lesion progression suggesting an anti-atherogenic role of F1 through changes in monocyte functions.

F1 treatment reduces CX3CR1-dependent monocyte survival

Interactions between CX3CR1 and its ligand provide an essential survival signal for monocytes and may participate in atherogenesis (Landsman et al., 2009). We hypothesized that, in addition to blocking CX3CR1-dependent adhesion, F1 may inhibit a CX3CR1-dependent survival signal (Figure 5). Bone marrow cells taken from C57bl/6 mice were grown in FCS-free conditions and live cells were identified using flow cytometry by the exclusion of the propidium iodide (Figure 5a). CX3CL1, at 10 and 100 nM, increased 7/4^{hi} monocytes survival by 50% whereas F1, at the same concentrations, had no effect on 7/4^{hi} monocyte survival (Figure 5b). However, when both CX3CR1 agonist and antagonist were added to the medium, F1 strongly inhibited CX3CL1-dependent survival. In order to test whether F1 alters cell survival *in vivo*, monocyte survival was compared in F1-treated or untreated APOE^{-/-} mice. The number of live 7/4^{hi} monocytes was reduced by about 50% in F1-treated APOE^{-/-} mice compared to untreated control mice (Figure 5c). Similar results were observed on 7/4^{lo} monocytes (Figure 5d). Overall our results show that both *in vitro* and *in vivo* F1 treatment reduced CX3CR1-dependent monocyte survival, consistent with the reduction in monocytosis observed after long-term F1 treatment.

F1 treatment slows down the development of advanced atherosclerotic lesions.

Because F1 displayed strong anti-adhesion and anti-survival properties, we thought that it could represent an interesting tool for limiting the development of more advanced atherogenic lesions. To address this question, F1 treatment of APOE^{-/-} mice was delayed by 3 weeks (from 5 to 8 weeks) after HFD and the progression of the atherosclerotic was compared between 8 weeks and 16 weeks of HFD (Figure 6a). ORO staining showed a significant increase in the lesion volume of the 16 weeks-HFD APOE^{-/-} mice ($0.24 \pm 0.03 \text{ mm}^3$) compared to the 8 weeks-HFD APOE^{-/-} mice ($0.12 \pm 0.03 \times 10^3 \text{ mm}^3$). In the F1-treated group, the lesion volumes did not significantly progress between 8 weeks and 16 weeks ($0.19 \pm 0.03 \text{ mm}^3$) and were reduced by about 20% compared to 16 weeks-HFD saline-treated mice. As expected, F1 treatment reduced by 40% the absolute number of 7/4^{hi} monocytes in APOE^{-/-} mice (Figure 6b, $17.8 \pm 4.6 \times 10^3 /\text{mL}$ vs $10.6 \pm 2.3 /\text{mL}$ for saline- and F1-treated mice, respectively) with no effect on the 7/4^{lo} monocytes (p=ns, $43.0 \pm 6.6 \times 10^3 /\text{mL}$ vs $43.6 \pm 12.3 /\text{mL}$ monocytes for saline- and F1-treated mice, respectively). We conclude that F1 acts as a potent inhibitor of atherosclerosis progression probably by controlling monocytosis.

Discussion

Here, we have shown for the first time that pharmacological inhibition of CX3CR1 in murine models of atherogenesis led to reduced atherosclerotic lesion development and attenuated monocytois. The anti-atherogenic potency of CX3CR1 blockade was associated with reduced CX3CR1-dependent adhesion and survival of inflammatory monocytes. This work reveals that controlling monocytois by blocking CX3CR1 may help prevent atherogenesis.

Although convincing evidence has validated the key role of chemokine receptors in promoting atherosclerosis, very few studies have used chemokine receptor antagonists to characterize their proatherogenic functions. Indeed, their role has essentially been inferred from studies using genetically deficient mice with chemokine or chemokine receptor gene deletion (for review, see (Barlic and Murphy, 2007; Weber et al., 2004)). The most studied chemokines regarding atherosclerosis are those controlling monocyte redistribution, as the prevailing model for lesion development proposed that local production of inflammatory chemokines promotes recruitment of monocytes into the intima and their differentiation into macrophages. For these reasons, mice deficient for genes encoding CCR2, CCR5 and CX3CR1 have been instrumental and showed that individual deletion of these genes resulted in a decrease in atherosclerotic lesions (Boring et al., 1998 ; Braunersreuther et al., 2007 ; Combadiere et al., 2003 ; Lesnik et al., 2003). However, none of these genetic deficiencies resulted in the abrogation of atherosclerotic lesions or of macrophage accumulation indicating that a complex network of recruitment signals is at work in atherogenesis. Indeed, multiple chemokine receptors acting in concert to orchestrate the migration of monocyte subpopulations were identified (Combadiere et al., 2008; Saederup et al., 2008 ; Tacke et al., 2007) and showed that CCR2, CX3CR1, and CCR5 play independent and additive roles in atherogenesis. Accordingly, antagonists blocking CCR2 (Olzinski et al., 2010) and CCR5 (Braunersreuther et al., 2008; Veillard et al., 2004) only partially prevented progression of atherosclerotic lesions and macrophage accumulation. To date, no study has assessed CX3CR1 blockade in atherogenesis models.

The chemokine-based CX3CR1 antagonist that we have developed efficiently limited atherosclerotic lesion development both in APOE^{-/-} and LDLR^{-/-} proatherogenic murine models, confirming the role of CX3CR1 in atherogenesis. The extent of inhibition, in term of lipid deposition and macrophage accumulation, was moderate (30% to 50%) but consistent with data obtained in CX3CR1^{-/-} APOE^{-/-} mice (Combadiere et al., 2003 ; Lesnik et al., 2003). This indicates that treatment may be optimal. However, macrophage density within the lesions was similar between saline- and F1-treated mice confirming the existence of CX3CR1-independent recruitment pathways controlling macrophage accumulation in the lesion (Combadiere et al., 2008; Saederup et al., 2008 ; Tacke et al., 2007).

The mechanistic role of CX3CR1 in atherosclerotic lesion progression remains highly debated and data argue for its involvement in monocyte recruitment (Cybulsky and Hegele, 2003), platelet-monocyte complex formation (Postea et al., 2012), dendritic cell accumulation (Liu et al., 2008), smooth muscle cell migration (Lucas et al., 2003) and monocyte survival (Landsman et al., 2009). We assumed that because the sole ligand of CX3CR1 is a membrane-tethered chemokine, it might have a crucial role in capturing monocytes from the blood. Indeed, monocytes exposed *in vivo* or *in vitro* to F1 have much less propensity to adhere to CX3CL1-expressing surfaces, therefore reducing their ability to migrate into the lesions.

Because F1 treatment reduced monocyte adhesion, preventing a portion of monocytes from infiltrating the atherosclerotic lesion, we were expecting that long-term treatment of mice would lead to increased monocytosis. In contrast, we observed that long-term F1 treatment lead to reduced monocytosis, specifically affecting inflammatory monocytes. We postulated that F1 might reduce monocyte survival by blocking the antiapoptotic effect of CX3CL1, as previously reported (Landsman et al., 2009). Our data indicate that inflammatory monocytes exposed *in vivo* or *in vitro* to F1 have impaired survival capacity. Surprisingly, *in vitro* F1 treatment reduced resident monocyte survival, while *in vivo* treatment had no effect. In addition, APOE^{-/-} and LDLR^{-/-} long-term F1 treatment resulted in a 30% reduction in inflammatory monocyte numbers, whilst having no effect on resident monocytes. These results appeared to contradict those obtained in CX3CR1-deficient mice

(CX3CR1^{GFP/GFP}), where a 3-fold reduction in resident monocyte numbers was observed (as compared to wild type) with no alteration in the number of inflammatory monocytes (Landsman et al., 2009). Such a difference in phenotype, which arises from the comparison of genetic deletion to pharmacological inhibition, is not unique and may exist for a number of reasons. A common cause of discrepancies is compensatory mechanisms that take place in gene-deleted mice during development. Another issue in this work is the potential existence of other sites of action of the antagonist that we have not as yet been able to identify. Future studies looking notably at the bioavailability of F1 need to be performed.

The effects of F1 treatment solely on inflammatory monocytes and not on resident monocytes proved particularly intriguing since the former express lower levels of CX3CR1 than the latter. It was expected that monocytes exhibiting strong expression of CX3CR1, the so-called resident monocytes, would be more sensitive to F1. However, previous work from Tacke et al (Tacke et al., 2007) has shown that 1) blood monocytosis was skewed towards an increase in inflammatory monocytes in APOE^{-/-} mice fed on HFD, 2) inflammatory monocytes accumulated in atherosclerotic lesions, whereas resident monocytes entered less frequently and 3) inflammatory monocytes unexpectedly required CX3CR1 in addition to CCR2 and CCR5 to accumulate within plaques. This study proposes CX3CR1 blockade as an effective treatment, aiming to limit recruitment of inflammatory monocytes while keeping intact CCR2-dependent functions. Our data are in perfect agreement with this study but the reasons for this skewing still remain elusive.

An additional novelty in our observations is that, in F1 treated mice, the correlation between lesion size and monocytosis was lost. These data indicate that F1 does not only affect the number of circulating monocytes but also their atherogenic properties. Indeed we confirmed that both *in vitro* and *in vivo* monocyte treatment with the CX3CR1 antagonist reduced the CX3CR1-dependent adherence and the survival of myeloid populations, in accordance with previous reports. We cannot exclude the fact that reduced adherence is due to the induction of cell death, but the inhibition of cell adherence *in vitro* was immediate whereas reduction of cell survival was only detectable after longer treatment, suggesting that inhibition of adherence preceded cell death. Whilst, we cannot rule out the

involvement of F1 in myeloid precursor modulation, neither the frequency nor the number of monocytes in the bone marrow and in the spleen were affected by F1 treatment, indicating that F1 may only act on circulating monocytes.

In conclusion, we show that F1 represents a potent inhibitor of the CX3CR1 axis and a promising compound for the prevention of atherogenesis. F1 was not only able to limit atherosclerosis progression but it also prevented the development of more advanced lesions. By limiting monocytosis, CX3CR1 inhibition may therefore be an alternative or complementary therapy to the more widely-used lipid lowering drugs in the treatment of atherosclerosis.

Acknowledgments: The authors wish to thank Dr Anna Lissina for critical review of the manuscript.

Sources of funding: This work was supported by grants from Inserm, UPMC “emergence”, European Grant ENDOSTEM (FP7# 241440), ANR Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-08-MNPS) and ANR Recherches Interdisciplinaires sur les Systèmes Biologiques et sur l’Innovation Biomédicale (ANR-09-PIRI-0003). C.C. is a recipient of a contract « Interface » from Assistance Publique-Hopitaux de Paris. P.D. is a scientist of the “Centre National de la Recherche Scientifique”.

Disclosures : The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
3. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
4. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366:1267-1278.
5. Jamerson K, Weber MA, Bakris GL, Dahlof B, Pitt B, Shi V, Hester A, Gupte J, Gatlin M, Velazquez EJ. Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2008;359:2417-2428.
6. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359:2195-2207.
7. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165-197.
8. Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol*. 1979;95:775-792.
9. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8264-8268.
10. Danenberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, Moerman E, Golomb G. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation*. 2002;106:599-605.
11. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, Bennett M. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res*. 2007;100:884-893.
12. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
13. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004;172:4410-4417.
14. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2,

- CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185-194.
15. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007;317:666-670.
 16. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*. 2007;117:195-205.
 17. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:894-897.
 18. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 1998;2:275-281.
 19. Teupser D, Pavlides S, Tan M, Gutierrez-Ramos JC, Kolbeck R, Breslow JL. Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:17795-17800.
 20. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debre P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in CX3CR1/Apolipoprotein E Double Knockout Mice. *Circulation*. 2003;107:1009-1016.
 21. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003;111:333-340.
 22. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2008;117:1649-1657.
 23. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 2008;117:1642-1648.
 24. Aiello RJ, Perry BD, Bourassa PA, Robertson A, Weng W, Knight DR, Smith AH, Frederick KS, Kalgutkar A, Gladue RP. CCR2 receptor blockade alters blood monocyte subpopulations but does not affect atherosclerotic lesions in apoE^(-/-) mice. *Atherosclerosis*. 2010;208:370-375.
 25. Olzinski AR, Turner GH, Bernard RE, Karr H, Cornejo CA, Aravindhan K, Hoang B, Ringenberg MA, Qin P, Goodman KB, Willette RN, Macphee CH, Jucker BM, Sehon CA, Gough PJ. Pharmacological inhibition of C-C chemokine receptor 2 decreases macrophage infiltration in the aortic root of the human C-C chemokine receptor 2/apolipoprotein E^{-/-} mouse: magnetic resonance imaging assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:253-259.

26. Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res*. 2004;94:253-261.
27. Braunersreuther V, Steffens S, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Proudfoot A, Mach F. A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1090-1096.
28. Dorgham K, Ghadiri A, Hermand P, Rodero M, Poupel L, Iga M, Hartley O, Gorochoy G, Combadiere C, Deterre P. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol*. 2009;86:903-911.
29. Huby T, Doucet C, Datchet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, Rubin E, Chapman MJ, Lesnik P. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest*. 2006;116:2767-2776.
30. Hermand P, Pincet F, Carvalho S, Ansanay H, Trinquet E, Daoudi M, Combadiere C, Deterre P. Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2008;283:30225-30234.
31. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol*. 2000;20:4106-4114.
32. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C, Jung S. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*. 2009;113:963-972.
33. Weber C, Schober A, Zernecke A. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1997-2008.
34. Barlic J, Murphy PM. Chemokine regulation of atherosclerosis. *J Leukoc Biol*. 2007;82:226-236.
35. Braunersreuther V, Zernecke A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:373-379.
36. Cybulsky MI, Hegele RA. The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003;111:1118-1120.
37. Postea O, Vasina EM, Cauwenberghs S, Projahn D, Liehn EA, Lievens D, Theelen W, Kramp BK, Butoi ED, Soehnlein O, Heemskerk JW, Ludwig A, Weber C, Koenen RR. Contribution of Platelet CX3CR1 to Platelet-Monocyte Complex Formation and Vascular Recruitment During Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1186-1193.

38. Liu P, Yu YR, Spencer JA, Johnson AE, Vallanat CT, Fong AM, Patterson C, Patel DD. CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:243-250.
39. Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation.* 2003;108:2498-2504.

Legends

Figure 1: Pharmacological inhibition of CX3CR1 reduces atherosclerotic plaque development.

APOE^{-/-} (a and b) and LDLR^{-/-} (c) mice fed on high-fat diet were treated with the CX3CR1 antagonist F1. (a) Representative photomicrographs of lipid deposition with ORO staining in aortic sinus of 20-weeks-old APOE^{-/-} treated with F1 (right) or not (left). Quantitative analysis of lesion volume in F1- and saline-treated 20-weeks-old APOE^{-/-} mice (b) and LDLR^{-/-} mice (c). With ** for p<0.01 with * for p<0.05.

Figure 2: Pharmacological inhibition of CX3CR1 attenuates macrophage lesion infiltration in ApoE^{-/-} mice.

Frozen sections from aortic sinus were stained for macrophages infiltration. Representative photomicrographs of MOMA-2 (a and b) and CX3CR1 staining (e and f) in saline- and F1-treated mice, respectively. Graphs represent quantification of the MOMA-2 (c) and CX3CR1 (g) staining area and the ratio of MOMA-2 (g) and CX3CR1 (h) staining area on the ORO lesion area. Bars represent mean±SEM of 8 to 10 mice in each group. * for p<0.05 and “ns” for not significant.

Figure 3: Both *in vitro* and *in vivo* F1 treatment inhibit CX3CR1-dependent monocyte adhesion.

(a) Bone marrow myeloid cells isolated from CX3CR1^{GFP/+} mice were treated or not with F1 at the indicated concentrations and exposed to immobilized CX3CL1. (b) CX3CR1^{GFP/+} APOE^{-/-} mice were treated with F1 or saline and bone marrow myeloid cells were isolated and exposed to immobilized CX3CL1. Data represent the percentage of GFP⁺ adherent cells compared to the number of GFP⁺ cells loaded in the well. Non-coated wells defined non-specific adhesion and was below 1%. Each figure is

a representative experiment from three independent assays and results are expressed as mean $\pm$ SEM %of CX3CR1-dependent adherent cells.

Figure 4: F1 reduces monocytoysis in APOE^{-/-} mice.

(a) Representative flow cytometry dot plot of blood myeloid populations with inflammatory monocytes defined as CD11b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{hi} and resident monocytes as CD11b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{lo}. Quantitative analysis of CD11b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{hi} (b) and CD11b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{lo} (c) cell populations expressed as number per mL of blood of saline- (white bars) and F1-treated (black bars) APOE^{-/-} mice. Each data set is summarized as mean $\pm$ SEM of 8 to 10 mice with * for p< 0.05. (d) Correlation between lesion volume and the number of blood CD11b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{hi} monocytes in saline and F1-treated APOE^{-/-} mice. Correlation r² and Pearson p value are indicated.

Figure 5 : F1 reduces CX3CR1-dependent monocyte survival.

(a) Representative flow cytometry dot plot of bone marrow monocyte populations stained with propidium iodide. (b) Mononuclear cells from the bone marrow of C57bl/6 mice were incubated for 4 hours in FCS-free medium in presence of CX3CL1 (grey bars) or F1 (Black bars) or both (hatched bars) at the indicated concentrations. Live CD11b⁺ Ly6G⁻ 7/4^{hi} monocytes were quantified by PI exclusion. Results are expressed as number of live monocytes. Bars represent mean $\pm$ SEM of triplicates pooled from 2 independent experiments. (c and d) APOE^{-/-} mice were treated with PBS or F1 for 24h. Blood cells were isolated and incubated for 4 hours in FCS-deprived medium. Live 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocytes were quantified by PI exclusion in c and d, respectively. Results are expressed as number of PI negative cells. Bars represent mean $\pm$ SEM of 3 mice for 3 independent experiments. * for p< 0.05 and ** for p< 0.01.

Figure 6 : F1 treatment slows down the development of advanced atherosclerotic lesions.

(a) Quantification of the ratio of the lesion extent on the lumen area with the ORO staining. Quantitative analysis of lesion volume in 8- and 16-weeks-old APOE^{-/-} mice with ** for $p < 0.01$. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (b) Quantitative analysis of inflammatory monocytes expressed as number per mL of blood of saline- (white bars) and F1- (black bars) treated 16 weeks old mice. * for $p < 0.05$.

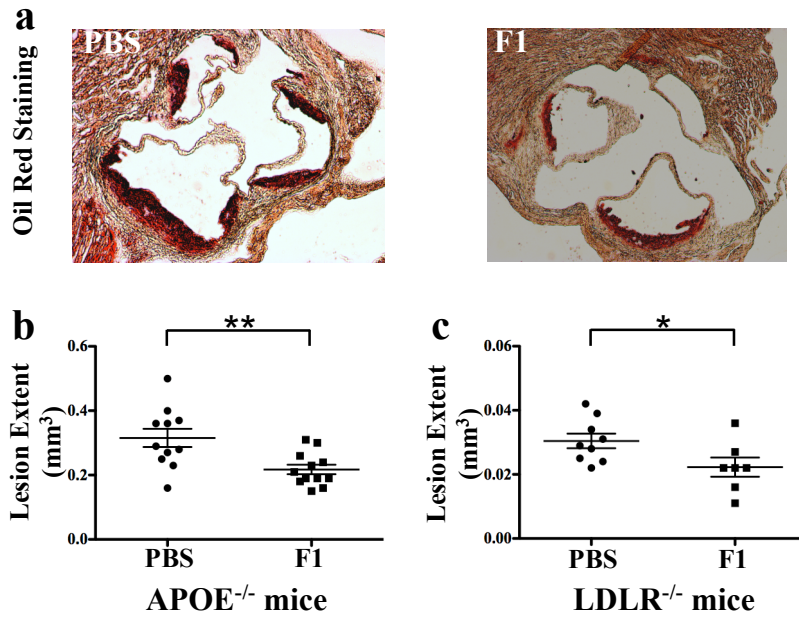


Figure 1 : Pharmacological inhibition of CX3CR1 reduces atherosclerotic plaque development.

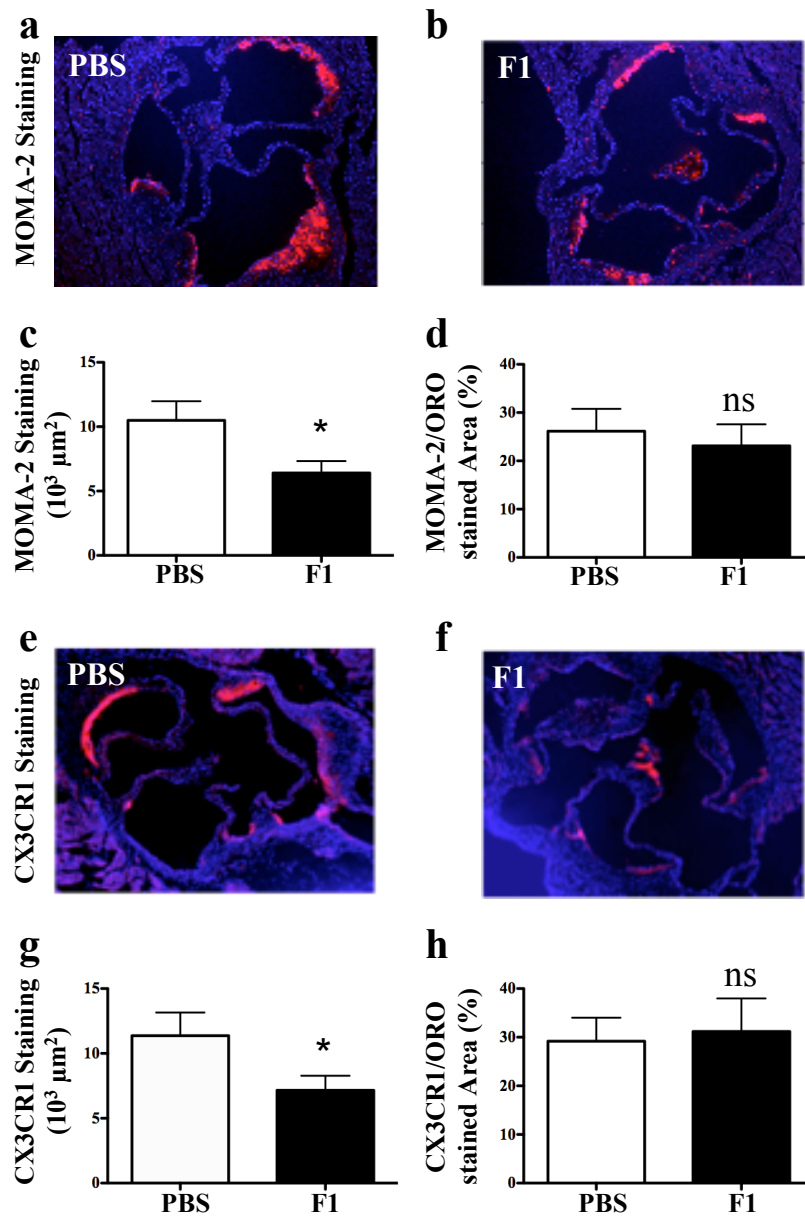


Figure 2 : Pharmacological inhibition of CX3CR1 attenuates macrophage lesion infiltration in APOE^{-/-} mice.

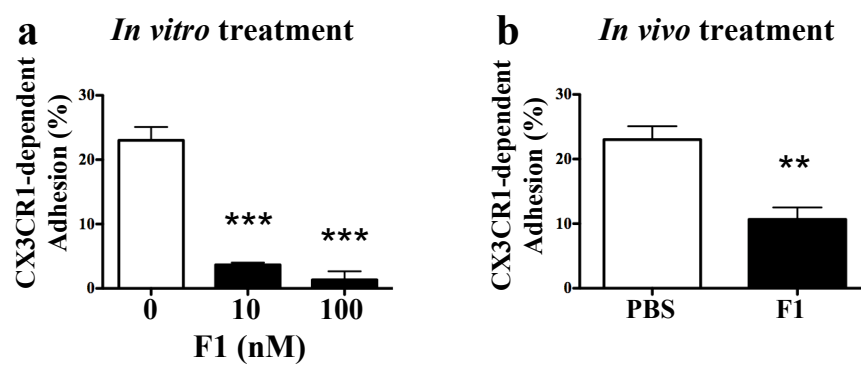


Figure 3 : Both *in vitro* and *in vivo* F1 treatments inhibit CX3CR1-dependent monocyte adhesion.

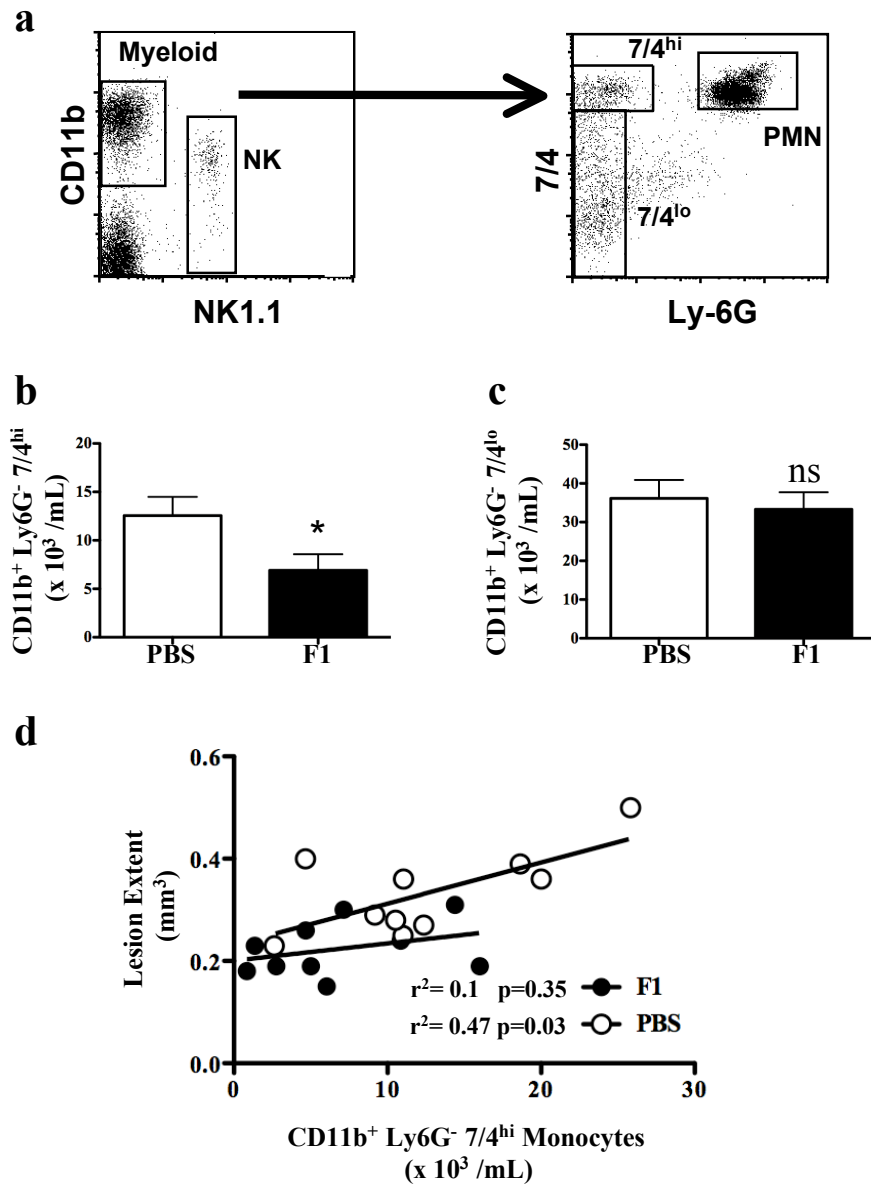


Figure 4: F1 reduces monocytes in APOE^{-/-} mice.

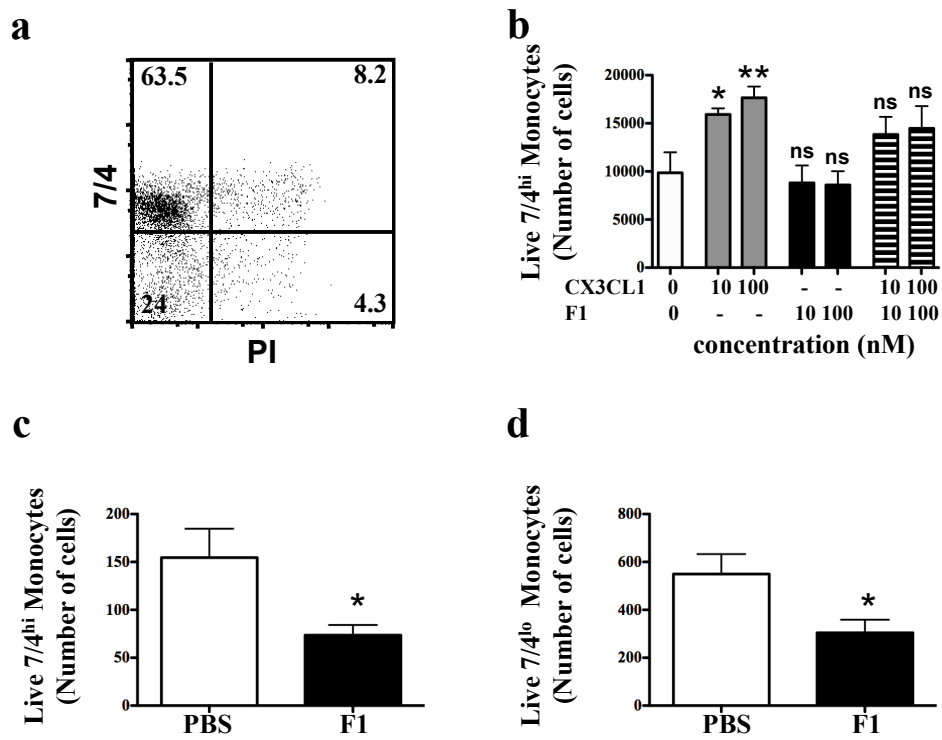


Figure 5 : F1 treatment reduces CX3CR1-dependent monocyte survival.

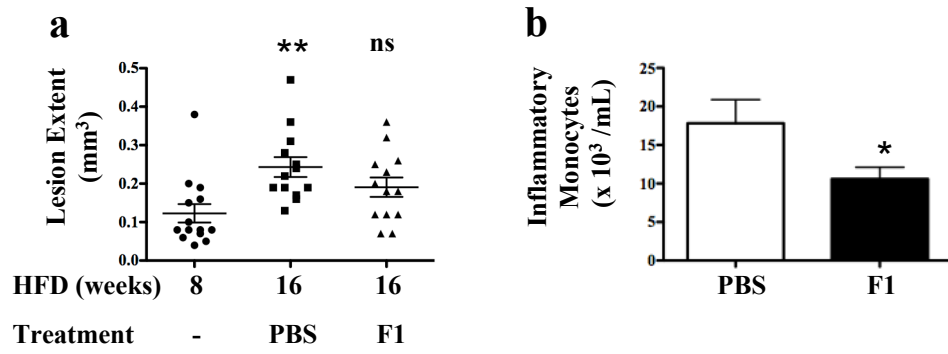


Figure 6 : F1 treatment slows down the development of advanced atherosclerotic lesions.

Résumé des résultats

V Résumé des résultats obtenus

L'utilisation précoce de F1 dans le développement de la maladie, après 5 semaines de régime hyperlipidique dans le modèle de souris ApoE, nous permet de contrôler le développement des plaques d'athérosclérose. Les souris traitées par F1 présentent des tailles de plaques 30% plus petites que les souris témoins (coloration ORO) (*Figure 1*).

Nous montrons également que F1 affecte le recrutement des MO au niveau de la lésion mais pas sa composition en macrophages. En effet, les marquages spécifiques des monocytes-macrophages (MoMA2) et de CX3CR1 sur des coupes de cœur de souris traitées par F1 sont significativement moins importants. Cependant, la proportion de ce marquage par rapport à la taille totale de la plaque est identique dans les deux groupes (rapport marquage MOMA2/ORO et CX3CR1/ORO) (*Figure 2*). Nous mettons en évidence que F1 inhibe spécifiquement l'adhérence des MO 7/4^{high} sur un tapis de CX3CL1 immobilisées in vitro et ex vivo avec des MO de moelle osseuse de souris traités par F1 (*Figure 3*).

Nous observons que les souris traitées par F1 ont une diminution spécifique du nombre de monocytes 7/4^{high} et nous corrélons directement la taille des plaques d'athérosclérose au nombre de monocyte 7/4^{high} circulant (*Figure 4*). A l'inverse de la propriété de survie de CX3CL1, F1 diminue la survie cellulaire. Les marquages à l'iodure de propidium sur des souris CX3CR1 GFP hétérozygote ont montré une mortalité plus importante des MO 7/4^{high} dans les souris traitées. F1 inhibe spécifiquement la survie des monocytes 7/4^{high} in vitro et ex vivo avec des MO de moelle osseuse (*Figure 5*).

Enfin l'utilisation tardive de F1, après 8 semaines de régime hyperlipidique permet de contrôler le développement des lésions d'athéroscléroses. Les souris traitées avec F1 ont des plaques plus petites que les souris non traitées et significativement non différentes du groupe contrôle, sacrifié le jour du début des injections (*Figure 6*).

Discussion

VI Discussion

- Rôle spécifique de CX3CR1 dans le développement de l'athérosclérose.

Notre travail met en évidence que l'utilisation d'un antagoniste de CX3CR1 à un temps précoce ou tardif du développement de l'athérosclérose permet de limiter partiellement le processus de formation des plaques d'athérome. Cette diminution est identique à celle obtenue dans les souris invalidées génétiquement pour le gène codant pour CX3CR1 et suggère que l'inhibition de CX3CR1 par l'antagoniste F1 est totale ce qui conduit à imaginer que l'invalidation génétique de CX3CR1 n'entraîne pas de phénomène de compensation au niveau de la formation des plaques d'athérosclérose. Cependant, les invalidations pharmacologique ou génétique de CX3CR1 n'entraînent qu'une protection partielle contre l'athérosclérose et ne sont pas spécifiquement déterminantes pour le recrutement des MO. Ces résultats corroborent l'observation décrite par Combadière et al., prouvant que la formation des plaques d'athérosclérose fait intervenir différentes voies chimiokines (CX3CR1, CCR2 et CCR5) mais que celles-ci sont complémentaires et indépendantes ; l'une ne peut se substituer à l'autre (Combadière et al., 2008). Ainsi, l'implication de CX3CR1 dans le développement des plaques d'athérosclérose est complexe.

Nos résultats montrent que F1 diminue spécifiquement les MO 7/4^{high} circulant, une des hypothèses serait qu'en conséquence F1 entraîne un recrutement préférentiel de la sous-population monocyttaire 7/4^{high} au niveau de la plaque, pouvant conduire à une modification des sous-populations accumulées. Pour vérifier cela, nous avons tenté de suivre le devenir des MO au niveau de la plaque en les traçant à l'aide de sondes fluorescentes. Nous avons utilisé des MO 7/4^{high}, provenant de la moelle osseuse de souris traitées in vitro par F1 (marquage CMTMR) ou non (marquage CFSE) puis ré-injectés en IP à des souris ApoE -/- sous régime hyperlipidique. Le niveau de mortalité de ces cellules marquées et la disparition du marquage ne nous ont pas permis de retrouver un nombre suffisant de cellules au niveau des plaques pour que les données soient exploitables. Une technique permettant de distinguer par immunohistochimie les différentes sous-populations de monocytes/macrophages infiltrées au niveau des lésions serait une alternative nécessaire. Malheureusement aujourd'hui il n'existe pas d'anticorps murin connu et efficace (tel qu'un co-marquage anti CX3CR1 et anti CCR2) permettant de réaliser cela. A la place, il pourrait être envisagé d'utiliser des souris

transgénique ayant des marqueurs fluorescents rapporteurs de l'expression de CX3CR1 et de CCR2, en notre possession, associé à une mutation du métabolisme lipidique.

L'utilisation de F1, après 8 semaines de régime hyperlipidique dans le modèle ApoE $-/-$, permet toujours de contrôler le développement des lésions. Les plaques d'athéromes des souris traitées par F1 sont plus petites que celles du groupe de souris non traitées et leurs tailles ne sont pas différentes du groupe témoin, sacrifié le jour du début des injections de F1. Ces résultats mettent en évidence que CX3CR1 est impliqué tout au long du processus de développement des plaques d'athérosclérose et que son absence n'empêche pas leur développement mais semble le ralentir : F1 ne peut pas inverser le processus enclenché. Cette observation est importante d'un point de vue thérapeutique, car malgré l'émergence des biomarqueurs, l'athérosclérose est une pathologie que l'on ne peut soigner que de façon curative étant donné son aspect asymptomatique.

Nos résultats montrent également que dans ces deux modèles d'athérosclérose précoce ou avancée, l'utilisation de F1 entraîne de subtiles modifications de l'environnement lipidique. En effet, la concentration plasmatique du cholestérol total reste inchangée tandis que celles du cholestérol libre et des triglycérides diminuent. Ces résultats sont fréquents lorsque l'on travaille dans des modèles murins génétiquement modifiés dans le métabolisme des lipides. Cette diminution est difficile à expliquer et suggère que CX3CR1 a un rôle négatif dans l'élimination des lipides circulants et pose le problème suivant : F1 diminue-t-il le développement des plaques en contrôlant le niveau de cholestérol libre et de triglycérides plasmatiques ou en contrôlant le recrutement des MO au niveau de la plaque ? ou les deux ?

Enfin, F1 est également capable de contrôler le développement des plaques d'athérosclérose dans un deuxième modèle de souris. Les souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur au LDL est un modèle moins athérogène que le modèle ApoE et montre de ce fait des résultats moins marqués. F1 diminue le développement des plaques d'athérosclérose, comparé au groupe de souris non traitées.

Ces deux modèles murins déclenchent l'athérosclérose par des mécanismes moléculaires différents provoquant de ce fait une susceptibilité différente face au développement des plaques sous régime hyperlipidique. Cependant, notre travail montre que quel que soient les

mécanismes initiateurs de l'athérosclérose mis en place, F1 est capable de limiter le développement des plaques d'athérosclérose.

- Rôle de CX3CR1 dans la mobilisation des monocytes au niveau de la plaque d'athérosclérose

La numération cellulaire après traitement par F1 met en évidence une diminution de la population myéloïde principalement due à la diminution spécifique de la sous-population monocyttaire inflammatoire $7/4^{\text{high}}$. Cette diminution s'observe à la fois sur le pourcentage et le nombre des MO $7/4^{\text{high}}$. Elle est associée à la diminution de la taille des plaques d'athérosclérose. Cela nous a permis d'établir une corrélation directe entre la taille des plaques et le nombre de MO $7/4^{\text{high}}$ circulants. Cette observation affine les premières observations de Combadière et al., qui corrélaient le nombre total de MO à la taille des plaques (Combadière et al., 2003). L'étude de la moelle osseuse et de la rate révèle que cette diminution ne semble pas due à un défaut de production ou de rétention de ces derniers dans ces deux compartiments. En effet, aucune variation de leur pourcentage ou de leur nombre n'est observée entre les groupes dans les deux cas. F1 affecte uniquement la sous-population monocyttaire circulante qui exprime le moins de récepteur CX3CR1 à sa surface.

Une des hypothèses pour expliquer l'effet spécifique de F1 sur les populations $7/4^{\text{high}}$ et pas $7/4^{\text{low}}$ pourrait être un « effet dose » : F1 bloquerait totalement CX3CR1 sur les MO $7/4^{\text{high}}$ et seulement partiellement ou moins efficacement ceux présents à la surface des MO $7/4^{\text{low}}$. Ainsi, les MO $7/4^{\text{high}}$ sont plus sensibles à un antagoniste de CX3CR1. Il faudrait peut être augmenter la dose de protéines F1 injectée pour toucher les deux populations simultanément. Des études de cinétique de F1 nous ont permis de constater qu'une seule injection intrapéritonéale de F1 permet d'obtenir une diminution significative des MO $7/4^{\text{high}}$ dans le sang et que celle-ci se maintient dans le temps avec une injection de F1 tous les deux jours. Deux aspects particuliers sont à noter ici :

1) ces résultats observés dans la souris ApoE -/- ne sont pas retrouvés dans les souris C57bl/6. En effet, l'effet de F1 sur les monocytes $7/4^{\text{high}}$ ne semble significatif qu'en contexte inflammatoire. Les souris ApoE sont connues pour leur contexte inflammatoire, elles présentent une monocytose 4 fois supérieure à une souris sauvage sous régime normal et 16 fois supérieure pour les monocytes Ly6C high vs Ly6C low. Cette forte monocytose pourrait

expliquer que l'effet de F1 est plus facilement visible dans un modèle de souris ApoE (Swirski et al., 2007).

2) la cinétique d'action de F1 semble très courte, ce qui soulève de nombreuses questions sur les mécanismes d'action de F1.

- Mécanismes mis en jeu par l'utilisation de F1

Afin de comprendre les mécanismes moléculaires permettant à F1 de diminuer la monocytose des $7/4^{\text{high}}$, nous nous sommes intéressés aux propriétés fonctionnelles de sa cible physiologique, c'est-à-dire CX3CR1. Deux fonctions précises ont été analysées en présence de F1 : l'adhérence et l'apoptose.

Adhérence CX3CR1-CX3CL1

Il est bien établi que le couple CX3CR1-CX3CL1 joue un rôle majeur dans le trafic des leucocytes notamment : la fixation de CX3CL1 par les leucocytes circulant au niveau de l'endothélium activé déclenche l'adhérence et la capture de ces derniers indépendamment des intégrines (Fong et al., 1998). Des expériences d'adhérence nous ont permis de mettre en évidence que F1 est capable d'inhiber spécifiquement l'adhésion des monocytes de la moelle osseuse sur la CX3CL1 immobilisée. Ces résultats nous permettent de supposer que *in vivo*, F1 limite le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium et par conséquent au niveau de la plaque d'athérosclérose. Des études menées au sein du laboratoire, basées sur l'imagerie intravitale montrent que le traitement par F1 induit une augmentation de la mobilité des monocytes dans le parenchyme de la moelle et une diminution de leur adhérence sur les parois des sinusoides suggérant que CX3CR1 serait associé à la rétention des MO $7/4^{\text{high}}$ au niveau de la moelle osseuse (Jacquelin et al, en cours). Nous allons développer prochainement une approche similaire en testant l'effet de F1 sur le « crawling » des MO le long de la barrière endothéliale dans la peau de souris CX3CR1-GFP. Nos résultats préliminaires n'ont pas montré d'effet significatif de F1 sur l'adhérence des MO ; cependant toutes nos études ont été réalisées 18h après la dernière injection de F1 suggérant que la durée d'action de F1 est un facteur limitant.

Apoptose et la voie CX3CR1-CX3CL1

La question se pose ensuite du devenir des MO : notre hypothèse est que par défaut d'adhérence sur les sites inflammatoires, ces derniers ne survivent pas. Différentes études ont mis en évidence un pouvoir anti-apoptotique de CX3CL1 et notamment dans l'athérosclérose. Certains ont décrit que la production de CX3CL1 était maximale au début du processus de développement des plaques quand la prolifération des cellules musculaires lisses et l'accumulation des MP est prédominante. Donc les effets anti-apoptotique et/ou prolifératif de CX3CL1 auraient un rôle dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose (Volger et al., 2007).

Landsman et al. ont récemment observé que l'absence de l'interaction CX3CR1-CX3CL1 provoque une augmentation de l'apoptose des macrophages et de ce fait entraîne une diminution du développement des plaques. L'ajout d'un transgène Bcl2 restaure le développement naturel des plaques en l'absence de CX3CR1, révélant que ce dernier est vital pour la survie des macrophages (Landsman et al., 2009).

Nous avons donc testé l'effet de F1 sur la survie cellulaire in vitro et ex vivo. Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence que F1, en empêchant l'interaction CX3CR1-CX3CL1, diminue significativement la survie des cellules 7/4^{high} in vitro. Ces expériences confirment le rôle de CX3CR1 dans la survie cellulaire et notre hypothèse. Cette action de F1 au niveau des MO pourrait entraîner la formation de lésions très nécrotique et donc instable. Des marquages « tunel », permettant de voir la mort cellulaire par apoptose en histologie, sont actuellement en cours pour vérifier ce point.

