

50376
1993
328

50376
1993
328

Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences de la Vie et de la Santé
Option Immunologie

par

Yves DELNESTE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU
ROLE DE LA CELLULE
ENDOTHELIALE DANS L'ASTHME**



Présentée le 9 novembre 1993 devant la commission d'examen:

Président : Professeur A. DHAINAUT

Rapporteurs : Docteur M. JOSEPH
Professeur L. PRIN

Examineurs : Professeur A. CAPRON
Professeur A.B. TONNEL
Docteur R. CECHELLI



A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur A. DHAINAUT,

Après m'avoir enseigné les bases de l'immunologie, vous acceptez aujourd'hui de juger ce travail. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de toute ma reconnaissance.

A mes rapporteurs et juges,

Monsieur le Docteur M. Joseph,

Vous m'avez suivi pendant ces années de formation à la recherche. Pour m'avoir fait partager toutes vos connaissances et apporté le sens critique du travail de recherche, soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Professeur L. Prin,

Vous avez toujours été su être accueillant et à l'écoute des étudiants. D'avoir accepté de juger ce travail est pour moi un grand honneur, soyez en remercié.

A messieurs les membres du jury,

Monsieur le Professeur A. CAPRON,

Vous m'avez encouragé et soutenu dans la voie de la recherche et vous acceptez de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Professeur A.B. TONNEL,

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire afin de me former à la recherche et avez été attentif à l'évolution de ce travail. Par votre disponibilité à l'égard des membres de votre laboratoire, vous avez su créer une dynamique de groupe permettant à chacun de s'exprimer dans le travail de recherche.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur R. CECHELLI,

Grace à votre sens critique, vous avez été attentif à l'élaboration de ce manuscrit. Vous avez accepté de juger ce travail. Veuillez trouver dans ce mémoire l'expression de mon plus profond respect.

Mes plus sincères remerciements à :

l'ensemble des membres du laboratoire d'immuno-allergologie de l'Institut Pasteur de Lille, qui m'ont soutenu tout au long de ces années de travail en commun :

Melle A. Tsicopoulos et M. J. Pestel, P. Gosset,
Mme I. Tillie-Leblond et M. D. Vanhée et P. Lassalle,
Mme G. Marchandise et M. H. Vorng

aux membres du centre d'immunologie et de biologie parasitaire, et du laboratoire d'oncologie moléculaire pour leurs précieux conseils.

aux membres du laboratoire de Pathologie respiratoire :

Monsieur le Professeur C. Voisin pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire afin d'y effectuer mon DEA

Monsieur le Professeur B. Wallaert, pour m'avoir toujours soutenu dans les moments difficiles,

Mme C. Aerts pour votre amitié et votre attention,

Mmes C. Fourneau et C. Merdy, pour votre amitié et vos conseils,

Mme S. Szeremata pour ta disponibilité.

à toutes les personnes qui m'ont conseillé et soutenu durant ces années.

Pour finir, une mention spéciale à M. P. Marquillies

pour avoir accepté de me former et de me supporter pendant ces années, pour ton soutien les jours de spleen, pour toutes les parties de plaisir, et surtout ta bonne humeur chaque jour renouvelée, un grand merci.

à Pascale,
à toute ma famille,

PUBLICATIONS

Delneste, Y., Lassalle, P., Jeannin, P., Mannessier, L., Dessaint, J.P., Joseph, M. & Tonnel, A.B.

Production of anti-endothelial cell antibodies by coculture of EBV-infected human B cells with endothelial cells.

Cellular Immunology, 150: 15-26

Delneste, Y., Jeannin, P., Gosset, P., Lassalle, P., Joseph, M. & Tonnel, A.B.

Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells

Manuscrit soumis

Delneste, Y., Jeannin, P., Lassalle, P., Gosset, P., Pestel, J., Cardot, E. Joseph, M. & Tonnel, A.B.

Allergen-stimulation of T lymphocyte from allergic patients induces VCAM-1 expression and IL-6 production by endothelial cells

Manuscrit soumis

Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P., Wallaert, B., Tonnel, A.B., Dessaint, J.P. & Capron, A.