Enfin il est prévu de déterminer si l'utilisation de F1 entraîne une modification de l'environnement inflammatoire. En contrôlant la monocytose et le développement des plaques d'athérosclérose, F1 pourrait en effet provoquer une diminution de la concentration plasmatique de cytokines inflammatoires. Un dosage ELISA de CX3CL1 nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration plasmatique de cette dernière chez les souris traitées avec F1. Cependant, cette mesure est faussée par le fait qu'il est impossible de différencier CX3CL1 de la protéine F1 injectée. Cette augmentation peut donc être due à une réelle augmentation du CX3CL1 endogène ou à la détection de F1 dans le plasma. Des dosages « multiplex » d'autres cytokines sont en cours.

- Autres travaux

D6

Nous avons également étudié le rôle des chimiokines dans l'athérosclérose à travers le récepteur leurre D6. Ce récepteur est connu pour lier certaines chimiokines et plus particulièrement CCL2 sans déclencher de signaux cellulaires. L'invalidation génétique de D6 dans un modèle d'infarctus du myocarde entraîne une augmentation du niveau plasmatique de CCL2 et de CCL3 corrélée à une augmentation de l'infiltration de neutrophiles et de MO 7/4^{high} (Cochain et al., 2012). Notre hypothèse est qu'en l'absence du récepteur D6, l'augmentation de CCL2 circulant devrait entraîner une augmentation de l'inflammation systémique, une augmentation du recrutement des MO au niveau de la lésion et par conséquent amener le développement de grosse plaque d'athérome.

Afin d'étudier le rôle de D6 dans l'athérosclérose, nous avons croisé des souris invalidées pour le gène de l'Apo E avec des souris invalidées pour le gène D6 afin d'obtenir des souris doubles déficientes pour les deux gènes. L'analyse de la taille des plaques a mis en évidence que les souris Apo E x D6 KO développent de plus petites plaques d'athéromes et leur numération cellulaire dans le sang et la moelle osseuse est quasiment identique à une souris Apo E .

Les résultats obtenus avec la double invalidation génétique du gène D6 et Apo E vont à l'encontre des hypothèses attendues. Une analyse transcriptionnelle des souris doubles mutées a révélé, que le gène CYP8B1 présent en amont du gène D6 est dérégulé par l'invalidation de ce dernier. La protéine CYP8B1 catalyse de nombreuses réactions métabolique ; elle est impliquée dans la synthèse de l'acide cholique. Cet acide biliaire affecte la solubilité du cholestérol permettant son absorption au niveau de l'intestin. Une étude récente utilisant des souris doublements invalidées pour le gène de l'ApoE et de Cyp8B1 a montré que ces souris sont partiellement protégées de l'athérosclérose et présentent une diminution du taux de cholestérol et de triglycérides plasmatique par rapport aux souris ApoE-/- (Slätis K et al J lipid Res 2010). Les résultats que nous obtenons sont donc cohérents avec la dérégulation de la synthèse du gène Cyp8b1 et sont inexploitable pour notre analyse. Des recherches sont actuellement en cours afin d'invalider le gène D6 sans affecter l'expression du gène Cyp8b1.

- **Autres travaux impliquant les CK**

Dans un contexte non hyperlipidémique, j'ai participé à la découverte de l'implication du récepteur leurre D6 dans le remodelage cardiaque après l'infarctus du myocarde (Cochain et al., ATVB 2012 annexe 1).

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu également collaborer à la découverte du rôle délétère du récepteur CCR1 dans le syndrome hémolytique urémique (Ramos VM. et al, M J pathol 2012 annexe 2) ainsi que dans le cancer du foie (Rodero MP et al, Neoplasia 2013 annexe 3), du rôle favorable de l'axe CCL2/CCR2 sur le contrôle de la néovascularisation cardiaque post-ischémique (Cochain et al., Cardiovasc Res 2010 annexe 4) à l'aide de modèles murins et de l'absence d'association entre des polymorphismes de la lactadhérine, glycoprotéine impliquée dans la reconnaissance des débris apoptotiques par les macrophages, dans l'angiogénèse VEGF dépendante, et la maladie de Dégénérescence Maculaire Lié à l'Age (Raoul W et al, Plos One 2012 annexe 5).

Conclusion et Perspectives

VII Conclusions générales et perspectives

L'antagoniste de CX3CR1 que nous avons caractérisé permet de maîtriser le développement des plaques d'athérosclérose et d'inhiber la monocytose des 7/4^{high} en modifiant leurs propriétés d'adhérence et de survie. Cette inhibition partielle met en évidence le fait qu'une molécule unique ne suffit pas à un contrôle suffisant de la pathologie. Une des premières perspectives serait d'utiliser cet antagoniste en association avec d'autres molécules, comme un antagoniste de CCR2 actuellement mis au point dans le laboratoire ou en combinaison avec des traitements préventifs conventionnels de l'athérosclérose (statine, anticoagulants, antiplaquettaires...). D'autre part, cette étude nous a permis de mieux comprendre le rôle de CX3CR1 dans la mobilisation des MO au cours d'un processus inflammatoire et de mettre en évidence qu'il s'étend au-delà de sa fonction de migration et de recrutement.

Le ciblage de l'axe CX3CR1-CX3CL1 pour des visées thérapeutiques ne se limite pas à la pathologie de l'athérosclérose. Sa position centrale dans la régulation des fonctions du système immunitaire explique son implication dans de nombreuses pathologies. Pouvant être protecteur ou délétère, le ciblage de cet axe est soumis à la balance des effets contradictoires qu'il peut générer dans ses réponses. Prenons quelques exemples :

L'axe CX3CR1-CX3CL1 possède un rôle critique néfaste dans différentes pathologies. Il joue un rôle délétère pro-inflammatoire dans la mise en place de l'inflammation du poumon dans le cadre d'une réaction asthmatique par un effet de recrutement et de survie des lymphocytes T CD4. Dans le cas de d'une ischémie cardiaque, la protection des souris déficientes pour CX3CR1 est associée à un milieu inflammatoire protecteur caractérisé par une polarisation des macrophages en sous-type M2 au temps précoce après lésion (Fumagalli et al., 2013). Enfin, dans un modèle de lésion artérielle la protection de la déficience de CX3CR1 est corrélée à une diminution de l'infiltration des monocytes au niveau de la lésion conduisant à une diminution de l'hyperplasie intinale (Liu et al., 2006).

A l'inverse, l'axe CX3CR1-CX3CL1 possède un rôle critique bénéfique dans d'autres pathologies. Dans le cas de lésions hépatiques induites par le tétrachlorure de carbone, un modèle de souris invalidées pour le gène CX3CR1 met plus longtemps à contrôler l'inflammation comparé aux souris sauvages et les macrophages nouvellement infiltrés entrent plus rapidement en apoptose (Karlmark et al., 2010). Dans des modèles de DMLA,

l'invalidation de CX3CR1 conduit à une accumulation des cellules microglies dans l'espace sous-rétinien et favorise l'apparition de drusens responsables des lésions oculaires (ref). Une hypothèse serait que CX3CR1 contrôle la sortie microgliales de cet espace. Au cours du sepsis, dans un modèle de CLP, la déficience de CX3CR1 aboutit à une diminution du contrôle bactérien et de la survie des animaux. Dans cette étude les auteurs montrent que les monocytes favorisent l'activité bactéricide des neutrophiles via l'axe CX3CR1 (Ishida et al., 2008).

Dans les cas de cancers, le rôle de CX3CR1 est ambigu. Protecteur, la présence d'une forte concentration locale de CX3CL1 semble limiter la production des facteurs de croissance tumoraux par l'activation des lymphocytes NK, des cellules dendritiques et des cellules T (Nukiwa et al., 2006; Xin et al., 2005). Délétaire, la présence de CX3CL1 semble également être associée, dans certains cas, à un potentiel métastatique plus élevé (Andre et al., 2006). De plus CX3CL1 est connue pour induire la production de VEGF facteur indispensable à l'angiogénèse.

Ces exemples mettent en évidence que l'ambition thérapeutique de l'axe CX3CR1-CX3CL1 ne peut se faire sans un ciblage spécifique du mécanisme à moduler. Dans le cas où l'axe CX3CR1 est néfaste en participant à la pathogenèse ou au maintien de la maladie, l'antagoniste F1 pourrait être un traitement envisageable. En revanche, dans un contexte où le duo CX3CR1-CX3CL1 est bénéfique, le traitement par F1 serait à proscrire au profit d'un traitement par un super agoniste de CX3CR1 par exemple.

Le cas des cancers est particulier et met en évidence la complexité du ciblage du réseau chimiokine. Les chimiokines, et particulièrement CX3CL1, sont impliquées dans une multitude de fonctions dont la balance est probablement dépendante de l'environnement local. Ainsi en fonction de la propriété du couple mise en avant, immunorégulatrice, angiogénique ou chimiotactique, le couple CX3CR1-CX3CL1 peut être aussi bien pro- qu'anti- tumoral.

Malgré le rôle controversé de CX3CL1, des études menées sur la souris ont révélé que la surexpression de CX3CL1 au niveau local de la tumeur induit une diminution de l'expression des facteurs de croissances et des métastases spontanées (Zeng et al., 2005). CX3CL1 participe également à un meilleur recrutement des populations leucocytaires anti-tumorales (Lavergne et al., 2003). Cela met en évidence une notion importante dont il faut tenir compte pour la recherche translationnelle de l'axe CX3CR1-CX3CL1 et des chimiokines en général, celle de l'espace. Délivrer spécifiquement la molécule au site de prédilection afin de limiter

au maximum la dérégulation des mécanismes non ciblés. La notion temporelle est également très importante. Les récepteurs de chimiokines peuvent avoir un rôle séquentiel dans la mise en place et le développement des maladies. Ainsi, dans l'athérosclérose le récepteur CCR5 semble n'être impliqué que lors des phases tardives du développement de la maladie (Kuziel et al., 2003). Cette notion peut être corrélée aux recrutements séquentiels des différentes sous-populations cellulaires au niveau des sites de prédilection par différents axes.

Dans le cas de l'athérosclérose, la notion temporelle est biaisée due au caractère asymptomatique de la maladie et la notion d'espace est délicate lorsqu'il s'agit des monocytes. En effet, la taille des plaques est directement corrélée au nombre de monocytes circulants, un traitement localisé pourrait être envisagé pour empêcher spécifiquement leur recrutement au niveau de la lésion. Le traitement systémique par F1 pose problème dans le sens où il induit potentiellement une diminution générale du recrutement des monocytes (diminution des monocytes circulants, défaut d'adhérence). En cas d'apparition d'une autre pathologie ou d'une pathologie associée cela peut être problématique. Nous avons montré que F1 bloque le recrutement monocyttaire dans un modèle inflammatoire de péritonite (Dorgham et al., 2009). La stratégie serait donc de pouvoir cibler spécifiquement les monocytes impliqués dans le développement de la plaque d'athérosclérose sans altérer le nombre total de monocytes circulants. Il faudrait pouvoir délivrer spécifiquement F1 au niveau de la lésion, afin d'empêcher les monocytes d'adhérer à l'endothélium et d'y pénétrer. Il serait intéressant d'étudier la réponse d'une utilisation locale au niveau des monocytes. On pourrait imaginer qu'administré de cette façon, la dose de F1 locale serait plus importante et suffisante pour toucher en même temps les deux sous populations monocytaires.

La fonction de survie de CX3CR1 est également intéressante car elle pourrait être utilisée pour détruire les édifices cellulaires impliquant des cellules qui expriment CX3CR1 par un ciblage local. Malheureusement, si à un stade précoce l'apoptose est bénéfique à la résolution de l'athérosclérose elle est délétère et dangereuse à un stade tardif en favorisant la nécrose et en amplifiant l'inflammation (Tabas, 2009). Dans l'état actuel la balance risque/bénéfice d'un traitement par F1 est difficile à déterminer. Par contre au niveau des cancers, nous envisageons dans le laboratoire de tester l'utilisation de F1 en locale afin d'induire directement l'apoptose des tumeurs d'origine cellulaire CX3CR1⁺ ou indirectement en agissant au niveau des macrophages pro-tumoraux.

Ces exemples illustrent la difficulté de prédire précisément les conséquences globales de l'utilisation d'un traitement dirigé contre l'axe CX3CR1-CX3CL1 sur la réponse immunitaire et concrétise l'importance de prendre en compte les notions d'espace et de temps. Aussi il semble aujourd'hui évident qu'une action combinée des agents thérapeutiques est essentielle pour optimiser les résultats et prévenir des effets secondaires surtout dans les cas de pathologies multiples et de co-morbidité. Cela met également en évidence la limite de nos recherches sur des modèles murins très éloignés de la réalité pathologique de l'organisme humain. Les stratégies thérapeutiques touchant le fonctionnement du système immunitaire doivent nécessairement passer par une fine compréhension des mécanismes moléculaires impliqués. Comme je l'ai déjà exposé précédemment, l'utilisation des souris génétiquement invalidées est pratique pour ce dernier point mais ne reflète pas la réalité surtout lorsqu'on les place dans un contexte pathologique. Les mécanismes moléculaire de compensation dus à une invalidation génétique congénitale sont difficiles à appréhender et rendent difficile la translation à l'homme. L'utilisation des antagonistes est un bon compromis dans ce contexte, bien qu'on sache qu'il existe des différences d'expression et d'affinité des CK/RCK.

La spécificité du duo CX3CR1-CX3CL1, la diversité de ses fonctions et l'ensemble de ces recherches mettent néanmoins en évidence la légitimité de tenter d'utiliser le système CK/RCK comme cible pharmacologique en vue de traiter des patients atteints de maladies cardiovasculaires mais aussi d'autres pathologies inflammatoires.

La complexité des mécanismes mis en jeu soulève de nombreuses limites mais révèle qu'il y a encore beaucoup de grandes découvertes à faire et de l'espoir pour les patients.

Annexes

Annexe 1

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

The Chemokine Decoy Receptor D6 Prevents Excessive Inflammation and Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction

Clément Cochain, Constance Auvynet, Lucie Poupel, José Vilar, Edouard Dumeau, Adèle Richart, Alice Récalde, Yasmine Zouggari, Kiave Yune Ho Wang Yin, Patrick Bruneval, Gilles Renault, Carmen Marchiol, Philippe Bonnin, Bernard Lévy, Raffaella Bonecchi, Massimo Locati, Christophe Combadière and Jean-Sébastien Silvestre

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:2206-2213; originally published online July 12, 2012;
doi: 10.1161/ATVBAHA.112.254409

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/32/9/2206>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2012/07/12/ATVBAHA.112.254409.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

The Chemokine Decoy Receptor D6 Prevents Excessive Inflammation and Adverse Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction

Clément Cochain, Constance Auvynet, Lucie Poupel, José Vilar, Edouard Dumeau, Adèle Richart, Alice Récalde, Yasmine Zougari, Kiave Yune Ho Wang Yin, Patrick Bruneval, Gilles Renault, Carmen Marchiol, Philippe Bonnin, Bernard Lévy, Raffaella Bonecchi, Massimo Locati, Christophe Combadière,* Jean-Sébastien Silvestre*

Objective—Leukocyte infiltration in ischemic areas is a hallmark of myocardial infarction, and overwhelming infiltration of innate immune cells has been shown to promote adverse remodeling and cardiac rupture. Recruitment of inflammatory cells in the ischemic heart depends highly on the family of CC-chemokines and their receptors. Here, we hypothesized that the chemokine decoy receptor D6, which specifically binds and scavenges inflammatory CC-chemokines, might limit inflammation and adverse cardiac remodeling after infarction.

Methods and Results—D6 was expressed in human and murine infarcted myocardium. In a murine model of myocardial infarction, D6 deficiency led to increased chemokine (C-C motif) ligand 2 and chemokine (C-C motif) ligand 3 levels in the ischemic heart. D6-deficient (D6^{-/-}) infarcts displayed increased infiltration of pathogenic neutrophils and Ly6Chi monocytes, associated with strong matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 activities in the ischemic heart. D6^{-/-} mice were cardiac rupture prone after myocardial infarction, and functional analysis revealed that D6^{-/-} hearts had features of adverse remodeling with left ventricle dilation and reduced ejection fraction. Bone marrow chimera experiments showed that leukocyte-borne D6 had no role in this setting, and that leukocyte-specific chemokine (C-C motif) receptor 2 deficiency rescued the adverse phenotype observed in D6^{-/-} mice.

Conclusion—We show for the first time that the chemokine decoy receptor D6 limits CC-chemokine-dependent pathogenic inflammation and is required for adequate cardiac remodeling after myocardial infarction. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2206-2213.)

Key Words: chemokines ■ immune system ■ inflammation ■ ischemic heart disease ■ leukocytes

The inflammatory response that develops in the ischemic heart after myocardial infarction (MI) is a major determinant of left ventricle (LV) remodeling.¹ In mice, several leukocyte subsets infiltrate the ischemic heart: neutrophils massively infiltrate the myocardium within the first 24 hours and rapidly fade thereafter. Infiltration of the 2 monocytes subsets, Ly6Chi and Ly6Clo, is biphasic; Ly6Chi monocytes dominate the acute phase of injury during the first 4 days, whereas Ly6Clo monocytes are prevalent thereafter.² Ly6Chi monocytes scavenge necrotic debris and control the early events of postinfarct remodeling through the combination of inflammatory mediator expression, phagocytosis, and proteolysis. Of note, serine proteases secreted by monocytes and

neutrophils promote LV dilation and cardiac rupture.³ In this line, Ly6Chi monocytosis in apolipoprotein E^{-/-} (ApoE^{-/-}) mice has been shown to be associated with high proteolytic activity in the myocardium and adverse LV remodeling after MI.⁴ In contrast, Ly6Clo monocytes are thought to have a pro-healing phenotype and promote vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis.²

Hence, the inflammatory response appears as a double-edged sword because it is a protective attempt by the organism to initiate the healing process; however, inflammation itself can exacerbate scarring and loss of organ function. In this view, the successful resolution of inflammation appears as a key event in the repair of tissue damage, but little is known

Received on: February 9, 2012; final version accepted on: June 27, 2012.

From the Université Paris Descartes, INSERM UMR-S970, Paris Cardiovascular Research Center, Hôpital Européen Georges Pompidou (C. Cochain, J.V., E.D., A. Richart, A. Récalde, Y.Z., K.Y.H.W.Y., B.L., J-S.S.); Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Université Paris 06, INSERM UMR-S945, Laboratoire Immunité et Infection, Hôpital Pitié-Salpêtrière (C.A., L.P., C. Combadière); Service d'anatomie pathologique, Hôpital Européen Georges Pompidou (P. Bruneval); Plate Forme d'imagerie du Petit Animal, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, (G.R., C.M.); Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Denis Diderot, (P. Bonnin) Paris, France; Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan (R.B., M.L.), Milan, Italy; and Humanitas Clinical and Research Center (R.B., M.L.), Milan, Italy.

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.112.254409/-/DC1>.

Correspondence to Jean-Sébastien Silvestre, PhD, Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970, Université Paris Descartes, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France. E-mail jean-sebastien.silvestre@inserm.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.254409

about the main mediators of this process in the infarcted cardiac tissue.

Leukocyte recruitment to the infarcted heart depends highly on chemokines of the CC-chemokine family. The chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)/chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) axis controls Ly6Chi monocyte infiltration in the infarcted myocardium, and several studies using genetic or pharmacological approaches have shown that disruption of CCL2/CCR2 signaling alleviates adverse LV remodeling after MI through the inhibition of inflammatory cell recruitment.⁵⁻⁷ In addition, expression of other CC-chemokines in the ischemic heart, such as CCL5 or CCL3,⁸ has been associated with excessive inflammation and poor LV remodeling.

Although extensive knowledge regarding the initiation of the inflammatory response after MI has been acquired over the past few years, little is known concerning endogenous mechanisms able to limit those inflammatory processes and the associated adverse tissue remodeling leading to loss of organ function. Here, we hypothesized that the chemokine decoy receptor D6 could limit post-MI inflammation through the control of CC-chemokine levels. Indeed, D6 possesses the unique ability to specifically bind and internalize inflammatory CC-chemokines⁹ without triggering conventional cell activation or chemotaxis, and has been shown to limit in vivo inflammatory responses in settings of skin inflammation, cancer,¹⁰ *Mycobacterium tuberculosis* infection,¹¹ and intestinal inflammation.¹² Recently, D6 has also been shown to prevent lymphatic congestion, and D6 deficiency is associated with poor lymphatic drainage of inflamed tissues.¹³

Here, we show that D6 is expressed in human and murine infarcted myocardium and controls levels of CC-chemokines after MI. D6 deficiency was associated with increased pathogenic inflammation, cardiac rupture, and adverse LV remodeling after MI.

Materials and Methods

Immunohistochemistry on Human Samples

Apical ischemic myocardial tissue was removed through a normal surgical procedure for the implantation of LV-assist devices in 6 patients presenting cardiogenic shock attributable to acute MI (1–7 days). The clinical course of these patients was previously described and published.¹⁴ The tissues were submitted to surgical pathology diagnosis as previously reported.¹⁴ The remnant tissues in paraffin blocks were used for research purpose with informed consent of the patients. The samples consisted of chips of left myocardium measuring 0.5 to 2 cm of long axis and were samples of cardiac apical LVs removed for implantation of a LV-assist device. The selected cases were acute MI lasting for 24 to 48 hours and presenting with acute cardiac failure. In these samples, some areas showed figures of remote MI with scarring. In paraffin sections, antigen retrieval was obtained with citrate buffer in a microwave oven (3×4 minutes at 400W). The anti-D6 polyclonal antibody (Thermo Scientific, Rockford, IL) was diluted at 1/300 and revealed with a 3-step technique using ABC peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Negative controls consisted of incubation of sections with a nonrelevant goat polyclonal antibody, anti-nephrin C-17 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA). Endothelial cells were stained with anti-CD31 antibody (Dako, Trappes, France; 1/20), macrophages with anti-CD68 antibody (Dako; 1/50), and lymphatic endothelial cells with D2.40 (podoplanin) antibody (Dako; 1/100).

Mice

Eight- to 12-week-old male mice were used. D6-deficient (D6^{-/-}) mice were on a C57BL6/J background as previously described.¹¹ CCR2-deficient (CCR2^{-/-}) mice were from Jackson Laboratories. Age-matched C57BL6/J mice were used as wild-type (WT) controls. For bone marrow (BM) chimeras generation, WT mice were irradiated with a total dose of 9.5 Gy and received an intravenous injection of 10⁷ total BM cells retrieved from WT, CCR2^{-/-}, or D6^{-/-} donors the next day. All the experiments were performed in accordance with the European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (No. 07430).

RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from the infarcted area and its border zone with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paris, France). DNA synthesis was performed with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Polymerase chain reaction was performed on an ABI Prizm 7700 with the use of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Mouse GAPDH was used to normalize sample amplification. The following oligonucleotides (Applied Biosystems) served as primers: GAPDH forward: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3'; reverse: 5'-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3'; D6 forward: 5'-GCAATCCGCAGCTAACAGTTAAG-3'; reverse: 5'-CAAGCCCAGCACGAAGATCAG-3'.

Myocardial Infarction

Mice were anesthetized with ketamine and xylazine and placed under mechanical ventilation. Left thoracotomy was performed to expose the LV of the heart. The left anterior descending coronary artery was visualized and ligated just below the left auricular level with a 7/0 nylon suture. Mechanical ventilation was maintained until mice awakening, and mice were then allowed to recover for 1 hour on a heating pad.

Echography

Before ischemic injury, M-mode echocardiography was performed by a blinded investigator. On infarcted mice, B-mode echocardiography was performed by blinded investigators at the Small Animal Imaging Unit (Plateforme d'imagerie du petit animal, Hôpital Cochin, Université Paris 5).

Flow Cytometry

The infarcted area and its border zone were isolated from WT and D6^{-/-} hearts, minced and digested in 450-U/mL collagenase I, 125-U/mL collagenase XI, 60-U/mL hyaluronidase, and 60-U/mL DNase for 1 hour, before gradient density centrifugation on histopaque 1083 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Infiltrating cells were stained with monoclonal rat anti-mouse CD45-allophycocyanin, CD11b-PerCPCy5.5 (clone M1/70), Ly6G-phycoerythrin (clone 1A8), natural killer 1.1-phycoerythrin (all from BD Biosciences, San Jose, CA), and 7/4-fluorescein isothiocyanate (Abd Serotec, Colmar, France) and analyzed on a BD LSR II flow cytometer.

Chemokine Protein Levels and Zymography

Infarcts from WT and D6^{-/-} mice were snap frozen in liquid nitrogen and homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer. The protein content of the samples was determined using a Lowry assay (BioRad). Total protein extracts (50 µg) were loaded onto CCL2, CCL3, CCL5, and chemokine (C-X-C motif) ligand 2 DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Lille, France) to determine chemokine levels. For gelatin zymography, 10 µg of total MI protein extracts were loaded onto a 9% acrylamide gel containing 0.1% gelatin. After protein migration, gels were incubated overnight in a calcium-containing buffer and gelatinase activity was revealed by Coomassie Blue staining.

Histology and Immunohistochemistry

Infarcts from WT or D6^{-/-} mice were snap frozen in liquid nitrogen. All stainings were performed on 7- μ m cryostats slides. Masson Trichrome staining was performed according to standard procedures. Caveolin-1 immunostaining was performed using polyclonal rabbit anti-mouse caveolin-1 antibody (1/100; Santa Cruz) followed by Texas Red conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (Jackson Immunochemistry, Suffolk, UK). Neutrophils and 7/4⁺ cells were stained with phycoerythrin-conjugated monoclonal rat anti-mouse Ly6G antibody (1/100; clone 1A8; BD Biosciences) and fluorescein isothiocyanate-conjugated 7/4 antibody (1/100; AbD Serotec).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM. Values were compared with a Mann–Whitney *U* test, and *P*<0.05 was considered significant. Kaplan–Meier analysis was used to compare survival after MI.

Results

D6 Is Expressed in Human Infarcted Myocardium

We first analyzed D6 expression by immunohistochemistry in biopsies from human MI patients. Although D6 expression was not detected in remote, viable myocardium (Figure 1A), we observed strong D6 signal in necrotic and inflammatory areas on infiltrating leukocytes and vascular structures (Figure 1B and 1C). Further staining of serial MI sections showed D6 expression on CD31⁺ endothelial cells, CD68⁺ macrophages,

and D2-40⁺ (podoplanin⁺) lymphatic endothelial cells (Figure 1D). These results show that D6 appears to be preferentially expressed in the ischemic human heart on cells of vascular endothelial, lymphatic, and macrophage lineages.

D6 Is Expressed in Murine MI and Controls CCL2 and CCL3 Levels

We then analyzed D6 mRNA expression in murine myocardium. D6 was expressed in normal mouse heart, although its mRNA levels were much lower than in positive control tissues such as lung and spleen¹¹ (Figure 2A; heart versus spleen *P*=0.08; heart versus lung *P*<0.001). Interestingly, D6 mRNA levels were upregulated by 2.0-, 2.5-, and 2.5-fold at 5, 7, and 14 days after coronary artery ligation, respectively (*P*<0.01; Figure 2B).

To analyze the role of D6 in the control of CC-chemokine levels after MI, we measured CCL2 and CCL3 protein levels in WT and D6^{-/-} hearts before as well as 1, 3, and 5 days after infarction. Although barely detectable in nonischemic WT or D6^{-/-} hearts, CCL2 levels raised drastically and to a similar extent in WT and D6^{-/-} hearts at 1 day after MI, indicating that the initial CCL2 burst is not altered in D6^{-/-} hearts. At day 3, we observed a slight but significant increase in CCL2 levels in D6^{-/-} hearts (*P*<0.05 versus WT). Most importantly, while CCL2 decreased between day 3 and day

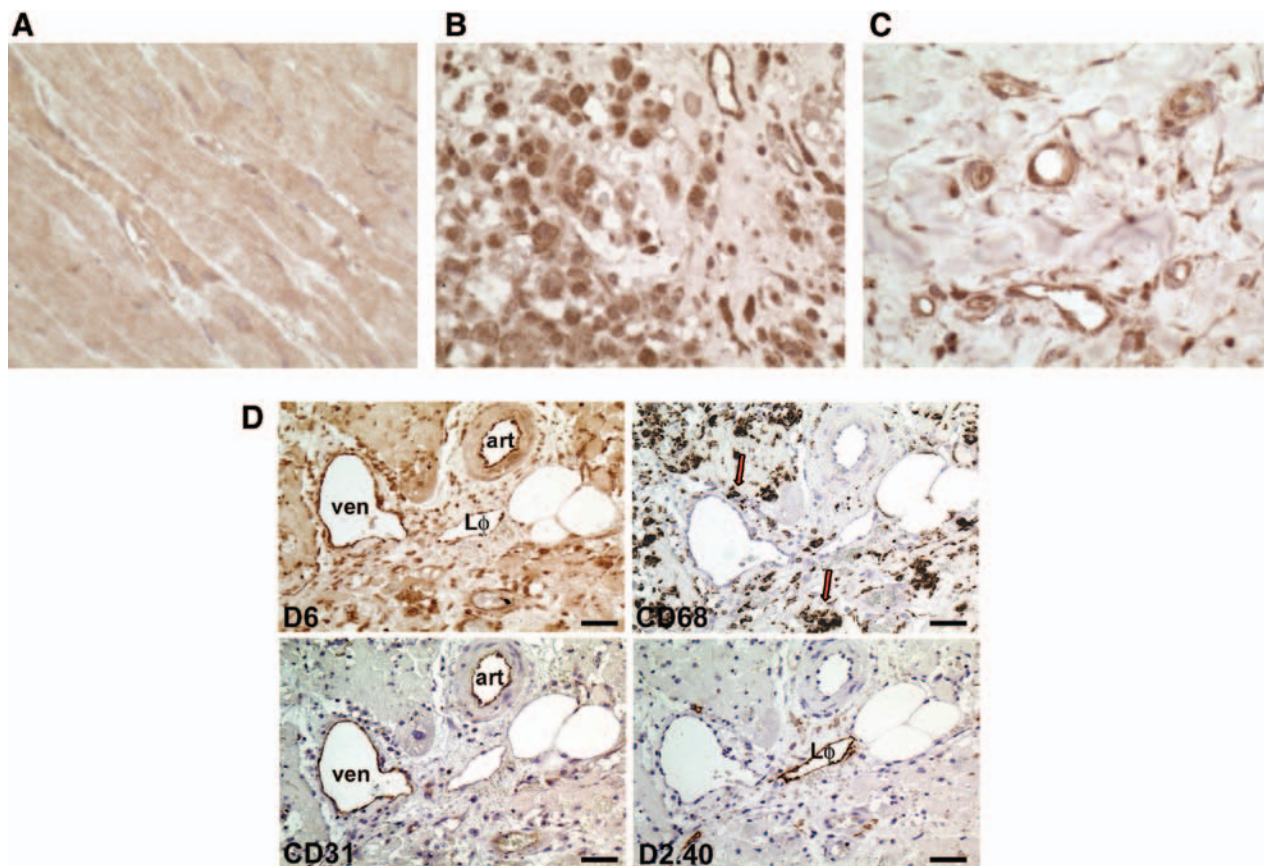


Figure 1. D6 expression in infarcted human myocardium. D6 immunostaining of human myocardial infarction (MI) tissue obtained during left ventricular assist device implantation in patients with recent MI (1–7 days). **A**, D6 immunostaining in adjacent, viable myocardium ($\times 400$). **B** and **C**, D6 immunostaining in necrotic MI areas ($\times 400$). **D**, D6 (**top left**), CD68 (**top right**, arrows), CD31 (**bottom left**), and D2.40 (podoplanin, **bottom right**) immunostainings on serial MI sections ($\times 200$). Ven indicates venule; art, artery; L ϕ , lymphatic vessel. Scale bar=30 μ m.

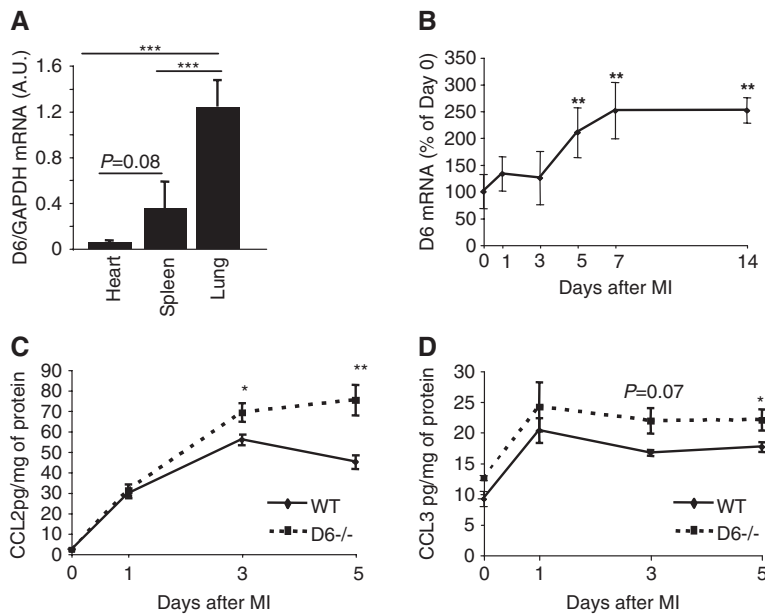


Figure 2. D6 and chemokine expression in murine infarcted myocardium. **A**, D6 mRNA levels, normalized to GAPDH mRNA, in normal murine heart, spleen, and lung, *** $P < 0.001$ ($n = 5$ per organ tested). **B**, D6 mRNA, in % of day 0 (no myocardial infarction [MI]) levels, in murine infarcted myocardium, ** $P < 0.01$ vs day 0 ($n = 3$ –5 per time point). **C**, Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and **D**, CCL3 protein levels in wild-type (WT) and D6^{-/-} hearts before and 1, 3, and 5 days after MI. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs WT ($n = 3$ –7 per group at each time point).

5 in WT hearts, CCL2 levels were maintained in D6^{-/-} hearts ($P < 0.01$ versus WT), indicating a defect in CCL2 clearance in D6^{-/-} hearts after MI (Figure 2C). We also observed a similar increase in CCL3 levels at 1 day after MI in WT and D6^{-/-} hearts. CCL3 levels tended to remain higher at 3 days in D6^{-/-} mice, although it did not reach statistical significance ($P = 0.07$ versus WT). Of note, at 5 days, CCL3 levels were significantly increased in D6^{-/-} hearts ($P < 0.05$ versus WT; Figure 2D). Surprisingly, CCL5 levels were not affected by D6 deficiency (Figure I in the online-only Data Supplement). Consistent with the specificity of D6 for inflammatory CC-chemokines, chemokine (C-X-C motif) ligand 2 levels were identical in WT and D6^{-/-} hearts (Figure I in the online-only Data Supplement). Altogether, our human and murine data show that D6 expression is increased after MI, and that D6 deficiency in mice is associated with a defective clearance of specific CC-chemokines after MI, with a particularly marked effect on CCL2 levels.

Increased Inflammation in D6^{-/-} Hearts After MI

At 5 days after MI, we collected infarcted hearts from D6^{-/-} and WT mice and analyzed the inflammatory infiltrate by flow cytometry. In D6^{-/-} hearts, infiltration of 7/4hi monocytes (equivalent to Ly6Chi monocytes)¹⁵ and Ly6G⁺ neutrophils was increased by 2.7- and 3.8-fold, respectively ($P < 0.05$; Figure 3A and 3B), whereas 7/4lo monocyte (equivalent to Ly6Clo monocytes)¹⁵ levels were similar to those found in WT (Figure 3B). These results were further confirmed by immunofluorescence analysis of Ly6G⁺ and 7/4⁺ cell density in WT or D6^{-/-} MI sections (Figure 3C and 3D). A similar infiltration pattern was observed at 7 days after MI: 7/4hi monocytes and neutrophil infiltration was still substantial in D6^{-/-} MIs, whereas those leukocyte subsets had almost completely vanished from WT MIs. 7/4lo monocyte levels remained unchanged (Figure II in the online-only Data Supplement). Neutrophils and inflammatory monocytes are a predominant source of proteases in the infarcted heart. We

measured matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in 5-day-old WT or D6^{-/-} MI by gelatin zymography and found strong increases of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in D6^{-/-} hearts at 5 days after MI (2.3- and 2.1-fold versus WT levels, respectively; $P < 0.05$; Figure 3C and 3D). Altogether, those data show that D6 deficiency leads to exacerbated infiltration of pathogenic Ly6Chi monocytes and neutrophils after MI, associated with high proteolytic activity in the ischemic heart.

Cardiac Rupture and Adverse LV Remodeling in D6^{-/-} Mice After MI

We then analyzed the survival of D6^{-/-} mice over a period of 14 days and assessed their cardiac function by echocardiography. Although mortality was low in infarcted WT mice, >40% of D6^{-/-} mice had died by day 10 (Figure 4A; $P < 0.05$). This increase in mortality was attributable to a high incidence of cardiac rupture in D6^{-/-} mice (45% versus 16.6% in WT; $P < 0.05$; Figure 4B). Although baseline cardiac function was identical in D6^{-/-} and WT mice (Figure III in the online-only Data Supplement), echocardiography revealed features of adverse LV remodeling in surviving D6^{-/-} mice at 14 days after MI: LV end-systolic and end-diastolic endocardial volumes were increased by 1.5- and 1.3-fold, respectively ($P < 0.01$; Figures 4C and 3D), indicating substantial LV dilation, and ejection fraction was decreased by 36% in D6^{-/-} hearts ($P < 0.05$; Figure 4E; Figure III in the online-only Data Supplement). Further echocardiographic parameters such as average LV wall thickness and fractional area contraction also tended to be altered in D6^{-/-} mice (Figure III in the online-only Data Supplement). Histological measures showed that D6^{-/-} infarcts were 20% larger ($P < 0.05$; Figure 4F). These data show that D6 deficiency leads to increased incidence of cardiac rupture and adverse LV remodeling in surviving mice. Increased LV dilation and poor LV contractility occurred despite higher angiogenesis, as the capillary density in the

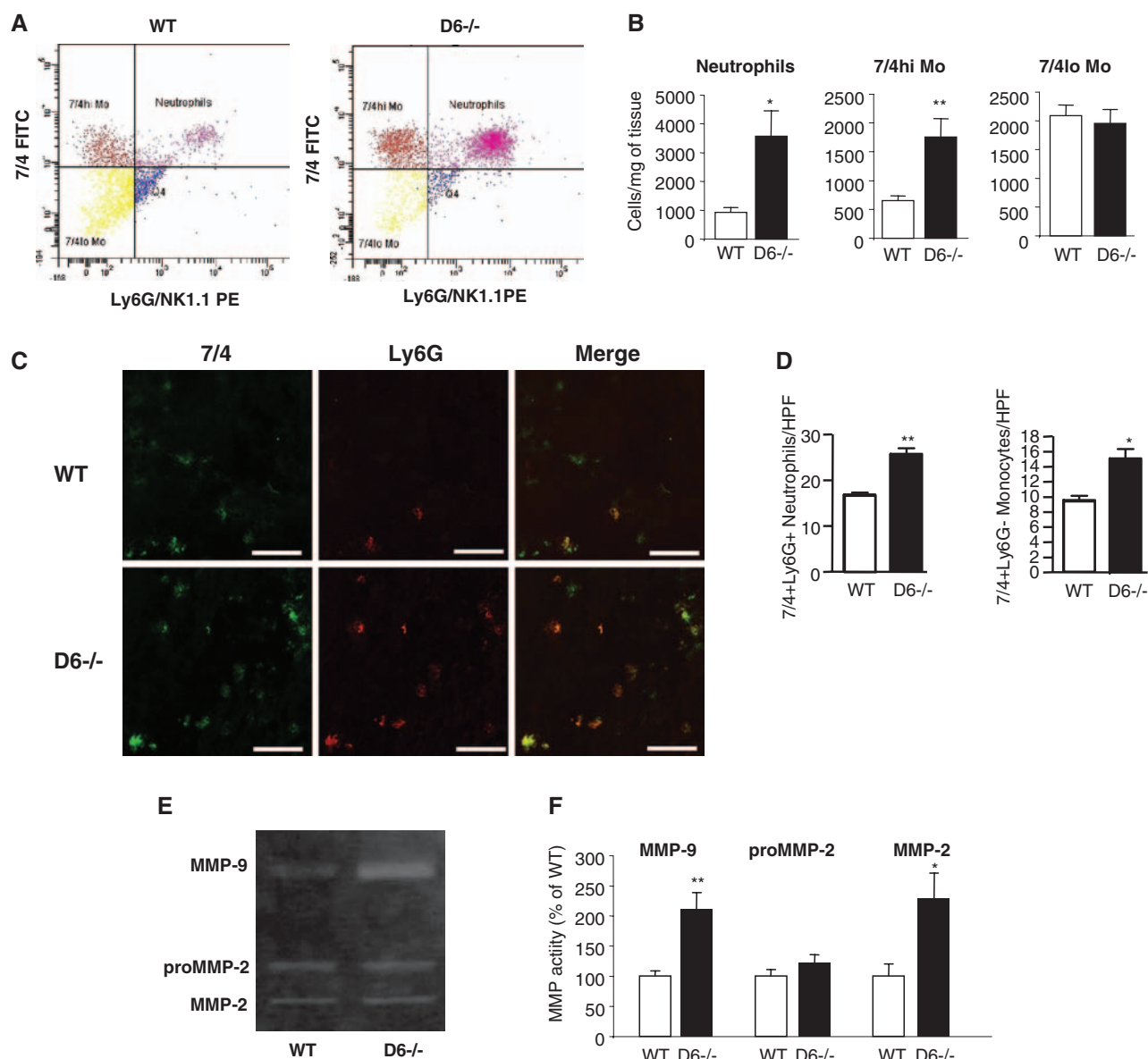


Figure 3. Increased inflammation in D6^{-/-} hearts after myocardial infarction (MI). **A**, Representative fluorescence-activated cell sorting dot plots obtained from wild-type (WT) and D6^{-/-} digested hearts at 5 days after MI. Cells were gated on CD11b-expressing leukocytes. **B**, Quantitative evaluation of neutrophils, 7/4hi monocytes, and 7/4lo monocytes infiltration in WT and D6^{-/-} hearts at 5 days after MI. ***P*<0.01, **P*<0.05 (*n*=6 per group). **C**, 7/4 (green) and Ly6G (red) immunostainings and **(D)** quantitative analysis of 7/4+Ly6G⁺ neutrophils and 7/4+Ly6G⁻ monocytes per high power field (HPF) on day 5 WT and D6^{-/-} MI cryosections, ×200 magnification, scale bar=10 μm. ***P*<0.01, **P*<0.05. **E**, Representative zymogram and **(F)** quantitative analysis of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and MMP-2 activity in WT and D6^{-/-} hearts at 5 days after MI. **P*<0.05, ***P*<0.01 (*n*=10 per group). FITC indicates fluorescein isothiocyanate; NK, natural killer; PE, phycoerythrin.

border zone of D6^{-/-} MI was slightly increased (Figure IV in the online-only Data Supplement).

Adverse Remodeling in D6^{-/-} Mice Depends on CCR2 Signaling

We observed substantial D6 expression on leukocytes, including CD68⁺ macrophages, infiltrating human MI (Figure 1). To assess the putative role of D6 expressed by leukocytes, we generated BM chimeras by reconstituting lethally irradiated WT mice with D6^{-/-} BM. Mice with leukocyte-specific D6 deficiency did not show any significant mortality after MI (data not shown) and had LV end-diastolic, LV end-systolic, and

LV ejection fraction identical to controls (irradiated WT mice reconstituted with WT BM; Figure 5A, 5B, and 5C; Figure III in the online-only Data Supplement). Nevertheless, those mice displayed a slight increase in neutrophil infiltration at day 7, although it did not reach statistical significance (Figure V in the online-only Data Supplement). These data suggest that although leukocyte born D6 might have an accessory role, it is clearly compensated by nonleukocyte D6 expression, at least in our model. To confirm the role of CC-chemokines, and most particularly that of CCL2, which local and systemic levels were preferentially enhanced by D6 deficiency, lethally irradiated D6^{-/-} mice were reconstituted with WT or

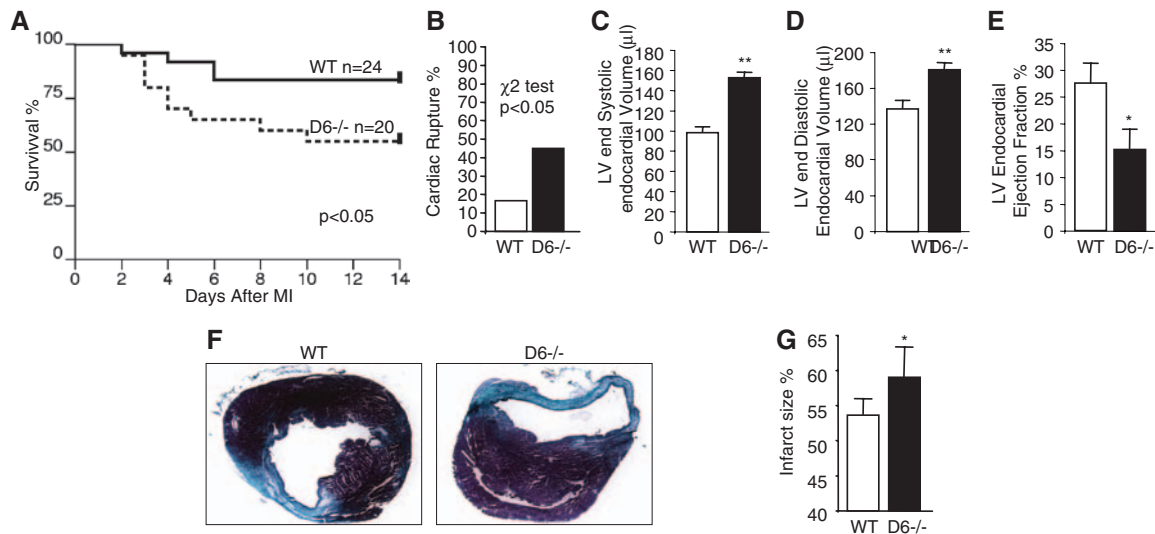


Figure 4. Cardiac rupture and adverse left ventricular (LV) remodeling in $D6^{-/-}$ mice after myocardial infarction (MI). **A**, Survival of wild-type (WT) vs $D6^{-/-}$ mice after MI. **B**, Percentage of cardiac rupture occurrence in WT vs $D6^{-/-}$ mice over 14 days. **C**, LV end-systolic endocardial volume (μL), **D**, LV end-systolic endocardial volume (μL), and **E**, endocardial ejection fraction (%) in WT vs $D6^{-/-}$ mice at 14 days after MI. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. **F**, Representative photographs of Masson Trichrome stainings and **G**, quantitative analysis of infarct size in WT and $D6^{-/-}$ infarcts at 14 days after MI. * $P<0.05$ ($n=7$ WT; 6 $D6^{-/-}$).