Neutrophil-endothelial cell interaction: evidence in vitro for a regulation by endothelial cells of neutrophil functions.

European Respiratory Journal, 1991, 4: 1251-1257.

Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P., Gras-Masse, H., Wallaert, B. & Tonnel, A.B.

T- and B-cell immune response to a 55 kD endothelial cell-derived antigen in severe asthma.

European Journal of Immunology, 1993, 23: 796-803.

Jeannin, P., Delneste, Y., Buisine, E., LeMao, J., Didierlaurent, A., Stewart, G.A., Tartar, A., Tonnel, A.B. & Pestel, J.

Immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides derived from mite allergen Der p I.

Accepté pour publication dans *Molecular Immunology*

Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P., Tonnel, A.B. & Capron, A.

Potential implication of endothelial cells in bronchial asthma.

International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1991, 94: 233-238.

Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P. & Tonnel, A.B.

Endothelial cells and asthma.

dans *New concepts in asthma*, par Tarayre, J.P., Vargaftig, B. & Carilla, E., éd Pierre Fabre Monograph Series, 1993, 200-208

Jeannin, P., Delneste, Y., Tillie-Leblond, I., Gosset, P., Lassalle, P., Wallaert, B., Tonnel, A.B. & Pestel, J.

Abnormal response of IgG4 antibodies to aeroallergens in *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitive patients

Manuscrit soumis

Jeannin, P., Delneste, Y., Gosset, P., Lassalle, P., Pestel, J. & Tonnel, A.B.

Histamine induces IL-8 production by human endothelial cells

Manuscrit soumis

- Lassalle, P., Lagrou, C., Delneste, Y., Sanceau, J., Coll, J., Torpier, G., Wietzerbin, J., Stehelin, D., Tonnel, A.B. & Capron, A.
Human endothelial cells transfected by SV40 T antigen: characterization and potential use as a source of normal endothelial factors.
European Journal of Immunology, 1992, 22: 425-431.
- Lassalle, P., Sergant, M., Delneste, Y., Gosset, P., Wallaert, B., Zandecki, M., Capron, A., Joseph, M. & Tonnel, A.B.
Levels of soluble IL-2 receptor in plasma from asthmatics - Correlation with blood eosinophilia, lung function, and corticosteroid therapy.
Clinical and Experimental Immunology, 1992, 87: 266- 27.
- Gosset, P., Malaquin, F., Delneste, Y., Wallaert, B., Capron, A., Joseph, M. & Tonnel, A.B.
IL-6 and IL-1 α production is associated with antigen-induced late nasal response
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1993, sous presse.
- Tonnel, A.B., Lassalle, P., Delneste, Y. & Wallaert, B.
Endothelial cells and bronchial asthma.
In *Advances in allergology and clinical immunology*. The proceedings of the XVth Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology., 1992
- Lassalle, P., Gosset, P., Delneste, Y., Tsicopoulos, A., Joseph, M. Tonnel, A.B. & Capron, A.
Modulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression on endothelial cells in bronchial asthma : role of macrophage-derived tumor necrosis factor α .
Clinical and Experimental Immunology, 1993, 94: 105-110.
- Pestel, J., Jeannin, P., Delneste, Y., Cesbron, J.Y., Dessaint, J.P., Capron, A. & Tonnel, A.B.
Human IgE in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitive patients.
Manuscrit soumis.
- Jeannin, P., Didierlaurent, A., Gras-Masse, H., Ellass A.A., Delneste, Y., Cardot, E., Joseph, M., Tartar, A., Vergoten, G. & Pestel, J.
Specific histamine release capacity of peptides selected from the modeled Der p I protein, a major allergen of *Dermatophagoides pteronyssinus*.
Molecular Immunology, 1992, 29: 739-749.

PLAN

Introduction

Les propriétés biologiques de l'endothélium

A/ Les aspects structuraux de l'endothélium

- 1) *Structure générale de l'endothélium*
- 2) *Polarisation des cellules endothéliales*
- 3) *Les jonctions intercellulaires*
- 4) *Le cytoplasme des cellules endothéliales*

B/ L'endothélium dans l'homéostasie tissulaire

C/ Le rôle de l'endothélium dans la perméabilité vasculaire

D/ L'endothélium et l'hémostase

- 1) *Les activités prothrombotiques de l'endothélium*
- 2) *Les propriétés antithrombogènes de l'endothélium*
- 3) *Les activités fibinolytiques de l'endothélium*

E/ L'endothélium dans la régulation de la vasomotricité

- 1) *La conversion de précurseurs inactifs en produits vasoactifs*
- 2) *La capture et la dégradation de substances vasoactives*
- 3) *La synthèse par la cellule endothéliale de substances vasoactives*
- 4) *Le système nerveux autonome dans la régulation du tonus vasculaire*
 - a) *Le contrôle adrénergique*
 - b) *Le contrôle cholinergique*

F/ L'endothélium et le système immunitaire

- 1) *Les récepteurs du complément et des immunoglobulines sur la cellule endothéliale*
- 2) *Le pool marginé pulmonaire*
- 3) *Les molécules d'adhésion dans les interactions des leucocytes avec les cellules endothéliales*

- a) Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales
 - a1) Les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines
 - a2) Les molécules d'adhésion de la famille des sélectines
 - a3) Les molécules d'adhésion de la famille des cadhérines
 - a4) Les autres systèmes d'adhésion cellulaire exprimés par la cellule endothéliale
 - b) Les molécules d'adhésion exprimées par les leucocytes
 - b1) Les molécules d'adhésion de la famille des intégrines
 - b2) Les sucres dans l'adhésion cellulaire
- 4) *La migration transvasculaire des leucocytes*
- 5) *Les médiateurs immunologiques produits par la cellule endothéliale*
- a) Les dérivés de l'acide arachidonique
 - b) Les cytokines d'origine endothéliale

Etudes sur le rôle de la cellule endothéliale dans l'asthme

I/ Rappels

A/ L'asthme allergique : données cliniques et biologiques

1) *Les données cliniques de l'asthme*

2) *Les données biologiques*

a) La réaction précoce

b) La réaction retardée

1. Le neutrophile

2. L'éosinophile

3. Les cellules phagocytaires mononucléées

4. Les plaquettes sanguines

5. Le lymphocyte T

B/ L'asthme non allergique

II/ La cellule endothéliale dans l'asthme non allergique associé une intolérance à l'aspirine

Mise en évidence d'une réponse immune anormale vis-à-vis d'un antigène de 55 kD exprimé par les cellules endothéliales et les plaquettes

- 1) *Introduction*
- 2) *Données biologiques et cliniques*
- 3) *Données biochimiques*
 - a) Expression de l'antigène de 55 kD
 - b) Purification biochimique
- 4) *Caractéristiques cellulaires*
- 5) *L'approche moléculaire*

III/ La cellule endothéliale dans l'asthme allergique

Etude de modèles d'interactions cellulaires établies entre la cellule endothéliale et les cellules inflammatoires

A/ Introduction

B/ Etude de l'activation des cellules endothéliales par l'histamine. Résultats.

- 1) *La production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale est dépendante de la dose d'histamine*
- 2) *Cinétique de production des cytokines après activation de la cellule endothéliale par l'histamine*
- 3) *Inhibition de la production d'IL-6 et d'IL-8 par les antagonistes des récepteurs à l'histamine*
- 4) *Potentialisation par le TNF α de la production de cytokines induite par l'histamine*

C/ Etude sur les coopérations cellulaires entre le lymphocyte T et la cellule endothéliale. Résultats.