CCR2 $^{-/-}$ BM. At 14 days after MI, $D6^{-/-}$ mice reconstituted with WT BM displayed LV dilation and reduced ejection fraction (Figure 5D, 5E, and 5F; Figure III in the online-only Data Supplement), further suggesting that leukocyte-borne D6 has no clear role in this setting. Most interestingly, leukocyte-specific CCR2 deficiency completely rescued the phenotype of $D6^{-/-}$ mice, because $D6^{-/-}$ mice reconstituted with CCR2 $^{-/-}$ BM displayed no significant LV dilation and had ejection fraction similar to controls (Figure 3D, 3E, and 3F; Figure III in the online-only Data Supplement). These data strongly suggest that leukocyte-borne D6 has no major role

in the inflammatory response after MI, and that the adverse remodeling phenotype in $D6^{-/-}$ mice depends on CCL2/CCR2 signaling.

Discussion

Here, we have shown for the first time that CC-chemokine, and most particularly CCL2-scavenging by the decoy receptor D6, prevented excessive inflammation in the ischemic heart and limited the extent of myocardial damage caused by an overwhelming immune response. We propose a model where ischemia induces CC-chemokines in the ischemic

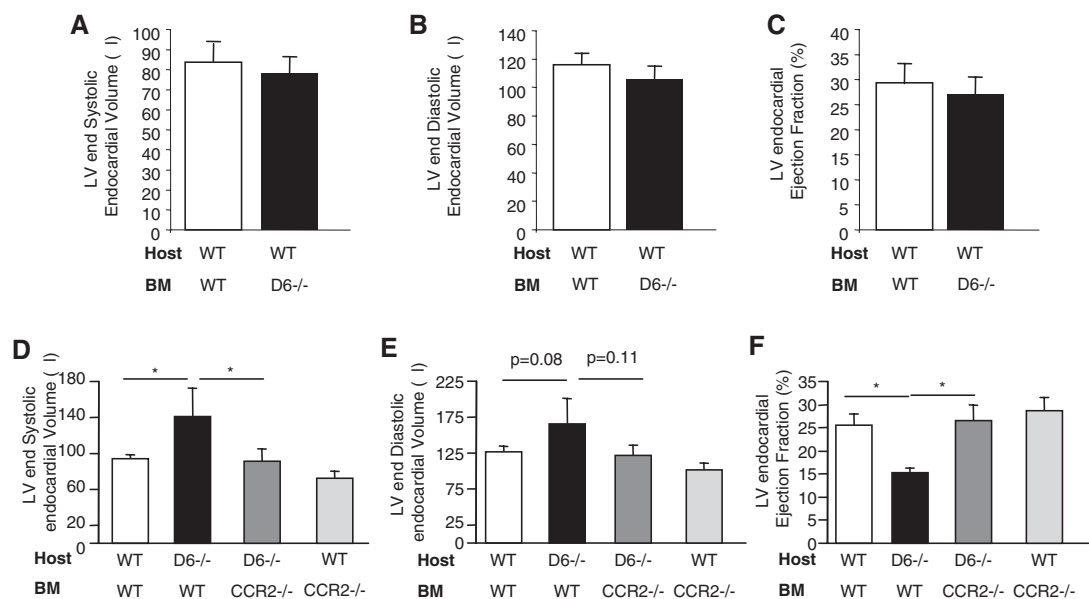


Figure 5. Adverse left ventricular (LV) remodeling in $D6^{-/-}$ mice depends on chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2) signaling. **A**, LV end-systolic endocardial volume (μL), **B**, LV end-systolic endocardial volume (μL), and **C**, endocardial ejection fraction (%) in wild-type (WT) mice lethally irradiated and reconstituted with WT or $D6^{-/-}$ bone marrow (BM) cells ($n=9-10$). **D**, LV end-systolic endocardial volume (μL), **E**, LV end-systolic endocardial volume (μL), and **F**, endocardial ejection fraction (%) in WT and $D6^{-/-}$ mice lethally irradiated and reconstituted with WT or CCR2 $^{-/-}$ BM cells. * $P<0.05$ ($n=3-10$).

heart, leading to the recruitment of pathogenic inflammatory Ly6Chi monocytes and neutrophils, and where D6 acts as a gatekeeper of uncontrolled inflammation through the regulation of CC-chemokine levels.

D6 is known to be expressed by lymphatic endothelial cells¹⁰ and some specific leukocyte population such as innate-like B cells¹⁶ and transforming growth factor- β -activated macrophages.¹⁷ Our data clearly suggest that D6 is preferentially expressed in the infarcted heart, as it was undetectable in viable human myocardium and its mRNA expression strongly raised after MI in mice. In our murine MI model, this increase in D6 levels could reflect expression by infiltrating leukocytes, increased expression in D6 expressing cells, or proliferation of D6 expressing cells after MI. The fact that high levels of D6 mRNA were maintained at 14 days after MI, when inflammation had almost completely faded (data not shown), suggests that this increase in D6 mRNA is at least partially leukocyte independent. In our immunohistochemical study on human MI biopsies, we surprisingly observed D6 expression on vascular endothelial cells (Figure 1), although these were previously described to be consistently D6 negative.¹⁸ Of note, these previous observations were mostly conducted on healthy tissues, and one could speculate that D6 expression could be induced in vascular endothelial cells in the hypoxic and highly pro-inflammatory environment of cardiac ischemic areas. In this line, transforming growth factor- β , which is predominantly expressed during MI healing,¹ is able to induce D6 expression in a globin transcription factor 1-dependent manner in leukocytes.¹⁷

Most interestingly, D6 controlled the level of the major inflammatory CC-chemokines CCL2 and CCL3. This might constitute a new mechanism by which the organism actively attempts to restrain post-MI inflammation and the associated tissue damage by diminishing CC-chemokine bioavailability. Indeed, various reports have shown that CCL2 or CCL3 were able to promote MI-associated inflammation.¹⁹ Most particularly, CCL2/CCR2 signaling is known to control Ly6Chi monocyte systemic levels after limb ischemia¹⁵ and controls the infiltration of this proinflammatory monocyte subset in the ischemic heart.² In this line, we observed a strong increase of Ly6Chi monocyte infiltration in D6^{-/-} MIs. Neutrophil levels were also increased, which was puzzling, as CC-chemokine are not classic granulocyte chemoattractants. Nevertheless, nuclear factor- κ B-dependent expression of CCR2 in neutrophils can be induced during inflammatory diseases such as sepsis.²⁰ CCL3, which levels were upregulated in D6^{-/-} hearts, has also been shown to attract neutrophils in a CCR1-dependent manner.²¹ Furthermore, increased neutrophil infiltration has been noted in D6^{-/-} mice in models of sterile skin inflammation¹⁰ and microbial lung inflammation.¹¹ Moreover, we observed increased neutrophil counts in the blood of D6^{-/-} mice at 5 and 7 days after MI (data not shown), further suggesting a clear effect of D6 deficiency on neutrophil systemic and local levels after MI. It is noteworthy that D6 deficiency led to a specific increase in the infiltration of potentially pathogenic neutrophils and Ly6Chi monocytes, although proangiogenic and more generally prohealing Ly6Clo monocytes levels were not affected. This might be

explained by the fact that Ly6Clo monocyte recruitment to the infarcted heart depends on chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 and its ligand, Fractalkine/chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, but not on CCR2.²

Previous reports have shown that neutrophils and Ly6Chi monocytes express proteases in the ischemic heart, which promote adverse remodeling and cardiac rupture.^{3,4} Nevertheless, leukocyte proteases are necessary for adequate myocardial angiogenesis after MI,³ and disruption of CCR2 signaling hampers angiogenesis in limb¹⁵ or myocardial² ischemia, emphasizing the need of an inflammatory balance for proper tissue remodeling. Here, D6 appears as an important regulator of this inflammatory balance, preventing Ly6Chi and neutrophil infiltration in the ischemic heart to reach pathogenic levels resulting in LV dilation and cardiac rupture.

Our observation of abundant D6 expression on leukocytes and CD68⁺ macrophages infiltrated in human MIs led us to hypothesize that chemokine scavenging in the ischemic heart might be mediated by inflammatory cell-borne D6. Nevertheless, our chimera studies in mice failed to evidence a role for leukocyte-borne D6. This is consistent with a previous study showing that despite strong D6 expression, leukocyte did not significantly participate to D6-mediated anti-inflammatory effects in a setting of gut inflammation.¹² Nonetheless, it should be noted that those experiments have been conducted in young and otherwise healthy WT animals in which D6 expression by other cell types, including lymphatic endothelial cells, might compensate the chemokine scavenging defect of infiltrating leukocytes. Cardiovascular risk factors such as hypercholesterolemia, which is known to induce lymphatic vessels dysfunction,²² might reduce chemokine scavenging by D6 expressing lymphatics and reveal a role for leukocyte-borne D6.

Besides its well-described role in monocyte chemoattraction, CCL2 has been suggested to promote fibrosis via direct action on fibroblasts,²³ and was also shown to induce cardiomyocyte apoptosis.^{24,25} Those 2 properties of CCL2 might participate to adverse LV remodeling after MI in D6^{-/-} mice. Nevertheless, we did not observe any evidence of significant fibrosis in D6^{-/-} hearts (data not shown), and deletion of CCR2 specifically on BM-derived leukocytes led to a total rescue of D6^{-/-} mice phenotype. Hence, it appears that D6 protective effects during post-MI LV remodeling preferentially depend on its anti-inflammatory properties.

In conclusion, we show in this work that D6-dependent CC-chemokine scavenging controls tissue homeostasis and cardiac remodeling after MI. Our study also provides a mechanism for the fine-tuning of the balance between protective and pathogenic immune responses, which could be a suitable target for innovative therapeutic approaches.

Sources of Funding

This work was supported by grants from INSERM, European community (ENDOSTEM No. 241440). C. Combadière is a recipient of a contract Interface from Assistance Publique-Hopitaux de Paris. Dr Silvestre is supported by grants from Fondation de la Recherche Médicale, Agence National pour la Recherche Chemrepair (2010 BLAN 1127 02) and fondation Leducq transatlantic network

(09-CVD-01). Dr Silvestre is a recipient of a Contrat d'Interface from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. K.Y.H.W. Yin is supported by Region île de France. A. Récalde is supported by Fondation pour la Recherche Médicale. M. Locati and R. Bonecchi are supported by Italian Association for Cancer Research, Regione Lombardia, and Fondazione Cariplo.

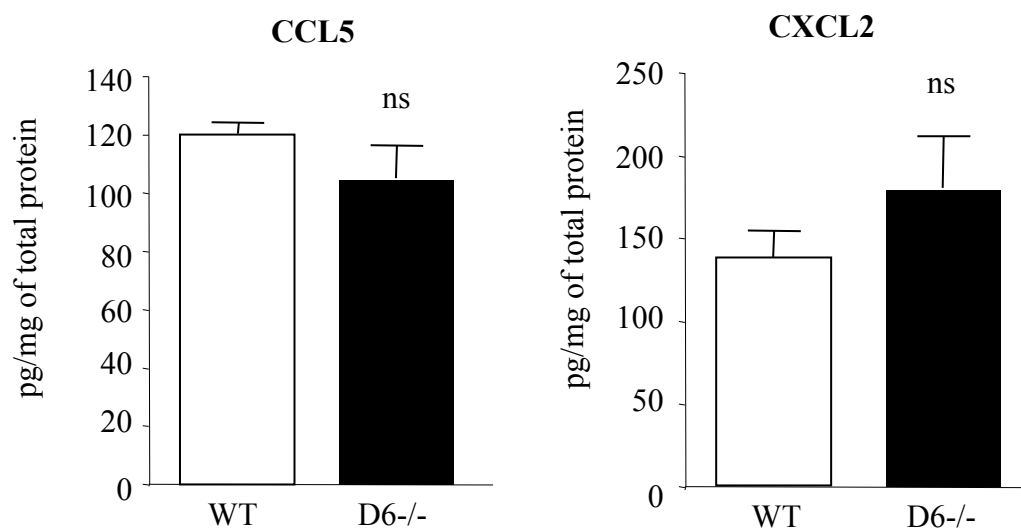
Disclosures

None.

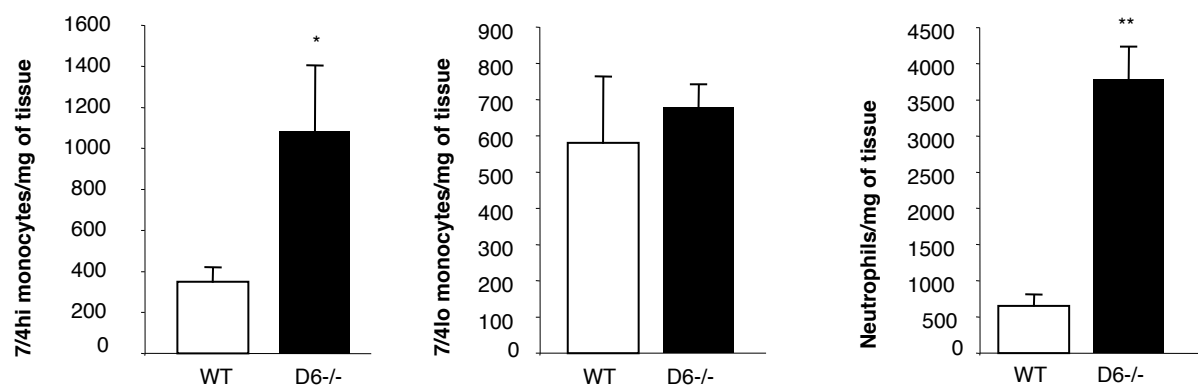
References

- Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1907–1939.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037–3047.
- Heymans S, Luttun A, Nuyens D, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. 1999;5:1135–1142.
- Panizzi P, Swirski FK, Figueiredo JL, Waterman P, Sosnovik DE, Aikawa E, Libby P, Pittet M, Weissleder R, Nahrendorf M. Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1629–1638.
- Kaikita K, Hayasaki T, Okuma T, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol*. 2004;165:439–447.
- Hayasaki T, Kaikita K, Okuma T, Yamamoto E, Kuziel WA, Ogawa H, Takeya M. CC chemokine receptor-2 deficiency attenuates oxidative stress and infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in mice. *Circ J*. 2006;70:342–351.
- Liehn EA, Piccinini AM, Koenen RR, Soehnlein O, Adage T, Fatu R, Curaj A, Popescu A, Zernecke A, Kungl AJ, Weber C. A new monocyte chemotactic protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:1847–1857.
- de Jager SC, Kraaijeveld AO, Grauss RW, de Jager W, Liem SS, van der Hoeven BL, Prakken BJ, Putter H, van Berkel TJ, Atsma DE, Schalij MJ, Jukema JW, Biessen EA. CCL3 (MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:446–452.
- Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:907–918.
- Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJ, Rot A, Nixon C, McLean P, Alcamí A, Lira SA, Wiekowski M, Graham GJ. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat Immunol*. 2005;6:403–411.
- Di Liberto D, Locati M, Caccamo N, Vecchi A, Meraviglia S, Salerno A, Sireci G, Nebuloni M, Caceres N, Cardona PJ, Dieli F, Mantovani A. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med*. 2008;205:2075–2084.
- Vetrano S, Borroni EM, Sarukhan A, Savino B, Bonecchi R, Correale C, Arena V, Fantini M, Roncalli M, Malesci A, Mantovani A, Locati M, Danese S. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated Colon Cancer through the chemokine decoy receptor D6. *Gut*. 2010;59:197–206.
- Lee KM, McKimmie CS, Gilchrist DS, Pallas KJ, Nibbs RJ, Garside P, McDonald V, Jenkins C, Ransohoff R, Liu L, Milling S, Cerovic V, Graham GJ. D6 facilitates cellular migration and fluid flow to lymph nodes by suppressing lymphatic congestion. *Blood*. 2011;118:6220–6229.
- Cazes A, Duong Van Huyen JP, Fornes P, Amrein C, Guillemain R, Grinda JM, Bruneval P. Mechanical ventricular assistance in heart failure: pathology of the cardiac apex removed during device implantation. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:112–116.
- Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Récalde A, Richart AL, Loinard C, Zouggari Y, Guérin C, Duriez M, Combadière B, Poupel L, Lévy BI, Mallat Z, Combadière C, Silvestre JS. Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res*. 2010;88:186–195.
- Hansell CA, Schiering C, Kinstrie R, Ford L, Bordon Y, McInnes IB, Goodyear CS, Nibbs RJ. Universal expression and dual function of the atypical chemokine receptor D6 on innate-like B cells in mice. *Blood*. 2011;117:5413–5424.
- McKimmie CS, Fraser AR, Hansell C, et al. Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1. *J Immunol*. 2008;181:8171–8181.
- Nibbs RJ, Kriebhuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, Henderson A, Kerjaschki D, Maurer D, Graham GJ, Rot A. The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol*. 2001;158:867–877.
- Frangogiannis NG, Entman ML. Targeting the chemokines in myocardial inflammation. *Circulation*. 2004;110:1341–1342.
- Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183:234–242.
- Bonecchi R, Polentarutti N, Luini W, Borsatti A, Bernasconi S, Locati M, Power C, Proudfoot A, Wells TN, Mackay C, Mantovani A, Sozzani S. Up-regulation of CCR1 and CCR3 and induction of chemotaxis to CC chemokines by IFN-gamma in human neutrophils. *J Immunol*. 1999;162:474–479.
- Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, Angeli V. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*. 2009;175:1328–1337.
- Gharraee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem*. 1996;271:17779–17784.
- Younce CW, Kolattukudy PE. MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCP-1. *Biochem J*. 2010;426:43–53.
- Younce CW, Wang K, Kolattukudy PE. Hyperglycaemia-induced cardiomyocyte death is mediated via MCP-1 production and induction of a novel zinc-finger protein MCP-1. *Cardiovasc Res*. 2010;87:665–674.

Supplement Material



Supplementary figure I. CCL5 and CXCL2 protein levels in WT and D6-/- hearts 5 days after infarction.

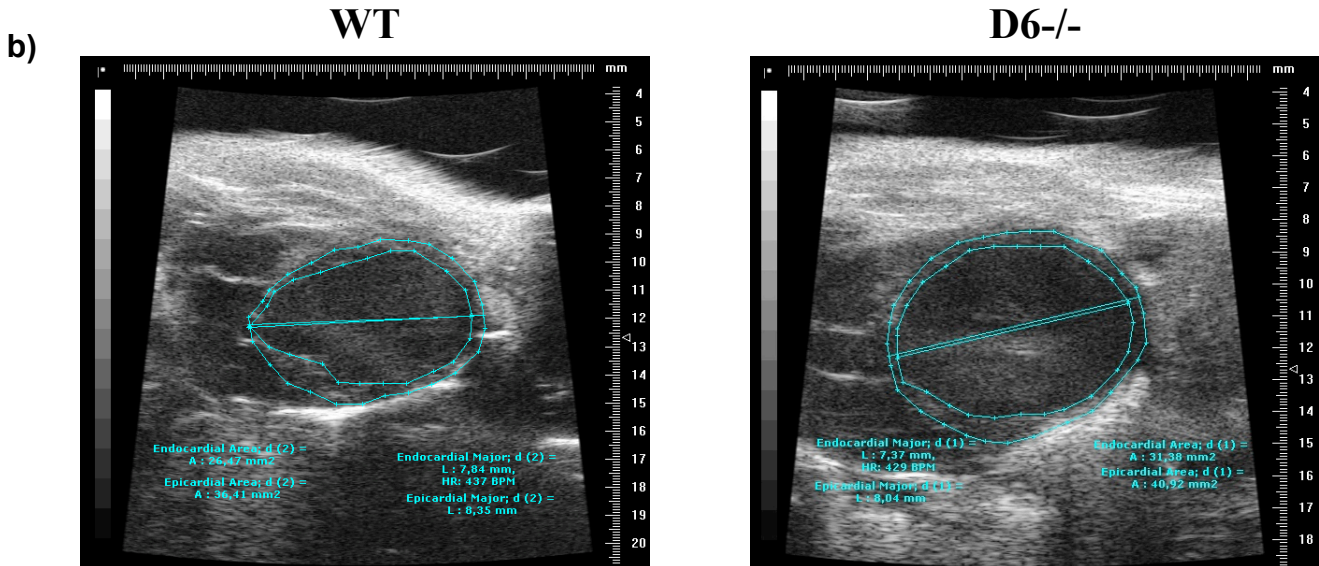


Supplementary figure II. Inflammatory cells infiltration in ischemic cardiac tissue at 7 days after infarction. Infiltration of 7/4hi monocytes, 7/4lo monocytes and neutrophils in WT and D6-/- infarcts 7 days after myocardial infarction. *p<0.05, **p<0.01 vs WT (n=3/group)

a)

	HR	IVSd (mm)	IVSs (mm)	LVPWd (mm)	LVPWs (mm)	LVIDd (mm)	LVIDs (mm)	FS (%)
<i>WT</i>	475+/-26	8.58+/-0.48	12.17+/-0.96	7.83+/-0.44	10.75+/-0.21	38.9+/-2.0	24.4+/-0.9	37.7+/-0.3
<i>D6-/-</i>	426+/-21	8.31+/-0.48	12.00+/-0.69	7.11+/-0.21	9.87+/-0.53	47.2+/-1.9	27.9+/-1.6	35.8+/-1.6
<i>p value</i>	0.19	0.71	0.88	0.16	0.20	0.22	0.12	0.35

HR: Heart rate in bpm; IVS: Interventricular Septal Wall Thickness, d=diastolic, s=systolic; LVPW: Left Ventricle Posterior Wall thickness, d=diastolic, s=systolic; LVID: Left Ventricular Internal Diameter, d=diastolic, s=systolic; FS: Fractional Shortening.



c)

	Heart Rate (BPM)	Average Wall Thickness (mm)	Fractional Area Contraction (%)
<i>WT</i>	474.5+/-15.7	0.46+/-0.02	17.8+/-2.7
<i>D6-/-</i>	495.0+/-13.5	0.39+/-0.02	9.3+/-0.8
<i>p value</i>	0.36	0.053	0.069

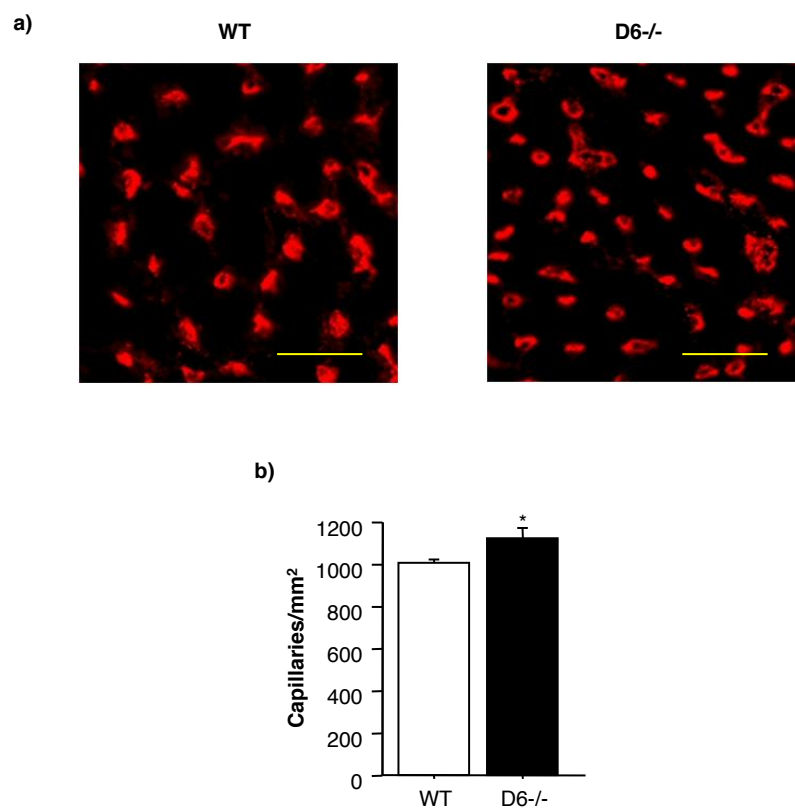
d)

Host	BM	Heart Rate (BPM)	Average Wall Thickness (mm)	Fractional Area Contraction (%)
<i>WT</i>	<i>WT</i>	458.3+/-32.1	0.41+/-0.02	16.82+/-2.7
<i>WT</i>	<i>D6-/-</i>	442.4+/-30.9	0.41+/-0.03	17.2+/-2.3
	<i>p value</i>	0.72	0.97	0.92

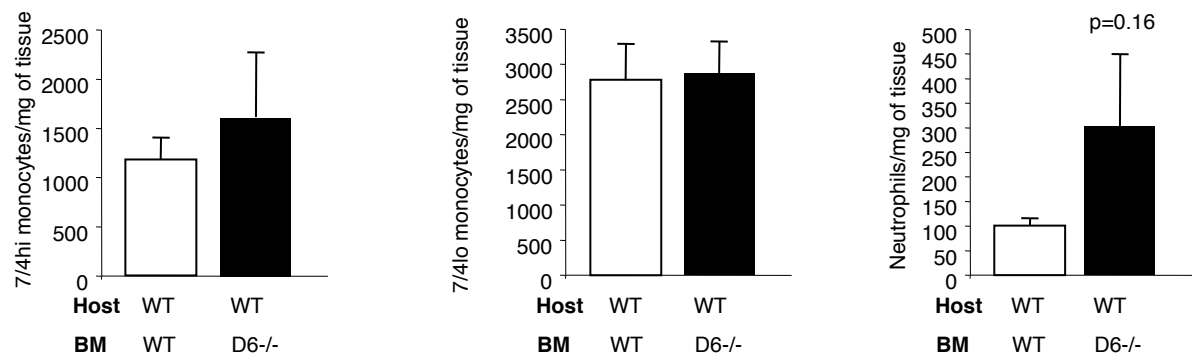
e)

Host	BM	Heart Rate (BPM)	Average Wall Thickness (mm)	Fractional Area Contraction (%)
<i>WT</i>	<i>WT</i>	479.5+/-15.1	0.53+/-0.01	16.4+/-1.9
<i>WT</i>	<i>CCR2-/-</i>	478.2+/-13.1	0.56+/-0.04	20.9+/-2.3
<i>D6-/-</i>	<i>WT</i>	480.0+/-22.45	0.44+/-0.02**	9.6+/-1.6*
<i>D6-/-</i>	<i>CCR2-/-</i>	483.6+/-11.6	0.55+/-0.05	18.0+/-0.7
	<i>p value</i>	ns	**p<0.01 vs WTBM:WThost	*p<0.05 vs WTBM:WThost

Supplementary figure III. a) Baseline cardiac function in D6-/- vs WT mice as assessed by M-mode echocardiography; b) Representative B-mode echocardiography images of a WT and a D6-/- heart in diastole, with delineation of endocardium and epicardium, at 14 days after MI. Additionally B-mode echocardiographic measurements 14 days after MI in c) WT vs D6-/- mice; d) WT BM>WT Host vs D6-/- BM>WT Host; e) WT BM>WT Host vs WT BM>D6-/- Host, CCR2-/- BM>D6-/- Host and CCR2-/- BM>WT Host.



Supplementary figure IV. Capillary density in the infarct border zone 14 days after infarction. a) representative photomicrographs and b) quantitative analysis of Caveolin1+ capillaries per mm² in the border zone of WT and D6^{-/-} infarcts, 14 days after MI. Scale bar 50 micrometers, *p<0.05 vs WT (n=6 to 8)



Supplementary figure V. Effect of leukocyte specific D6 deletion on MI inflammation. 7/4hi monocytes, 7/4lo monocytes and neutrophils infiltration in WT mice lethally irradiated and reconstituted with WT (WT BM) or D6-/- (D6-/- BM) bone marrow cells, 7 days after MI (n=5/group).

Annexe 2

Chemokine Receptor CCR1 Disruption Limits Renal Damage in a Murine Model of Hemolytic Uremic Syndrome

Maria V. Ramos,* Constance Auvynet,[†]
Lucie Poupel,[†] Mathieu Rodero,[†]
Maria Pilar Mejias,* Cecilia A. Panek,*
Silvia Vanzulli,[‡] Christophe Combadiere,[†] and
Marina Palermo*

From the Division of Immunology,* Institute of Experimental Medicine (IMEX-CONICET), and the Division of Pathology,[‡] Institute of Oncologic Investigation, National Academy of Medicine, Buenos Aires, Argentina; and the Laboratory of Immunity and Infection,[†] INSERM UMRS 945, University of Pierre and Marie Curie, Paris, France

Shiga toxin (Stx)–producing *Escherichia coli* is the main etiological agent that causes hemolytic uremic syndrome (HUS), a microangiopathic disease characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure. Although direct cytotoxic effects on endothelial cells by Stx are the primary pathogenic event, there is evidence that indicates the inflammatory response mediated by polymorphonuclear neutrophils and monocytes as the key event during HUS development. Because the chemokine receptor CCR1 participates in the pathogenesis of several renal diseases by orchestrating myeloid cell kidney infiltration, we specifically addressed the contribution of CCR1 in a murine model of HUS. We showed that Stx type 2–treated CCR1^{−/−} mice have an increased survival rate associated with less functional and histological renal damage compared with control mice. Stx type 2–triggered neutrophilia and monocytes and polymorphonuclear neutrophil and monocyte renal infiltration were significantly reduced and delayed in CCR1^{−/−} mice compared with control mice. In addition, the increase of the inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- α and IL-6) in plasma was delayed in CCR1^{−/−} mice compared with control mice. These data demonstrate that CCR1 participates in cell recruitment to the kidney and amplification of the inflammatory response that contributes to HUS development. Blockade of CCR1 could be important to the design of future therapies to restrain

the inflammatory response involved in the development of HUS. (Am J Pathol 2012, 180:1040–1048; DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.11.011)

Shiga toxin–producing *Escherichia coli* is the principal etiological agent of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). HUS mainly affects children and is characterized by microangiopathic hemolytic anemia, thrombocytopenia, and acute renal failure.^{1–3} The incidence of HUS varies according to the country. Argentina shows the highest incidence worldwide, with 12 to 14 cases per 100,000 children aged <5 years per year and >400 new cases annually.⁴ This rate is 10 times higher than in other industrialized countries⁵ and remains a major health problem, with no specific treatment.

Endothelial damage has been recognized to play a central role in the sequence of events leading to the microangiopathic process of HUS.⁶ Human glomerular endothelial cells are the primary target of the toxic effects of Shiga toxin (Stx), which, on binding to its specific receptor Gb3, triggers a cascade of signaling events contributing to the development of vascular dysfunction, recruitment of leukocytes, platelet thrombus formation, and fibrin deposition.⁷ Moreover, in human endothelial cells, Gb3 expression and Stx toxicity are further increased by inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)- α ,⁷ that can be released from monocytes/macrophages (Macs) in response to Stx.⁸ There is considerable evidence that polymorphonuclear neutrophils (PMNs)⁹ and monocytes¹⁰ play an active role in the

Supported in part by grants from INSERM, the Agence Nationale de la Recherche (ANR) Maladies Neurologiques et Psychiatriques (ANR-08-MNPS-003), European Grant Innochem (LSHB-CT-2005-518167 to C.C.), and Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica from Argentina (PICT 08/417 to M.P.). C.C. is a recipient of a contract (Interface) from Assistance Publique-Hopitaux de Paris.

Accepted for publication November 11, 2011.

C.C. and M.P. contributed equally to this work.

Address reprint requests to Maria Victoria Ramos, Ph.D., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Pacheco de Melo 3081, C1425AUM, Argentina. E-mail: mvrmos@hematologia.anm.edu.ar or toresani7@hotmail.com.

pathogenesis of HUS, and that their interaction with activated endothelial cells contributes to amplify microvascular injury in the kidney.

During the acute phase of the disease, PMNs are activated, become more adhesive, and damage the endothelium.^{11,12} Kidney biopsy specimens from children with HUS showed monocytes and PMNs within the glomeruli, along the zone of microvascular injury.^{13,14} Several reports described, in mice, that PMN infiltration in kidney is dependent on chemokine CXCL1/keratinocyte chemoattractant (KC) and CXCL2/Mac inflammatory protein-2 local up-regulation,¹⁵ mainly chemokine ligand (CCL) 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CXCL8/IL-8, two key modulators of monocytes/Macs and PMN adhesion and transmigration.¹⁶ Moreover, elevated urinary levels of these two chemokines in patients with HUS have been reported.¹⁶ Other chemokines, such as CX₃CL1/fractalkine and its receptor, CX₃CR1, have also been implicated in HUS. We previously reported that CX₃CR1 is down-regulated on peripheral leukocytes from patients with HUS,¹⁷ and Zanchi et al¹⁸ showed that Stx induces the synthesis of CX₃CL1 by human endothelial cells. Thus, locally secreted chemokines participate in the accumulation of inflammatory cells at kidney level¹⁵ and amplify the inflammatory processes instrumental to the activation of renal microvascular endothelial cells. Another chemokine axis, CCR1 and its ligand, has been implicated in renal diseases.¹⁹ CCR1 is mainly expressed on PMNs, monocytes, lymphocytes, and eosinophils, and binds the chemokines Mac-inflammatory protein (CCL3/Mac inflammatory protein-1 α) and regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (CCL5), among other related chemokines.^{20–22} In particular, Macs are recruited into kidney from Stx plus lipopolysaccharide-injected mice, in response to CCL2, CCL5, and CCL3 secretion.²³ CCL3 is produced by endothelial cells, epithelial cells, and leukocytes, and binds to CCR1 and CCR5 with high affinity to exert its biological effects.^{24–26}

In the present study, we addressed the role of CCR1 in a murine model of HUS-inducing renal damage by i.v. Stx type 2 (Stx2) injection. We showed that CCR1-deficient mice (CCR1^{-/-}) were less susceptible to Stx2 cytotoxic effects and showed higher survival rates than control mice. These data imply that CCR1 may be an important chemokine receptor during inflammatory response in HUS evolution.

Materials and Methods

Mice

CCR1- and CCR5-deficient mice (CCR1^{-/-} and CCR5^{-/-}) were generated as previously described.^{21,27} CCR1^{-/-} were provided by Drs. Philippe Murphy and Ji Liang Gao (Laboratory of Molecular Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD). CCR5^{-/-} (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and C57BL/6 control mice (weight, 18 to 22 g) were maintained at the Centre d'Exploration Fonction-

nelle animal facility (Pitié-Salpêtrière, Paris, France). All deficient mice were bred onto the C57BL/6 background (six to eight backcrosses). Mice were housed in a 12-hour light-dark cycle and maintained with food and water available *ad libitum*. Animal experiments were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee of Faculté of Medicine Pitié-Salpêtrière.

Murine Model of HUS

Stx2 was prepared as previously described.²⁸ Cytotoxic activity was evaluated on Vero cells, and the CD₅₀ (cytotoxic dose that kills 50% of Vero cells) was calculated.²⁹ Control and CCR1^{-/-} mice were injected i.v. with a dose equivalent to 300 CD₅₀ that induced >80% of mortality during the 6 days after injection. Mice were anesthetized, bled by puncture of the retro-orbital plexus, and subjected to necropsy at different times after Stx2 injection. Whole blood (100 μ L) was analyzed by flow cytometry. Animals were perfused with sterile PBS. Bone marrow cells were obtained from one femur and tibia. Lungs were homogenized and passed through a cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), and the cells were washed and resuspended in PBS. Kidneys were incubated with collagenase type IV for 40 minutes, and cells were washed and sedimented on a Ficoll gradient to recover leukocytes.

Flow Cytometry

Leukocyte subpopulations were detected by flow cytometry using the standard procedures and the following monoclonal antibodies: anti-7/4–fluorescein isothiocyanate, CD11b-phycoerythrin (PE) Cy5, Ly6G-PE, CD11c-PE (BD PharMingen, San Diego, CA), and F4/80–antigen-presenting cell (Serotec, Oxford, UK). Cell suspensions were incubated with appropriate fluorochrome-conjugated antibodies and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson), using Cell Quest Pro software (Becton Dickinson). The absolute number of each leukocyte subpopulation was calculated as the total leukocytes multiplied by the percentage of cells inside the specific gate analyzed by flow cytometry. Total leukocytes in 1 mL were calculated using a predetermined number of beads (Polybead, carboxylate microsphere; Polysciences Europe, Eppelheim, Germany) added to each tube.

Renal Damage Evaluation

Urea and Creatinine Evaluation

Biochemical determinations of urea and creatinine in plasma were performed using commercial kits [Quantichrom™ Urea Assay Kit (DIUR-500) and Creatinine Assay Kit; BioAssay Systems, Hayward, CA], following standardized instructions.

Histopathological Analyses

For histological analysis, kidneys from control and CCR1^{-/-} mice, excised before and after Stx2 injection,

were bisected longitudinally; fixed in 10% neutral formalin; and embedded in paraffin. Tissue sections (4- μ m thick) were stained with H&E and PAS before light microscopic examination. Renal tubular injury was evaluated according to the following criteria: swelling and cytoplasmic vacuolation, sloughing tubular epithelium, basement membrane integrity, necrosis, and apoptosis. The extent of damage was assessed by counting the number of affected tubules per cortical field. Glomerular changes were quantified as the number of hyperemic glomeruli per cortical field. All quantifications were performed by randomly counting 20 fields at $\times 400$ magnification for four independent sections from three mice.

IHC Renal Evaluation of F4/80⁺ Cells

Paraffin sections were fixed in xylene and rehydrated through ethanol and 1 mol/L PBS (pH 6.0). Endogenous peroxidases were quenched with 3% H₂O₂ in methanol, before blocking nonspecific binding with 1.5% normal rabbit serum (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted in PBS. Sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody: rat anti-mouse F4/80 (dilution, 1:25; 0.5 mg/mL; AbD Serotec, Oxford). The slides were washed and incubated with biotin-conjugated rabbit anti-rat IgG (dilution, 1:100; 0.5 mg/mL; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 40 minutes, followed by streptavidin-conjugated peroxidase and 3',3'-diaminobenzidine (Vector Laboratories), and counterstained with hematoxylin.

Immunofluorescent Staining of Renal Leukocytes

To determine the presence of tissue-associated leukocytes, frozen kidney samples were embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue Tek, Tokyo, Japan) and cut into sections (5 μ m thick) in a cryostat, fixed with cold acetone for 10 minutes, and blocked with 1% PBS-bovine serum albumin for 30 minutes. Sections were incubated overnight with the primary antibodies: rat anti-mouse Ly6G antibody (dilution, 1:100; 0.5 mg/mL; BD Pharmingen, Franklin Lakes) or rat anti-mouse CD11b (integrin α M chain; MAC-1; dilution, 1:10; 125 μ g/mL; BD Pharmingen). The sections were washed with PBS and incubated with anti-rat Alexa 488-conjugated secondary antibody (dilution, 1:1000; 2 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, CA) for 2 hours. At the final step, sections were washed with PBS and mounted with VectaShieldHard Set mounting reagent (Vector Laboratories) containing 12.5 μ g/mL DAPI to identify nuclei. As a negative control, the same concentration of secondary antibody was used without any primary antibodies. Images were captured with a Coolsnap digital camera (RS Photometrics, Tucson, AZ) attached to an Olympus BX51 fluorescence microscope (Olympus, Rungis, France). For statistical analysis, digital quantification of CD11b⁺ or Ly6G⁺ cells was performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Measurement of Cytokines by ELISA

Concentrations of murine TNF- α and IL-6 were measured in plasma from control and CCR1^{-/-} mice before or at various time points after Stx2 injection, using a standardized sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (Quantikine R&D Systems, Rochester, MN), according to the manufacturer's instructions. The optical density was determined at 450 nm in an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader. Recombinant murine cytokines (Quantikine R&D Systems) were used to generate standard curves, and concentrations were expressed as pg/mL.

Statistical Analysis

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for data analysis and graphic representation. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of each group of mice. The Student's *t*-test was used for analysis of biochemical parameters of renal damage, flow cytometry data, and leukocyte counts obtained by kidney staining. The χ^2 test was used for histological parameter analysis. The log-rank test was used to compare survival curves. *P* < 0.05 was considered significant.

Results

CCR1^{-/-} Mice Are Less Susceptible to Stx2 Than Control Mice

To determine whether chemokine receptor CCR1 is implicated in a murine model of HUS pathogenesis, CCR1^{-/-} and control C57BL/6 mice were injected i.v. with Stx2 and survival rate was evaluated. As shown in Figure 1A, 70% of the CCR1-deficient mice survived to Stx2 injection compared with 20% of control mice. Because CCR1 and CCR5 share several ligands, we also evaluated Stx2 cytotoxic effect in CCR5^{-/-} mice. Survival in CCR5^{-/-} mice showed no significant difference with control mice (Figure 1A). These data suggest that, even though CCR1 and CCR5 share their main ligands CCL3 and CCL5, CCR1 plays a critical role in HUS evolution. Because the main Stx2 target tissue is the kidney, renal function was evaluated by measuring urea and creatinine levels in plasma. The level of plasmatic urea increased 24 hours after Stx2 injection and peaked by day 3 in control mice, whereas it increased slightly and belatedly in CCR1^{-/-} mice (Figure 1B). Moreover, creatinine was only significantly increased in control mice at day 3 but not in CCR1^{-/-} mice (Figure 1C). These data suggest that the increased survival observed in CCR1^{-/-} mice was associated with reduced renal damage.