- 1) *Les lymphocytes T d'allergiques stimulés par l'allergène relevant induisent l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales*
- 2) *Les lymphocytes T d'allergiques stimulés par l'allergène relevant induisent la production d'IL-6 par les cellules endothéliales*

3) *L'IL-4 et l'IFN γ apparaissent comme les principaux médiateurs lymphocytaires T responsables de l'induction de l'expression de VCAM-1 et de la production d'IL-6*

IV/ Discussion

A/Mise en évidence d'une réactivité de type autoimmune dans les asthmes non allergiques

B/Étude des modalités d'activation de la cellule endothéliale dans la réaction inflammatoire

1) *Mise en évidence d'une production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales activées par l'histamine*

2) *Mise en évidence d'une activation des cellules endothéliales par les lymphocytes T de sujets allergiques activés par l'allergène relevant*

V/ Perspectives

Résumé

Annexes : Matériel et méthodes

A/ Techniques utilisées dans la mise en évidence des anticorps anti-55 kD dans les asthmes non allergiques

- 1) *Culture des cellules endothéliales*
- 2) *Isolement des populations leucocytaires*
- 3) *Préparation des extraits antigéniques cellulaires*
- 4) *L'électrophorèse monodimensionnelle*
- 5) *L'électrophorèse bidimensionnelle*
- 6) *La technique des immunoempreintes*
- 7) *Technique de transformation lymphoblastique*
- 8) *Préparation des colonnes d'immunoabsorption*
- 9) *Construction des banques d'ADN complémentaire*

B/ Techniques utilisées dans l'étude de l'activation de la cellule endothéliale par l'histamine:

- 1) *Dosage des interleukines*
- 2) *Évaluation de l'expression des molécules d'adhésion*

C/ Techniques utilisées dans l'étude des coopérations cellules endothéliales/lymphocytes T

- 1) *Activation des lymphocytes T*
- 2) *Activation des cellules endothéliales*
- 3) *Dosage du TNF α*
- 4) *Quantification de l'IL-4 et de l'IFN γ*
- 5) *Tests statistiques*

Bibliographie

RESUME

L'asthme se définit comme une bronchoconstriction réversible parfois associée à une réaction inflammatoire. Cette réaction est caractérisée par un important infiltrat leucocytaire à la base des destructions du tissu bronchique (desquamation épithéliale et processus de fibrose) et de l'hyperréactivité bronchique non spécifique. De par sa localisation, l'endothélium vasculaire constitue une structure essentielle dans la régulation du développement de la réaction inflammatoire. En effet, les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion qui permettent l'adhérence puis la migration transvasculaire des leucocytes du sang vers le site inflammatoire, ainsi qu'elles produisent des médiateurs proinflammatoires (leucotriènes, PAF, cytokines, ...).

Dans l'asthme non allergique associé à une intolérance à l'aspirine, nous avons mis en évidence un désordre de type autoimmun caractérisé par 1) : une réactivité lymphocytaire B par l'existence d'anticorps dirigés contre une protéine endothéliale de 55 kD et 2) : une réactivité lymphocytaire T qui était inversement corrélée à l'état clinique du patient. Cet antigène est exprimé de façon constitutive par les cellules endothéliales et les plaquettes; il présente un pHi voisin de 8,0. Quoique ces autoanticorps caractérisent cette forme d'asthme non allergique, aucune donnée expérimentale ne permet d'établir leur implication dans sa physiopathologie. La caractérisation moléculaire de cet antigène devra permettre de répondre à cette question.

Dans les asthmes allergiques, notre étude a porté sur les coopérations établies entre la cellule endothéliale et deux autres types cellulaires impliqués dans la phase précoce (mastocytes) et dans la phase retardée (lymphocytes T). L'histamine, médiateur produit par les mastocytes lors d'une activation dépendante de l'IgE, induit la production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale, détectable dès la 4^{ème} heure d'activation et maximale à 24 heures; elle est inhibée par les antagonistes des récepteurs de type H2. Elle est potentialisée par le TNF α (médiateur mastocytaire produit lors d'une activation par l'allergène). L'histamine, classiquement associée à la réaction précoce, peut induire la production de cytokines impliquées dans la phase tardive de la réaction allergique.

La stimulation de lymphocytes T d'allergiques par l'allergène relevant induit la stimulation *in vitro* de la cellule endothéliale, objectivée par l'augmentation d'expression de VCAM-1 et la production d'IL-6, induites respectivement par l'IL-4 et l'IFN γ . Les lymphocytes T d'allergiques stimulés par un allergène non relevant et les lymphocytes T de témoins stimulés par un allergène, bien que produisant de l'IFN γ , n'induisent pas d'activation de la cellule endothéliale.