CCR1^{-/-} Mice Display Reduced Tubular Damage

Because the kidney is the main target for Stx2 toxicity, renal tissue samples of both mouse strains were studied before and after Stx2 injection. Normal renal histological

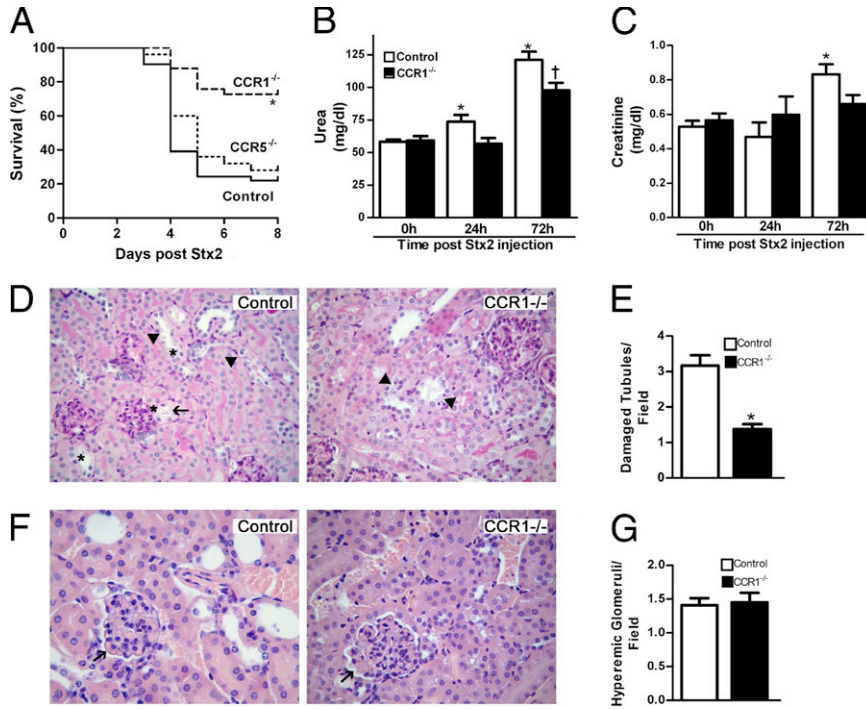


Figure 1. CCR1^{-/-} survival and renal damage after Stx2 intoxication. **A:** CCR1^{-/-} ($n = 38$), CCR5^{-/-} ($n = 20$), and control ($n = 30$) mice were injected i.v. with Stx2. The survival was monitored on a daily basis. * $P < 0.001$ versus control; † $P < 0.05$ versus CCR5^{-/-} mice. Plasma urea (**B**) and creatinine (**C**) concentrations were measured at preintoxication (0 hours) or after Stx2 administration (24 or 72 hours) in CCR1^{-/-} and control mice. Data represent mean $\pm$ SEM values ($n = 15$ per group). * $P < 0.05$ versus control preintoxication (0 hours); † $P < 0.05$ versus CCR1^{-/-} preintoxication (0 hours). **D:** Representative PAS-stained sections from renal tissue of control and CCR1^{-/-} mice showing Stx2-induced tubular injury after 72 hours. In control mice, more tubules showed focal necrosis, evaluated as tubular epithelial cells with eosinophilic cytoplasm and loss or picnotic nuclei (arrowheads), detachment from basement membrane (arrow), and cell sloughing (asterisks). Original magnification, $\times 200$. **E:** Number of damaged tubules in 20 cortical fields in control and CCR1^{-/-} mice. * $P < 0.001$ versus control mice. Original magnification, $\times 400$. **F:** H&E-stained sections from control and CCR1^{-/-} mice 72 hours after Stx2 intoxication displaying hyperemic glomeruli and hyperemic vessels (arrow) in the interstitium. **G:** Number of hyperemic glomeruli counted in 20 cortical fields showed no difference between control and CCR1^{-/-} mice. Original magnification, $\times 400$.

characteristics were observed before treatment in both mouse strains. At 72 hours after intoxication, histopathological analysis showed damage mainly localized in renal tubules in CCR1^{-/-} and control mice (Figure 1, D and E). The quantification of affected tubules showed significantly fewer damaged tubules in CCR1^{-/-} than in control mice (Figure 1E), indicating less extensive tubular epithelial necrosis in CCR1^{-/-} mice. The damaged tubules exhibited swelling, cytoplasmic vacuolation, and sloughing of tubular epithelium in both mouse strains. Although tubules from both strains display apoptotic cells, a few tubules were completely necrotic (2.5%) in control mice. This type of injury was absent in renal parenchyma from CCR1^{-/-} mice, suggesting less severe lesions. The only glomerular change was manifested by hyperemia, but occluded glomeruli or amorphous material suggestive of intraglomerular fibrin deposits was not observed (data not shown). The quantification of hyperemic glomeruli was similar in both mouse strains (Figure 1, F and G). These results suggest that reduced renal dysfunction, evaluated as urea and creatinine levels, correlated with a reduced extent of tubular damage in CCR1^{-/-} mice.

Myeloid Cell Infiltration Is Dampened in CCR1^{-/-} Mouse Kidney

Because leukocyte subpopulations, such as PMNs and monocytes, are implicated in the pathogenesis of HUS, immunostaining was performed to analyze early myeloid cell infiltration into the renal tissue. Immunofluorescence staining indicates more accumulation of interstitial CD11b⁺ cells in renal tissue from control than from CCR1^{-/-} mice 24 hours after Stx2 treatment (Figure 2, A and B). According to Ly6G staining, more PMNs were

also observed in control compared with CCR1^{-/-} mice (Figure 2, C and D). Before Stx2 injection, there were no differences in the number of these cells in both mouse strains (data not shown).

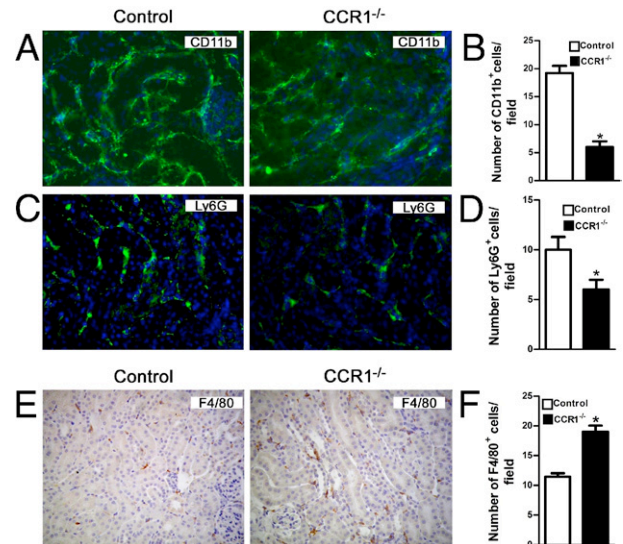


Figure 2. Leukocyte recruitment in kidney tissue. **A:** Representative microphotographs of CD11b immunofluorescent staining (green) of kidney cortex from control and CCR1^{-/-} mice 24 hours after Stx2 intoxication. **B:** Quantification of the renal CD11b⁺ myeloid cells ($n = 5$). **C:** Representative microphotographs of Ly6G immunofluorescent staining (green) of kidney cortex from control and CCR1^{-/-} mice 24 hours after Stx2 intoxication. **D:** Quantification of the renal Ly6G⁺ myeloid cells ($n = 5$). Nuclei were depicted using DAPI labeling (blue). Data represent the mean $\pm$ SEM of absolute numbers quantified in three randomly selected fields. **E:** Representative microphotographs of F4/80 immunostaining to detect Mac/iDC 72 hours after Stx2 intoxication. **F:** Quantification of interstitial F4/80⁺ cells in 20 cortical fields in control and CCR1^{-/-} mice 72 hours after Stx2 intoxication. Original magnification, $\times 200$ (**E** and **F**). * $P < 0.05$ versus control mice (**B**, **D**, and **F**).

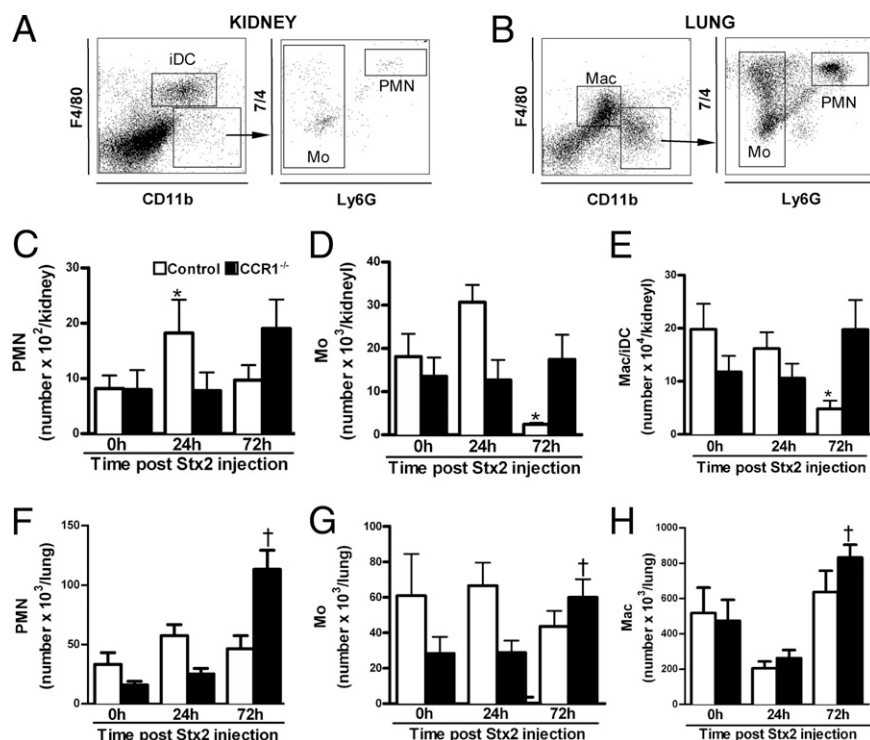


Figure 3. Leukocyte subsets in kidney and lung. *CCR1*^{-/-} and control mice were injected i.v. with Stx2. Kidneys and lungs were collected at different time points. **A:** Representative dot plot identifying PMNs (CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁺ 7/4⁺), monocytes (Mos; CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁻ 7/4⁺), and Macs/iDCs (CD11b⁺ F4/80⁺ CD11c⁺) in kidney. **B:** Representative dot plot identifying PMNs (CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁺ 7/4⁺), Mos (CD11b⁺ F4/80⁻ Ly6G⁻ 7/4⁺), and Macs (F4/80⁺ CD11b⁺) in lung. Kidney cells were analyzed by flow cytometry, and the absolute number of PMNs (C), Mos (D), and Macs/iDCs (E) was calculated as detailed in *Materials and Methods*. Lung cells were analyzed by flow cytometry, and the absolute number of PMNs (F), Mos (G), and Macs (H) was similarly calculated. Data represent the mean ± SEM of absolute numbers in each group (*n* = 10). **P* < 0.05 versus control before Stx2 intoxication (0 hours); †*P* < 0.05 versus *CCR1*^{-/-} before Stx2 intoxication (0 hours).

To further analyze Mac populations, immunohistochemical (IHC) detection with anti-F4/80 antibody was performed before and at different times after Stx2 injection. Interestingly, fewer F4/80⁺ cells were observed in the renal interstitium of control mice compared with *CCR1*^{-/-} mice at 72 hours after Stx2 injection (Figure 2, E and F), whereas no differences were observed at earlier times (data not shown).

To confirm and quantify myeloid cell infiltration in kidney, the presence of PMNs, monocytes, and Macs/interstitial dendritic cells (Macs/iDCs) in this organ was analyzed by flow cytometry. PMNs were defined as cells expressing the myeloid marker CD11b and the specific antigens Ly6G and 7/4, whereas monocytes express CD11b and 7/4, but not Ly6G (Figure 3A). We identified Macs as cells expressing the conventional markers F4/80 and CD11b. However, because most of this cell population also expresses the common DC marker CD11c, we generically called this subset Mac/iDC, in agreement with previous reports.³⁰ Stx2 induced a transient increase of PMNs (Figure 3C) and monocytes (Figure 3D) in the kidney of control mice, peaking at 24 hours, followed by a decrease of these myeloid populations. Macs/iDCs only showed a significant decrease at 72 hours after Stx2 injection (Figure 3E). *CCR1*^{-/-} mice showed increased PMN and Mac/iDC populations in kidney at 72 hours, whereas monocytes were unchanged at all time points (Figure 3, C–E).

In parallel, the recruitment of myeloid cells in the lung, which is considered the major endothelial bed in which activated PMNs usually adhere, was studied. PMNs and monocytes from lung were identified following the same staining performed for kidney samples. CD11b⁺ and F4/80⁺ cells from lung include mainly interstitial and alveolar

Macs.³¹ and were defined generically as Macs (Figure 3B). Control mice had no significant variations in the number of lung-associated leukocytes along the indicated experimental time, whereas *CCR1*^{-/-} mice showed a significant increase of PMNs (Figure 3F), monocytes (Figure 3G), and Macs (Figure 3H) 72 hours after Stx2 injection.

Myeloid Cell Populations Are Differently Altered in Blood and Bone Marrow from Control and *CCR1*^{-/-} Mice after Stx2 Injection

To study whether myeloid cells, such as PMNs and monocytes, were differently mobilized in control and *CCR1*^{-/-} mice, cells from peripheral blood and bone marrow were counted and analyzed by flow cytometry at different times after Stx2 injection. PMNs and monocytes were defined according to the CD11b, Ly6G, and 7/4 expression in blood (Figure 4A) and bone marrow (Figure 4D), as previously described. Control mice showed an early and marked increase in peripheral PMNs (Figure 4B) and monocytes (Figure 4C), accompanied by a simultaneous reduction of both populations in bone marrow at 24 hours (Figure 4, E and F). After 72 hours, PMNs and monocytes were reduced in blood compared with initial values, and returned to baseline in bone marrow. By contrast, *CCR1*^{-/-} mice only showed a significant, but delayed, increase of peripheral PMNs and a reduction of monocytes 72 hours after Stx2, compared with initial values (Figure 4, B and C). In parallel, there was an early reduction of both subpopulations in bone marrow that was finally restored to normal levels, as happened in control mice (Figure 4, E and F). These data indicate that

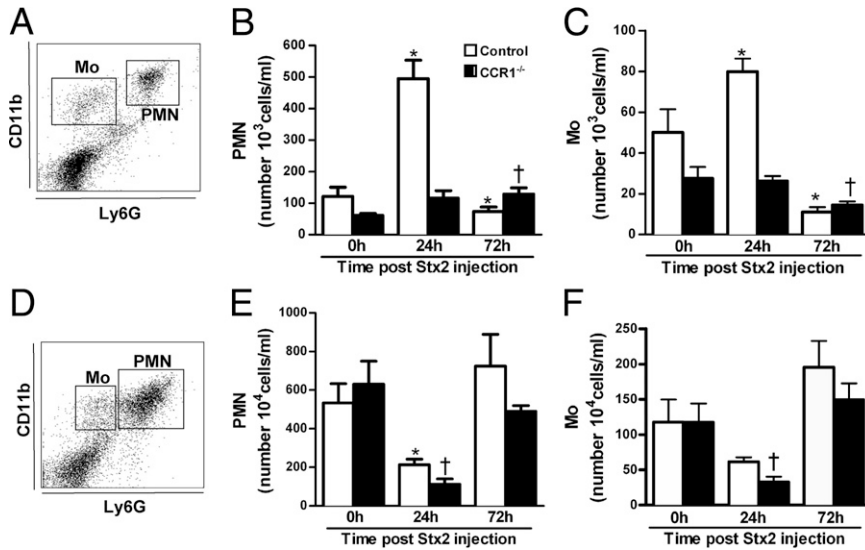


Figure 4. Leukocyte subsets in blood and bone marrow. Control and CCR1^{-/-} mice were injected i.v. with Stx2. Blood and bone marrow were collected before (0 hours) and at different times after Stx2 injection. Representative dot plots identifying PMNs (CD11b⁺Ly6G⁺) and monocytes (Mos; CD11b⁺Ly6G⁻) in blood (A) and bone marrow (D). Cells were analyzed by flow cytometry, and absolute numbers of PMNs and Mos were calculated in blood (B and C) and bone marrow (E and F), as previously described in *Materials and Methods*. Data represent the mean $\pm$ SEM of absolute numbers in each group ($n = 10$). * $P < 0.05$ versus control before injection (0 hours); † $P < 0.05$ versus CCR1^{-/-} before injection (0 hours).

Stx2-triggered neutrophilia and monocytosis is dampened in CCR1-deficient mice.

Inflammatory Cytokines Are Differently Expressed in Control and CCR1^{-/-} Mice after Stx2 Injection

To evaluate soluble parameters of inflammatory response, the level of cytokines, such as TNF- α and IL-6, was evaluated. For this purpose, both cytokines were tested in plasma from control and CCR1^{-/-} mice at different points after Stx2 injection. Plasmatic TNF- α (Figure 5A) and IL-6 (Figure 5B) levels increased rapidly at 2 and 24 hours, respectively, in control mice after Stx2 injection and returned to baseline thereafter. However, both cytokines were only increased at a later time point (72 hours) in CCR1^{-/-} mice, suggesting that the inflammatory onset is delayed in CCR1^{-/-} mice.

Discussion

The present work showed that the chemokine receptor CCR1 plays an important role during HUS evolution. Mice deficient in CCR1 had an increased survival rate after Stx2 injection compared with control mice. We also observed that CCR1^{-/-} mice had an increased survival rate compared with CCR5^{-/-} mice, suggesting that the absence of CCR5 may not be essential to the onset of HUS. Although both receptors share their main ligands (CCL3 and CCL5), the pattern of cellular expression is different. In particular, although CCR1 is expressed by monocytes, Macs, and PMNs, CCR5 expression is absent in PMNs. In addition, differential expression of CCR1 and CCR5 has been reported in different subsets of monocytes, suggesting a sequential influx of monocytes/Macs with different functional capacities.³² For example, the blockade of CCR5 with soluble antagonists, such as Met-regulated on activation normal T-cell expressed and secreted, during experimental glomerulonephritis reduced CCR5⁺

Macs into glomeruli.³² However, mice still develop severe histopathological lesions. These results suggest that CCR5⁺ Macs participate in the removal of apoptotic cells protecting tissues from the toxic content of dying cells. In addition, CCR5 mediates glomerular, but not interstitial, Mac recruitment in murine nephritis.³² Resistance in CCR1^{-/-} mice to Stx2 intoxication was related to reduced renal damage, evaluated through plasmatic urea and creatinine levels, and kidney histological features. In a similar HUS murine model using a combination of Stx and lipopolysaccharide injection, renal expression of CCL3, CCL5, and CCL2 correlates with Mac infiltrate and blockade of these chemokines reduces such cell accu-

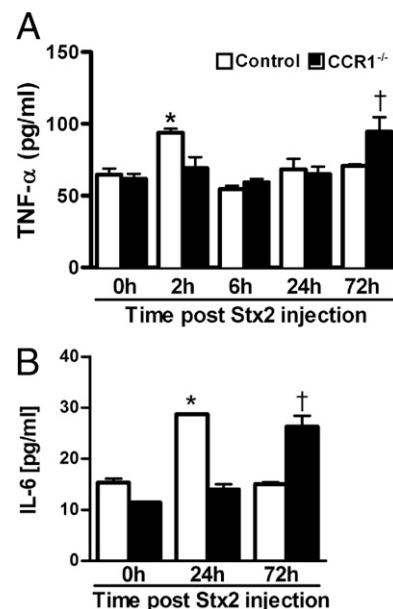


Figure 5. Cytokine expression in plasma from control and CCR1^{-/-} mice after Stx2 injection. TNF- α (A) and IL-6 (B) were evaluated in plasma from control and CCR1^{-/-} mice. Samples were obtained before and at indicated times after Stx2 injection. Data represent the mean $\pm$ SEM of absolute numbers in each group ($n = 10$). * $P < 0.001$ versus control before Stx injection (0 hours); † $P < 0.05$ versus CCR1^{-/-} before Stx injection (0 hours).

mulation.²³ Although the central pathological injury in children with HUS is at the glomerular level, Stx-treated mice show lesions in tubules, with little or no glomerular pathological features.³³ Moreover, tubular lesions in mice given Stx2 predominantly affect renal cortical proximal tubules, with cortical distal tubules being relatively unaffected. The development of tubular injury can be explained by the localization of the Stx receptors, mainly on mouse renal tubules. In line with these reports, 72 hours after Stx2 treatment, we observed more severe tubular than glomerular lesions in both mouse strains. In many animal models of inflammatory kidney disease, such as unilateral ureteral obstruction^{34,35} and murine doxorubicin (Adriamycin) nephropathy,³⁶ CCR1 blockade markedly reduces Mac and T-cell infiltrates, tubular injury, and interstitial fibrosis, but not glomerular pathological features. Likewise, we observed that CCR1 deficiency results in reduced renal leukocyte recruitment and reduced tubular damage but a similar level of glomerular congestion than control mice.

Previous studies have implicated CCR1 in the modulation of leukocyte trafficking and activation³⁷ and in the balance of types 1 and 2 cytokines during infections.^{38,39} During HUS, a successful response to infection consists of a delicate balance between pro- and anti-inflammatory cytokines^{40,41} because an exacerbated inflammatory response mediated by leukocytes and cytokines/chemokines contributes to potentiate Stx-triggered endothelial damage.^{9,10}

Analysis of tissue-associated leukocytes demonstrated that Stx2 treatment induces an early trafficking of PMNs and monocytes to the kidney in control, but not in CCR1^{-/-} mice. On the other hand, CCR1^{-/-} mice had a delayed and slight increase of kidney leukocytes 72 hours after injection. Previous studies³⁸ have shown that PMNs from CCR1^{-/-} mice are nonresponsive to CCL3 and that CCR1 may be essential for influx of these cells to the injured tissues. Down-regulation of PMN influx to kidney may contribute to the protection against Stx2 toxicity in CCR1^{-/-} mice. When monocytes and Macs/iDCs were analyzed, control mice showed a reduction in both cell subsets 72 hours after Stx2 control mice. These reductions could be attributed to apoptosis of these cell subsets after activation, accompanying the beginning of the resolution of the inflammatory reaction.^{42,43} However, CCR1^{-/-} mice showed a slight increase in the number of monocytes and Macs/iDCs. Further studies are needed to define the molecular mechanism leading to accumulation of these cell subsets in CCR1^{-/-} mouse kidney. Whether this delayed infiltration is mediated by other chemokine axis and may favor fibrosis and repair remains to be elucidated. Renal iDCs may contribute to the recovery process by a dynamic phenotypic change from pro-inflammatory to anti-inflammatory. In this regard, during ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury, depletion of iDCs was associated with persistent renal damage, more apoptosis, inflammation, and impaired tubular proliferation.⁴³ Considering this, we suggest that early increase of renal content of inflammatory cells may contribute to renal damage through induction of apoptosis and/or necrosis of renal cells and local inflammation.

Leukocyte activation and adherence to endothelium were simultaneously evaluated through lung content of the myeloid populations. PMNs, monocytes, and Macs were increased in lungs from CCR1^{-/-} mice just at 72 hours after Stx2 injection, following the same kinetic pattern observed in the kidneys from these mice. On the other hand, control mice showed no significant alterations in the recruitment of cells into lung. These data suggest that Stx2 also induces activation of myeloid cells in CCR1^{-/-} mice, demonstrated by cells with increased adhesive properties to lung vessels, which are known as the major marginal pool of PMNs. However, in the absence of CCR1 chemoattractant axis, marginated cells may not infiltrate tissue. Unfortunately, we could not distinguish marginated from infiltrated or transmigrated cells in lungs using flow cytometry to confirm this hypothesis. Likewise, in the ischemia-reperfusion kidney model of acute renal damage, there is an enhanced number of PMNs in the lung that are not infiltrating the tissue; for this reason, cells probably do not induce injury.³⁰ Furthermore, lung Macs could be defined as interstitial Macs (F4/80⁺CD11c⁻) and alveolar Macs (F4/80⁺CD11c⁺). These Mac populations show anti-inflammatory profiles by producing high levels of IL-10 or by interfering with lung DC function.³¹ These reports suggest that accumulation of Macs in lung, as we observed in CCR1^{-/-} Stx2-treated mice, is not strictly related to a severe pulmonary disease.

Because there is considerable evidence that PMNs and monocytes play an active role in the pathogenesis of HUS, and both subpopulations express CCR1, they were analyzed in CCR1^{-/-} and control mice after Stx2 injection. Although both strains showed mobilization of these cell subsets from bone marrow to periphery as a consequence of systemic Stx2 injection, the kinetics and intensity of such phenomenon were different. Interestingly, the severe and early neutrophilia observed in control mice was delayed and reduced in CCR1^{-/-} mice. In addition, monocytes were only increased in control mice. These alterations were accompanied by the transitory depletion of PMNs and monocytes in the bone marrow. Although this process occurred in both mouse strains, CCR1^{-/-} mice showed a more pronounced decrease and a slower recovery of normal cellularity compared with control mice. In this regard, it was previously demonstrated that Stx2-induced neutrophilia arose from different events, including acceleration in the release of bone marrow cells and increase in the proliferation of progenitor myeloid cells.⁴⁴ CCL3, one of the main ligands for CCR1, has mediated proliferation of mature progenitor cells in bone marrow.³⁸ Decreased numbers of progenitors of granulocytes and Macs have been observed in the spleen and blood of the CCR1^{-/-} mice.³⁸ All these events could be limiting the neutrophilia and monocytosis in CCR1^{-/-} mice. We have previously reported that depletion of PMNs or Macs increases mouse survival to Stx2.^{9,10} We propose that a reduced neutrophilia and monocytosis at the beginning could be associated with a decrease in renal damage in deficient mice. Moreover, the inflammatory microenvironment inside the kidney induced an early and specific recruitment of myeloid cells to this organ

solely in control mice. Cytokines, such as TNF- α and IL-6, which are usually up-regulated during a systemic inflammatory response and also in patients with HUS,⁴⁵ were analyzed in plasma from Stx2-treated mice. In particular, TNF- α , a critical cytokine involved in triggering the inflammation and in sensitizing endothelium to Stx action, is induced on Stx2 interaction with monocytes and renal epithelial cells.^{46,47} In agreement with this, we observed an early and transient increase of plasmatic TNF- α and IL-6 levels in control mice. However, the peak of both cytokines was delayed up to 72 hours in CCR1^{-/-} mice. Therefore, results presented herein suggest that CCR1 is necessary for cell recruitment and for amplification of local and systemic inflammatory response.

Previous reports in a murine model of sepsis have shown an altered cytokine/chemokine profile in CCR1^{-/-} mice. Lower levels of CXCL2/Mac inflammatory protein-2 and KC, both cytokines implicated in PMN recruitment, and also TNF- α were observed in CCR1^{-/-} compared with control mice.³⁹ An interesting feature of our findings is that a dampened and delayed inflammatory response, evidenced through a delayed increase in circulating cytokines and mobilization of myeloid cells, may have a pronounced effect on the outcome of HUS. In this regard, previous reports^{9,10,48} have indicated that the simultaneous action of Stx and the inflammatory factors are essential and necessary to HUS development.

At present, apart from supportive therapy, there are no specific treatments for HUS.⁴⁹ The knowledge about relevant components of host response involved in HUS pathogenesis could be useful for developing new therapeutic strategies for children who are infected with Stx-producing *E. coli* bacteria. Because most chemokine receptors bind multiple pro-inflammatory chemokines, therapeutic blockade of chemokine receptors, rather than individual chemokines, may be the preferred strategy to interfere with leukocyte recruitment to sites of tissue injury. Considering the results presented herein, we conclude that single blockade of CCR1 is important to the future design of alternative therapies to control kidney-specific infiltration of inflammatory cells involved in HUS.

Acknowledgments

We thank the Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, and Évaluation-Orientación de la Coopération Scientifique collaboration program; Romina Fraiman for collaborating in the edition of digital images; and Catherine Sofianides for language review of the manuscript.

References

- Noris M, Remuzzi G: Hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005, 16:1035–1050
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL: Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome. *Lancet* 2005, 365:1073–1086
- Siegler R, Oakes R: Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, treatment, and outcome. *Curr Opin Pediatr* 2005, 17:200–204
- Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA: The epidemiology of hemolytic uremic syndrome in Argentina: diagnosis of the etiologic agent, reservoirs and routes of transmission [in Spanish]. *Medicina (B Aires)* 2006, 66(Suppl 3):27–32
- Mead PS, Griffin PM: *Escherichia coli* O157: H7. *Lancet* 1998, 352:1207–1212
- Ruggenti P, Noris M, Remuzzi G: Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int* 2001, 60:831–846
- van Setten PA, van Hinsbergh VW, van der Velden TJ, van de Kar NC, Vermeer M, Mahan JD, Assmann KJ, van den Heuvel LP, Monnens LA: Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int* 1997, 51:1245–1256
- van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW: Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood* 1996, 88:174–183
- Fernandez GC, Lopez MF, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, Landoni VI, Dran GI, Meiss R, Isturiz MA, Palermo MS: Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin Exp Immunol* 2006, 146:76–84
- Palermo MS, Alves Rosa MF, Van Rooijen N, Isturiz MA: Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol* 1999, 116:462–467
- Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM: Interleukin-8 and polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int* 1992, 42:951–956
- Forsyth KD, Simpson AC, Fitzpatrick MM, Barratt TM, Levinsky RJ: Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 1989, 2:411–414
- Inward CD, Howie AJ, Fitzpatrick MM, Rafaat F, Milford DV, Taylor CM; British Association for Paediatric Nephrology: Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1997, 11:556–559
- van Setten PA, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Preyers F, Dijkman HB, Assmann KJ, van der Velden TJ, Monnens LA: Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 1998, 43:759–767
- Roche JK, Keepers TR, Gross LK, Seamer RM, Obrig TG: CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 are critical effectors and potential targets for therapy of *Escherichia coli* O157: H7-associated renal inflammation. *Am J Pathol* 2007, 170:526–537
- Zoja C, Angioletti S, Donadelli R, Zanchi C, Tomasoni S, Binda E, Imberti B, te Loo M, Monnens L, Remuzzi G, Morigi M: Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1. *Kidney Int* 2002, 62:846–856
- Ramos MV, Fernandez GC, Patey N, Schierloh P, Exeni R, Grimaldi I, Vallejo G, Elias-Costa C, Del Carmen Sasiain M, Trachtman H, Combadere C, Proulx F, Palermo MS: Involvement of the fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2007, 109:2438–2445
- Zanchi C, Zoja C, Morigi M, Valsecchi F, Liu XY, Rottoli D, Locatelli M, Buelli S, Pezzotta A, Mapelli P, Geelen J, Remuzzi G, Hawiger J: Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin. *J Immunol* 2008, 181:1460–1469
- Anders HJ, Ninichuk V, Schlondorff D: Progression of kidney disease: blocking leukocyte recruitment with chemokine receptor CCR1 antagonists. *Kidney Int* 2006, 69:29–32
- Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ: Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell* 1993, 72:415–425
- Gao JL, Murphy PM: Cloning and differential tissue-specific expression of three mouse beta chemokine receptor-like genes, including the gene for a functional macrophage inflammatory protein-1 alpha receptor. *J Biol Chem* 1995, 270:17494–17501
- Gao JL, Sen AI, Kitaura M, Yoshie O, Rothenberg ME, Murphy PM, Luster AD: Identification of a mouse eosinophil receptor for the CC chemokine eotaxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 223:679–684

23. Keepers TR, Gross LK, Obrigg TG: Monocyte chemoattractant protein 1, macrophage inflammatory protein 1 alpha, and RANTES recruit macrophages to the kidney in a mouse model of hemolytic-uremic syndrome. *Infect Immun* 2007, 75:1229–1236
24. Danforth JM, Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, VanOtteren GM, Standiford TJ: Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid. *Clin Immunol Immunopathol* 1995, 74:77–83
25. Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM: Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med* 1993, 177:1421–1427
26. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL: Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* 1993, 178:63–72
27. Kuziel WA, Dawson TC, Quinones M, Garavito E, Chenaux G, Ahuja SS, Reddick RL, Maeda N: CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherosclerosis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis* 2003, 167:25–32
28. Capozzo AV, Pistone Creydt V, Dran G, Fernandez G, Gomez S, Bentancor LV, Rubel C, Ibarra C, Isturiz M, Palermo MS: Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. *Infect Immun* 2003, 71:3971–3978
29. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H: The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1985, 151:775–782
30. Awad AS, Rouse M, Huang L, Vergis AL, Reutershan J, Cathro HP, Linden J, Okusa MD: Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int* 2009, 75:689–698
31. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, Closset R, Dewals B, Thielen C, Gustin P, de Leval L, Van Rooijen N, Le Moine A, Vanderplasschen A, Cataldo D, Drion PV, Moser M, Lekeux P, Bureau F: Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 2009, 119:3723–3738
32. Anders HJ, Frink M, Linde Y, Banas B, Wornle M, Cohen CD, Vielhauer V, Nelson PJ, Grone HJ, Schlondorff D: CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J Immunol* 2003, 170:5658–5666
33. Paixao-Cavalcante D, Botto M, Cook HT, Pickering MC: Shiga toxin-2 results in renal tubular injury but not thrombotic microangiopathy in heterozygous factor H-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 2009, 155:339–347
34. Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Grone HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlondorff D: A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 2002, 109:251–259
35. Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, Linde Y, Segerer S, Perez De Lema G, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Horuk R, Murphy PM, Gao JL, Hudkins KL, Alpers CE, Grone HJ, Schlondorff D, Anders HJ: Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:337–347
36. Anders HJ, Belemzova E, Eis V, Segerer S, Vielhauer V, Perez de Lema G, Kretzler M, Cohen CD, Frink M, Horuk R, Hudkins KL, Alpers CE, Mampaso F, Schlondorff D: Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15:1504–1513
37. Shang X, Qiu B, Frait KA, Hu JS, Sonstein J, Curtis JL, Lu B, Gerard C, Chensue SW: Chemokine receptor 1 knockout abrogates natural killer cell recruitment and impairs type-1 cytokines in lymphoid tissue during pulmonary granuloma formation. *Am J Pathol* 2000, 157:2055–2063
38. Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, Tiffany HL, Westphal H, Kwon-Chung J, Murphy PM: Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med* 1997, 185:1959–1968
39. Ness TL, Carpenter KJ, Ewing JL, Gerard CJ, Hogaboam CM, Kunkel SL: CCR1 and CC chemokine ligand 5 interactions exacerbate innate immune responses during sepsis. *J Immunol* 2004, 173:6938–6948
40. Inward CD, Varagunam M, Adu D, Milford DV, Taylor CM: Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Arch Dis Child* 1997, 77:145–147
41. Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, Honda T, Sugimoto H, Monden M, Matsuura N, Okada S: Profiles of circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with hemolytic uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. *Cytokine* 1998, 10:544–548
42. Ferenbach D, Kluth DC, Hughes J: Inflammatory cells in renal injury and repair. *Semin Nephrol* 2007, 27:250–259
43. Kim MG, Boo CS, Ko YS, Lee HY, Cho WY, Kim HK, Jo SK: Depletion of kidney CD11c⁺ F4/80⁺ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2010, 25:2908–2921
44. Fernandez GC, Rubel C, Dran G, Gomez S, Isturiz MA, Palermo MS: Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clin Immunol* 2000, 95:227–234
45. Karpman D, Andreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C: Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol* 1995, 9:694–699
46. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE: Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human glomerular epithelial cells. *Nephron* 2001, 88:14–23
47. Foster GH, Armstrong CS, Sakiri R, Tesh VL: Shiga toxin-induced tumor necrosis factor alpha expression: requirement for toxin enzymatic activity and monocyte protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Infect Immun* 2000, 68:5183–5189
48. Palermo M, Alves-Rosa F, Rubel C, Fernandez GC, Fernandez-Alonso G, Alberto F, Rivas M, Isturiz M: Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin Exp Immunol* 2000, 119:77–83
49. Michael M, Elliott EJ, Craig JC, Ridley G, Hodson EM: Interventions for hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Kidney Dis* 2009, 53:259–272

Annexe 3

Control of Both Myeloid Cell Infiltration and Angiogenesis by CCR1 Promotes Liver Cancer Metastasis Development in Mice^{1,2}

Mathieu Paul Rodero*, Constance Auvynet*, Lucie Poupel*, Behazine Combadière*,† and Christophe Combadière*,†

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM UMR-S 945-IUC and Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Laboratory of Immunity and Infection, Institut Universitaire du Cancer, Paris, France; †Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Immunologie, Paris, France

Q1

Abstract

Expression of the CC chemokine receptor 1 (CCR1) by tumor cells has been associated with protumoral activity; however, its role in nontumoral cells during tumor development remains elusive. Here, we investigated the role of CCR1 deletion on stromal and hematopoietic cells in a liver metastasis tumor model. Metastasis development was strongly impaired in CCR1-deficient mice compared to control mice and was associated with reduced liver monocyte infiltration. To decipher the role of myeloid cells, sublethally irradiated mice were reconstituted with CCR1-deficient bone marrow (BM) and showed better survival rates than the control reconstituted mice. These results point toward the involvement of CCR1 myeloid cell infiltration in the promotion of tumor burden. In addition, survival rates were extended in CCR1-deficient mice receiving either control or CCR1-deficient BM, indicating that host CCR1 expression on nonhematopoietic cells also supports tumor growth. Finally, we found defective tumor-induced neoangiogenesis (*in vitro* and *in vivo*) in CCR1-deficient mice. Overall, our results indicate that CCR1 expression by both hematopoietic and nonhematopoietic cells favors tumor aggressiveness. We propose CCR1 as a potential therapeutic target for liver metastasis therapy.

Neoplasia (2013) X, 1–8

Introduction

Chemokines are small chemoattractant cytokines that bind to seven-transmembrane domain G protein–coupled receptors. A large number of chemokines are secreted by most, if not all, tumor cells. They are implicated in a wide spectrum of tumor environment–related processes, including tumor spreading [1], tumor survival [2], and angiogenesis [3]; however, the major effect of chemokines is proposed to be on immune cell recruitment [4].

It is now well described that the infiltration of tumors by leukocytes, and more specifically macrophages, could have a protumoral activity [5]. The tumoral environment progressively reprograms infiltrating macrophages, also termed tumor-associated macrophages (TAMs), resulting in a progressive loss of antitumor activity. This is shown by reduced potency of antigen presentation [6], cell cytotoxicity, Th1 cytokine secretion and enhanced tumor survival, and production of proangiogenic, tissue modeling, and anergistic cytokines [7]. High infiltration of tumors by macrophage-like cells in humans and mice is associated with poor survival [5] and high angio-

genesis [8] and has been described to favor metastasis formation and dissemination [9].

The CC chemokine receptor 1 (CCR1) is primarily expressed by cells of myeloid lineage, including monocytes, neutrophils, and

Address all correspondence to: Christophe Combadière, INSERM UMR-S945, Laboratory of Immunity and Infection, 6th Floor 91, Bld de l'Hôpital, 75013 Paris Cedex 13, France. E-mail: christophe.combadiere@upmc.fr

¹This work is supported in part by grants from INSERM, the Institut du Cancer (INCA 2005), the Canceropole-Ile de France, the Agence Nationale de la Recherche "Cardiovasculaire, Obésité et Diabète" (grant AO5088DS), ANR "blanc" (AO5120DD), and European grant "Innochem" (LSHB-CT-2005-518167). M.P.R. was a recipient of a fellowship from Canceropole-Ile de France and supported by European grant Innochem 518167. C.A. is a recipient of the Neuropôle de Recherche Francilien. C.C. is the recipient of a contract "Interface" from Assistance Publiques-Hopitaux de Paris.

²This article refers to supplementary materials, which are designated by Table W1 and Figures W1 to W3 and are available online at www.neoplasia.com.

Received 7 November 2012; Revised 20 March 2013; Accepted 24 March 2013

Copyright © 2013 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/13/\$25.00
DOI 10.1593/neo.121866

Q5

Q6

Q2

Q3

Q4

dendritic cells but also by some T lymphocytes and intimal smooth muscle-like cells. In a mouse colorectal tumor model, tumor cell invasion, metastasis formation, and myeloid progenitor cell recruitment were inhibited in CCR1^{-/-} mice or after administration of CCR1 pharmacological blockade [10,11], suggesting that CCR1-dependent myeloid infiltration has a protumoral effect. In addition, it has been proposed that CCR1 promotes tumor spreading and angiogenesis by controlling metalloproteinase secretion [12]. In this study, we used a model of liver tumor metastasis development and provided, for the first time, evidence of CCR1 expression by non-tumoral cells favoring hepatocellular metastasis development through control of both mononuclear cell infiltration and angiogenesis.

Materials and Methods

Mice

Female C57Bl/6 mice (Charles River, Lyon, France) were maintained under specific pathogen-free conditions on a 12-hour light-dark cycle. CCR1-deficient mice (CCR1^{-/-}) on C57Bl/6 background were provided by Drs Philippe Murphy and Ji Liang Gao (Laboratory of Molecular Immunology, NIAID, NIH, Bethesda, MD). CCR1^{-/-} mice were back-crossed eight generations with C57Bl/6 GFP [C57Bl/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J] mice from The Jackson Laboratory to obtain CCR1^{-/-} GFP mice. GFP expression was detected in all tissues examined and used to track leukocytes after transplantation. Mice used for experiments were 8 to 10 weeks old. Animal experiments were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee of Centre d'Exploration Fonctionnelle, Pitié-Salpêtrière.

Cell Lines

The C57Bl/6 dimethylbenzanthracene-induced thymoma EL-4 was maintained in RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Paisley, Scotland) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Seromed, Berlin, Germany), 2 mM L-glutamine, 1000 U/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin, 250 ng/ml amphotericin B (Invitrogen Life Technologies), and 3 μ M 22-ME (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Tumor Models

C57Bl/6 control mice or CCR1^{-/-} mice were injected in the tail vein with 5×10^5 EL-4. In another model, mice received subcutaneous (s.c.) injections of 1×10^5 tumor cells in 100 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) in the right flank. Tumor size was measured three times a week with calipers, and tumor volume was estimated using the following formula: width $\times$ length $\times$ (width + length)/2. Mice were sacrificed when the tumor volume reached approximately 3 cm³.

Flow Cytometry

At day 12 after EL-4 tail vein injection, harvested livers were cut into small pieces and digested with 400 units of collagenase D (Roche Diagnostics, Germany) for 30 minutes. Cell suspensions were filtered through a 70- μ m cell strainer (BD Biosciences, Bedford, MA) and isolated with density separation medium (Histopaque 1083; Sigma-Aldrich). Leukocytes were collected, washed in PBS, and labeled for flow cytometry using the following monoclonal antibodies: antibody to CD11b (anti-CD11b PerCP-Cy5), anti-Ly-6G

PE, anti-Ly-6C-biotin, anti-CD4 PE, anti-CD3 Alexa Fluor 488, anti-CD8a Alexa Fluor 647, NK1.1 Alexa Fluor 647, anti-CD11c APC, and streptavidin-PerCP (all sourced from BD Pharmingen, San Diego, CA). Anti-mouse neutrophil 7/4 Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647 were from AB Serotec (Oxford, United Kingdom). Cell suspensions were incubated with appropriate fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies and analyzed on a FACSCalibur cytofluorimeter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Results were analyzed with CellQuest Pro software (Becton Dickinson).

Bone Marrow Chimeras

Control and CCR1^{-/-} recipient mice were irradiated with 10-Gy radiation using an ORION linear accelerator (General Electric Healthcare). Whole bone marrow (BM) from either control GFP mice [C57Bl/6-Tg(UBC-GFP)30Scha/J] or transgenic CCR1^{-/-} GFP (see Mice section) was extracted from the tibia and femur. Donor cells (5×10^6) were injected into recipient mice through the retro-orbital vein. Twelve weeks after transplant, recipient mice were injected with EL-4 thymoma cells.

Aortic Rings

Control and CCR1^{-/-} mice aortas were isolated and cut into small segments. These were placed in Matrigel (BD Biosciences)-coated 42-well plates containing 10% FCS in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) culture medium. Cultures were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 6 days, and explants were monitored for sprouting vessels. For the EL-4-conditioned medium experiments, cultured media were removed from wells after 3 days and replaced by 50% DMEM, 10% FCS + 50% RPMI, 10% FCS or 50% DMEM, 10% FCS + 50% EL-4-conditioned RPMI, 10% FCS. After fixation and DAPI (Sigma-Aldrich) staining, vessel formation was quantified by measuring the area of vessel-like extensions from the explants using ImageJ 1.39U software.

CD31 and Lectin Immunohistochemical Staining

At day 12 after EL-4 tail vein injection, 6- μ m frozen liver sections from control and CCR1^{-/-} mice were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes, washed three times for 5 minutes in PBS, and incubated overnight at 4°C with anti-CD31 (AB Serotec) or anti-lectin (Sigma-Aldrich) antibody. CD31 staining was visualized with RPE-conjugated anti-rabbit Ig antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA). Lectin- and CD31-positive areas in tumoral and nontumoral livers were visualized by scanning sections at low magnification ($\times 20$). The number of microvessels was recorded in six randomly chosen fields of view using ImageJ 1.39U software.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from sorted hepatic endothelial cells (ECs), PBMCs, or cultured EL-4 using Qiagen Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed to cDNA using Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time polymerase chain reaction was carried out using SYBR Premix (Invitrogen) with the primer sets described in Table W1. To standardize mRNA concentrations, transcript levels of GAPDH were determined in parallel for each sample, and relative transcript levels were corrected by normalization on the basis of GAPDH transcript levels.

Q10

Q11

Q12

Q13

Q14

Q15

Q16

Q17

Q18

Statistical Analysis

Mann-Whitney test and/or log-rank (Mantel-Cox) test were used to determine whether variation in experimental groups was significant using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA).

Results

CCR1 Deficiency Increases Survival in Tumor Metastasis Engraftment Models

After IV injection of control C57BL/6 mice into the tail vein, EL-4 thymoma cells selectively grew in the liver and kidney. The mortality occurred approximately 3 weeks after tumor cell injection, and after 32 days, all of the mice had died (Figure 1A). Interestingly, in this tumor model, the CCR1-deficient mice (CCR1^{-/-}) survived longer than control mice, with a mean survival of 27.5 and 23 days, respectively (Figure 1A). In addition, 20 days after IV tumor cell injection, livers from CCR1^{-/-} mice were much smaller in size than those from control mice, 2.1 ± 0.2 and 3.4 ± 0.4 g, respectively (Figure 1B). To confirm the role of CCR1 in tumor growth, we set up a second model in which tumor cells were injected s.c. While all control mice developed palpable tumors 6 days after s.c. injection, only half of the CCR1^{-/-} mice showed the presence of tumors at day 8 (Figure 1C). After 3 weeks, 30% of the CCR1^{-/-} mice remained tumor-free, as opposed to all of the control mice that had developed tumors. The

mean volume of EL-4 tumors in CCR1^{-/-} mice was less than in control mice at all time points (Figure 1D). These results indicate that host cell CCR1 expression favors tumor aggressiveness.

CCR1 Deficiency Is Associated with Decreased Infiltration of Myeloid Cells into Tumors

To better understand how CCR1 activation may promote liver metastasis development, we analyzed the leukocyte infiltration during early stages of tumor development. Analyses were performed 12 days after IV tumor injection in the liver and the kidney. At this stage, tumor foci are undetectable macroscopically. Using flow cytometry, we identified tumor cell infiltrates as myeloid infiltrates based on CD11bhi and NK 1.1neg expression (gate 1 in Figure 2A, left panel). Inflammatory monocytes were discriminated from the so-called "patrolling" monocytes based on 7/4 expression level [13] (gates 2 and 3 in Figure 2A, right panel). There was a strict co-expression between 7/4 marker and Ly6C, the marker commonly used to discriminate monocyte subpopulations as previously published [13] (in Supplementary data). Inflammatory monocytes were defined as 7/4hi, Ly6Chi, Ly6Gneg cells and resident monocytes as 7/4lo, Ly6Cint/lo, Ly6Gneg cells. Neutrophils were defined as 7/4hi Ly6Chi Ly6Ghi cells (gate 4). CD4 and CD8 lymphocytes were defined as, respectively, CD3+ CD4+ NK1.1- and CD3+ CD8+ cells, whereas NK cells were defined as CD3- NK1.1+ cells and NKT as CD3+ NK1.1+ cells (not

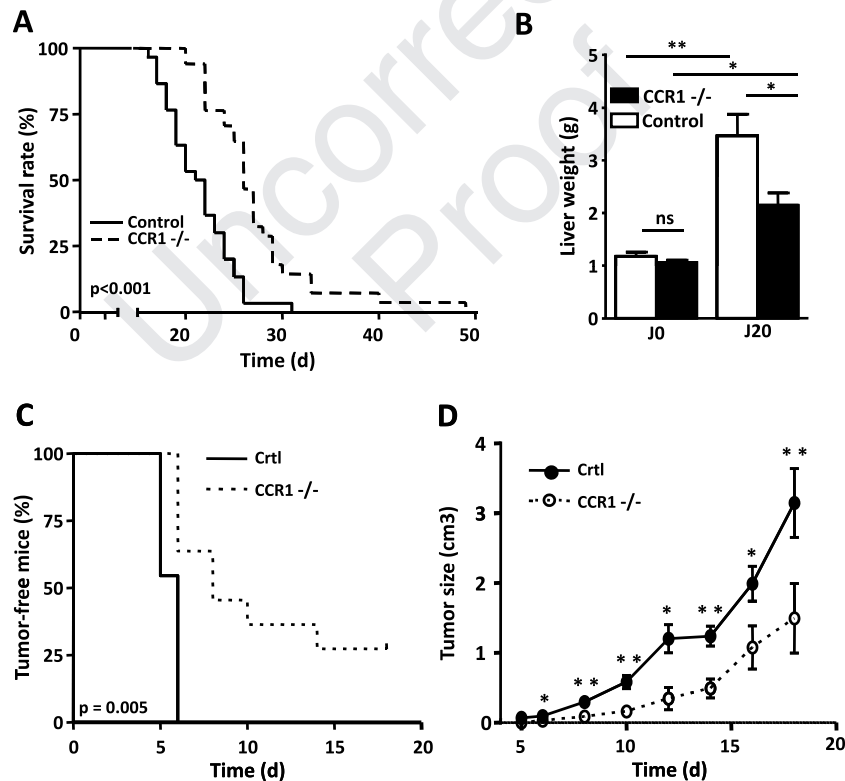


Figure 1. Lack of CCR1 reduces tumor development. (A) Survival curve of C57BL/6 control mice (solid line) or C57BL/6 CCR1^{-/-} mice (dotted line) injected IV with 5×10^5 EL-4. Mean survival time of CCR1^{-/-} mice ($n = 28$) was 20% longer than in control mice ($n = 19$). (B) Twenty-one days after tumor inoculation, the increase in liver weight is smaller in CCR1^{-/-} mice compared to WT mice. Each data point represents the mean tumoral liver weight $\pm$ SEM of 10 mice. (C) CCR1^{-/-} mice (dotted line, $n = 11$) showed delay tumor apparition compared to control mice (solid line, $n = 11$), log-rank test, $P = .005$. (D) Tumor size growth in control mice (solid line, $n = 11$) or CCR1^{-/-} mice (dotted line, $n = 11$) injected s.c. with 1×10^5 EL-4. Tumor development is delayed in CCR1^{-/-} mice. * $P < .05$; ** $P < .01$ (mice with tumor size of >3 cm³ were killed).

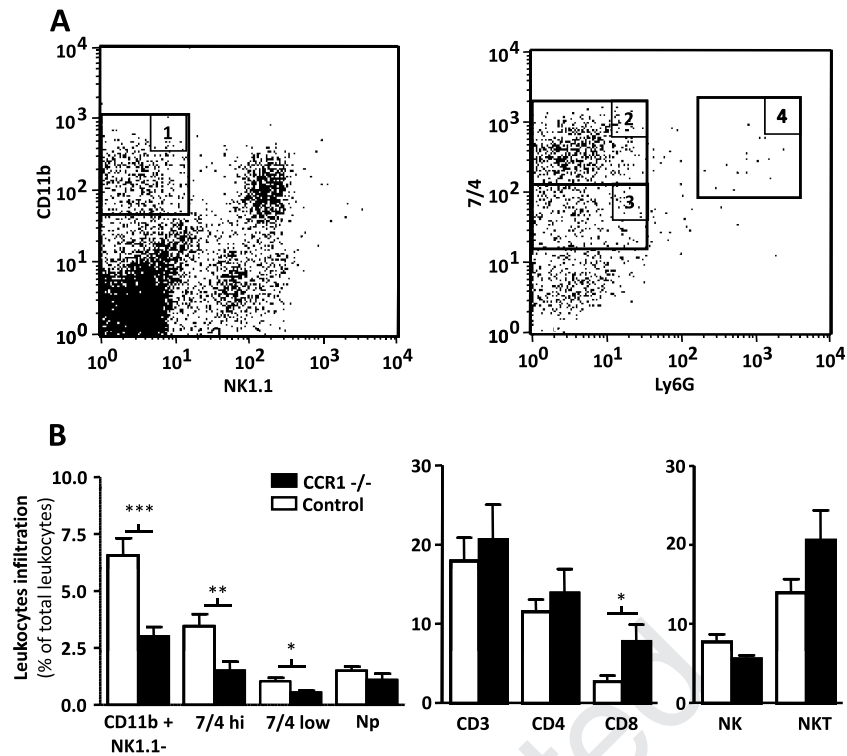


Figure 2. CCR1 deficiency alters leukocyte recruitment at the tumor site. (A) Dot plot analysis identified tumoral leukocyte subpopulation infiltrates by flow cytometry analysis: 1, myeloid cells; 2, inflammatory monocytes; 3, resident monocytes; 4, neutrophils. (B) CCR1^{-/-} mice show defect in the myeloid cell mobilization, mainly due to a defect recruitment of the 7/4 + monocyte population. Percentages $\pm$ SEM were indicated for each group (control in black, $n = 10$; CCR1^{-/-} in white, $n = 10$) and were obtained from two independent experiments. Np, neutrophils; significant value of $*P < .05$, $**P < .001$, and $***P < .001$.

Q19 shown). Interestingly, a major effect on leukocyte recruitment in the CD11b + myeloid compartment was observed (Figure 2B, left panel), with a 50% reduction in CCR1^{-/-} mouse liver (6.6% and 3% of total cells, respectively, $P < .001$). This was associated with reduced infiltration of both inflammatory (3.5% and 1.5%, $P = .005$) and “patrolling” monocytes (1% and 0.5%, $P = .014$). We did not observe any significant differences in the neutrophil infiltrate. In the lymphocyte compartment (Figure 2B, middle panel), only CD3⁺ CD8⁺ cells were

present in larger number in the livers of CCR1^{-/-} mice compared to those of control mice (Figure 3B; $P = .043$), whereas CD3⁺ CD4⁺, NK, and NKT cells were unaltered (Figure 3B, middle and right panels). Analysis of the kidney infiltrates showed similar trends with reduced monocyte and CD8⁺ cell infiltration (Figure W1). The concomitant decrease of TAM infiltration, with the increase of cytotoxic CD8 T cells, may indicate a better control of tumor immunosuppression by the immune system in CCR1^{-/-} mice.

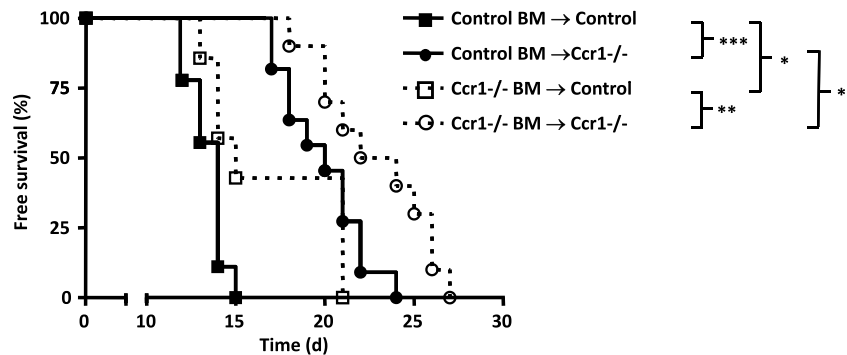


Figure 3. CCR1 expression by both BM and non-BM-derived cells promotes tumor metastasis. Survival curve of CCR1^{-/-} and control chimeric mice injected IV with 5×10^5 EL-4. Chimeric mice resulted from control and CCR1^{-/-} irradiated hosts reconstituted with CCR1^{-/-} GFP or control GFP BM. CCR1^{-/-} hosts with control BM (open squares; $n = 7$) and WT host with control BM (filled squares; $n = 9$) had significantly decreased mean survival than mice of the same genotype with CCR1 BM, respectively, WT host with CCR1 BM (open circles; $n = 10$) and CCR1 host with CCR1 BM (filled circles; $n = 11$ mice).

Protumoral Effect of CCR1 Is Due to Expression on Both Hematopoietic and Nonhematopoietic Cells

We hypothesized that in addition to CCR1-driven protumoral leukocyte recruitment, nonhematopoietic cells expressing CCR1 may also favor tumor growth, as proposed previously for CCR5 [14]. To delineate the contribution of CCR1 on hematopoietic cells compared to nonhematopoietic cells, we performed BM chimera experiments. We first assessed the effect of CCR1 deletion on leukocyte subpopulation engraftment. The distributions of lymphocytes, NK, monocytes, and neutrophils in the blood of WT mice irradiated and reconstituted with WT or CCR1^{-/-} BM or in the blood of CCR1^{-/-} mice irradiated and reconstituted with WT BM were unchanged, indicating that the lack of CCR1 expression by either hematopoietic or nonhematopoietic cells did not alter engraftment (Figure W2). CCR1^{-/-} and control mice were sublethally irradiated and reconstituted with BM cells from either GFP control or CCR1^{-/-} GFP transgenic mice (Figure 3). All mice showed greater than 90% of GFP-positive leukocytes (data not shown). After EL-4 IV injection, both control (open squares) and CCR1^{-/-} recipient (open circles) mice showed increased survival when reconstituted with CCR1^{-/-} BM compared to their respective controls, with median survival of 14 and 20 days ($P < .001$) and 15 and 23 days ($P = .01$), respectively. This indicates that hematopoietic cell CCR1 expression favors EL-4 burden. Surprisingly, survival rates were extended in CCR1^{-/-} mice receiving either control (filled circles) or CCR1^{-/-} (open circle) BM, with median survival of 20 and 23 days ($P = .018$). This suggests that the expression of CCR1 by nonhematopoietic cells also contributes to tumor growth.

Lack of CCR1 Led to Reduce Hepatic Capillary Density during Early-Stage Tumor Development

We postulated that CCR1 may also control metastasis development by regulating tumor-induced vascularization. To test this hypothesis, we measured the blood capillary density in the control or CCR1^{-/-} mouse livers at a time point where tumors were not macroscopically detectable (Figure 4A, left and right panels, respectively). Twelve days

after tumor inoculation, the liver microvessel density as assessed by CD31 staining was increased by more than three-fold ($P = .004$) in control mice, whereas it was only modestly increased in CCR1^{-/-} mice (Figure 4B). Similar results were obtained with lectin staining (Figure W3). These results indicated that tumor development is associated with enhanced hepatic capillary density before we could detect the tumoral foci and strongly suggested that CCR1 promoted tumor-associated vascularization of the liver.

CCR1 Deficiency Led to Reduced Monocyte-Independent Neoangiogenesis

Because CCR1 may favor tumor-associated vascularization, we investigated the role of CCR1 in an *in vitro* angiogenesis model supposedly independent of the circulating leukocytes. We compared the vessel sprouting around aortic ring from control and CCR1^{-/-} mice (Figure 5A, left and right panels, respectively). After 6 days in culture, the area of vessel-like extensions from CCR1^{-/-} explants was about 50% smaller than those of control explants (Figure 5B). These data suggest that CCR1 promotes EC outgrowth, independent of recruited myeloid cell with proangiogenic properties. To further investigate the mechanism associated with EL-4-induced angiogenesis in the liver, we compared the vessel sprouting around aortic ring from control and CCR1^{-/-} mice in the presence of EL-4-conditioned media. EL-4 supernatant increased vessel sprouting from WT mouse aortic ring compared to control media by 55% ($P = .0085$). In these conditions, vessel sprouting of CCR1^{-/-} aortic ring was strongly inhibited (57%, $P < .001$), indicating that EL-4 promoted CCR1-dependent angiogenesis in a hematopoietic-independent model. To support the hypothesis that similar mechanisms may take place in the tumor micro-environment, we investigated the expression of CCR1 in sorted hepatic ECs (Figure 5C) and of its ligands in the EL-4 tumoral cell line (Figure 5D). CCR1 transcripts were strongly expressed in PBMCs and were also detected in hepatic ECs. EL-4 expressed high level of CCL5 but no CCL3, indicating that EL-4 secretion may directly

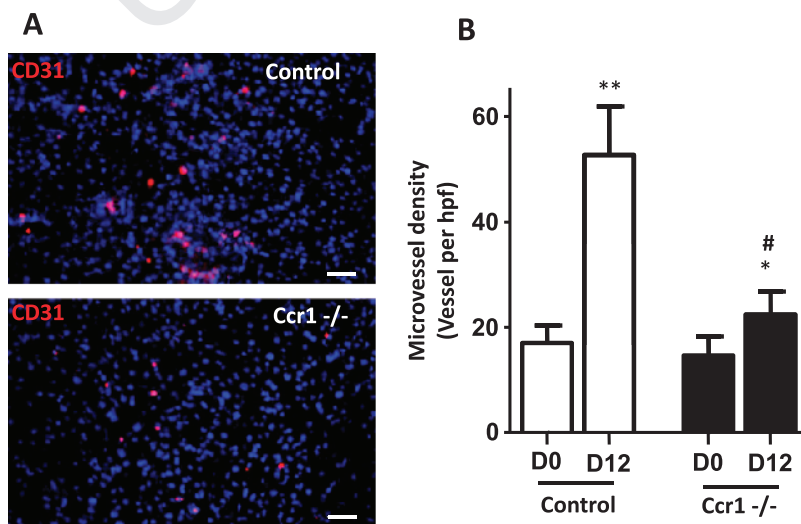


Figure 4. Reduced numbers of microvessels in tumoral liver of CCR1^{-/-} mice. Frozen liver sections from CCR1^{-/-} and control mice injected with tumor cells were stained with anti-CD31 antibody. Control staining was performed by only incubating with the secondary antibody. Number of microvessels were counted in six randomly chosen fields. Each value represents mean $\pm$ SEM ($n = 6$). * $P < .05$, ** $P < .001$ compared to D0, # $P < .05$ compared to control mice.

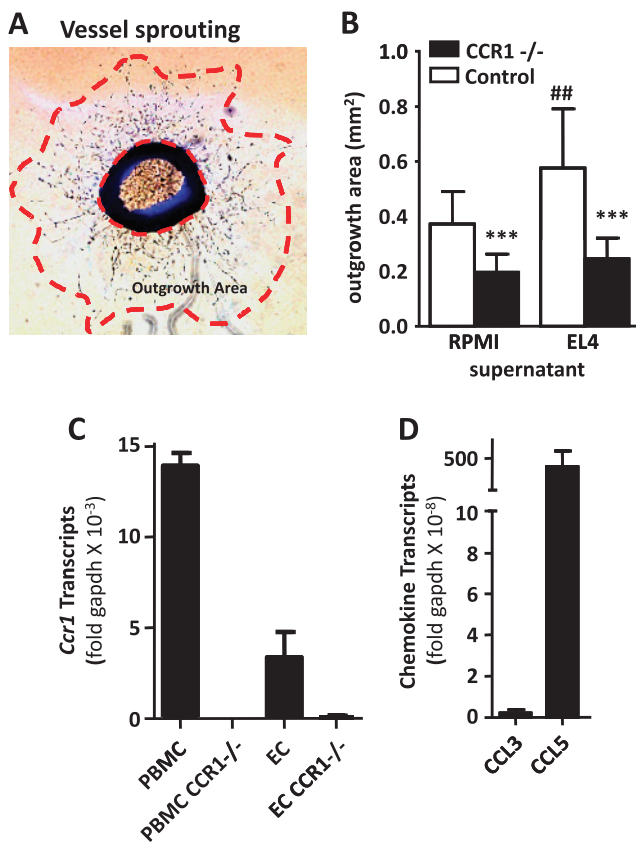


Figure 5. Lack of CCR1 reduces neoangiogenesis in a vessel sprouting assay. (A) Representative photomicrography of aortic ring with vessel sprouting. The outgrowth area was measured between the vessel growth front and the base of the aortic ring. (B) Vessel sprouting in control and CCR1-deficient aortic ring. Outgrowth area was measured in the absence or presence of EL-4-conditioned media. Each value represents mean area $\pm$ SEM ($n = 12$). (C) Level of *Ccr1* transcripts in hepatic ECs and PBMCs from WT and CCR1^{-/-} mice. ECs were isolated by flow cytometry and defined as CD45⁺F4/80⁺CD31⁺ cells. (D) Level of CCR1 ligand transcripts (CCL3 and CCL5) in EL-4. *** $P < .001$ compared to WT and ## $P < .01$ compared to control media.

activate hepatic ECs. Altogether, these data support the model of CCR1-triggered angiogenesis in the absence of hematopoietic cells.

Discussion

While lymphocyte infiltration is usually associated with good prognosis [15], tumor-associated myeloid lineage cells are almost always associated with poor survival, increased tumor spreading, and metastases [5]. The roles of several chemokines in controlling human tumor development or spreading have been well demonstrated [16]. Several polymorphisms in human chemokine genes affect patient prognosis markers, possibly by controlling TAM recruitment [17,18]. The protumoral effect of CCR1 by tumor cells has been described in several mouse tumor models [19–22]. This study focused on the role of CCR1, expressed by stromal cells but not tumor cells. Our data indicate that tumor development is impaired in CCR1^{-/-} mice, in both the tumor metastasis implantation model and tumor growth model, compared to control mice. We showed that CCR1 expression on both hematopoietic and nonhematopoietic cells impaired mouse survival.

The better survival of the CCR1^{-/-} mice is associated with both the reduction in infiltration of myeloid lineage cells and highest level of infiltration of CD8 T cells. Moreover, angiogenesis is defective in CCR1^{-/-} mice both *in vivo* and *in vitro*.

It was previously proposed that CCR1 controls immature myeloid cell recruitment in tumors, therefore promoting tumor development [10,11]. Here, we show that CCR1 is also involved in the recruitment of mature myeloid cells, mainly altering monocyte but not neutrophil infiltration. Although neutrophils express CCR1, the kinetics of their recruitment may differ from that of monocytes. Alternatively, neutrophils may be recruited by other tumor-secreted chemokines, such as Cxcl8, which could compensate for the lack of CCR1. CCR1 deficiency affects slightly more inflammatory monocyte infiltration than “patrolling” monocyte infiltration. Some chemokine receptors, like Ccr2 or Cx3cr1, are known to be differentially expressed by these subsets of monocytes, but there are no clear evidences concerning CCR1 [23]. However, a previous report indicated that the CCR1 RNA expression level is two to three times higher in 7/4hi monocytes than 7/4lo from the blood [24]. Nonetheless, the implication of CCR1 in migratory properties of different subsets of monocytes should be completed to confirm that CCR1 is preferentially implicated in 7/4hi monocyte migration than 7/4lo monocyte migration. We also observed enhanced CD8 T lymphocyte infiltration in CCR1^{-/-} mice, likely to result from the tumor microenvironment alteration in CCR1^{-/-} mice. Globally, both reduction in the protumoral myeloid compartment and enhanced cytotoxic CD8 T cell infiltration may play a role in the improved control of tumor development in CCR1 mice. The role of CCR1 expressed by nontumoral cells remains ambiguous in tumor development. Although the expression of CCR1 by cells of myeloid lineage may promote tumor development, several models support the idea that CCR1 may favor antitumor immune response when tumor immunotolerance is thwarted. For instance, the antitumoral effect of radiofrequency ablation was enhanced by an agonist of CCR1 in a murine hepatocellular carcinoma model. This effect was associated with increased infiltration of the radiofrequency ablation-treated tumor by lymphocytes and CCR1-positive dendritic cells. In CCR1^{-/-} mice, both the leukocyte recruitment and antitumor effect, induced by the CCR1 agonist, were inhibited [25]. Taken together, the CCR1 axis may control the subtle balance between innate protumoral activity and adaptative antitumoral responses.

The tumor-induced vascular capillary density was reduced in CCR1-deficient mice. These results confirm previous observation made by Yang et al. in a model of induced hepatocellular carcinoma [12], although our data indicated that this effect was dependent on host CCR1 expression and not due to tumor cells that were CCR1 competent. The cellular origin of the neovasculature in this model is not clearly established, as the ability of BM-derived cells to integrate vessel has been proposed in an aggressive tumor model. However, we demonstrated that EL-4 supernatant promotes angiogenesis *ex vivo* independently of hematopoietic cells. Moreover, the vessel density was measured before macroscopic tumor detection, suggesting that, at that time, mostly hepatic vasculature was altered. Hence, even if we cannot exclude it, the contribution of hematopoietic cells in the formation of the neovessel wall is likely to be minor. Consistent with previous studies performed with CCR5^{-/-} mice [14], we demonstrated, using BM transfer experiments, that tumor aggressiveness is not only dependent on CCR1 expression by stromal hematopoietic cells but also on its expression by stromal nonhematopoietic cells. Indeed, stromal nonhematopoietic cells have already been associated

with tumor development, promoting angiogenesis [26] or metastasis formation [27]. Surprisingly, when irradiated and reconstituted with BM from control mice, CCR1-deficient mice have a longer survival than irradiated control mice reconstituted with homologous control BM. This indicates that CCR1 expression by nonhematopoietic cells also contributes to tumor aggressiveness. The angiogenesis aortic ring model, with or without condition media from EL-4 culture, confirmed that EL-4 secreted cytokines that promote angiogenesis in the absence of hematopoietic cells by CCR1-dependent mechanism. It is not clear which cell population, present in the aorta, controls new capillary formation in a CCR1-dependent mechanism. However, we showed here that CCR1 mRNA was expressed by hepatic EC. These results are in accordance with previous work showing the expression of CCR1 mRNA by rat EC [28] and the ability of human EC lines to migrate and differentiate when stimulated with a CCR1 agonist [29]. Moreover, the high expression of CCL5 transcript, but not CCL3, by EL-4 was consistent with the direct proangiogenic effect of CCL5 through binding on CCR1 expressed by EC [30]. In addition, the mesenchymal stem cells present in the media of the aorta express CCR1 transcript [31], and recent insights support the role of CCR1 expression by mesenchymal stem cells in angiogenesis [32]. We show that the protumoral effect of CCR1 was mediated by both hematopoietic and nonhematopoietic CCR1-expressing cells. However, the relative importance of each compartment remains unclear. The percentage of recruitment of only some leukocyte populations is affected in CCR1 null mice, suggesting that these defects of recruitment did not result from reduced angiogenesis. In addition, the concomitant defect in infiltration of the tumor by monocytes and strong diminution of the capillary density in CCR1^{-/-} is consistent with our recent finding that inflammatory monocytes promote post-ischemic neovascularization [33]. Interestingly, we did not observe any differences when we compared the hepatic artery network by microangiography in control and CCR1^{-/-} mice, 12 days after EL-4 injection (data not shown). These data suggest that the role of CCR1 on angiogenesis is restricted to capillary vessels, and not larger arteries, at least during early-stage metastasis development.

In conclusion, we showed that both hematopoietic and stromal cells participate in CCR1-dependent protumoral activity. CCR1 deficiency limited tumor progression and increased mouse survival rates. These beneficial effects were associated with reduced monocyte mobilization and reduced tumoral neovascularization. Further experiments should be performed to confirm the pertinence of using CCR1 as a therapeutic target in the control of metastasis development.

Acknowledgments

The authors thank Cangialosi Arnaud, Godart Jeremy, and Potier Yann for technical mouse assistance. The authors also thank Vilar José for technical assistance, Catherine Blanc for her help in cell sorting, and Rebecca Ellis for her assistance in preparing the manuscript.

References

- [1] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56.
- [2] Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, Porcile C, Pirani P, Ravetti JL, Zona GL, Spaziant R, Florio T, and Schettini G (2003). Stromal cell-derived factor 1 α stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* **63**, 1969–1974.
- [3] Strieter RM, Kunkel SL, Elner VM, Martonyi CL, Koch AE, Polverini PJ, and Elner SG (1992). Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* **141**, 1279–1284.
- [4] Balkwill F and Mantovani A (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539–545.
- [5] Lewis CE and Pollard JW (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**, 605–612.
- [6] Loercher AE, Nash MA, Kavanagh JJ, Platsoucas CD, and Freedman RS (1999). Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells. *J Immunol* **163**, 6251–6260.
- [7] Mantovani A, Allavena P, and Sica A (2004). Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer* **40**, 1660–1667.
- [8] Leek RD and Harris AL (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **7**, 177–189.
- [9] Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, and Pollard JW (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* **193**, 727–740.
- [10] Kitamura T, Kometani K, Hashida H, Matsunaga A, Miyoshi H, Hosogi H, Aoki M, Oshima M, Hattori M, Takabayashi A, et al. (2007). SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1⁺ myeloid cells that promote invasion. *Nat Genet* **39**, 467–475.
- [11] Kitamura T, Fujishita T, Loetscher P, Revesz L, Hashida H, Kizaka-Kondoh S, Aoki M, and Taketo MM (2010). Inactivation of chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1) suppresses colon cancer liver metastasis by blocking accumulation of immature myeloid cells in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 13063–13068.
- [12] Yang X, Lu P, Fujii C, Nakamoto Y, Gao JL, Kaneko S, Murphy PM, and Mukaida N (2006). Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression. *Int J Cancer* **118**, 1869–1876.
- [13] Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, and Mallat Z (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* **117**, 1649–1657.
- [14] van Deventer HW, O'Connor W Jr, Brickey WJ, Aris RM, Ting JP, and Serody JS (2005). C-C chemokine receptor 5 on stromal cells promotes pulmonary metastasis. *Cancer Res* **65**, 3374–3379.
- [15] Bordinon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, et al. (1999). Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* **84**, 1110–1149.
- [16] Lazenec G and Richmond A (2010). Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends Mol Med* **16**, 133–144.
- [17] Rodero M, Marie Y, Coudert M, Blondet E, Mokhtari K, Rousseau A, Raoul W, Carpentier C, Sennlaub F, Deterre P, et al. (2008). Polymorphism in the microglial cell-mobilizing CX3CR1 gene is associated with survival in patients with glioblastoma. *J Clin Oncol* **26**, 5957–5964.
- [18] Rodero M, Rodero P, Descamps V, Lebbe C, Wolkenstein P, Aegerter P, Vitoux D, Basset-Seguin N, Dupin N, Grandchamp B, et al. (2007). Melanoma susceptibility and progression: association study between polymorphisms of the chemokine (CCL2) and chemokine receptors (CX3CR1, CCR5). *J Dermatol Sci* **46**, 72–76.
- [19] Wang CL, Sun BS, Tang Y, Zhuang HQ, and Cao WZ (2009). CCR1 knock-down suppresses human non-small cell lung cancer cell invasion. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**, 695–701.
- [20] Wu X, Fan J, Wang X, Zhou J, Qiu S, Yu Y, Liu Y, and Tang Z (2007). Down-regulation of CCR1 inhibits human hepatocellular carcinoma cell invasion. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 866–871.
- [21] Menu E, De Leenheer E, De Raeye H, Coulton L, Imanishi T, Miyashita K, Van Valckenborgh E, Van Riet I, Van Camp B, Horuk R, et al. (2006). Role of CCR1 and CCR5 in homing and growth of multiple myeloma and in the development of osteolytic lesions: a study in the 5TMM model. *Clin Exp Metastasis* **23**, 291–300.
- [22] Lu P, Nakamoto Y, Nemoto-Sasaki Y, Fujii C, Wang H, Hashii M, Ohmoto Y, Kaneko S, Kobayashi K, and Mukaida N (2003). Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *Am J Pathol* **162**, 1249–1258.
- [23] Geissmann F, Jung S, and Littman DR (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.

- [24] Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, et al. (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **117**, 185–194.
- [25] Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N, and Kaneko S (2010). Antitumor effect after radiofrequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of CC chemokine ligand 3/ macrophage inflammatory protein-1 α . *Cancer Res* **70**, 6556–6565.
- [26] Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, and Weinberg RA (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335–348.
- [27] Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, and Garcia-Muniz JL (2007). Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br J Cancer* **96**, 903–911.
- [28] Thomas RA, Pietrzak DC, Scicchitano MS, Thomas HC, McFarland DC, and Frazier KS (2009). Detection and characterization of circulating endothelial progenitor cells in normal rat blood. *J Pharmacol Toxicol Methods* **60**, 263–274.
- [29] Hwang J, Son KN, Kim CW, Ko J, Na DS, Kwon BS, Gho YS, and Kim J (2005). Human CC chemokine CCL23, a ligand for CCR1, induces endothelial cell migration and promotes angiogenesis. *Cytokine* **30**, 254–263.
- [30] Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, Maillard L, Louedec L, Haddad O, Martin L, Laguillier C, Richard B, Oudar O, et al. (2012). RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* **15**, 727–744.
- [31] Brooke G, Tong H, Levesque JP, and Atkinson K (2008). Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells Dev* **17**, 929–940.
- [32] Huang J, Zhang Z, Guo J, Ni A, Deb A, Zhang L, Mirotsoy M, Pratt RE, and Dzau VJ (2010). Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium. *Circ Res* **106**, 1753–1762.
- [33] Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Recalde A, Richart A, Loinard C, Zouggari Y, Guerin C, Duriez M, Combadiere B, et al. (2010). Regulation of monocyte subsets systemic levels by distinct chemokine receptors controls postischemic neovascularization. *Cardiovasc Res* **88**, 186–195.

Q24 Table W1.

Genes	Forward	Reverse
Q25 <i>CCL5</i>	GCTGCCCTCACCATCATCCTCACT	GGCACACACTTGGCGGTTCCCTTC
<i>CCL3</i>	GTGCCCTTGCTGTTGTTGTGTGAT	CTGCCGGTTTCTCTTCGTCAGGA
<i>CCR1</i>	TTAGCTTCCATGCCTGCCTTATA	TCCACCTGCTTCAGGCTCTTGT
<i>GAPDH</i>	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	AGAGTGGGAGTTGCTGTTGACTC

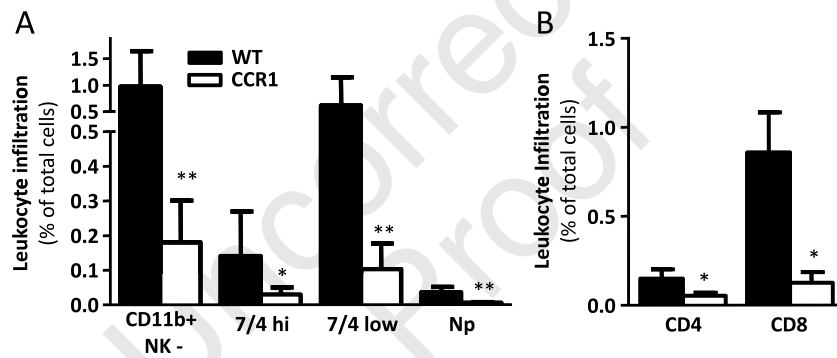


Figure W1. CCR1 deficiency alters leukocyte recruitment at the tumor site. (A) CCR1^{-/-} mice showed defects in the myeloid and lymphoid cell mobilization in the kidney at day 12 post-tumor inoculation. Percentages ($\pm$ SEM) were indicated for each group (control in black, $n = 5$; CCR1^{-/-} in white, $n = 5$). Np, neutrophils; significant value of $*P < .05$ and $**P < .001$.

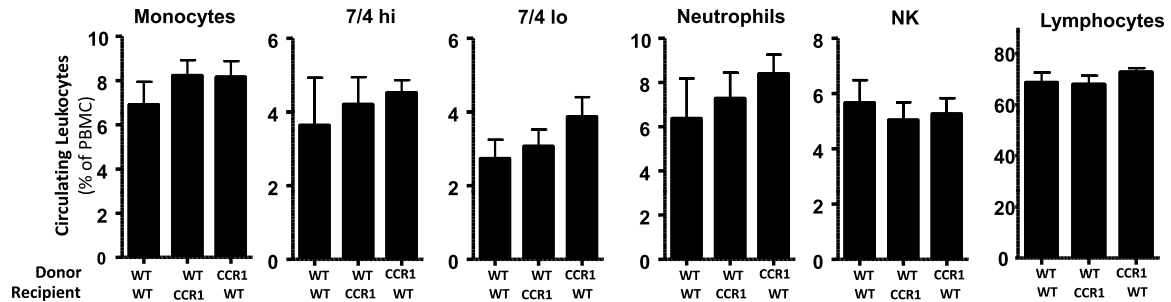


Figure W2. CCR1 expression by hematopoietic or nonhematopoietic cells do not alter the peripheral leukocyte distribution after BM transfer. Percentages of circulating total monocytes, inflammatory monocytes, resident monocytes, neutrophils, NK, and lymphocytes were evaluated 8 weeks after irradiation of WT or CCR1^{-/-} recipients reconstituted with WT or CCR1^{-/-} BM; *n* = 3 to 5 mice.

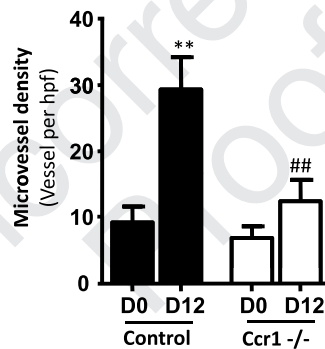


Figure W3. Reduced numbers of microvessels in tumoral liver of CCR1^{-/-} mice. Frozen liver sections from CCR1^{-/-} and control mice injected with tumor cells were stained with lectin antibody. The number of microvessels was counted in six randomly chosen fields. Each value represents mean $\pm$ SEM (*n* = 6 to 8). ***P* < .01 compared to D0; ##*P* < .01 compared to control mice.

Annexe 4

Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization

Clément Cochain^{1†}, Mathieu P. Rodero^{2†}, José Vilar¹, Alice Récalde¹, Adèle L. Richart¹, Céline Loinard¹, Yasmine Zouggar¹, Coralie Guérin¹, Micheline Duriez¹, Behazine Combadière², Lucie Poupel², Bernard I. Lévy¹, Ziad Mallat^{1,3}, Christophe Combadière², and Jean-Sébastien Silvestre^{1*}

¹INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center—PARCC, Université Paris Descartes, UMR-S970 Paris, France; ²Laboratoire d'Immunologie et Infection, INSERM UMR-S945, Université Pierre et Marie Curie, Site Pitié-Salpêtrière, Paris, France; and ³University of Cambridge, Department of Medicine, Division of Cardiovascular Medicine, Cambridge, United Kingdom

Received 12 March 2010; revised 18 May 2010; accepted 21 May 2010; online publish-ahead-of-print 25 May 2010

Time for primary review: 26 days

Aims	Monocyte systemic levels are known to be a major determinant of ischaemic tissue revascularization, but the mechanisms mediating mobilization of different monocyte subsets—Ly6C ^{hi} and Ly6C ^{lo} —to the blood and their respective role in post-ischaemic neovascularization are not clearly understood. Here, we hypothesized that distinct chemokine/chemokine receptor pathways, namely CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, and CCL5/CCR5, differentially control monocyte subset systemic levels, and might thus impact post-ischaemic vessel growth.
Methods and results	In a model of murine hindlimb ischaemia, both Ly6C ^{hi} and Ly6C ^{lo} monocyte circulating levels were increased after femoral artery ligation. CCL2/CCR2 activation enhanced blood Ly6C ^{hi} and Ly6C ^{lo} monocyte counts, although the opposite effect was seen in mice with CCL2 or CCR2 deficiency. CX3CL1/CX3CR1 strongly impacted Ly6C ^{lo} monocyte levels, whereas CCL5/CCR5 had no role. Only CCL2/CCR2 signalling influenced neovascularization, which was increased in mice overexpressing CCL2, whereas it markedly decreased in CCL2 ^{−/−} mice. Moreover, adoptive transfer of Ly6C ^{hi} —but not Ly6C ^{lo} —monocytes enhanced vessel growth and blood flow recovery.
Conclusion	Altogether, our data demonstrate that regulation of proangiogenic Ly6C ^{hi} monocytes systemic levels by CCL2/CCR2 controls post-ischaemic vessel growth, whereas Ly6C ^{lo} monocytes have no major role in this setting.
Keywords	Ischaemia • Angiogenesis • Arteriogenesis • Inflammation • Monocyte subset

1. Introduction

Arteriogenesis and angiogenesis are critical processes involved in the response of the organism to ischaemic injury, and contribute to tissue revascularization and organ preservation.¹ Infiltration of inflammatory cells in hypoxic areas is a hallmark of tissue ischaemia, and the respective role of distinct leucocyte subsets in post-ischaemic neovascularization—CD4⁺ and CD8⁺ T cells,^{2,3} NK cells,⁴ regulatory T cells,⁵ mast cells⁶—has been unravelled. Monocytes have also been shown to promote arteriogenesis and angiogenesis by releasing angiogenic growth factors, cytokines, and metalloproteinases.^{7,8}

Mouse monocytes comprise at least two phenotypically distinct subsets: Ly6C^{hi} 7/4^{hi}CCR2⁺CX3CR1^{lo} and Ly6C^{lo} 7/4^{lo}CCR2[−]CX3CR1^{hi} monocytes. The human counterparts are CD14^{hi}CD16[−] and CD14^{lo}CD16⁺ monocytes, respectively.⁹ 'Inflammatory' Ly6C^{hi} monocytes rapidly enter sites of inflammation, whereas 'Resident' Ly6C^{lo} monocytes enter lymphoid and non-lymphoid organs under homeostatic conditions,¹⁰ and patrol across the vascular endothelium in a CX3CR1-dependent manner.¹¹ The specific role of each monocyte subset in post-ischaemic neovascularization remains unclear: Nahrendorf *et al.*¹² proposed a proangiogenic activity for Ly6C^{lo} monocytes, based on their high secretion of vascular endothelial

[†] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Paris Descartes, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France. Tel: +33 153988060; fax: +33 153987951, Email: jean-sebastien.silvestre@inserm.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.

growth factor (VEGF) in the ischaemic myocardium. Accumulation of CX3CR1-expressing cells also exacerbates retinal neovascularization in a murine model of age-related macular degeneration, presumably through VEGF expression.¹³ Additionally, a population of Tie2-expressing monocytes, belonging to the Ly6C^{lo} subset, has been shown to promote tumour angiogenesis.¹⁴ In contrast, Capoccia et al.¹⁵ demonstrated that adoptive transfer of bone marrow (BM)-derived Ly6C^{hi} monocytes in mice with unilateral limb ischaemia improved blood flow recovery, whereas adoptive transfer of Ly6C^{lo} monocytes did not. Thus, specific involvement of each monocyte subset in post-ischaemic neovascularization requires further investigation.

Monocyte recruitment to ischaemic areas is thought to occur mainly via chemokine/chemokine receptor signalling. In ischaemic hindlimb models deficiency in CCL2 or its receptor, CCR2, reduces post-ischaemic inflammation and vessel growth.^{16,17} Of interest, lack of CCR2 specifically abrogates Ly6C^{hi} monocyte infiltration in the ischaemic myocardium.^{12,18} However, other chemoattractant pathways might be involved: CX3CL1/CX3CR1 and CCL5/CCR5 promote Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocyte infiltration into atherosclerotic plaques, respectively,¹⁹ and CX3CR1 governs Ly6C^{lo} monocyte infiltration into the ischaemic myocardium.¹²

In addition to the well-established role of CCL2/CCR2 signalling in monocytes recruitment to inflamed tissues, recent reports also highlighted its involvement in monocytes mobilization from the BM.^{20–22} Interestingly, in two models of bacterial infection, CCR2 was involved in monocytes mobilization from the BM, but not in their recruitment towards inflamed tissues.^{22,23} Moreover, CX3CR1 and CCR5 have been shown to control blood monocyto-sis in high fat diet fed hyperlipidemic mice.²⁰ As post-ischaemic neovascularization is highly dependent on monocytes levels in the bloodstream,²⁴ one can speculate that CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, and CCL5/CCR5 might mainly control the circulating number of monocyte subset.

Here, we studied the role of CCL2/CCR2, CX3CL1/CX3CR1, and CCL5/CCR5 in the regulation of Ly6C^{hi} and Ly6C^{lo} monocytes systemic levels and their subsequent roles in post-ischaemic neovascularization. We demonstrate that CCL2/CCR2 controls circulating levels of both monocyte subset, whereas CX3CL1/CX3CR1 preferentially impacts Ly6C^{lo} monocytes. We also show that CCL2/CCR2 signalling is required for adequate neovascularization, and that adoptive transfer of Ly6C^{hi}—but not Ly6C^{lo}—monocytes promotes functional blood flow recovery in ischaemic hindlimbs.

2. Methods

2.1 Animals

Ten-week-old males C57BL/6 (Charles River), CCL2^{−/−} (from Barrett Rollins, Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA), CCR2^{−/−}, CX3CR1^{−/−}, CR5^{−/−} mice and mice expressing GFP under the CX3CR1 promoter (CX3CR1^{gfp/+}) (from Jackson Laboratories) were used.

The investigation conformed with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

All the experiments were performed in accordance with the European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (No. 07430).

2.2 Hindlimb ischaemia model and plasmid electrotransfer

Mice underwent right femoral artery ligation under isoflurane anaesthesia. Right femoral artery was permanently ligated. Six hours after femoral artery ligation, 50 µg of plasmids encoding an irrelevant Ig, CCL2, CX3CL1, or CCL5 were injected into both tibial anterior and gastrocnemius muscles of the anesthetized mouse. Then, transcutaneous electric pulses (8 square-wave electric pulses of 200 V/cm, 20 ms each, at 2 Hz) were delivered by a PS-15 electropulsator (Jouan) with two stainless steel plate electrodes placed 4.2–5.3 mm apart, at each side of the leg. The left leg was not ligated or electrotransferred and was used as an internal control.

2.3 Analysis of neovascularization

2.3.1 Microangiography

Mice were anesthetized (pentobarbital), and longitudinal laparotomy was performed to introduce a polyethylene catheter into the abdominal aorta and inject contrast medium (barium sulfate, 1 g/mL). Angiography of hindlimbs was then performed, and images (2 per animal) were acquired with the use of a high-definition digital X-ray transducer. Images were assembled to obtain a complete view of the hindlimbs. The number of pixels occupied by vessels was measured in the quantification area with the use of Primedangio software (Trophy System, Paris, France). Area of quantification was limited by placement of the ligature on the femoral artery, the knee, the edge of the femur, and the external limit of the leg. The results were then expressed as a ratio of ischaemic to non-ischaemic leg.