L'ensemble de cette étude a permis de confirmer l'implication de la cellule endothéliale dans les mécanismes physiopathologiques de l'asthme, et en particulier de la réaction inflammatoire. Cette étude se poursuivra par l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires développés entre la cellule endothéliale et les lymphocytes T, lors de l'adhérence et la migration transendothéliale des leucocytes.

INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, la cellule endothéliale n'est plus considérée comme un élément structural passif entre le sang et les tissus. De très nombreux travaux ont montré que l'endothélium vasculaire régit ou est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques essentielles comme la vasomotricité, les échanges gazeux, le transport de nutriments, l'hémostase. La cellule endothéliale produit également de nombreux médiateurs associés à la réponse immune (leucotriènes, prostaglandines et cytokines). Sa position lui confère de plus un rôle essentiel dans la régulation des flux cellulaires entre le sang et les tissus (par l'expression de molécules d'adhésion qui vont médier l'adhérence puis la migration transendothéliale). Son implication dans de nombreuses pathologies est largement documentée : les métastases cancéreuses, l'angiogénèse tumorale ou encore l'athérosclérose, mais surtout le développement de la réaction inflammatoire.

L'asthme bronchique est une pathologie caractérisée par une bronchoconstriction réversible, qui peut se présenter sous deux formes : l'asthme allergique et l'asthme non allergique. La deuxième forme est d'étiologie inconnue; l'asthme allergique est lié à une hyperréactivité bronchique des patients vis-à-vis d'agents exogènes appelés allergènes. L'asthme est souvent associé à une réaction inflammatoire, qui peut évoluer vers la chronicité.

Les travaux concernant la physiopathologie de la réaction inflammatoire s'attachent essentiellement à :

- comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base du développement et de la pérennisation de cette réaction (production de cytokines proinflammatoires, modulation d'expression des molécules d'adhésion),

- définir les modalités de sa régulation (physiologique et pharmacologique).

La réaction inflammatoire associée à l'asthme constituant l'une de ses principales aggravations cliniques, le groupe de recherche du Pr. Tonnel s'est particulièrement investi dans l'étude des mécanismes

physiopathologiques de cette réaction associés aux pathologies pulmonaires et à l'asthme en particulier :

- dans les asthmes non allergiques, par la recherche de mécanismes physiopathologiques impliquant la cellule endothéliale,
- dans les asthmes allergiques, par l'étude des coopérations établies entre les cellules endothéliales et les leucocytes dans l'initiation de la réaction inflammatoire.

Le travail de recherche que nous avons mené a consisté en :

- la définition moléculaire d'un antigène de 55 kD exprimé par les cellules endothéliales, cible d'autoanticorps dans les asthmes graves,
- l'analyse des mécanismes cellulaires d'activation de la cellule endothéliale lors de la réaction allergique bronchique.

Dans un premier temps, nous rappellerons les propriétés physiologiques de l'endothélium vasculaire.