2.3.2 Capillary density analysis

Sections (7 µm) of gastrocnemius muscles were stained using FITC-conjugated *Bandeirea simplicifolia* Isolectin B4. Capillaries were counted in five randomly chosen fields of a definite area with the use of Image J (NIH) software. Analyses were performed in a blinded manner by two independent investigators. The capillary density was determined in both ischaemic and non-ischaemic legs. Results were expressed as ischaemic to non-ischaemic ratio.

2.3.3 Laser Doppler perfusion imaging

Briefly, excess hairs were removed by depilatory cream from the limb and mice were placed on a heating plate at 37°C to minimize temperature variation. Foot perfusion was measured using a Moor LDI. Perfusion is expressed as a ratio of ischaemic to non-ischaemic foot paw.

2.4 Flow cytometry analysis

Ischaemic gastrocnemius and tibialis anterior muscles were weighed, minced, and digested in 450 U/mL Collagenase I, 125 U/mL Collagenase XI, 60 U/mL DNaseI, and 60 U/mL hyaluronidase (Sigma Aldrich) for 1 h at 37°C. Cells were also isolated from femur, venous blood, and spleen. All cell suspensions were layered on Histopaque 1083 (Sigma Aldrich) for gradient density centrifugation. The mononuclear cell fraction was counted and stained using anti-mouse CD11b-PerCPy5.5, Ly6G-PE, NK1.1-PE (BD Biosciences), 7/4-FITC or 7/4-APC (Serotec), or the corresponding isotypes, and analysed on a LSRII Flow Cytometer (Becton Dickinson) with the FACS Diva software (Becton Dickinson). Cells being CD11b^{hi}Ly6G[−]NK1.1[−] were considered to be monocytes, and subsets discrimination was made upon 7/4 expression. 7/4 expression has been shown to be equivalent to Ly6C expression on monocyte subset.²⁰

2.5 RNA extraction and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA from tibialis anterior muscle was extracted with Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Paris, France). RNA was extracted from sorted monocytes with RNeasy microkits

(Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed with QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Polymerase chain reaction was performed on an ABI Prizm 7700 with the use of Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Mouse GAPDH was used to normalize sample amplification. The following oligonucleotides (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) served as primers: GAPDH forward: 5'-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3', reverse: 5'-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3'; CCL2 forward: 5'-CCCCACTCACCT GCTGCT A-3', reverse: 5'-TTACGGG TCAACTTCACATTCAAA-3'; CCL5 forward: 5'-GCTGCCCTCACCAT CATCCTCACT 3', reverse: 5'-GGCACACACTTGGCGGTTCTTC-3'; CX3CL1 forward: F:5'-GTGGCTTTGCTC ATCCGCTATCAG-3', reverse:5'-CACATTGTCCACCCGCTTCTCA-3'. MMP9 Forward: 5'-TC

GGGAAGGCTCTGCTGTTC-3', Reverse: 5'-GGAAACTCACACGCC AGAAGAATTG-3'.

2.6 Chemokine plasma levels

Plasma CCL2, CX3CL1, and CCL5 were measured using Quantikine Elisa Kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

2.7 Monocyte sorting and adoptive transfer experiments

For RT-PCR experiments, 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocytes were sorted from digested ischaemic muscles of blood and 3 days after femoral artery ligation, CX3CR1^{gfp/+} mice. For adoptive transfer experiments, spleens

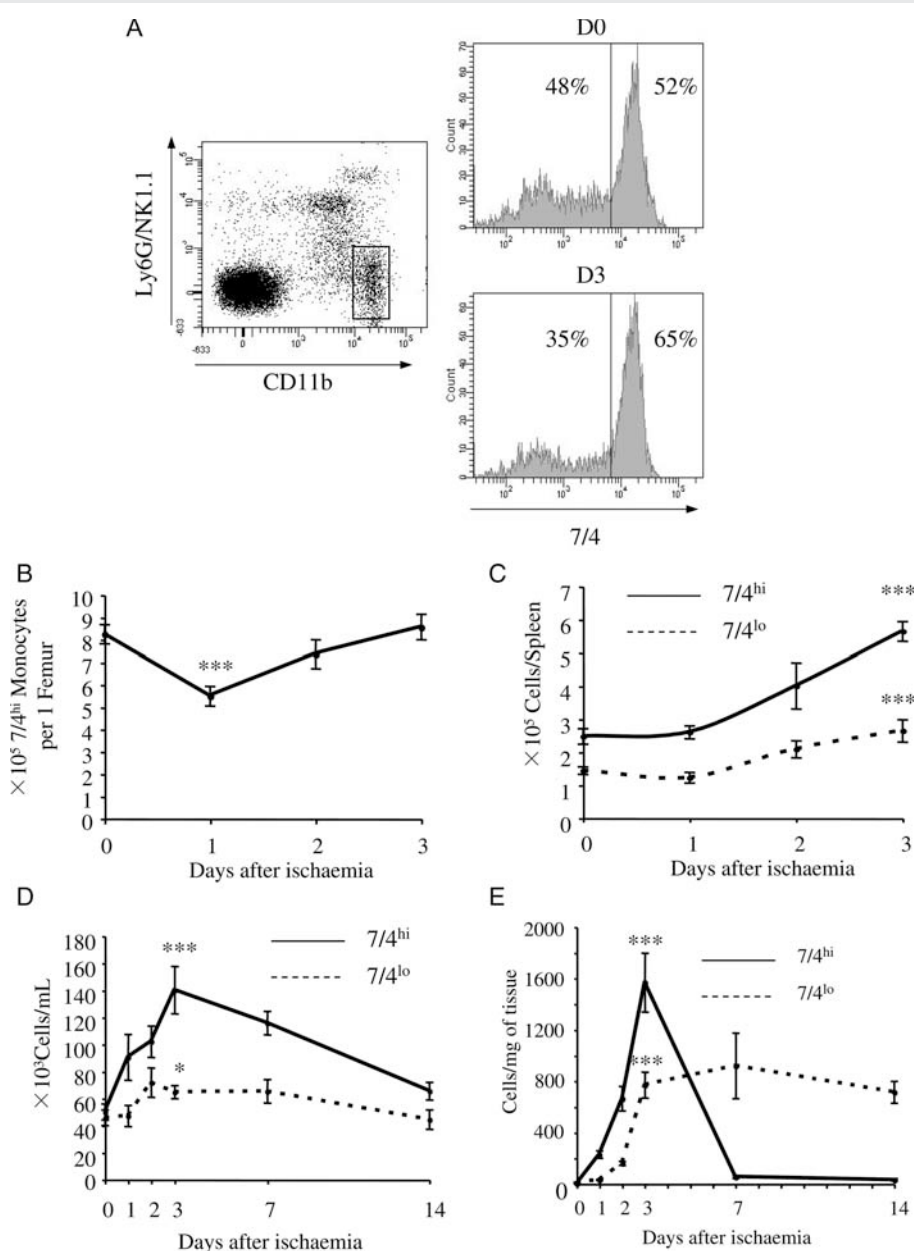


Figure 1 (A) Representative fluorescence activated cell sorting analysis of monocyte. Analysis of circulating leucocytes is shown. Left: representative gating of CD11b^{hi}Ly6G⁺NK1.1⁺ monocytic cells. Right: histograms showing 7/4 expression on gated cells at D0 and D3 after ischaemia. Monocyte counts in the (B) BM and (C) spleen at D0, D1, D2, and D3 after ischaemia. Counts of 7/4^{hi} (full line) and 7/4^{lo} (dotted line) monocytes in the (D) blood, and (E) ischaemic muscles at D0, D1, D2, D3, D7, and D14 after ischaemia. **P* < 0.05; ****P* < 0.001 vs. D0; *n* = 4–10/time point.

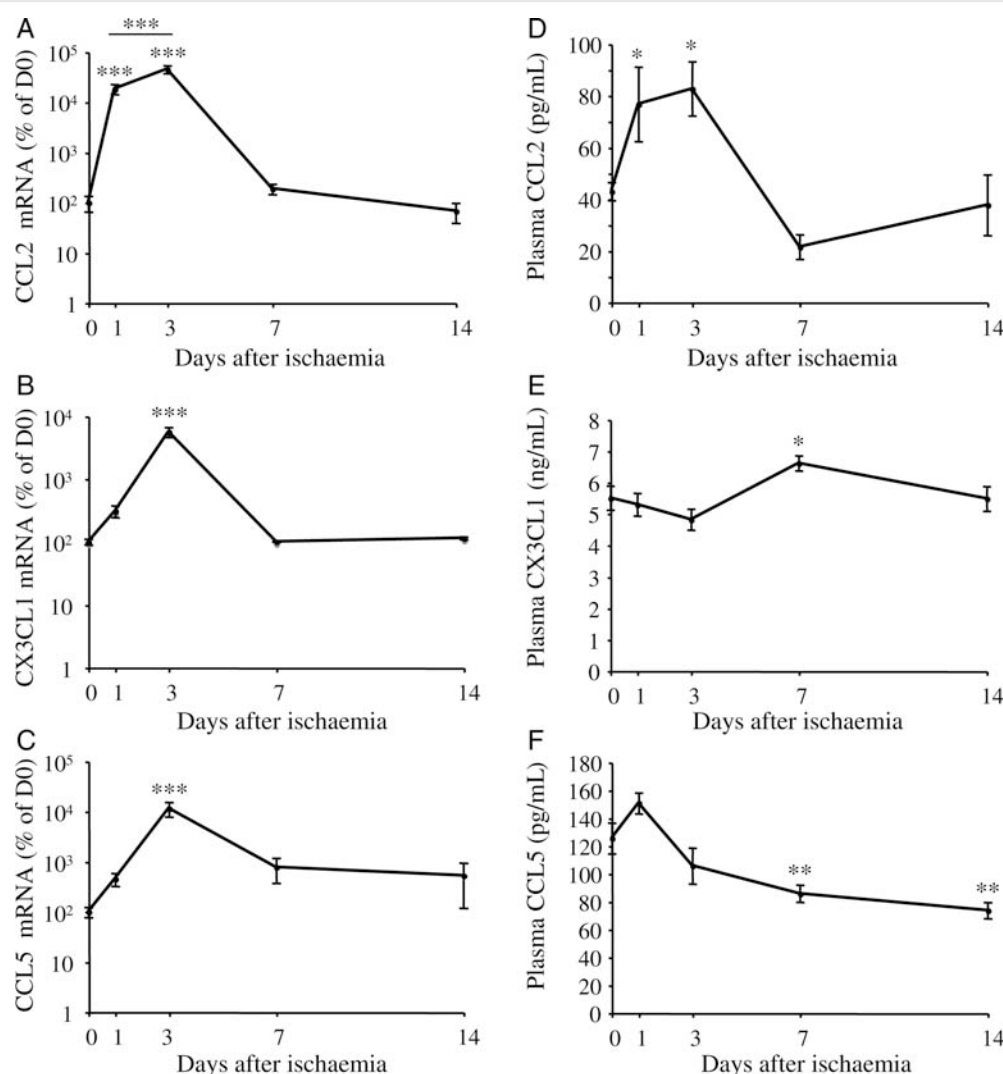


Figure 2 Left: mRNA levels of (A) CCL2, (B) CX3CL1, and (C) CCL5 in the ischaemic tibialis anterior muscle at 0, 1, 3, 7, and 14 days after induction of limb ischaemia, expressed as percentage of mRNA levels at D0. *** $P < 0.001$ vs. D0. Right: Plasma levels of (D) CCL2, (E) CX3CL1, and (F) CCL5 measured at 0, 1, 3, 7, and 14 days after ischaemia. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs. D0. $n = 4-10$ /time point.

from 8 weeks old C57BL/6 mice were mechanically dissociated on 40 μ m cell strainer. Ly6G⁺CD11b⁺ cells were magnetically selected with Ly6G and CD11b microbeads (Miltenyi), according to the manufacturers instructions, and stained with CD11b-PerCPy5.5, Ly6G-PE, NK1.1-PE, and 7/4-FITC. CD11b⁺Ly6G⁺NK1.1⁺ 7/4^{hi} and CD11b⁺Ly6G⁺NK1.1⁺ 7/4^{lo} were then selected using a FACS Aria (BD). Purity for both subset was >99%. Before injection, cells were counted by trypan blue exclusion. 10^5 7/4^{hi} monocytes or 10^5 7/4^{lo} monocytes were then intravenously injected to C57BL/6 recipients, 6 h after femoral artery ligation.

2.8 Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SEM. Kruskal–Wallis analysis of variance was used to compare each parameter. *Post hoc* Mann–Whitney *U* test with Bonferroni correction were then performed to identify which group differences account for the significant overall Kruskal–Wallis. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Ischaemia induces monocyte mobilization from the BM to the bloodstream and recruitment to ischaemic muscles

CD11b⁺Ly6G⁺NK1.1⁺ cells were considered to be monocytes (Figure 1A), and 7/4 expression levels were used to discriminate between monocyte subsets (Figure 1A).

In the BM, monocyte count decreased between D0 and D1, and returned to basal levels thereafter (Figure 1B). In a model of myocardial infarction, monocytes have been shown to be mobilized from the spleen.¹⁸ However, we did not observe any decrease in spleen monocyte content in our experimental conditions. In contrast, spleen 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocyte numbers remained stable between D0 and D1, and increased thereafter (Figure 1C).

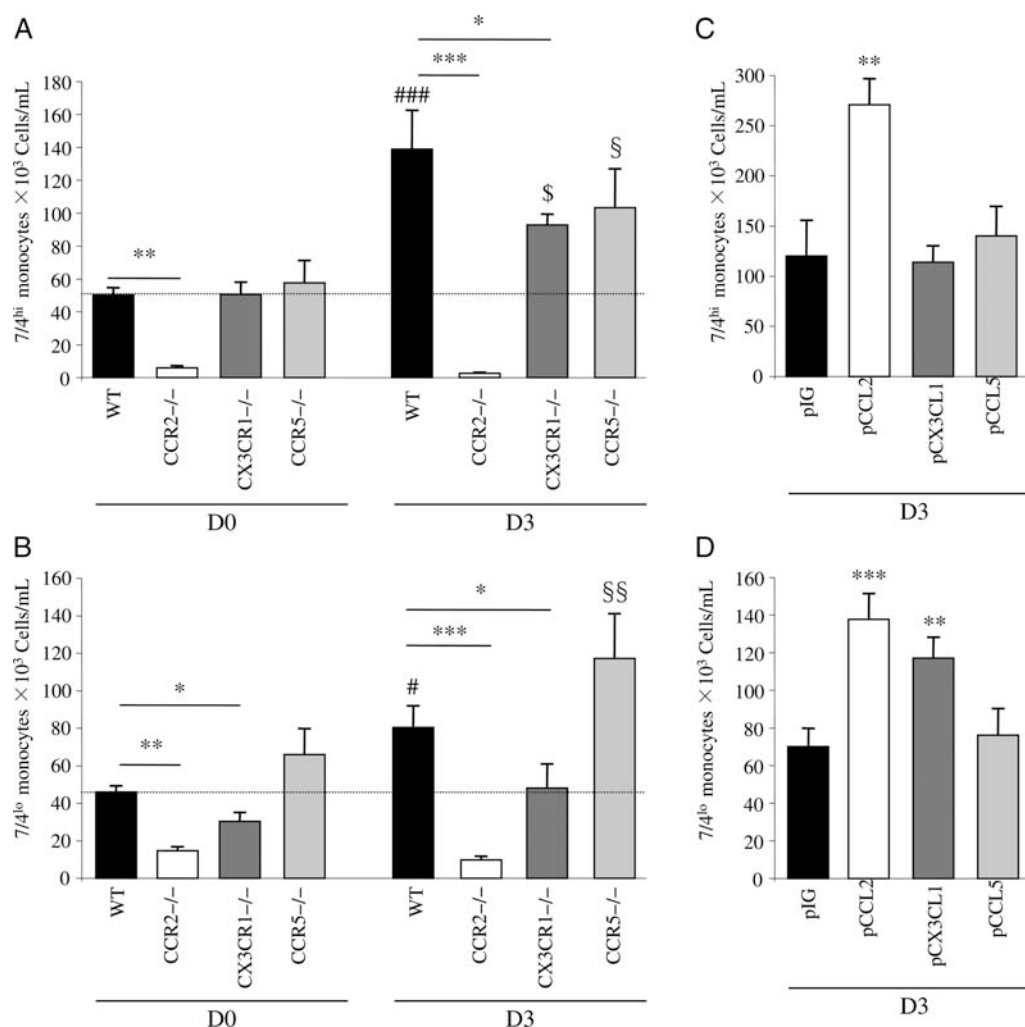


Figure 3 Circulating (A) 7/4^{hi} and (B) 7/4^{lo} monocytes in WT, CCR2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, and CCR5^{-/-} mice at D0 and D3. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; #*P* < 0.05; ###*P* < 0.001 vs. WT at D0; \$*P* < 0.05 vs. CX3CR1^{-/-} at D0; §*P* < 0.05; §§*P* < 0.001 vs. CCR5^{-/-} at D0. Circulating (C) 7/4^{hi} and (D) 7/4^{lo} monocytes in mice electrotransfected with a plasmid expressing an irrelevant IG (pIG), CCL2 (pCCL2), CX3CL1 (pCX3CL1), or CCL5 (pCCL5). ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 vs. pIG. In (A) and (B), dotted line represents the baseline levels in WT mice. *n* = 4–8 mice/group.

In the blood, 7/4^{hi} monocyte count raised between D0 and D1, peaked at D3 and returned to basal levels at D14. 7/4^{lo} monocyte levels were increased at D2 and D7 after the onset of ischaemia (Figure 1D).

In the ischaemic muscle, 7/4^{hi} monocytes were the main subset of infiltrating monocytes, and peaked at day 3 after ischaemia. 7/4^{lo} monocytes levels were upregulated at D3, and remained stable from D3 to D14 (Figure 1E).

3.2 Ischaemia upregulates CCL2, CX3CL1, and CCL5 mRNA and protein levels

CCL2 mRNA was upregulated as early as D1 after ischaemia and peaked at D3 (Figure 2A, *P* < 0.001). CX3CL1 and CCL5 mRNAs were raised at D3 (Figure 2B and C, *P* < 0.001). CCL2, CX3CL1, and CCL5 mRNAs contents returned to basal levels at D7 (Figure 2A, B, and C).

Plasma CCL2 was strongly increased by 74 and 92% at D1 and D3, respectively (*P* < 0.05 vs. D0), and returned to basal levels thereafter (Figure 2D). A significant (*P* < 0.05) increase in plasma CX3CL1 levels was observed at D7 after ischaemia, only (Figure 2E). Plasma CCL5 was slightly increased at D1 after ischaemia, but this did not reach statistical significance (*P* = 0.067). However, it significantly decreased at D7 and D14 (Figure 2F). Those results show that ischaemia markedly upregulates inflammatory chemokines expression and secretion.

3.3 Differential role of chemokine/chemokine receptor pathways in the control of circulating monocyte levels after ischaemia

In CCR2^{-/-} mice, circulating 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocyte levels were reduced when compared with wild-type mice (Figure 3A and B, *P* < 0.05 to *P* < 0.001), and were not upregulated after femoral artery ligation. Similar results were observed in CCL2^{-/-} mice

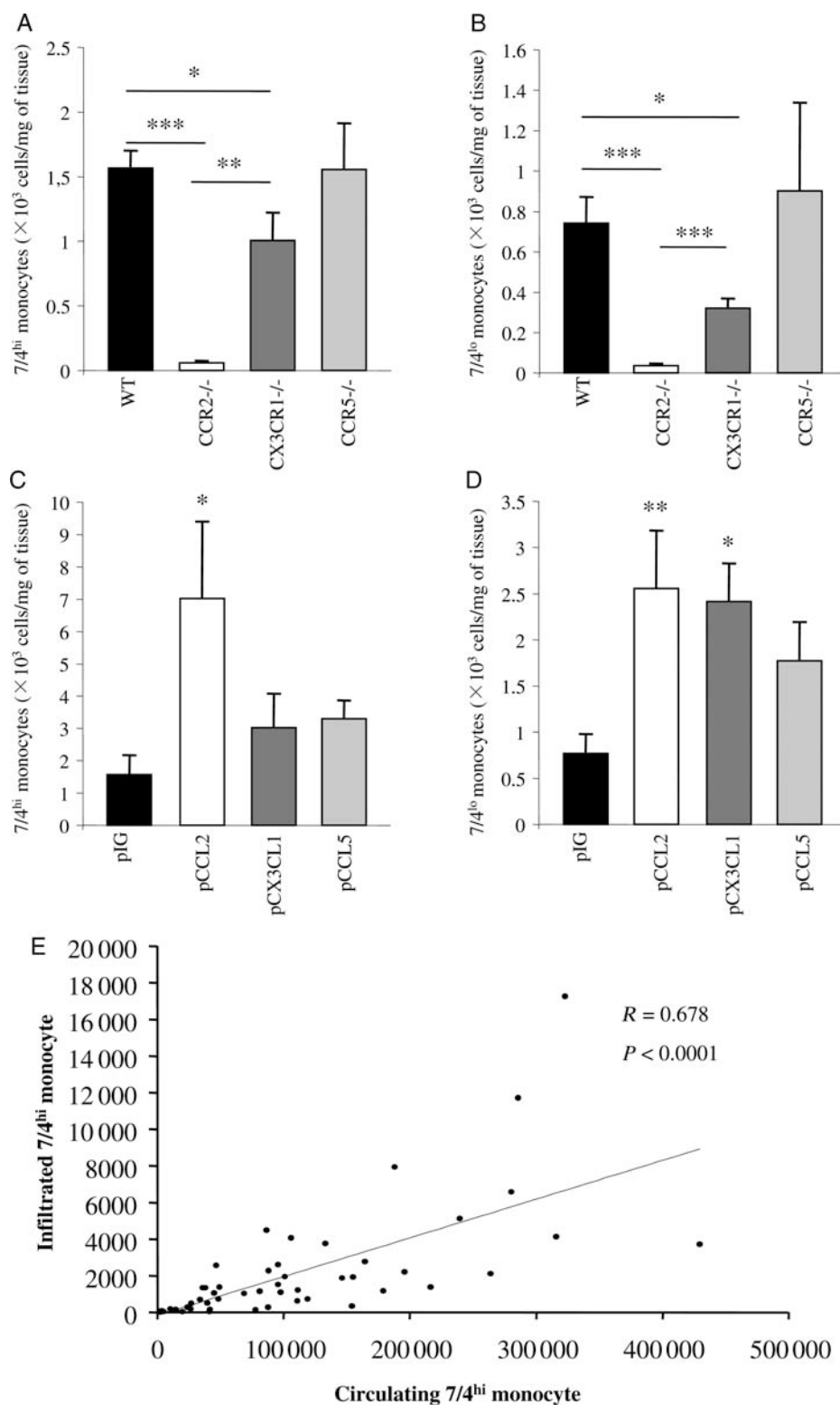


Figure 4 Infiltration of (A) 7/4^{hi} and (B) 7/4^{lo} monocytes in the ischaemic muscles of WT, CCR2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, and CCR5^{-/-} mice D3. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Infiltration of (C) 7/4^{hi} and (D) 7/4^{lo} monocyte in the ischaemic muscles of mice electrotransferred with a plasmid expressing an irrelevant IG (pIG), CCL2 (pCCL2), CX3CL1 (pCX3CL1), or CCL5 (pCCL5) at D3 after ischaemia. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. pIG. $n = 4-8$ mice/group. (E) Correlation between circulating and infiltrating 7/4^{hi} monocyte at D3. All genotypes (WT, CCR2^{-/-}, CCR5^{-/-}, CX3CR1^{-/-}) and plasmid-treated groups (pIG, pCCL2, pCX3CL1, pCCL5) are represented, $R = 0.678$; $P < 0.0001$; $n = 53$.

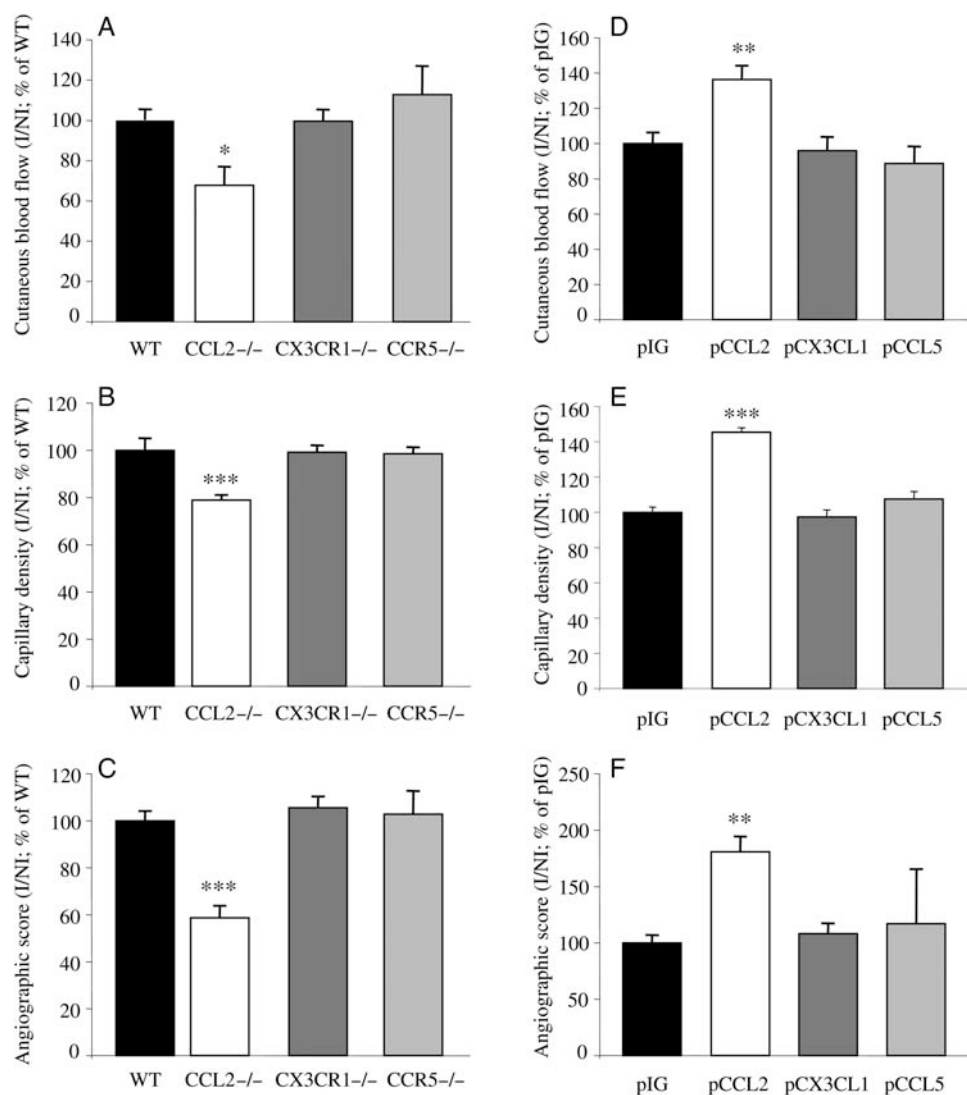


Figure 5 (A) Cutaneous blood flow, (B) capillary density, and (C) angiographic score in WT, CCL2^{-/-}, CX3CR1^{-/-}, and CCR5^{-/-} mice 21 days after ischaemia. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs. WT. (D) cutaneous blood flow, (E) capillary density, and (F) angiographic score in mice electrotransfected with a plasmid expressing an irrelevant IG (pIG), CCL2 (pCCL2), CX3CL1 (pCX3CL1), or CCL5 (pCCL5). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. pIG. $n = 4-10$ mice/group.

(data not shown). Interestingly, CX3CR1 deficiency mainly reduced 7/4^{lo} monocytes levels and hampered the ischaemia-induced 7/4^{lo} monocyte counts upregulation. CCR5 deficiency had no obvious effects. Those results are consistent with additional data showing that overexpression of CCL2 by plasmid electrotransfer markedly increased circulating 7/4^{hi} (Figure 3C, $P < 0.01$) and 7/4^{low} (Figure 3D, $P < 0.001$) monocyte counts at D3. In addition, CX3CL1 overexpression raised 7/4^{lo} monocytes, only (Figure 3D, $P < 0.01$), whereas CCL5 overexpression had no effect (Figure 3C and D).

3.4 Monocyte recruitment to ischaemic tissues depends on their circulating levels

7/4^{hi} (Figure 4A) and 7/4^{lo} (Figure 4B) monocyte infiltration was almost abolished in the ischaemic muscles of CCR2^{-/-} mice. 7/4^{lo} monocyte subset infiltration was reduced by 62%, and that of 7/4^{hi} by 35% only, in CX3CR1-deficient mice (Figure 4A and B). CCR5 deficiency did not alter monocyte numbers in ischaemic muscles (Figure 4A and B).

In line with these results, overexpression of CCL2 increased infiltration of 7/4^{hi} (Figure 4C, $P < 0.05$) and 7/4^{lo} (Figure 4D, $P < 0.01$) monocytes. CX3CL1 upregulation raised 7/4^{lo} monocytes only ($P < 0.05$). CCL5 plasmid had no significant effect. Taken together, our results showed that, CCL2/CCR2 signalling affected infiltration of both monocyte subset, whereas CX3CL1/CX3CR1 preferentially acted on the 7/4^{lo} population. Even though adoptively transferred CCR2^{-/-} monocytes had a reduced ability to infiltrate ischaemic tissues (data not shown), the rate of infiltrating monocytes was highly dependent on their circulating numbers (Figure 4E, $r = 0.678$; $P < 0.0001$).

3.5 CCL2/CCR2, but not CX3CL1/CX3CR1 or CCL5/CCR5, controls post-ischaemic neovascularization

Next, we sought to evaluate the impact of the three signalling pathways on post-ischaemic vessel growth. Twenty-one days after the onset of

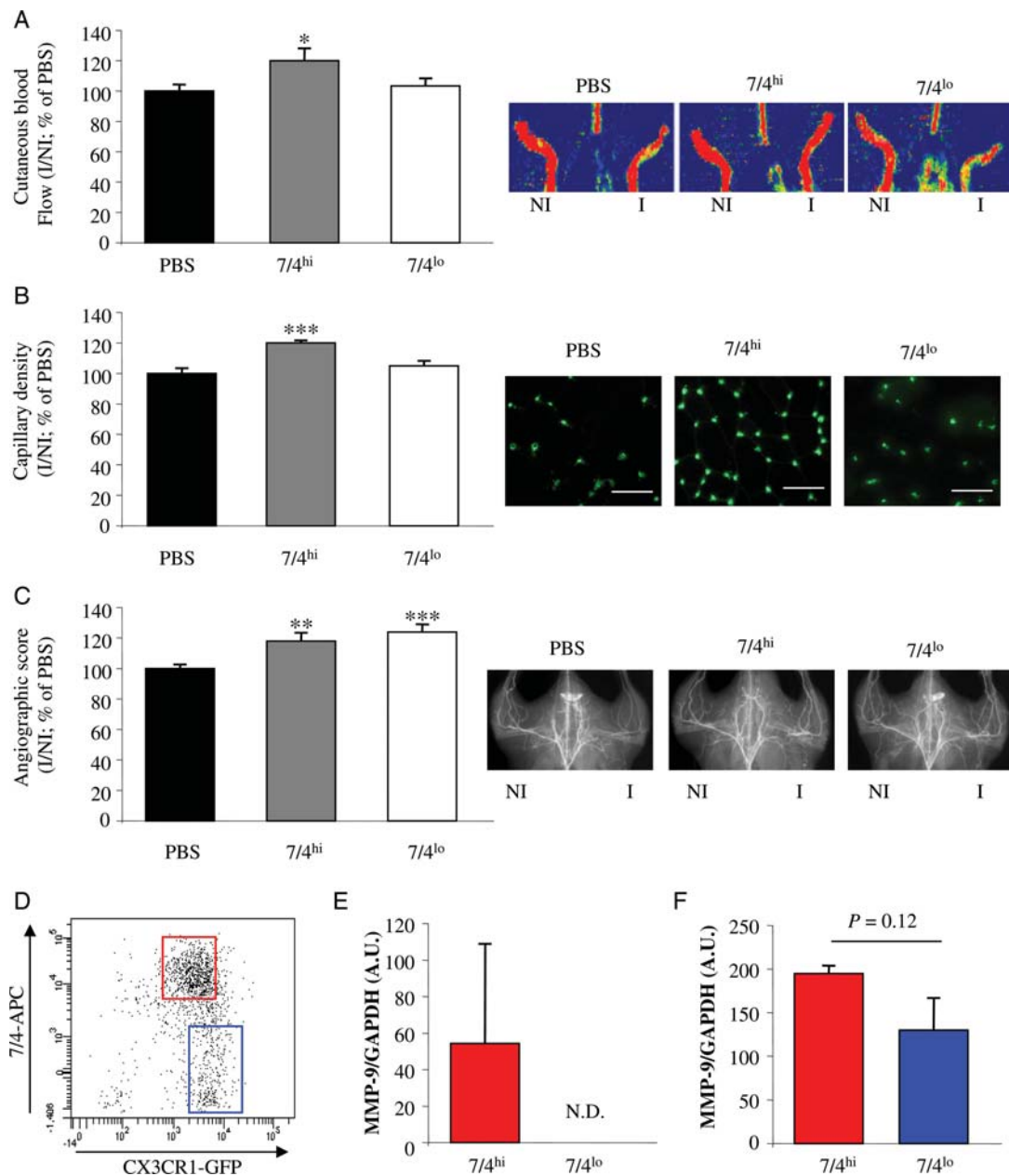


Figure 6 Left: quantitative evaluation and right: representative photomicrographs of (A) cutaneous blood flow, (B) capillary density (scale bar = 50 micrometers), and (C) angiographic score 14 days after ischaemia in animals intravenously injected with PBS, 10^5 7/4^{hi} monocytes or 10^5 7/4^{lo} monocyte. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. PBS injected mice. $n = 4-6$ mice/group. (D) Representative dot plot of gated CD11b⁺Ly6G⁻NK1.1⁻ monocytes obtained from digested ischaemic muscles of CX3CR1^{gfp/+} mice. Representative gating used for monocyte subset sorting is shown. (E) MMP-9 mRNA expression in sorted peripheral blood monocyte subset (A.U., arbitrary units; N.D., not detected). (F) MMP-9 mRNA expression in sorted infiltrating monocyte subset.

ischaemia, foot perfusion ($P < 0.01$), angiographic score ($P < 0.001$), and capillary density ($P < 0.001$) were reduced in CCL2^{-/-} mice. In contrast, post-ischaemic vessel growth was unchanged in CX3CR1^{-/-} and CCR5^{-/-} mice (Figure 5A and C). In this line, electrotransfer of CCL2 expressing plasmid increased foot perfusion ($P < 0.001$), angiographic score ($P < 0.001$), and capillary density ($P < 0.001$) when compared with control mice. Neither CX3CL1 nor CCL5 overexpression-induced significant effects (Figure 5D, E, and F). Altogether, these results show that CCL2/CCR2 signalling, but not CX3CL1/CX3CR1 or CCL5/CCR5, controls post-ischaemic neovascularization.

3.6 7/4^{hi} monocytes promote post-ischaemic neovascularization

Because 7/4^{lo} monocytes are scarce in the BM and difficult to collect in sufficient amounts from blood, we used splenic 7/4^{hi} and 7/4^{lo} monocytes as surrogates for circulating monocyte subset. In addition, a recent report has shown that blood and spleen monocyte subset are almost identical in transcriptome and function.¹⁸ Six hours after femoral artery ligation, mice received intravenous injection of PBS, 10^5 7/4^{hi} monocytes or 10^5 7/4^{lo} monocytes. 7/4^{hi} monocytes transfer

improved foot perfusion (Figure 6A, $P < 0.05$), capillary density (Figure 6B, $P < 0.001$), and angiographic score (Figure 6C, $P < 0.01$) compared with PBS-treated mice. In contrast, injection of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes only enhanced angiographic score by 25% (Figure 6C, $P < 0.001$ vs. PBS). To start to investigate the mechanism implicated in promotion of vessel growth by the two distinct populations, we analysed MMP-9 and VEGF-A levels. At 3 days after ischaemia, monocyte subset were sorted from peripheral blood and ischaemic muscles of mice expressing GFP under the CX3CR1 promoter (CX3CR1^{8fp/+} mice) (Figure 6D) and RT-PCR analysis was performed. MMP-9 mRNA was detected in circulating $7/4^{\text{hi}}$ GFP^{lo} but not in $7/4^{\text{lo}}$ GFP^{hi} monocytes. MMP-9 levels were increased by 1.5-fold in infiltrating $7/4^{\text{hi}}$ GFP^{lo} monocytes compared with $7/4^{\text{lo}}$ GFP^{hi} monocytes, although this did not reach statistical significance (Figure 6E, $P = 0.12$). In this line, MMP-9 levels were reduced in the ischaemic muscles of CCR2^{-/-} mice, at D3 (data not shown). VEGF expression did not differ between monocyte subset (data not shown).

4. Discussion

Our results emphasize the major role of CCL2/CCR2 signalling in the control of monocyte subset circulating levels and subsequently in ischaemia-induced neovascularization.

In mice with femoral artery ligation, circulating $7/4^{\text{hi}}$ monocyte levels were increased as early as day 1 after ischaemia. Similarly, blood monocytosis has been shown in patients with critical limb ischaemia.²⁵ In mice with myocardial infarction, mobilized monocytes originated from the spleen.¹⁸ However, splenic counts of each monocyte subset did not decrease after femoral artery ligation, suggesting that monocytes are not mobilized from the spleen in this setting. In contrast, we noted a significant decrease of BM $7/4^{\text{hi}}$ monocytes at day 1 suggesting that monocytes mobilized in the bloodstream following ischaemia originate from the BM.

CCL2/CCR2 controls monocytes recruitment to ischaemic tissues.^{12,15–17} However, we demonstrate here that this signalling pathway is mainly involved in the regulation of their circulating levels following ischaemia. Blood monocytes number is a critical determinant of post-ischaemic vessel growth.²⁴ Our results clearly show that disruption of the CCL2/CCR2 pathway leads to a drastic reduction of monocytes mobilization to the bloodstream and hampers post-ischaemic vessel growth. Similarly, overexpression of CCL2 strongly increased both $7/4^{\text{hi}}$ and $7/4^{\text{lo}}$ monocytes circulating numbers and activated neovascularization. Altogether, our results suggest that, even though recruitment of adoptively transferred monocytes was dampened by CCR2 deficiency, infiltration of $7/4^{\text{hi}}$ monocytes into ischaemic tissues was mainly dependent on their circulating levels.

We also evidenced a role of CX3CL1/CX3CR1, but not of CCL5/CCR5, in the control of monocytes circulating numbers. Monocytes are short-lived cells, and CX3CR1 signalling has been shown to promote their survival.²⁶ endogenous CX3CR1 signalling might be required for the survival of newly mobilized BM-originating monocytes. This is supported by our observation of a lower number of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes in CX3CR1^{-/-} mice. CCL5/CCR5 is involved in the regulation of monocyte circulating counts in high fat diet fed ApoE^{-/-} mice,²⁰ which represent a context of chronic inflammation. In the early phase of limb ischaemia, which might be considered as a context of acute inflammation, we were unable to evidence a clear role of CCL5/CCR5 in the regulation of circulating or infiltrating monocytes. Similarly, treatment with the CCR5

antagonist Met-Rantes only affects monocyte number in hypercholesterolemic and chronically inflamed ApoE^{-/-} mice, but not in ApoE^{+/+} controls.²⁰

Following the increase of their levels in the bloodstream, both subsets of monocytes, $7/4^{\text{hi}}$ (Ly6C^{hi}) and $7/4^{\text{lo}}$ (Ly6C^{lo}), were recruited to ischaemic muscles. Inflammatory $7/4^{\text{hi}}$ monocytes were preponderant at early time points, whereas only $7/4^{\text{lo}}$ monocytes were present after day 7 onward, as previously reported.¹² Variations in monocytes levels were associated with changes in the chemokines expression pattern: CCL2 was increased at day 1 in the ischaemic tissues and blood, whereas CX3CL1 was upregulated at day 3 and 7, only.

The proangiogenic potential of the distinct monocyte subset in the context of tissue ischaemia has been unclear so far.^{12,15} In this study, we highlighted a major role of $7/4^{\text{hi}}$ monocytes in post-ischaemic vessel growth. Indeed, abrogation of ischaemia-induced $7/4^{\text{hi}}$ monocyte infiltration in CCL2^{-/-} mice fully inhibited post-ischaemic vessel growth. In contrast, a drastic reduction of infiltrating $7/4^{\text{lo}}$ monocytes number associated with CX3CR1 deficiency did not hamper arteriogenesis or angiogenesis. Similarly, intravenous administration of $7/4^{\text{hi}}$ (Ly6C^{hi}) enhanced arteriogenesis and angiogenesis, leading to functional blood flow recovery, whereas that of $7/4^{\text{lo}}$ (Ly6C^{lo}) monocytes only promoted arteriogenesis and did not affect tissue perfusion. This distinct proangiogenic potential might result from the differential expression of angiogenic factors. Sorted $7/4^{\text{hi}}$ monocytes expressed more MMP-9 than $7/4^{\text{lo}}$ monocytes, which is consistent with their high proteolytic activity observed in a model of myocardial infarction.¹² The role of MMP-9 in angiogenesis has been well documented: MMP-9 has a crucial role in newly formed capillaries branching after tissue ischaemia.⁸ MMP-9 also triggers the angiogenic switch in tumours through release of extracellular matrix bound VEGF,²⁷ and myeloid cells-induced tumour angiogenesis is dependent on MMP-9.²⁸

Interestingly, activation or disruption of CCL2/CCR2 signalling impacted circulating and infiltrating levels of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes, which barely express CCR2: $7/4^{\text{hi}}$ monocytes might trigger the secondary recruitment of $7/4^{\text{lo}}$ monocytes. $7/4^{\text{hi}}$ monocytes might also switch to a $7/4^{\text{lo}}$ phenotype, as proposed previously.²⁹

In conclusion, we showed that ischaemia induces the mobilization of proangiogenic and proarteriogenic monocytes to the bloodstream through CCL2/CCR2, with an accessory role of CX3CL1/CX3CR1. This chemokine-dependent regulation of monocyte systemic levels dictates the amplitude of their recruitment into ischaemic tissues, where they promote revascularization and functional recovery of blood flow.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by grants from Inserm, ANR «Cardiovasculaire, obésité et diabète» (AO5088DS), ANR 2008 «Neurologiques et Maladies Psychiatriques», European Grant Innochem 518167 European community (ENDOSTEM No. 241440) and Assistance Public-Hôpitaux de Paris/Institut Pasteur. M.P.R. is supported by European Grant Innochem 518167 and L.P. by Assistance Public-Hôpitaux de Paris.

References

1. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;**9**:653–660.
2. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4–knockout mice. *Circulation* 2003;**108**:205–210.
3. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U et al. CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of

- collateral vessel development and recruiting CD4⁺ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 2006;**113**:118–124.
4. van Weel V, Toes RE, Seghers L, Deckers MM, de Vries MR, Eilers PH et al. Natural killer cells and CD4⁺ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;**27**:2310–2318.
 5. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L, Vilar J, Loinard C, Cochain C et al. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation* 2009;**120**:1415–1425.
 6. Heissig B, Rafii S, Akiyama H, Ohki Y, Sato Y, Rafael T et al. Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization. *J Exp Med* 2005;**202**:739–750.
 7. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* 2004;**95**:449–458.
 8. Johnson C, Sung HJ, Lessner SM, Fini ME, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-9 is required for adequate angiogenic revascularization of ischemic tissues: potential role in capillary branching. *Circ Res* 2004;**94**:262–268.
 9. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;**19**:71–82.
 10. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;**27**:669–692.
 11. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007;**317**:666–670.
 12. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007;**204**:3037–3047.
 13. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodero M, Pezard A et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2007;**117**:2920–2928.
 14. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;**8**:211–226.
 15. Capoccia BJ, Gregory AD, Link DC. Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion. *J Leukoc Biol* 2008;**84**:760–768.
 16. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S et al. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 2004;**94**:671–677.
 17. Waeckel L, Bignon J, Liu JM, Markovits D, Ebrahimi TG, Vilar J et al. Tetrapeptide AcSDKP induces postischemic neovascularization through monocyte chemoattractant protein-1 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:773–779.
 18. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009;**325**:612–616.
 19. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzik C, Spanbroek R, Llodra J et al. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 2007;**117**:185–194.
 20. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2008;**117**:1649–1657.
 21. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007;**117**:902–909.
 22. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 2006;**7**:311–317.
 23. Engel DR, Maurer J, Tittel AP, Weisheit C, Cavlar T, Schumak B et al. CCR2 mediates homeostatic and inflammatory release of Gr1(high) monocytes from the bone marrow, but is dispensable for bladder infiltration in bacterial urinary tract infection. *J Immunol* 2008;**181**:5579–5586.
 24. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**283**:H2411–H2419.
 25. Magri D, Vasilas P, Muto A, Nishibe T, Dardik A. Elevated monocytes in patients with critical limb ischemia diminish after bypass surgery. *J Surg Res* 2009;**158**:1–11.
 26. Landsman L, Bar-On L, Zernecke A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 2009;**113**:963–972.
 27. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;**2**:737–744.
 28. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008;**13**:206–220.
 29. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 2004;**172**:4410–4417.

Annexe 5

MFGE8 Does Not Influence Chorio-Retinal Homeostasis or Choroidal Neovascularization *in vivo*

William Raoul^{1,2,3*}, Lucie Poupel^{5,6}, David-Alexandre Tregouet^{9,15}, Sophie Lavalette^{1,2,3}, Serge Camelo^{8,9,10}, Nicole Keller^{8,9,10}, Sophie Krumeich^{11,12}, Bertrand Calippe^{1,2,3}, Xavier Guillonnet^{1,2,3}, Francine Behar-Cohen^{4,8,9,10}, Salomon-Yves Cohen¹⁴, Holger Baatz¹³, Christophe Combadière^{5,6,7}, Clotilde Théry^{11,12}, Florian Sennlaub^{1,2,3,4*}

1 INSERM, U968, Paris, France, **2** University Pierre and Marie Curie, Institut de la Vision, Paris, France, **3** Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, France, **4** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôtel Dieu, Service d'Ophtalmologie, Paris, France, **5** INSERM, UMR S945, Laboratory of Immunity and Infection, Paris, France, **6** University Pierre and Marie Curie, Laboratory of Immunity and Infection, Paris, France, **7** Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Immunologie, Paris, France, **8** INSERM, UMR S 872, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **9** University Pierre and Marie Curie, Paris, France, **10** Université Paris Descartes, Paris, France, **11** INSERM, U932, Paris, France, **12** Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, France, **13** Augenklinische Gemeinschaftspraxis, Augenzentrum Recklinghausen und Zentrum der Augenheilkunde, J-W Goethe Universität Frankfurt am Main, Frankfurt, Germany, **14** Centre d'Angiographie et de Laser, Paris, France, **15** INSERM, UMR S 937, Faculté de Médecine La Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Abstract

Purpose: Milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII (MFGE8) is necessary for diurnal outer segment phagocytosis and promotes VEGF-dependent neovascularization. The prevalence of two single nucleotide polymorphisms (SNP) in *MFGE8* was studied in two exudative or "wet" Age-related Macular Degeneration (AMD) groups and two corresponding control groups. We studied the effect of MFGE8 deficiency on retinal homeostasis with age and on choroidal neovascularization (CNV) in mice.

Methods: The distribution of the SNP (rs4945 and rs1878326) of *MFGE8* was analyzed in two groups of patients with "wet" AMD and their age-matched controls from Germany and France. MFGE8-expressing cells were identified in *Mfge8*^{+/-} mice expressing β-galactosidase. Aged *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-} mice were studied by funduscopy, histology, electron microscopy, scanning electron microscopy of vascular corrosion casts of the choroid, and after laser-induced CNV.

Results: rs1878326 was associated with AMD in the French and German group. The *Mfge8* promoter is highly active in photoreceptors but not in retinal pigment epithelium cells. *Mfge8*^{-/-} mice did not differ from controls in terms of fundus appearance, photoreceptor cell layers, choroidal architecture or laser-induced CNV. In contrast, the Bruch's membrane (BM) was slightly but significantly thicker in *Mfge8*^{-/-} mice as compared to controls.

Conclusions: Despite a reproducible minor increase of rs1878326 in AMD patients and a very modest increase in BM in *Mfge8*^{-/-} mice, our data suggests that MFGE8 dysfunction does not play a critical role in the pathogenesis of AMD.

Citation: Raoul W, Poupel L, Tregouet D-A, Lavalette S, Camelo S, et al. (2012) MFGE8 Does Not Influence Chorio-Retinal Homeostasis or Choroidal Neovascularization *in vivo*. PLoS ONE 7(3): e33244. doi:10.1371/journal.pone.0033244

Editor: Alfred Lewin, University of Florida, United States of America

Received: November 28, 2011; **Accepted:** February 6, 2012; **Published:** March 15, 2012

Copyright: © 2012 Raoul et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from INSERM, Agence Nationale pour la Recherche (ANR) "blanc" (AO5120DD), ANR "Maladies Neurologiques et Maladies Psychiatriques" (R08098DS), ANR "Genopat" (R09099DS), European Grant "Innochem" (LSHB-CT-2005-518167), ERC starting Grant (ERC-2007 St.G. 210345), and a grant from Fondation de France to C.T. F.S. is a recipient of ERC starting grant. C.C. and F.S. are recipients of a contract "Interface" from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: william.raoul@inserm.fr (WR); florian.sennlaub@inserm.fr (FS)

Introduction

Milk fat globule-EGF-factor (MFGE8), also named lactadherin, PAS 6/7, SED1, BA46, p47, is a secreted glycoprotein first described in milk fat globules released in milk by mammary epithelial cells [1,2]. Secreted by different cell types, it promotes phagocytosis by linking phosphatidylserine at the surface of membrane vesicles [3] and apoptotic cells [4] to the αvβ3/β5 integrin on phagocytic cells. MFGE8 mediated phagocytosis induces a regulatory T cell response [5] and *Mfge8*^{-/-} mice develop spontaneous late onset lupus-like disease and glomerulo-

nephritis [6]. In humans, the association of two nucleotide polymorphisms in the coding region of *MFGE8* predisposes subjects to systemic lupus erythematosus [7], suggesting that these single nucleotide polymorphisms (SNP) lead to a dysfunctional MFGE8. Furthermore, MFGE8 binds to αvβ3/β5 of vascular endothelial cells and promotes VEGF-driven neovascularization [8].

Phagocytosis of spent outer segments (OS) is critical for the long-term maintenance of the retina [9,10] and dependent upon a tyrosine kinase receptor (Mertk) [11,12] and the αvβ5 integrin [13]. The neural retina and the retinal pigment epithelium (RPE)

express MFGE8 [14], whose interaction with $\alpha v\beta 5$ integrin of RPE cells is essential in the diurnal OS phagocytosis [15]. Furthermore, we have previously shown that OS phagocytosis by the RPE is necessary for choroidal maintenance *in vivo* [16].

Age-related macular degeneration (AMD) is a major cause of central vision loss in the elderly in Western countries [17]. AMD's most prominent pathological features are lesions involving the RPE and Bruch's membrane (BM), the degeneration of photoreceptors, [18] and VEGF-driven choroidal neovascularization (CNV) [19], that occurs approximately in 10% of patients. The causes of AMD are not well understood, but epidemiological studies [20] and murine models [21] have identified key factors in its pathogenesis such as age [17,22], family history [23] and smoking [24,25].

In summary, MFGE8 has been shown to be essential in diurnal OS phagocytosis and in angiogenesis. In the eye, its dysfunction could therefore lead both to retinal degeneration and choroidal involution as a consequence of impaired RPE phagocytosis and/or to inhibition of neovascularization. We investigated whether a SNP associated with increased prevalence of lupus in human patients [7] is associated with AMD. Furthermore, we investigated whether the deficiency of MFGE8 affects chorioretinal homeostasis and CNV *in vivo* using *Mfge8*^{-/-} mice.

Materials and Methods

Ethics statement

In accordance with the Declaration of Helsinki, patients and volunteers provided written and informed consent for the studies, which were approved by the Hôtel Dieu ethics committee (CCPPRB no. 0611303) and by the ethics committee of the Ärztekammer Westfalen-Lippe and the University of Münster (no. 2007-246-f-S).

Animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee, "Comité d'éthique pour l'expérimentation animale Charles Darwin" (ID Ce5/2010/002), and treated in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Single Nucleotide Polymorphisms analysis in AMD

Studies, including participants' assessments and ethics details of each cohort were described in Combadiere *et al.* [26] and Baatz *et al.* [27]. White Caucasian control subjects and AMD patients were recruited in Paris (France: 251 control subjects, 274 "wet" AMD patients) and in Recklinghausen (Germany: 317 control subjects, 263 "wet" AMD patients). The mean age and gender distribution are summarized in Tables 1 and 2.

Rs4945 is in open reading frame SNP and leads to Arginine replacement of a Serine in the amino acid number 3. Rs1878326 is

Table 1. The mean age and gender distribution in the patient and control groups.

Patients	FCTL, n (%)	FAMD, n (%)
Men	91 (36,25)	81 (29,56)
Women	160 (63,75)	193 (70,44)
Total	251	274
Mean Age	71,8+/-7,75	79,5+/-6,72
P value (χ^2 test)	0.1	

French groups (control group : FCTL; AMD group : FAMD).

doi:10.1371/journal.pone.0033244.t001

Table 2. The mean age and gender distribution in the patient and control groups.

Patients	GCTL, n (%)	GAMD, n (%)
Men	115 (43,73)	126 (39,75)
Women	148 (56,27)	191 (60,25)
Total	263	317
Mean Age	77,8+/-5,38	79,2+/-5,47
P value (χ^2 test)	0.3	

German groups (control group : GCTL; AMD group : GAMD).

doi:10.1371/journal.pone.0033244.t002

also in open reading frame SNP of *MFGE8* and leads to Leucine replacement of Methionine in the amino acid number 76. Allelic frequencies were calculated by gene counting.

We used the chi-square test (χ^2) to compare genotype distributions and allele frequencies in participants. The Hardy-Weinberg equilibrium was tested using a χ^2 test with 1 degree of freedom. Association between SNP and "wet" AMD was assessed by use of the Cochran-Armitage's trend test [28]. Linkage disequilibrium and haplotype association analyses were performed by the use of THESIAS software [29].

Animals

Mfge8^{-/-} and ^{+/-} mouse strains were generated as described before [8]. *Mfge8*^{-/-} are functionally deficient in MFGE8 due to a gene-trap insertion of β -galactosidase in the *Mfge8* gene (C57Bl/6 background, N8). The mice were maintained at the Institut Curie animal facility or Centre de Recherche des Cordeliers animal facility (Paris, France) under pathogen-free conditions. All animals were housed in a 12/12 hour light/dark (100–500 lux) cycle with food and water available *ad libitum*.

Fundus Photography and Laser-Photocoagulation

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (40 mg/kg). Pupils were fully dilated with 1% tropicamide. Coverslips positioned on the mouse cornea were used as a contact glass. Fundus photographs were taken with a digital CCD camera (Nikon D3) coupled with an endoscope (Karl Storz, Guyancourt, France) as previously described [30].

Laser-photocoagulations were performed 1 to 2 disc diameters away from the papillae with an Argon laser (Viridis 532 nm, Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) mounted on a slit lamp (400 mW, 50 ms and 50 μ m; Hagg-Streit, BQ 900). For CNV visualization at day 14, 3 months old mice were anesthetized and perfused through their heart with phosphate buffered saline (PBS) containing fluorescein (FITC)-dextran 50 mg/ml (2.10⁶ mW). Animals were sacrificed with 100% CO₂ and their eyes were removed and processed as described below. CNV was quantified on photographs with Image J analysis software. CNV was quantified as FITC positive surface.

Choroidal Flatmounts and Immunohistochemistry

The eyes were enucleated, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes at room temperature, and sectioned at the limbus; the cornea and lens were discarded. The retinas were peeled from the RPE/choroid/sclera. Retinas and choroids were incubated with the indicated primary and secondary antibodies. The choroids and retinas were radially incised and flatmounted. The primary antibodies used were rabbit anti-IBA1 (1:400; Wako,

Neuss, Germany) and rhodamine phalloidine (1:200; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Sections were counterstained with 4–6-diamino-2-phenylindole (DAPI). Choroids, retinas and sections were viewed with a fluorescence microscope (DM5500B, Leica, Nanterre, France).

For β -galactosidase activity detection, frozen sections from eyes were fixed in 4% PFA before incubation. The samples were then incubated in the beta-galactosidase detection reagent (5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 0.30 mg X-gal/ml in PBS) overnight at 37°C before mounting in Immumount (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

Histology and Electron Microscopy

For histology, eyes were fixed in 0.5% glutaraldehyde/4% PFA for 2 h, dehydrated and mounted in historesin. 5- μ m sections were cut and stained with toluidin blue. For electron microscopy, eyes were fixed in 2.5% glutaraldehyde of cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). After 1 hour, eyeballs were dissected, fixed for another 3 hours, post-fixed in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer, and dehydrated in graduated ethanol solution. The samples were included in epoxy resin and oriented. Semi-thin sections (1 μ m), obtained with an ultramicrotome Reichert Ultracut E (Leica), were stained with toluidin blue, examined with a light microscope, and photoreceptor layer thickness was measured. Ultra-thin sections (80 nm) were contrasted by uranyl acetate and lead citrate, then observed in an electron microscope JEOL 100 CX II (JEOL, Tokyo, Japan) with 80 kV.

Vascular Corrosion Casts

Animals were sacrificed by CO₂ inhalation. Vascular corrosion cast was performed as previously described by Houssier *et al.* [16]. Briefly, a perfusion was done with Mercor resin+catalyst (Ladd Research/Inland, Saint Loup sur Semouse, France) into the aorta through left heart ventricle. After removal, eye tissues were conserved overnight at 37°C in PBS to allow complete polymerisation and digested by 5% KOH during 2 weeks at 37°C until only the vascular corrosion casts remained. The specimens were prepared for electron microscopy, then scanned and analyzed using Image J Software (NIH). The avascular area was measured on frontal views and expressed as the percentage of intercapillary surface of the whole area. The thickness of choriocapillaries was measured on perpendicular views of the cast from the retinal to scleral side of the choriocapillary cast.

Reverse Transcription and Real Time Polymerase Chain Reaction

After tissues were separated (neural retina and choroid/RPE), total RNA was isolated with NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Single-stranded cDNA was synthesized from total RNA (pre-treated with DNaseI amplification grade) using oligodT as primer and superscript reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Subsequent real-time polymerase chain reaction (RT PCR) was performed using cDNA, qPCR SuperMix-UDG Platinum SYBR Green (Invitrogen), and the following primers (0.5 pmol/ μ l): mm actin sense: 5'-AAGGC-CAACCGTGAAGAT-3'; mm actin antisense : 5'-GTGGTACGACCAGAGGCATAC-3'; mm *Mfge8* sense : 5'-GGATAATCAGGGCAAGATCA-3'; mm *Mfge8* antisense : 5'-TAGGACGCCACATACTGGAT-3'

PCR reactions were performed in 40 cycles of 15 s at 95°C, 45 s at 60°C. Product was not generated in control reactions in which reverse transcriptase was omitted during cDNA synthesis.

Statistical Analysis

Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for the data analysis and graphic representations. All values are reported as means $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test for comparison among means between two groups or ANOVA test between more than two groups. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

MFGE8 single nucleotide polymorphism studies in two groups of wet AMD patients and their controls

Two common SNP were previously identified in the open reading frame of the *MFGE8* gene called *MFGE8* R3S (rs4945 for nucleotide C>A) and *MFGE8* M76L (rs1878326 for nucleotide 226 A>C), associated with an increased risk of systemic lupus erythematosus [7]. The fact that *Mfge8*^{-/-} mice develop a spontaneous late onset lupus-like disease and glomerulonephritis [6] suggests that rs4945 and rs1878326 lead to a decrease of MFGE8 bioactivity, that would explain their association with the human disease.

We thus investigated the described *MFGE8* SNP in two DNA collections of “wet” AMD patients recruited in France (FAMD, 274 subjects) and in Germany (GAMD, 317 subjects) and their age matched controls (FCTL, 251 subjects; GCTL, 263 subjects). The mean age and gender distribution are summarized in Tables 1 and 2. All of the subjects were of caucasian origin or decent. Risk factors for “wet” AMD such as Factor H and smoking were more frequent among cases than among controls as previously described [31].

Genotype frequencies distribution of the rs4945 C>A (R3S) and rs1878326 A>C (M76L) are shown in Tables 3 and 4, respectively. All genotype distributions were compatible with Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$) in cases and in controls, from both French and German samples. In the French sample, the rs4945 -A allele was more frequent in cases than in controls (0.36 vs 0.29, $P = 0.017$) but the inverse trend was observed in German (0.30 vs 0.33, $P = 0.229$). Conversely, the pattern of association of the rs1878326 with AMD was homogeneous across populations. In both samples, the rs1878326-C allele tended to be more frequent in cases than in controls, 0.36 vs 0.32, $P = 0.184$ and 0.41 vs 0.35, $P = 0.053$, in French and German, respectively. The corresponding OR for AMD were then 1.19 [0.92–1.53] in French and 1.27 [1.00–1.61] in German. The two ORs were not significantly different ($P = 0.92$). Even though statistical significance was not reached separately in each sample (likely due to small sample size), the resulting combined OR for AMD associated with the rs1878326-C allele was 1.23 [1.03–1.46] and achieved significance ($P = 0.019$).

The pattern of linkage disequilibrium was homogeneous across populations and was characterized by a moderate linkage disequilibrium between the two studied SNP ($r^2 = 0.07$, $D' = -0.53$ in French and $r^2 = 0.10$, $D' = -0.60$) in German). As a consequence, the two SNP generated 4 common haplotypes (Table 5) among which the two haplotypes carrying the rs1878326-C allele were more frequent in cases than in controls in the German and the French study, confirming the association of the rs1878326-C allele with AMD observed in the univariate analysis.

MFGE8 expressing cells in the retina

In the litterature, immunohistochemistry using an anti-MFGE8 antibody localized MFGE8 protein mainly to the inner segments of photoreceptors and to a lesser extent to RPE cells in mice using

Table 3. Genotype distribution of MFGE8 rs4945 (R3S) polymorphism in AMD patients and controls.

MFGE8 rs4945	FCTL, n = 241	FAMD, n = 271	GCTL, n = 260	GAMD, n = 308
CC	122 (51%)	110 (41%)	118 (45%)	154 (50%)
CA	99 (41%)	128 (47%)	112 (43%)	125 (41%)
AA	20 (8%)	33 (12%)	30 (12%)	29 (9%)
MAF	0.29	0.36	0.33	0.30
OR [95%CI]	1.376 [1.056–1.791]		0.855 [0.665–1.100]	
P	0.017		0.229	

MAF: Minor Allele Frequency.

OR: Allelic Odds Ratio with its 95% Confidence Interval.

P: Cochran-Armitage trend test's p-value.

doi:10.1371/journal.pone.0033244.t003

two different antibodies [14]. We identified MFGE8 expressing cells in *Mfge8*^{+/-} mice thanks to the gene-trap insertion of β -galactosidase in the *Mfge8* gene. The resulting fusion protein is retained in the cell and β -galactosidase activity therefore allows to identify MFGE8 expressing cells [8]. β -galactosidase, detected by a β -galactosidase detection reagent, mainly localizes to the outer nuclear layer (ONL) containing photoreceptor cell bodies (Fig. 1A). Higher magnification reveals that staining is particularly strong in the outer part of the ONL and that the RPE does express little β -galactosidase (Fig. 1B), confirming the previously published results using MFGE8 antibodies [14]. There was no endogenous β -galactosidase detection in WT mice (data not shown). We confirmed this staining pattern using RT PCR in separated tissues (Fig. 1C). *Mfge8* mRNA was highly expressed in young and aged neural retina. In the RPE/choroid, basal mRNA expression was significantly lower than in the neural retina. A slight but significant increase in *Mfge8* mRNA expression at 18 month old compared to 3-month-old C57Bl6 mice was observed. Taken together, our results identify photoreceptors as the main source of MFGE8 in the eye and suggest that MFGE8 localization in the RPE cells [14] is due to uptake rather than RPE MFGE8 expression.

MFGE8 and retinal homeostasis

MFGE8 has been shown to be essential in diurnal OS phagocytosis [15] and disturbance of the phagocytosis of spent OS by the RPE, as observed in the RCS rat, leads to photoreceptor degeneration [10]. To evaluate if MFGE8 deficiency alters long-term retinal homeostasis, we first studied the fundoscopic appearance of 16–18 month old *Mfge8*^{+/-} (Fig. 2A) and *Mfge8*^{-/-} (Fig. 2B). Both fundi appeared smooth, devoid of

any remarkable lesions, and similar to each other. Furthermore, histological sections of aged *Mfge8*^{+/-} (Fig. 2C) and *Mfge8*^{-/-} mice (Fig. 2D) showed a regular photoreceptor layer and quantification of the number of photoreceptor cell nuclei layers in the ONL revealed no signs of degeneration from the inferior to the superior pole in *Mfge8*^{-/-} (Fig. 2E grey line) compared to *Mfge8*^{+/-} mice (Fig. 2E black line). Labelling for RPE (phalloidine, red) and subretinal macrophages/microglial cells (IBA1, green) in aged *Mfge8*^{+/-} (Fig. 2F) and *Mfge8*^{-/-} mice (Fig. 2G) showed no morphological abnormalities of RPE cells and no pathological accumulation of phagocytes under the retina. Instead, we found a tendency of decreased subretinal phagocytes in 18-month-old *Mfge8*^{-/-} compared to *Mfge8*^{+/-} (Fig. 2H, quantification of subretinal IBA1 positive cells). Laminar deposits in the BM and Drusen in the RPE/BM complex are early signs of AMD that ultimately impact RPE and photoreceptor health [18,32]. To evaluate if MFGE8 is implicated in homeostasis of BM, we evaluated BM morphology of 16–18 month old *Mfge8*^{+/-} (Fig. 2I and K) and *Mfge8*^{-/-} (Fig. 2J and L) by electron microscopy. Although retina and RPE were ultrastructurally similar, we observed a very modest, but significant thickening of BM in *Mfge8*^{-/-} mice by 22% (Fig. 2M). To evaluate possible differences in genes that are potentially involved in lipid clearance from the BM, we analyzed *Abca1*, *Abca4*, *Ldlr*, *cd36* and *Caveolin1* mRNA in aged *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-}. However, we were not able to detect an influence of MFGE8 on the expression of these genes (Figure S1). Since BM is rich in collagen, and MFGE8 has been shown to promote collagen phagocytosis to prevent reactive fibrosis [33], BM thickening observed in aged *Mfge8*^{-/-} mice could be a result of a reactive fibrosis.

Table 4. Genotype distribution of MFGE8 rs1878326 (M76L) polymorphism in AMD patients and controls.

MFGE8 rs1878326	FCTL, n = 251	FAMD, n = 274	GCTL, n = 263	GAMD, n = 317
AA	108 (43%)	114 (42%)	112 (43%)	113 (35%)
AC	123 (49%)	121 (44%)	116 (44%)	148 (47%)
CC	20 (8%)	39 (14%)	35 (13%)	56 (18%)
MAF	0.32	0.36	0.35	0.41
OR [95%CI]	1.186 [0.919–1.531]		1.271 [1.001–1.613]	
P	0.184		0.053	

MAF: Minor Allele Frequency.

OR: Allelic Odds Ratio with its 95% Confidence Interval.

P: Cochran-Armitage trend test's p-value.

doi:10.1371/journal.pone.0033244.t004

Table 5. Haplotype frequency distributions derived from MFGE8 rs1878326 (M76L) and rs4945 (R3S) polymorphisms in AMD patients and controls.

Polymorphisms		French		German	
rs1878326	rs4945	FCTL (n = 238)	FAMD (n = 269)	GCTL (n = 253)	GAMD (n = 298)
A	C	0.426	0.342	0.355	0.344
A	A	0.252	0.293	0.289	0.245
C	C	0.284	0.299	0.310	0.359
C	A	0.038	0.066	0.045	0.052

doi:10.1371/journal.pone.0033244.t005

MFGE8 and choroidal homeostasis and neovascularization

Although MFGE8 deficiency did not lead to retinal degeneration, disturbances in RPE biology and diminished expression of trophic factors can lead to choroidal involution [16]. However, vascular corrosion casts of 16–18 month old *Mfge8*^{+/-} (Fig. 3 I and D) and *Mfge8*^{-/-} (Fig. 3 B and E) showed no MFGE8-related vascular drop-out, measured as a percentage of intercapillary

area of the total area, (Fig. 3C) or thinning, measured on pericentral, perpendicular sections through the vascular casts (Fig. 3F).

MFGE8 interacts with $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ on vascular endothelium and specifically promotes VEGF-driven ischemic neovascularization *in vivo*, but not bFGF induced neovascularization [8]. Since laser-induced CNV has been shown to be VEGF and integrin dependent [34,35], we quantified CNV in the MFGE8-deficient mice. Interestingly, FITC-dextran perfused choroidal flatmounts at 14 d after laser-induced neovascularization of *Mfge8*^{+/-} (Fig. 3G) and *Mfge8*^{-/-} (Fig. 3H), showed no difference of CNV in the two groups (Fig. 3I). These results are consistent with our recent observation that the promoting function of MFGE8 on development of bladder tumors is not linked with alterations in intra-tumor angiogenesis [36]. Thus, the interactions of MFGE8, integrin dimers and VEGF are possibly tissue dependent.

Discussion

MFGE8s essential role in diurnal OS phagocytosis [15] and critical involvement in VEGF-driven neovascularization [8] make it a candidate gene for an involvement in the pathogenesis of AMD, where photoreceptor degeneration, choroidal involution, or CNV can occur. We here show a suggestive statistical evidence for association of the rs1878326-C allele with increased risk of AMD in two European populations.

To evaluate the influence of MFGE8 dysfunction *in vivo* on retinal homeostasis and CNV we analyzed *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-} mice with ageing and in a model of CNV. We first confirmed that MFGE8 is constitutively expressed by photoreceptors *in vivo*. Interestingly, the suppression of the diurnal peak of OS phagocytosis observed in *Mfge8*^{-/-} mice [15] has very little negative effect on long term chorioretinal homeostasis in 18-month-old knockout mice, apart from a slight thickening of the BM. These findings confirm and extend the lack of retinal degeneration in 12-month-old *Mfge8*^{-/-} mice [37]. Furthermore, even though MFGE8 interacts with $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ on the vascular endothelium and strongly promotes VEGF-driven neovascularization [8], it has no effect on laser-induced CNV which is VEGF and $\alpha v\beta 3$ integrin dependent [34,35].

Taken together, our data shows that MFGE8 is expressed in the retina but not critically involved in retinal homeostasis or CNV. It seems unlikely that it is predominantly involved in the pathogenesis of AMD. Although we present mostly negative results, we feel that this extensive *in vivo* study is of interest to researchers in the field of AMD pathogenesis, due to its exclusion of a high potential candidate gene. We hope that the publication of these negative results are helpful to the community to exclude a valid hypothesis and avoid repetition of expensive research in other laboratories.

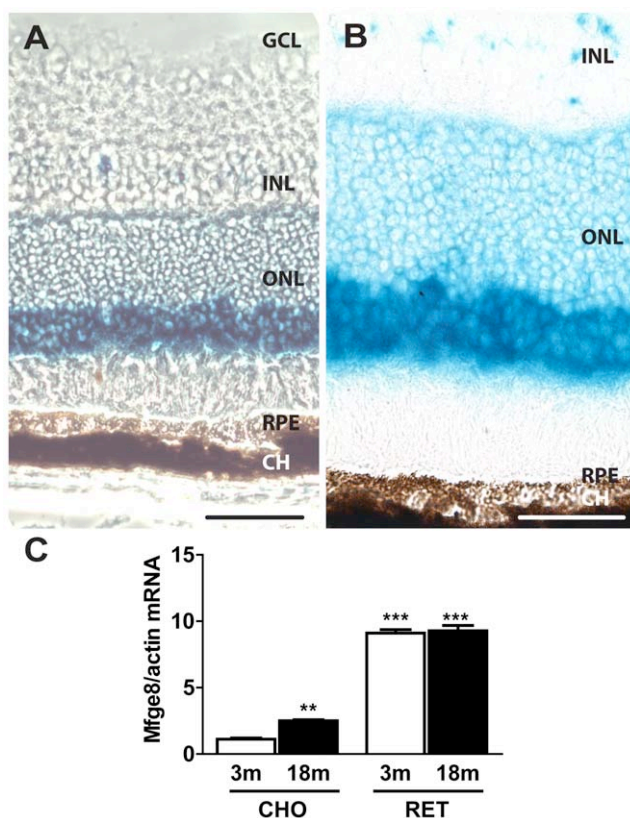


Figure 1. MFGE8 expressing cells in mouse retina. Representative micrographs of β -galactosidase localization in *Mfge8*^{+/-} mice detected by a β -galactosidase detection reagent (blue staining). Phase contrast (A) image and light transmitted (B) image. CH: choroid; GCL: ganglion cell layer; INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer; RPE: retinal pigment epithelium. Experiments were reproduced at least 3 times. Scale bars: 100 μ m (A); 25 μ m (B). *Mfge8* RT PCR in neural retina (RET) and choroid (CHO) at different time points in C57Bl6 mice (3 month old vs 18 month old, n=6/group; Dunnett test with 3 m old CHO as control, **, $P \leq 0.01$ and ***, $P \leq 0.001$). doi:10.1371/journal.pone.0033244.g001

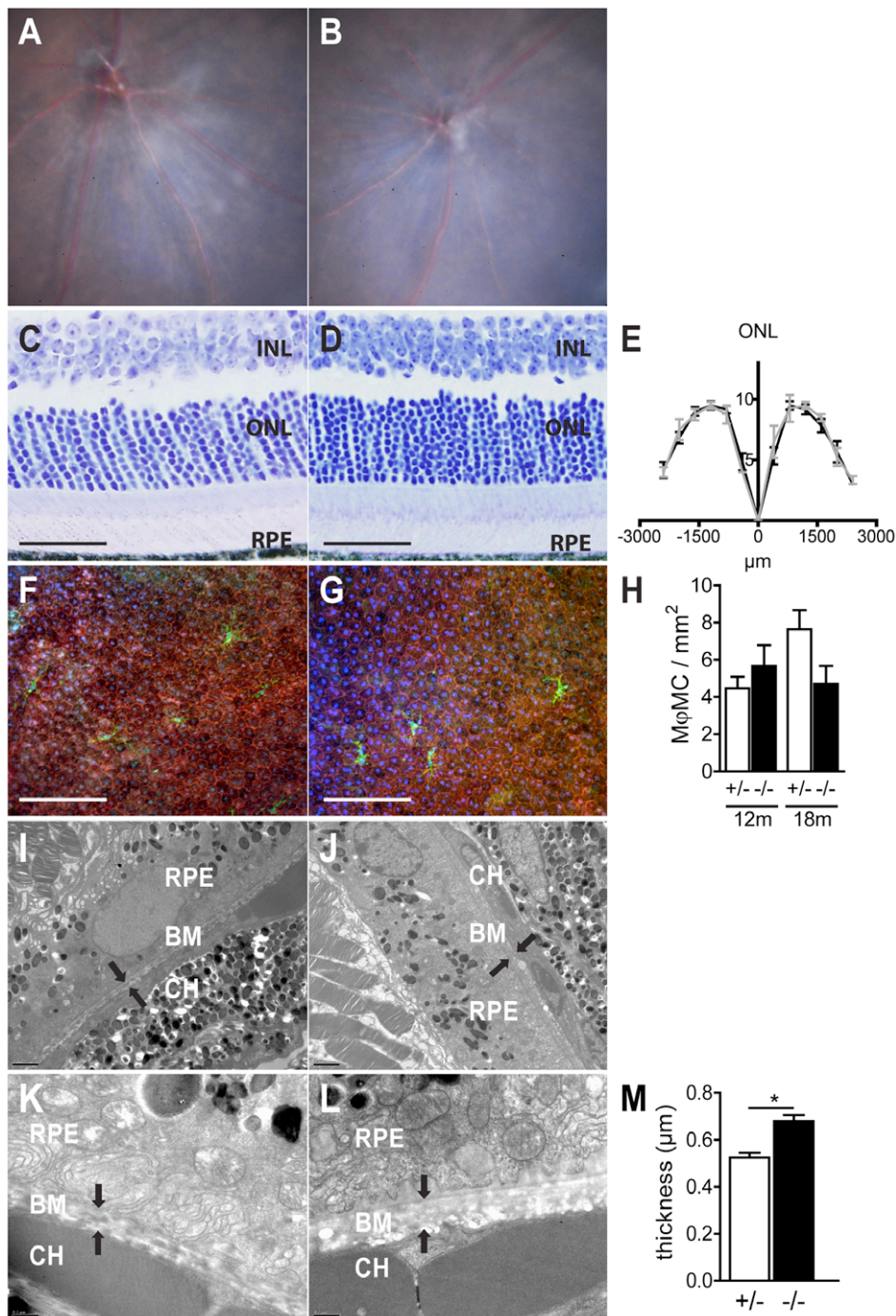


Figure 2. MFGE8 and retinal homeostasis. Fundus photographs of 18 month-old *Mfge8*^{+/-} mice (A) and *Mfge8*^{-/-} mice (B). Histological sections of historesin-embedded eyes from 18 months old *Mfge8*^{+/-} mice (C) and *Mfge8*^{-/-} mice (D). Quantification of the number of photoreceptor cell nuclei layers in the ONL from the inferior to the superior pole in 18 month old *Mfge8*^{-/-} (E grey line) compared to *Mfge8*^{+/-} (E black line, n = 4 mice/group). Rhodamine phalloidine (red) IBA1 (green) stained RPE flatmounts of 18 month-old *Mfge8*^{+/-} mice (F) and *Mfge8*^{-/-} mice (G). Quantification of subretinal macrophages/microglia (Mφ/MC) IBA1 positive cells, (H, n = 6–8 mice/group). Representative transmission electron micrograph of Bruch's membrane (black arrows) of 18 month old *Mfge8*^{+/-} (I and K) and *Mfge8*^{-/-} (J and L) mice. Bruch's membrane thickness measurements in 18 month old *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-} mice (M, $P \leq 0.05$, n = 4 mice/group). INL: inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer; RPE: retinal pigment epithelium; BM: Bruch's membrane; CH: Choroid. Scale bars: 50 μm (C, D), 150 μm (F, G); 2 μm (I, J); 0.5 μm (K, L). doi:10.1371/journal.pone.0033244.g002

Supporting Information

Figure S1 *Abca1*, *Abca4*, *Ldlr*, *Cd36*, *Cav1* RT PCR in choroid/RPE in 16–18 month old *Mfge8*^{-/-} (-/-)

compared to age-matched *Mfge8*^{+/-} (+/-). 8 eyes/group; no statistical difference in all groups. (TIF)

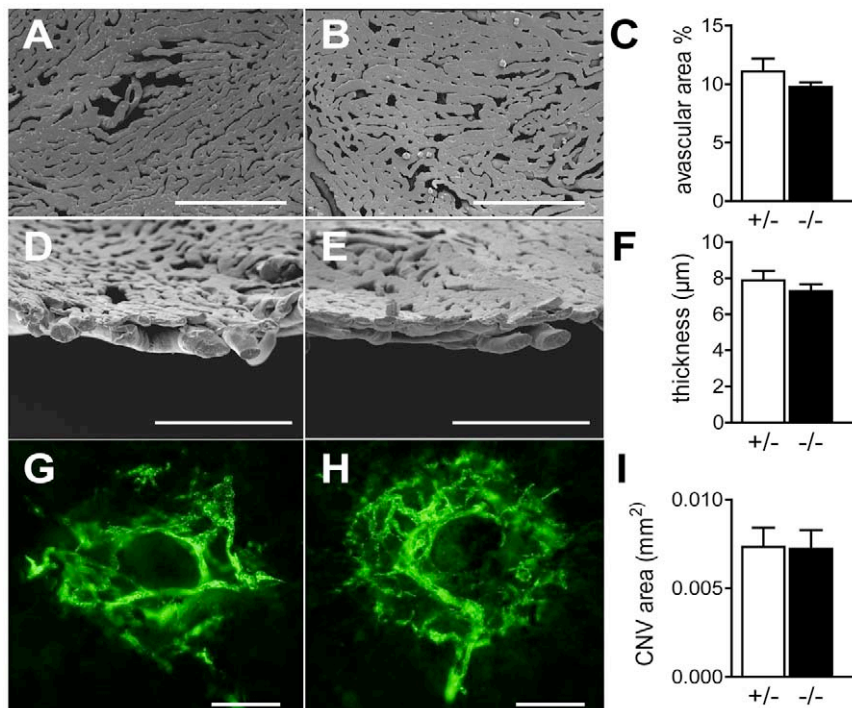


Figure 3. MFGE8 and choroidal homeostasis and neovascularization. Vascular corrosion casts of the retinal aspect of choriocapillaries of 16–18 month old *Mfge8*^{+/-} (A) and *Mfge8*^{-/-} mice (B). Quantification of the avascular intracapillary area in *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-} mice (C, 5 mice/group). Vascular corrosion casts of perpendicularly cut choroid of 16–18 month old *Mfge8*^{+/-} (D) and *Mfge8*^{-/-} (E). Quantification of the thickness of the choriocapillaries in *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-} mice (F, 3 mice/group). FITC-dextran perfused choroidal flatmounts at 14 d after laser-induced neovascularization in *Mfge8*^{+/-} (G) and *Mfge8*^{-/-} (H). Quantification of FITC positive choroidal neovascularizations in *Mfge8*^{+/-} and *Mfge8*^{-/-} mice (I, n=8 mice/group). Scale bars: 200 μm (A, B); 100 μm (D, E); 50 μm (G, H). doi:10.1371/journal.pone.0033244.g003

Acknowledgments

The authors wish to thank Christopher Murray for critical review, Soazig Le Lay and Isabelle Dugail for data analysis and Isabel Le Disquet for scanning electron microscopy.

References

- Ceriani RL, Peterson JA, Lee JY, Moncada R, Blank EW (1983) Characterization of cell surface antigens of human mammary epithelial cells with monoclonal antibodies prepared against human milk fat globule. *Somatic Cell Genet* 9: 415–427.
- Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, Bui A, Yuzuki D, et al. (1990) cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8417–8421.
- Oshima K, Aoki N, Kato T, Kitajima K, Matsuda T (2002) Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur J Biochem* 269: 1209–1218.
- Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, et al. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417: 182–187.
- Jinushi M, Nakazaki Y, Dougan M, Carrasco DR, Mihm M, et al. (2007) MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *J Clin Invest* 117: 1902–1913.
- Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, et al. (2004) Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304: 1147–1150.
- Hu CY, Wu CS, Tsai HF, Chang SK, Tsai WI, et al. (2009) Genetic polymorphism in milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) is associated with systemic lupus erythematosus in human. *Lupus* 18: 676–681.
- Silvestre JS, Thery C, Hamard G, Boddaert J, Aguilar B, et al. (2005) Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* 11: 499–506.
- Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42: 392–403.
- Edwards RB, Szamier RB (1977) Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science* 197: 1001–1003.
- Nandrot E, Dufour EM, Provost AC, Pequignot MO, Bonnel S, et al. (2000) Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol Dis* 7: 586–599.
- D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, et al. (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 9: 645–651.
- Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12932–12937.
- Burgess BL, Abrams TA, Nagata S, Hall MO (2006) MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse. *Mol Vis* 12: 1437–1447.
- Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, et al. (2007) Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12005–12010.
- Houssier M, Raoul W, Lavalette S, Keller N, Guillonnet X, et al. (2008) CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med* 5: e39.
- Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, et al. (2004) Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 122: 564–572.
- Sarks SH (1976) Ageing and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol* 60: 324–341.
- Rosenfeld PJ, Brown DM, Heier JS, Boyer DS, Kaiser PK, et al. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355: 1419–1431.
- Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137: 486–495.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: WR FS. Performed the experiments: WR LP SL SC NK SK BC XG FS FBC SYC HB. Analyzed the data: WR DAT CC CT FS. Wrote the paper: WR FS.

21. Ding X, Patel M, Chan CC (2009) Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 28: 1–18.
22. Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, Chakravarthy U, Seland J, et al. (2006) Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch Ophthalmol* 124: 529–535.
23. Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, et al. (1995) An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39: 367–374.
24. Vinding T, Appleyard M, Nyboe J, Jensen G (1992) Risk factor analysis for atrophic and exudative age-related macular degeneration. An epidemiological study of 1000 aged individuals. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 70: 66–72.
25. Klein R, Klein BE, Linton KL, DeMets DL (1993) The Beaver Dam Eye Study: the relation of age-related maculopathy to smoking. *Am J Epidemiol* 137: 190–200.
26. Combadiere C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Roderio M, et al. (2007) CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 117: 2920–2928.
27. Baatz H, Poupel L, Coudert M, Sennlaub F, Combadiere C (2009) [Polymorphisms of complement factor genes and age-related macular degeneration in a German population]. *Klin Monbl Augenheilkd* 226: 654–658.
28. Sasieni PD (1997) From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53: 1253–1261.
29. Tregouet DA, Garelle V (2007) A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinformatics* 23: 1038–1039.
30. Paques M, Guyomard JL, Simonutti M, Roux MJ, Picaud S, et al. (2007) Panretinal, high-resolution color photography of the mouse fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2769–2774.
31. Swaroop A, Branham KE, Chen W, Abecasis G (2007) Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2: R174–182.
32. Green WR, Enger C (1993) Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 100: 1519–1535.
33. Atabai K, Jame S, Azhar N, Kuo A, Lam M, et al. (2009) Mfge8 diminishes the severity of tissue fibrosis in mice by binding and targeting collagen for uptake by macrophages. *J Clin Invest* 119: 3713–3722.
34. Kwak N, Okamoto N, Wood JM, Campochiaro PA (2000) VEGF is major stimulator in model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3158–3164.
35. Kamizuru H, Kimura H, Yasukawa T, Tabata Y, Honda Y, et al. (2001) Monoclonal antibody-mediated drug targeting to choroidal neovascularization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2664–2672.
36. Sugano G, Bernard-Pierrot I, Lac M, Battail C, Allory Y, et al. (2010) Milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII (MFGE8)/lactadherin promotes bladder tumor development. *Oncogene* 30: 642–653.
37. Nandrot EF, Finnemann SC (2008) Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Res* 40: 120–123.

Références

- Aiello, R.J., P.A. Bourassa, S. Lindsey, W. Weng, E. Natoli, B.J. Rollins, and P.M. Milos. 1999. Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1518-1525.
- Aiello, R.J., B.D. Perry, P.A. Bourassa, A. Robertson, W. Weng, D.R. Knight, A.H. Smith, K.S. Frederick, A. Kalgutkar, and R.P. Gladue. 2010. CCR2 receptor blockade alters blood monocyte subpopulations but does not affect atherosclerotic lesions in apoE(-/-) mice. *Atherosclerosis.* 208:370-375.
- Alcami, A. 2007. New insights into the subversion of the chemokine system by poxviruses. *Eur J Immunol.* 37:880-883.
- An, G., H. Wang, R. Tang, T. Yago, J.M. McDaniel, S. McGee, Y. Huo, and L. Xia. 2008. P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation.* 117:3227-3237.
- Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S.K. Shaw, F.W. Luscinskas, and D. Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med.* 197:1701-1707.
- Ancuta, P., J. Wang, and D. Gabuzda. 2006. CD16+ monocytes produce IL-6, CCL2, and matrix metalloproteinase-9 upon interaction with CX3CL1-expressing endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 80:1156-1164.
- Andre, F., N. Cabioglu, H. Assi, J.C. Sabourin, S. Delaloge, A. Sahin, K. Broglio, J.P. Spano, C. Combadiere, C. Bucana, J.C. Soria, and M. Cristofanilli. 2006. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol.* 17:945-951.
- Angiolillo, A.L., C. Sgadari, D.D. Taub, F. Liao, J.M. Farber, S. Maheshwari, H.K. Kleinman, G.H. Reaman, and G. Tosato. 1995. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med.* 182:155-162.
- Arnold, L., A. Henry, F. Poron, Y. Baba-Amer, N. van Rooijen, A. Plonquet, R.K. Gherardi, and B. Chazaud. 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med.* 204:1057-1069.
- Aslanian, A.M., and I.F. Charo. 2006. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis. *Circulation.* 114:583-590.
- Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elaine, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, and F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 317:666-670.
- Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 27:669-692.
- Baeten, D., H.J. Moller, J. Delanghe, E.M. Veys, S.K. Moestrup, and F. De Keyser. 2004. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis Rheum.* 50:1611-1623.
- Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 392:565-568.
- Baigent, C., A. Keech, P.M. Kearney, L. Blackwell, G. Buck, C. Pollicino, A. Kirby, T. Sourjina, R. Peto, R. Collins, and R. Simes. 2005. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet.* 366:1267-1278.
- Barlic, J., and P.M. Murphy. 2007. Chemokine regulation of atherosclerosis. *J Leukoc Biol.* 82:226-236.
- Belge, K.U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 168:3536-3542.
- Benkirane, M., D.Y. Jin, R.F. Chun, R.A. Koup, and K.T. Jeang. 1997. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem.* 272:30603-30606.

- Bogdan, C., J. Paik, Y. Vodovotz, and C. Nathan. 1992. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem.* 267:23301-23308.
- Boger, C.A., M. Fischereder, M. Deinzer, C. Aslanidis, G. Schmitz, M. Stubanus, B. Banas, B. Kruger, G.A. Riegger, and B.K. Kramer. 2005. RANTES gene polymorphisms predict all-cause and cardiac mortality in type 2 diabetes mellitus hemodialysis patients. *Atherosclerosis.* 183:121-129.
- Boisvert, W.A., D.M. Rose, K.A. Johnson, M.E. Fuentes, S.A. Lira, L.K. Curtiss, and R.A. Terkeltaub. 2006. Up-regulated expression of the CXCR2 ligand KC/GRO-alpha in atherosclerotic lesions plays a central role in macrophage accumulation and lesion progression. *Am J Pathol.* 168:1385-1395.
- Boisvert, W.A., R. Santiago, L.K. Curtiss, and R.A. Terkeltaub. 1998. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 101:353-363.
- Boring, L., J. Gosling, M. Cleary, and I.F. Charo. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 394:894-897.
- Bouhlef, M.A., B. Derudas, E. Rigamonti, R. Dievart, J. Brozek, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, G. Torpier, N. Marx, B. Staels, and G. Chinetti-Gbaguidi. 2007. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 6:137-143.
- Braunersreuther, V., S. Steffens, C. Arnaud, G. Pelli, F. Burger, A. Proudfoot, and F. Mach. 2008. A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1090-1096.
- Braunersreuther, V., A. Zerneck, C. Arnaud, E.A. Liehn, S. Steffens, E. Shagdarsuren, K. Bidzhekov, F. Burger, G. Pelli, B. Luckow, F. Mach, and C. Weber. 2007. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:373-379.
- Breland, U.M., A.E. Michelsen, M. Skjelland, L. Folkersen, K. Krohg-Sorensen, D. Russell, T. Ueland, A. Yndestad, G. Paulsson-Berne, J.K. Damas, E. Oie, G.K. Hansson, B. Halvorsen, and P. Aukrust. 2010. Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation. *Cardiovasc Res.* 86:265-273.
- Butcher, E.C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell.* 67:1033-1036.
- Chapman, C.M., J.P. Beilby, B.M. McQuillan, P.L. Thompson, and J. Hung. 2004. Monocyte count, but not C-reactive protein or interleukin-6, is an independent risk marker for subclinical carotid atherosclerosis. *Stroke.* 35:1619-1624.
- Charo, I.F., and R.M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 354:610-621.
- Cinamon, G., V. Shinder, R. Shamri, and R. Alon. 2004. Chemoattractant signals and beta 2 integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. *J Immunol.* 173:7282-7291.
- Clore, G.M., and A.M. Gronenborn. 1995. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *FASEB J.* 9:57-62.
- Cochain, C., C. Auvynet, L. Poupel, J. Vilar, E. Dumeau, A. Richart, A. Recalde, Y. Zouggar, K.Y. Yin, P. Bruneval, G. Renault, C. Marchiol, P. Bonnin, B. Levy, R. Bonecchi, M. Locati, C. Combadiere, and J.S. Silvestre. 2012. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:2206-2213.
- Collins, R.G., R. Velji, N.V. Guevara, M.J. Hicks, L. Chan, and A.L. Beaudet. 2000. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 191:189-194.

- Combadiere, C., S. Potteaux, J.L. Gao, B. Esposito, S. Casanova, E.J. Lee, P. Debre, A. Tedgui, P.M. Murphy, and Z. Mallat. 2003. Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in CX3CR1/Apolipoprotein E Double Knockout Mice. *Circulation*. 107:1009-1016.
- Combadiere, C., S. Potteaux, M. Rodero, T. Simon, A. Pezard, B. Esposito, R. Merval, A. Proudfoot, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2008. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 117:1649-1657.
- Connolly, S., M. Skrinjar, and A. Rosendahl. 2012. Orally bioavailable allosteric CCR8 antagonists inhibit dendritic cell, T cell and eosinophil migration. *Biochem Pharmacol*. 83:778-787.
- Connor, R.I., L. Shen, and M.W. Fanger. 1990. Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of Fc gamma RI and Fc gamma RII and the effects of cytokines at the single cell level. *J Immunol*. 145:1483-1489.
- Constantin, G., M. Majeed, C. Giagulli, L. Piccio, J.Y. Kim, E.C. Butcher, and C. Laudanna. 2000. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*. 13:759-769.
- Crump, M.P., J.H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J.L. Virelizier, M. Baggiolini, B.D. Sykes, and I. Clark-Lewis. 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.
- Cybulsky, M.I., and R.A. Hegele. 2003. The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest*. 111:1118-1120.
- Cybulsky, M.I., K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J.C. Gutierrez-Ramos, P.W. Connelly, and D.S. Milstone. 2001. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 107:1255-1262.
- Damaj, B.B., S.R. McColl, K. Neote, N. Songqing, K.T. Ogborn, C.A. Hebert, and P.H. Naccache. 1996. Identification of G-protein binding sites of the human interleukin-8 receptors by functional mapping of the intracellular loops. *FASEB J*. 10:1426-1434.
- Danenberg, H.D., I. Fishbein, J. Gao, J. Monkkonen, R. Reich, I. Gati, E. Moerman, and G. Golomb. 2002. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation*. 106:599-605.
- Darbandi-Tehrani, K., P. Hermand, S. Carvalho, K. Dorgham, A. Couvineau, J.J. Lacapere, C. Combadiere, and P. Deterre. 2010. Subtle conformational changes between CX3CR1 genetic variants as revealed by resonance energy transfer assays. *FASEB J*. 24:4585-4598.
- Desvarieux, M., R.T. Demmer, T. Rundek, B. Boden-Albala, D.R. Jacobs, Jr., R.L. Sacco, and P.N. Papapanou. 2005. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation*. 111:576-582.
- Devalaraja, R.M., L.B. Nanney, J. Du, Q. Qian, Y. Yu, M.N. Devalaraja, and A. Richmond. 2000. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol*. 115:234-244.
- Doitsidou, M., M. Reichman-Fried, J. Stebler, M. Kopranner, J. Dorries, D. Meyer, C.V. Esguerra, T. Leung, and E. Raz. 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell*. 111:647-659.
- Dong, Z.M., S.M. Chapman, A.A. Brown, P.S. Frenette, R.O. Hynes, and D.D. Wagner. 1998. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 102:145-152.
- Dorgham, K., A. Ghadiri, P. Hermand, M. Rodero, L. Poupel, M. Iga, O. Hartley, G. Gorochoy, C. Combadiere, and P. Deterre. 2009. An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity. *J Leukoc Biol*. 86:903-911.
- Ellery, P.J., E. Tippet, Y.L. Chiu, G. Paukovics, P.U. Cameron, A. Solomon, S.R. Lewin, P.R. Gorry, A. Jaworowski, W.C. Greene, S. Sonza, and S.M. Crowe. 2007. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol*. 178:6581-6589.
- Evans, R., I. Patzak, L. Svensson, K. De Filippo, K. Jones, A. McDowall, and N. Hogg. 2009. Integrins in immunity. *J Cell Sci*. 122:215-225.

- Fatkenheuer, G., A.L. Pozniak, M.A. Johnson, A. Plettenberg, S. Staszewski, A.I. Hoepelman, M.S. Saag, F.D. Goebel, J.K. Rockstroh, B.J. Dezube, T.M. Jenkins, C. Medhurst, J.F. Sullivan, C. Ridgway, S. Abel, I.T. James, M. Youle, and E. van der Ryst. 2005. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med*. 11:1170-1172.
- Fazio, S., D.A. Sanan, Y.L. Lee, Z.S. Ji, R.W. Mahley, and S.C. Rall, Jr. 1994. Susceptibility to diet-induced atherosclerosis in transgenic mice expressing a dysfunctional human apolipoprotein E(Arg 112,Cys142). *Arterioscler Thromb*. 14:1873-1879.
- Fong, A.M., L.A. Robinson, D.A. Steeber, T.F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai, and D.D. Patel. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*. 188:1413-1419.
- Frankenberger, M., T. Sternsdorf, H. Pechumer, A. Pforte, and H.W. Ziegler-Heitbrock. 1996. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 87:373-377.
- Fumagalli, S., C. Perego, F. Ortolano, and M.G. De Simoni. 2013. CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. *Glia*. 61:827-842.
- Galkina, E., B.L. Harry, A. Ludwig, E.A. Liehn, J.M. Sanders, A. Bruce, C. Weber, and K. Ley. 2007. CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall. *Circulation*. 116:1801-1811.
- Galkina, E., and K. Ley. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 27:165-197.
- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19:71-82.
- Gerrity, R.G., H.K. Naito, M. Richardson, and C.J. Schwartz. 1979. Dietary induced atherogenesis in swine. Morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol*. 95:775-792.
- Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M.F. Mehler, S.J. Conway, L.G. Ng, E.R. Stanley, I.M. Samokhvalov, and M. Merad. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 330:841-845.
- Glagov, S., E. Weisenberg, C.K. Zarins, R. Stankunavicius, and G.J. Kolettis. 1987. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 316:1371-1375.
- Glass, C.K., and J.L. Witztum. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 104:503-516.
- Gonzalez, P., R. Alvarez, A. Batalla, J.R. Reguero, V. Alvarez, A. Astudillo, G.I. Cubero, A. Cortina, and E. Coto. 2001. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infarction. *Genes Immun*. 2:191-195.
- Gordon, S., and P.R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 5:953-964.
- Gourdy, P., Z. Mallat, C. Castano, B. Garmy-Susini, J.L. Mac Gregor, A. Tedgui, J.F. Arnal, and F. Bayard. 2003. The atheroprotective effect of 17 beta-estradiol is not altered in P-selectin- or ICAM-1-deficient hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis*. 166:41-48.
- Greaves, D.R., and S. Gordon. 2001. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *Trends Immunol*. 22:180-181.
- Grone, H.J., C. Weber, K.S. Weber, E.F. Grone, T. Rabelink, C.M. Klier, T.N. Wells, A.E. Proudfoot, D. Schlondorff, and P.J. Nelson. 1999. Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J*. 13:1371-1383.
- Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, and B.J. Rollins. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*. 2:275-281.
- Guo, J., V. de Waard, M. Van Eck, R.B. Hildebrand, E.J. van Wanrooij, J. Kuiper, N. Maeda, G.M. Benson, P.H. Groot, and T.J. Van Berkel. 2005. Repopulation of apolipoprotein E knockout mice with CCR2-deficient bone marrow progenitor cells does not inhibit ongoing atherosclerotic lesion development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:1014-1019.

- Guo, J., M. Van Eck, J. Twisk, N. Maeda, G.M. Benson, P.H. Groot, and T.J. Van Berkel. 2003. Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:447-453.
- Handel, T.M., Z. Johnson, D.H. Rodrigues, A.C. Dos Santos, R. Cirillo, V. Muzio, S. Riva, M. Mack, M. Deruaz, F. Borlat, P.A. Vitte, T.N. Wells, M.M. Teixeira, and A.E. Proudfoot. 2008. An engineered monomer of CCL2 has anti-inflammatory properties emphasizing the importance of oligomerization for chemokine activity in vivo. *J Leukoc Biol.* 84:1101-1108.
- Hardtke, S., L. Ohl, and R. Forster. 2005. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood.* 106:1924-1931.
- Heidemann, J., H. Ogawa, M.B. Dwinell, P. Rafiee, C. Maaser, H.R. Gockel, M.F. Otterson, D.M. Ota, N. Lugering, W. Domschke, and D.G. Binion. 2003. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem.* 278:8508-8515.
- Heine, G.H., C. Ulrich, E. Seibert, S. Seiler, J. Marell, B. Reichart, M. Krause, A. Schlitt, H. Kohler, and M. Girndt. 2008. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int.* 73:622-629.
- Hermand, P., F. Pincet, S. Carvalho, H. Ansanay, E. Trinquet, M. Daoudi, C. Combadiere, and P. Deterre. 2008. Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain. *J Biol Chem.* 283:30225-30234.
- Horuk, R. 2009. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. *Nat Rev Drug Discov.* 8:23-33.
- Huby, T., C. Doucet, C. Dachet, B. Ouzilleau, Y. Ueda, V. Afzal, E. Rubin, M.J. Chapman, and P. Lesnik. 2006. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest.* 116:2767-2776.
- Huo, Y., A. Schober, S.B. Forlow, D.F. Smith, M.C. Hyman, S. Jung, D.R. Littman, C. Weber, and K. Ley. 2003. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 9:61-67.
- Ibrahim, A.I., M.T. Obeid, M.J. Jouma, G.A. Moasis, W.L. Al-Richane, I. Kindermann, M. Boehm, K. Roemer, N. Mueller-Lantzsch, and B.C. Gartner. 2005. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in atherosclerotic plaques and in unaffected bypass grafts. *J Clin Virol.* 32:29-32.
- Ikeda, U., K. Matsui, Y. Murakami, and K. Shimada. 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol.* 25:143-147.
- Ishibashi, S., J.L. Goldstein, M.S. Brown, J. Herz, and D.K. Burns. 1994. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 93:1885-1893.
- Ishida, Y., T. Hayashi, T. Goto, A. Kimura, S. Akimoto, N. Mukaida, and T. Kondo. 2008. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol.* 181:4208-4218.
- Jamerson, K., M.A. Weber, G.L. Bakris, B. Dahlof, B. Pitt, V. Shi, A. Hester, J. Gupte, M. Gatlin, and E.J. Velazquez. 2008. Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients. *N Engl J Med.* 359:2417-2428.
- Jaworowski, A., D.D. Kamwendo, P. Ellery, S. Sonza, V. Mwapasa, E. Tadesse, M.E. Molyneux, S.J. Rogerson, S.R. Meshnick, and S.M. Crowe. 2007. CD16+ monocyte subset preferentially harbors HIV-1 and is expanded in pregnant Malawian women with Plasmodium falciparum malaria and HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 196:38-42.
- Jenkins, S.J., D. Ruckerl, P.C. Cook, L.H. Jones, F.D. Finkelman, N. van Rooijen, A.S. MacDonald, and J.E. Allen. 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* 332:1284-1288.

- Johnson, R.C., S.M. Chapman, Z.M. Dong, J.M. Ordovas, T.N. Mayadas, J. Herz, R.O. Hynes, E.J. Schaefer, and D.D. Wagner. 1997. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* 99:1037-1043.
- Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, and D.R. Littman. 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.
- Kakuta, Y., M. Okumi, S. Miyagawa, K. Tsutahara, T. Abe, K. Yazawa, K. Matsunami, H. Otsuka, S. Takahara, and N. Nonomura. 2012. Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection. *Transplantation.* 93:24-31.
- Kansas, G.S. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 88:3259-3287.
- Karlmak, K.R., H.W. Zimmermann, C. Roderburg, N. Gassler, H.E. Wasmuth, T. Luedde, C. Trautwein, and F. Tacke. 2010. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology.* 52:1769-1782.
- Keane, M.P., J.A. Belperio, Y.Y. Xue, M.D. Burdick, and R.M. Strieter. 2004. Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. *J Immunol.* 172:2853-2860.
- Koch, A.E., S.L. Kunkel, W.H. Pearce, M.R. Shah, D. Parikh, H.L. Evanoff, G.K. Haines, M.D. Burdick, and R.M. Strieter. 1993. Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 in human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* 142:1423-1431.
- Kraft, K., H. Olbrich, I. Majoul, M. Mack, A. Proudfoot, and M. Oppermann. 2001. Characterization of sequence determinants within the carboxyl-terminal domain of chemokine receptor CCR5 that regulate signaling and receptor internalization. *J Biol Chem.* 276:34408-34418.
- Krutzik, S.R., B. Tan, H. Li, M.T. Ochoa, P.T. Liu, S.E. Sharfstein, T.G. Graeber, P.A. Sieling, Y.J. Liu, T.H. Rea, B.R. Bloom, and R.L. Modlin. 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 11:653-660.
- Kuziel, W.A., T.C. Dawson, M. Quinones, E. Garavito, G. Chenuaux, S.S. Ahuja, R.L. Reddick, and N. Maeda. 2003. CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherosclerosis in apoE knockout mice. *Atherosclerosis.* 167:25-32.
- Kwon, T.W., D.K. Kim, J.S. Ye, W.J. Lee, M.S. Moon, C.H. Joo, H. Lee, and Y.K. Kim. 2004. Detection of enterovirus, cytomegalovirus, and Chlamydia pneumoniae in atheromas. *J Microbiol.* 42:299-304.
- Laframboise, W.A., R. Dhir, L.A. Kelly, P. Petrosko, J.M. Krill-Burger, C.M. Sciulli, M.A. Lyons-Weiler, U.R. Chandran, A. Lomakin, R.V. Masterson, O.C. Marroquin, S.R. Mulukutla, and D.M. McNamara. 2012. Serum protein profiles predict coronary artery disease in symptomatic patients referred for coronary angiography. *BMC Med.* 10:157.
- Landsman, L., L. Bar-On, A. Zerneck, K.W. Kim, R. Krauthgamer, E. Shagdarsuren, S.A. Lira, I.L. Weissman, C. Weber, and S. Jung. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherosclerosis by promoting cell survival. *Blood.* 113:963-972.
- Lapham, C.K., M.B. Zaitseva, S. Lee, T. Romanstseva, and H. Golding. 1999. Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat Med.* 5:303-308.
- Laudanna, C., J.Y. Kim, G. Constantin, and E. Butcher. 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev.* 186:37-46.
- Lavergne, E., B. Combadiere, O. Bonduelle, M. Iga, J.L. Gao, M. Maho, A. Boissonnas, P.M. Murphy, P. Debre, and C. Combadiere. 2003. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res.* 63:7468-7474.
- Lawrence, M.B., and T.A. Springer. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 65:859-873.

- Lefevre, L., A. Gales, D. OLAGNIE, J. Bernad, L. Perez, R. Burcelin, A. Valentin, J. Auwerx, B. Pipy, and A. Coste. 2010. PPARgamma ligands switched high fat diet-induced macrophage M2b polarization toward M2a thereby improving intestinal Candida elimination. *PLoS One*. 5:e12828.
- Lefort, C.T., and K. Ley. 2012. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*. 3:157.
- Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 111:333-340.
- Leuschner, F., P.J. Rauch, T. Ueno, R. Gorbato, B. Marinelli, W.W. Lee, P. Dutta, Y. Wei, C. Robbins, Y. Iwamoto, B. Sena, A. Chudnovskiy, P. Panizzi, E. Keliher, J.M. Higgins, P. Libby, M.A. Moskowitz, M.J. Pittet, F.K. Swirski, R. Weissleder, and M. Nahrendorf. 2012. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med*. 209:123-137.
- Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 7:678-689.
- Liao, F., J.A. Berliner, M. Mehrabian, M. Navab, L.L. Demer, A.J. Lusis, and A.M. Fogelman. 1991. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest*. 87:2253-2257.
- Libby, P., D. Egan, and S. Skarlatos. 1997. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation*. 96:4095-4103.
- Liu, K., and M.C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*. 234:45-54.
- Liu, P., S. Patil, M. Rojas, A.M. Fong, S.S. Smyth, and D.D. Patel. 2006. CX3CR1 deficiency confers protection from intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:2056-2062.
- Liu, P., Y.R. Yu, J.A. Spencer, A.E. Johnson, C.T. Vallanat, A.M. Fong, C. Patterson, and D.D. Patel. 2008. CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28:243-250.
- Locati, M., E. Riboldi, K. Otero, F.O. Martinez, F. Riva, P. Perrier, S. Baviera, P. Signorelli, R. Bonocchi, P. Allavena, S. Sozzani, and A. Mantovani. 2001. Regulation of the chemokine system at the level of chemokine receptor expression and signaling activity. *Immunobiology*. 204:536-542.
- Lodowski, D.T., and K. Palczewski. 2009. Chemokine receptors and other G protein-coupled receptors. *Curr Opin HIV AIDS*. 4:88-95.
- Loetscher, P., and I. Clark-Lewis. 2001. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol*. 69:881-884.
- Long, E.O. 2011. ICAM-1: getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol*. 186:5021-5023.
- Lucas, A.D., C. Bursill, T.J. Guzik, J. Sadowski, K.M. Channon, and D.R. Greaves. 2003. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation*. 108:2498-2504.
- Lucas, A.D., and D.R. Greaves. 2001. Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med*. 3:1-18.
- Ludwig, A., T. Berkhout, K. Moores, P. Groot, and G. Chapman. 2002. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol*. 168:604-612.
- Ludwig, A., and C. Weber. 2007. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost*. 97:694-703.
- Lusis, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature*. 407:233-241.
- Mahalingam, S., and G. Karupiah. 1999. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol*. 77:469-475.

- Maione, T.E., G.S. Gray, J. Petro, A.J. Hunt, A.L. Donner, S.I. Bauer, H.F. Carson, and R.J. Sharpe. 1990. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science*. 247:77-79.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 25:677-686.
- Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 27:451-483.
- McDermott, D.H., A.M. Fong, Q. Yang, J.M. Sechler, L.A. Cupples, M.N. Merrell, P.W. Wilson, R.B. D'Agostino, C.J. O'Donnell, D.D. Patel, and P.M. Murphy. 2003. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest*. 111:1241-1250.
- McDermott, D.H., J.P. Halcox, W.H. Schenke, M.A. Wacławski, M.N. Merrell, N. Epstein, A.A. Quyyumi, and P.M. Murphy. 2001. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res*. 89:401-407.
- Mestas, J., M.D. Burdick, K. Reckamp, A. Pantuck, R.A. Figlin, and R.M. Strieter. 2005. The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol*. 175:5351-5357.
- Middleton, J., L. Americh, R. Gayon, D. Julien, L. Aguilar, F. Amalric, and J.P. Girard. 2004. Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther*. 6:60-72.
- Misslitz, A., O. Pabst, G. Hintzen, L. Ohl, E. Kremmer, H.T. Petrie, and R. Forster. 2004. Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med*. 200:481-491.
- Moatti, D., S. Faure, F. Fumeron, W. Amara Mel, P. Seknadji, D.H. McDermott, P. Debre, M.C. Aumont, P.M. Murphy, D. de Prost, and C. Combadiere. 2001. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood*. 97:1925-1928.
- Moreau, M., I. Brocheriou, L. Petit, E. Ninio, M.J. Chapman, and M. Rouis. 1999. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation*. 99:420-426.
- Moser, B., and K. Willmann. 2004. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*. 63 Suppl 2:ii84-ii89.
- Mosi, R.M., V. Anastassova, J. Cox, M.C. Darkes, S.R. Idzan, J. Labrecque, G. Lau, K.L. Nelson, K. Patel, Z. Santucci, R.S. Wong, R.T. Skerlj, G.J. Bridger, D. Huskens, D. Schols, and S.P. Fricker. 2012. The molecular pharmacology of AMD11070: an orally bioavailable CXCR4 HIV entry inhibitor. *Biochem Pharmacol*. 83:472-479.
- Mosser, D.M., and E. Handman. 1992. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol*. 52:369-376.
- Mosser, D.M., and X. Zhang. 2008. Activation of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 14:Unit 14 12.
- Mueller, A., N.G. Mahmoud, and P.G. Strange. 2006. Diverse signalling by different chemokines through the chemokine receptor CCR5. *Biochem Pharmacol*. 72:739-748.
- Murdoch, C., and A. Finn. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 95:3032-3043.
- Murooka, T.T., M.M. Wong, R. Rahbar, B. Majchrzak-Kita, A.E. Proudfoot, and E.N. Fish. 2006. CCL5-CCR5-mediated apoptosis in T cells: Requirement for glycosaminoglycan binding and CCL5 aggregation. *J Biol Chem*. 281:25184-25194.
- Murphy, P.M. 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat Immunol*. 2:116-122.
- Napoli, C., F.P. D'Armiento, F.P. Mancini, A. Postiglione, J.L. Witztum, G. Palumbo, and W. Palinski. 1997. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by

- maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 100:2680-2690.
- Neel, N.F., E. Schutyser, J. Sai, G.H. Fan, and A. Richmond. 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:637-658.
- Niessner, A., R. Marculescu, H. Kvakan, A. Haschemi, G. Endler, C.M. Weyand, G. Maurer, C. Mannhalter, J. Wojta, O. Wagner, and K. Huber. 2005. Fractalkine receptor polymorphisms V249I and T280M as genetic risk factors for restenosis. *Thromb Haemost.* 94:1251-1256.
- Nozawa, N., K. Hibi, M. Endo, T. Sugano, T. Ebina, M. Kosuge, K. Tsukahara, J. Okuda, S. Umemura, and K. Kimura. 2010. Association between circulating monocytes and coronary plaque progression in patients with acute myocardial infarction. *Circ J.* 74:1384-1391.
- Nukiwa, M., S. Andarini, J. Zaini, H. Xin, M. Kanehira, T. Suzuki, T. Fukuhara, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Saijo, T. Nukiwa, and T. Kikuchi. 2006. Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors. *Eur J Immunol.* 36:1019-1027.
- Olzinski, A.R., G.H. Turner, R.E. Bernard, H. Karr, C.A. Cornejo, K. Aravindhan, B. Hoang, M.A. Ringenberg, P. Qin, K.B. Goodman, R.N. Willette, C.H. Macphee, B.M. Jucker, C.A. Sehon, and P.J. Gough. 2010. Pharmacological inhibition of C-C chemokine receptor 2 decreases macrophage infiltration in the aortic root of the human C-C chemokine receptor 2/apolipoprotein E^{-/-} mouse: magnetic resonance imaging assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:253-259.
- Ortlepp, J.R., K. Vesper, V. Mevissen, F. Schmitz, U. Janssens, A. Franke, P. Hanrath, C. Weber, K. Zerres, and R. Hoffmann. 2003. Chemokine receptor (CCR2) genotype is associated with myocardial infarction and heart failure in patients under 65 years of age. *J Mol Med (Berl).* 81:363-367.
- Paigen, B., P.A. Holmes, D. Mitchell, and D. Albee. 1987. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis.* 64:215-221.
- Panzer, U., A. Schneider, J. Wilken, D.A. Thompson, S.B. Kent, and R.A. Stahl. 1999. The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56:2107-2115.
- Paolini, J.F., D. Willard, T. Consler, M. Luther, and M.S. Krangel. 1994. The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations. *J Immunol.* 153:2704-2717.
- Parks, W.C., C.L. Wilson, and Y.S. Lopez-Boado. 2004. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 4:617-629.
- Parsey, M.V., and G.K. Lewis. 1993. Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells. *J Immunol.* 151:1881-1893.
- Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 74:2527-2534.
- Patel, S.S., R. Thiagarajan, J.T. Willerson, and E.T. Yeh. 1998. Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation.* 97:75-81.
- Peng, Y., Y. Latchman, and K.B. Elkon. 2009. Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1. *J Immunol.* 182:2777-2785.
- Petrkova, J., Z. Cermakova, J. Drabek, J. Lukl, and M. Petrek. 2003. CC chemokine receptor (CCR)2 polymorphism in Czech patients with myocardial infarction. *Immunol Lett.* 88:53-55.
- Petrkova, J., Z. Cermakova, J. Lukl, and M. Petrek. 2005. CC chemokine receptor 5 (CCR5) deletion polymorphism does not protect Czech males against early myocardial infarction. *J Intern Med.* 257:564-566.
- Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C.M. Ballantyne, and P. Kubes. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 203:2569-2575.

- Postea, O., E.M. Vasina, S. Cauwenberghs, D. Projahn, E.A. Liehn, D. Lievens, W. Theelen, B.K. Kramp, E.D. Butoi, O. Soehnlein, J.W. Heemskerk, A. Ludwig, C. Weber, and R.R. Koenen. 2012. Contribution of Platelet CX3CR1 to Platelet-Monocyte Complex Formation and Vascular Recruitment During Hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:1186-1193.
- Potteaux, S., C. Combadiere, B. Esposito, S. Casanova, R. Merval, P. Ardouin, J.L. Gao, P.M. Murphy, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2005. Chemokine receptor CCR1 disruption in bone marrow cells enhances atherosclerotic lesion development and inflammation in mice. *Mol Med.* 11:16-20.
- Potteaux, S., C. Combadiere, B. Esposito, C. Lecureuil, H. Ait-Oufella, R. Merval, P. Ardouin, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2006. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1858-1863.
- Poupel, L., and C. Combadiere. 2010. [Atherosclerosis : on the trail of chemokines]. *Biol Aujourd'hui.* 204:285-293.
- Proudfoot, A.E., R. Buser, F. Borlat, S. Alouani, D. Soler, R.E. Offord, J.M. Schroder, C.A. Power, and T.N. Wells. 1999. Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. *J Biol Chem.* 274:32478-32485.
- Proudfoot, A.E., C.A. Power, A. Hoogewerf, M.O. Montjovent, F. Borlat, and T.N. Wells. 1995. Characterisation of the RANTES/MIP-1 alpha receptor (CC CKR-1) stably transfected in HEK 293 cells and the recombinant ligands. *FEBS Lett.* 376:19-23.
- Purcell-Huynh, D.A., R.V. Farese, Jr., D.F. Johnson, L.M. Flynn, V. Pierotti, D.L. Newland, M.F. Linton, D.A. Sanan, and S.G. Young. 1995. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest.* 95:2246-2257.
- Qiao, J.H., J. Tripathi, N.K. Mishra, Y. Cai, S. Tripathi, X.P. Wang, S. Imes, M.C. Fishbein, S.K. Clinton, P. Libby, A.J. Lusis, and T.B. Rajavashisth. 1997. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 150:1687-1699.
- Quinones, M.P., H.G. Martinez, F. Jimenez, C.A. Estrada, M. Dudley, O. Willmon, H. Kulkarni, R.L. Reddick, G. Fernandes, W.A. Kuziel, S.K. Ahuja, and S.S. Ahuja. 2007. CC chemokine receptor 5 influences late-stage atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 195:e92-103.
- Rajagopal, S., J. Kim, S. Ahn, S. Craig, C.M. Lam, N.P. Gerard, C. Gerard, and R.J. Lefkowitz. 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:628-632.
- Raman, D., T. Sobolik-Delmaire, and A. Richmond. 2011. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res.* 317:575-589.
- Randolph, G.J., G. Sanchez-Schmitz, R.M. Liebman, and K. Schakel. 2002. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med.* 196:517-527.
- Richmond, A. 2011. Chemokine research moves on. *Exp Cell Res.* 317:553-555.
- Ridker, P.M., E. Danielson, F.A. Fonseca, J. Genest, A.M. Gotto, Jr., J.J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A.J. Lorenzatti, J.G. MacFadyen, B.G. Nordestgaard, J. Shepherd, J.T. Willerson, and R.J. Glynn. 2008. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.* 359:2195-2207.
- Robben, P.M., M. LaRegina, W.A. Kuziel, and L.D. Sibley. 2005. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med.* 201:1761-1769.
- Rodriguez-Frade, J.M., A.J. Vila-Coro, A.M. de Ana, J.P. Albar, A.C. Martinez, and M. Mellado. 1999. The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3628-3633.
- Rogacev, K.S., C. Ulrich, L. Blomer, F. Hornof, K. Oster, M. Ziegelin, B. Cremers, Y. Grenner, J. Geisel, A. Schlitt, H. Kohler, D. Fliser, M. Girndt, and G.H. Heine. 2010. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 31:369-376.

- Rollins, B.J. 1996. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today*. 2:198-204.
- Rosenkilde, M.M., M.J. Smit, and M. Waldhoer. 2008. Structure, function and physiological consequences of virally encoded chemokine seven transmembrane receptors. *Br J Pharmacol*. 153 Suppl 1:S154-166.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340:115-126.
- Saederup, N., L. Chan, S.A. Lira, and I.F. Charo. 2008. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 117:1642-1648.
- Salcedo, R., K. Wasserman, H.A. Young, M.C. Grimm, O.M. Howard, M.R. Anver, H.K. Kleinman, W.J. Murphy, and J.J. Oppenheim. 1999. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am J Pathol*. 154:1125-1135.
- Saleh, M.N., S.J. Goldman, A.F. LoBuglio, A.C. Beall, H. Sabio, M.C. McCord, L. Minasian, R.K. Alpaugh, L.M. Weiner, and D.H. Munn. 1995. CD16⁺ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 85:2910-2917.
- Sartina, E., C. Sugihara, S. Ramchandran, P. Nwajei, M. Rodriguez, E. Torres, D. Hehre, C. Devia, M.J. Walters, M.E. Penfold, and K.C. Young. 2012. Antagonism of CXCR7 attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Pediatr Res*. 71:682-688.
- Schall, T.J., and A.E. Proudfoot. 2011. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol*. 11:355-363.
- Schecter, A.D., B.J. Rollins, Y.J. Zhang, I.F. Charo, J.T. Fallon, M. Rossikhina, P.L. Giesen, Y. Nemerson, and M.B. Taubman. 1997. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem*. 272:28568-28573.
- Schlitt, A., G.H. Heine, S. Blankenberg, C. Espinola-Klein, J.F. Dopheide, C. Bickel, K.J. Lackner, M. Iz, J. Meyer, H. Darius, and H.J. Rupprecht. 2004. CD14⁺CD16⁺ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost*. 92:419-424.
- Schmidt, M.I., B.B. Duncan, A.R. Sharrett, G. Lindberg, P.J. Savage, S. Offenbacher, M.I. Azambuja, R.P. Tracy, and G. Heiss. 1999. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 353:1649-1652.
- Schwenke, D.C., and T.E. Carew. 1989. Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis*. 9:895-907.
- Serbina, N.V., T. Jia, T.M. Hohl, and E.G. Pamer. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*. 26:421-452.
- Serbina, N.V., and E.G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 7:311-317.
- Sheikine, Y., C.S. Bang, L. Nilsson, A. Samnegard, A. Hamsten, L. Jonasson, P. Eriksson, and A. Sirsjo. 2006. Decreased plasma CXCL16/SR-PSOX concentration is associated with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 188:462-466.
- Shi, C., and E.G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 11:762-774.
- Simeoni, E., B.R. Winkelmann, M.M. Hoffmann, S. Fleury, J. Ruiz, L. Kappenberger, W. Marz, and G. Vassalli. 2004. Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur Heart J*. 25:1438-1446.
- Skinner, N.A., C.M. MacIsaac, J.A. Hamilton, and K. Visvanathan. 2005. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol*. 141:270-278.

- Smith, J.D., E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, and M. Miyata. 1995. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8264-8268.
- Springael, J.Y., P.N. Le Minh, E. Urizar, S. Costagliola, G. Vassart, and M. Parmentier. 2006. Allosteric modulation of binding properties between units of chemokine receptor homo- and hetero-oligomers. *Mol Pharmacol*. 69:1652-1661.
- Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 346:425-434.
- Springer, T.A. 1995. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*. 57:827-872.
- Stary, H.C., A.B. Chandler, R.E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M.E. Rosenfeld, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, and R.W. Wissler. 1995. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 92:1355-1374.
- Steinberg, D., and A.M. Gotto, Jr. 1999. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels: fifty years from bench to bedside. *JAMA*. 282:2043-2050.
- Stoneman, V., D. Braganza, N. Figg, J. Mercer, R. Lang, M. Goddard, and M. Bennett. 2007. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res*. 100:884-893.
- Strieter, R.M., M.D. Burdick, B.N. Gomperts, J.A. Belperio, and M.P. Keane. 2005. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 16:593-609.
- Strieter, R.M., P.J. Polverini, D.A. Arenberg, and S.L. Kunkel. 1995. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. *Shock*. 4:155-160.
- Sun, Y., Z. Cheng, L. Ma, and G. Pei. 2002. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem*. 277:49212-49219.
- Sunderkotter, C., T. Nikolic, M.J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D.A. Drevets, and P.J. Leenen. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 172:4410-4417.
- Swirski, F.K., P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F.W. Luscinskas, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2007. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*. 117:195-205.
- Swirski, F.K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J.L. Figueiredo, R.H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T.R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder, and M.J. Pittet. 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 325:612-616.
- Swirski, F.K., M. Nahrendorf, and P. Libby. 2012. The ins and outs of inflammatory cells in atheromata. *Cell Metab*. 15:135-136.
- Szalai, C., J. Duba, Z. Prohaszka, A. Kalina, T. Szabo, B. Nagy, L. Horvath, and A. Csaszar. 2001. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD). Coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genotype in CAD patients. *Atherosclerosis*. 158:233-239.
- Tabas, I. 2009. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal*. 11:2333-2339.
- Tachibana, K., S. Hirota, H. Iizasa, H. Yoshida, K. Kawabata, Y. Kataoka, Y. Kitamura, K. Matsushima, N. Yoshida, S. Nishikawa, T. Kishimoto, and T. Nagasawa. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 393:591-594.
- Tacke, F., D. Alvarez, T.J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S.A. Lira, A.J. Habenicht, and G.J. Randolph. 2007. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 117:185-194.

- Tacke, F., F. Ginhoux, C. Jakubzick, N. van Rooijen, M. Merad, and G.J. Randolph. 2006. Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery. *J Exp Med.* 203:583-597.
- Tanaka, T., Y. Manome, P. Wen, D.W. Kufe, and H.A. Fine. 1997. Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med.* 3:437-442.
- Teupser, D., S. Pavlides, M. Tan, J.C. Gutierrez-Ramos, R. Kolbeck, and J.L. Breslow. 2004. Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17795-17800.
- Thelen, M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol.* 2:129-134.
- Tie, J., and J. Desai. 2012. Antiangiogenic therapies targeting the vascular endothelial growth factor signaling system. *Crit Rev Oncog.* 17:51-67.
- Trinchieri, G., M. Rengaraju, A. D'Andrea, N.M. Valiante, M. Kubin, M. Aste, and J. Chehimi. 1993. Producer cells of interleukin-12. *Immunol Today.* 14:237-238.
- Ueno, T., F. Saito, D.H. Gray, S. Kuse, K. Hieshima, H. Nakano, T. Kakiuchi, M. Lipp, R.L. Boyd, and Y. Takahama. 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med.* 200:493-505.
- Umehara, H., E. Bloom, T. Okazaki, N. Domae, and T. Imai. 2001. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol.* 22:602-607.
- Uy, G.L., M.P. Rettig, and A.F. Cashen. 2008. Plerixafor, a CXCR4 antagonist for the mobilization of hematopoietic stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 8:1797-1804.
- Valente, A.J., M.M. Rozek, E.A. Sprague, and C.J. Schwartz. 1992. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1. *Circulation.* 86:III20-25.
- Varol, C., L. Landsman, D.K. Fogg, L. Greenshtein, B. Gildor, R. Margalit, V. Kalchenko, F. Geissmann, and S. Jung. 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med.* 204:171-180.
- Veillard, N.R., B. Kwak, G. Pelli, F. Mulhaupt, R.W. James, A.E. Proudfoot, and F. Mach. 2004. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ Res.* 94:253-261.
- Vila-Coro, A.J., M. Mellado, A. Martin de Ana, P. Lucas, G. del Real, A.C. Martinez, and J.M. Rodriguez-Frade. 2000. HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3388-3393.
- Vila-Coro, A.J., M. Mellado, A. Martin de Ana, A.C. Martinez, and J.M. Rodriguez-Frade. 1999. Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex. *J Immunol.* 163:3037-3044.
- Vischer, H.F., C. Vink, and M.J. Smit. 2006. A viral conspiracy: hijacking the chemokine system through virally encoded pirated chemokine receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 303:121-154.
- Volger, O.L., J.O. Fledderus, N. Kisters, R.D. Fontijn, P.D. Moerland, J. Kuiper, T.J. van Berkel, A.P. Bijnens, M.J. Daemen, H. Pannekoek, and A.J. Horrevoets. 2007. Distinctive expression of chemokines and transforming growth factor-beta signaling in human arterial endothelium during atherosclerosis. *Am J Pathol.* 171:326-337.
- von Hundelshausen, P., K.S. Weber, Y. Huo, A.E. Proudfoot, P.J. Nelson, K. Ley, and C. Weber. 2001. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 103:1772-1777.
- Wang, B., D.T. Hendricks, F. Wamunyokoli, and M.I. Parker. 2006. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res.* 66:3071-3077.
- Wang, K.Q., Z.G. Li, Q.L. Hao, J.L. He, X.Z. Li, H.Z. Zhang, J.J. Tang, G. Wu, B.S. Chen, J.M. Wang, and et al. 1990. The differences of serum cholesterol and lipoproteins in animals susceptible

- and nonsusceptible to atherosclerosis. *Proc Chin Acad Med Sci Peking Union Med Coll.* 5:112-119.
- Weber, C., A. Schober, and A. Zerneck. 2004. Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1997-2008.
- White, G.E., T.C. Tan, A.E. John, C. Whatling, W.L. McPheat, and D.R. Greaves. 2010. Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling. *Cardiovasc Res.* 85:825-835.
- Wislez, M., N. Fujimoto, J.G. Izzo, A.E. Hanna, D.D. Cody, R.R. Langley, H. Tang, M.D. Burdick, M. Sato, J.D. Minna, L. Mao, I. Wistuba, R.M. Strieter, and J.M. Kurie. 2006. High expression of ligands for chemokine receptor CXCR2 in alveolar epithelial neoplasia induced by oncogenic kras. *Cancer Res.* 66:4198-4207.
- Woollard, K.J., D. Kling, S. Kulkarni, A.M. Dart, S. Jackson, and J. Chin-Dusting. 2006. Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion. *Circ Res.* 98:149-156.
- Wu, B., E.Y. Chien, C.D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F.C. Bi, D.J. Hamel, P. Kuhn, T.M. Handel, V. Cherezov, and R.C. Stevens. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science.* 330:1066-1071.
- Wuttge, D.M., X. Zhou, Y. Sheikine, D. Wagsater, V. Stemme, U. Hedin, S. Stemme, G.K. Hansson, and A. Sirsjo. 2004. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:750-755.
- Xin, H., T. Kikuchi, S. Andarini, S. Ohkouchi, T. Suzuki, T. Nukiwa, Huqun, K. Hagiwara, T. Honjo, and Y. Saijo. 2005. Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells. *Eur J Immunol.* 35:1371-1380.
- Xu, H., R. Dawson, I.J. Crane, and J. Liversidge. 2005. Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:2487-2494.
- Yan, J., and T. Jin. 2012. Signaling network from GPCR to the actin cytoskeleton during chemotaxis. *Bioarchitecture.* 2:15-18.
- Yla-Herttuala, S., B.A. Lipton, M.E. Rosenfeld, T. Sarkioja, T. Yoshimura, E.J. Leonard, J.L. Witztum, and D. Steinberg. 1991. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:5252-5256.
- Yoshimoto, S., K. Nakatani, M. Iwano, O. Asai, K. Samejima, H. Sakan, M. Terada, K. Harada, Y. Akai, H. Shiiki, M. Nose, and Y. Saito. 2007. Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 50:47-58.
- Yu, X., S. Druz, D.T. Graves, L. Zhang, H.N. Antoniades, W. Hollander, S. Prusty, A.J. Valente, C.J. Schwartz, and G.E. Sonenshein. 1992. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6953-6957.
- Yudkin, J.S., C.S. Yajnik, V. Mohamed-Ali, and K. Bulmer. 1999. High levels of circulating proinflammatory cytokines and leptin in urban, but not rural, Indians. A potential explanation for increased risk of diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care.* 22:363-364.
- Zawada, A.M., K.S. Rogacev, B. Rotter, P. Winter, R.R. Marell, D. Fliser, and G.H. Heine. 2011. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood.* 118:e50-61.

- Zeng, Y., J. Jiang, N. Huebener, J. Wenkel, G. Gaedicke, R. Xiang, and H.N. Lode. 2005. Fractalkine gene therapy for neuroblastoma is more effective in combination with targeted IL-2. *Cancer Lett.* 228:187-193.
- Zernecke, A., I. Bot, Y. Djalali-Talab, E. Shagdarsuren, K. Bidzhekov, S. Meiler, R. Krohn, A. Schober, M. Sperandio, O. Soehnlein, J. Bornemann, F. Tacke, E.A. Biessen, and C. Weber. 2008. Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 102:209-217.
- Zhang, S.H., R.L. Reddick, J.A. Piedrahita, and N. Maeda. 1992. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 258:468-471.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., B. Passlick, and D. Flieger. 1988. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma.* 7:521-527.
- Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-127.
- Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity.* 36:705-716.
- Zou, Y.R., A.H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, and D.R. Littman. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 393:595-599.