**LES PROPRIETES BIOLOGIQUES
DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE**

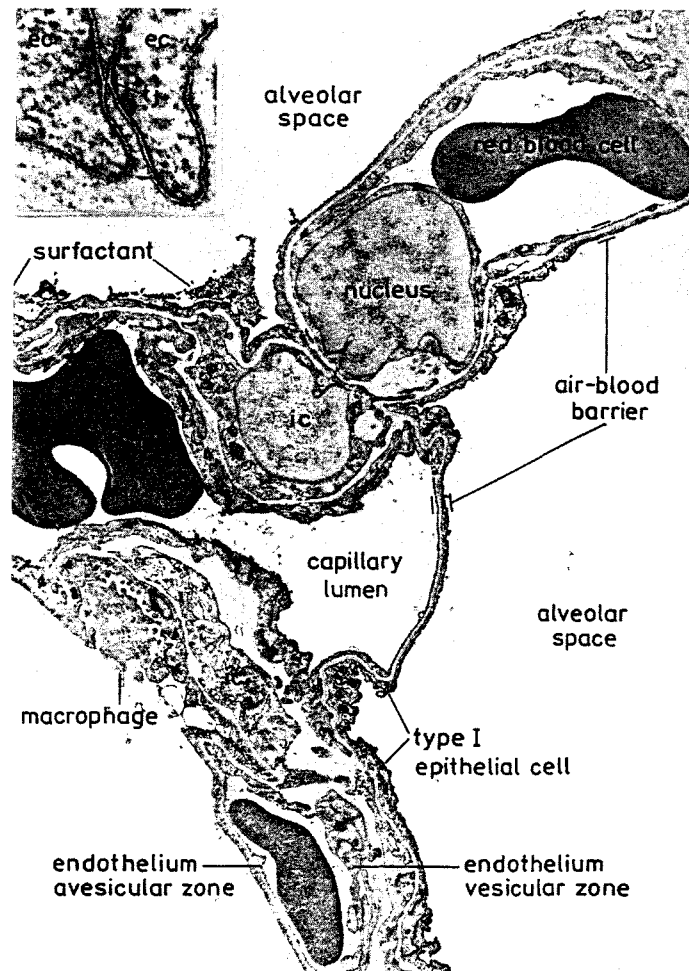


Photo 1 : Vue générale d'une zone alvéolo-capillaire (poumon de rat). L'espace alvéolaire, limité par des cellules épithéliales de type I est entouré par des capillaires présentant un endothélium continu. La zone avésiculaire de l'endothélium et de l'épithélium correspondant constitue la barrière air/sang. (ic: cellule interstitielle; tj: tight junction; ec: cellule endothéliale) (grossissement : x 5800; insert : x 104000) (d'après M. Simionescu et N. Simionescu. Dans *Pulmonary endothelium in health and disease*, édité par U.S. Ryan, Marcel Dekker Inc, 1987).

L'endothélium vasculaire se définit comme la structure tissulaire bordant l'ensemble des vaisseaux de l'organisme, responsables du transport sanguin ou lymphatique.

De par ses caractéristiques morphologiques, telles qu'on peut les observer en microscopie optique sur des coupes tissulaires, l'endothélium vasculaire a longtemps été considéré comme une barrière passive. L'intérêt porté depuis une trentaine d'années à l'étude de l'endothélium et des types cellulaires qui le composent (cellules musculaires lisses, fibroblastes) a montré que cette définition, bien que simpliste, reste néanmoins vraie quant à sa fonction primordiale de barrière entre les éléments sanguins et les tissus qu'il irrigue. Nous verrons que la cellule endothéliale intervient également dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques essentielles comme :

- la régulation de la perméabilité transvasculaire, les échanges gazeux, liquidiens et le transport de nutriments,
- la régulation du tonus vasculaire,
- l'hémostase, en se comportant comme une surface antithrombogène,
- la régulation de la réaction inflammatoire,
- le développement et la réorganisation des vaisseaux, la formation de circulations collatérales (angiogénèse).

L'ensemble des données que nous développerons dans cet exposé visent à présenter de manière générale ses fonctions biologiques. Un accent particulier sera porté sur l'endothélium pulmonaire. Le poumon est constitué de 40 types cellulaires différents, dont l'endothélium n'en n'est pas le moins représenté : la surface endothéliale pulmonaire représente 3000 cm²/gramme de tissu, correspondant à 120 m² de surface totale, 10¹¹ cellules endothéliales. Cet ensemble est irrigué par un volume sanguin de 215 ml (Gehr *et al.*, 1978). Le réseau capillaire suit les alvéoles qui sont limitées par l'épithélium (cf photo 1).

Le système intra-alvéolaire contient les capillaires, les cellules interstitielles et un tissu matriciel conjonctif dense. L'importance de l'endothélium, quantitative et qualitative, justifie donc l'intérêt qui lui est porté, surtout dans la compréhension des nombreux mécanismes pathologiques dont l'athérosclérose, la régulation du tonus vasculaire, la métastase ou la réaction inflammatoire.

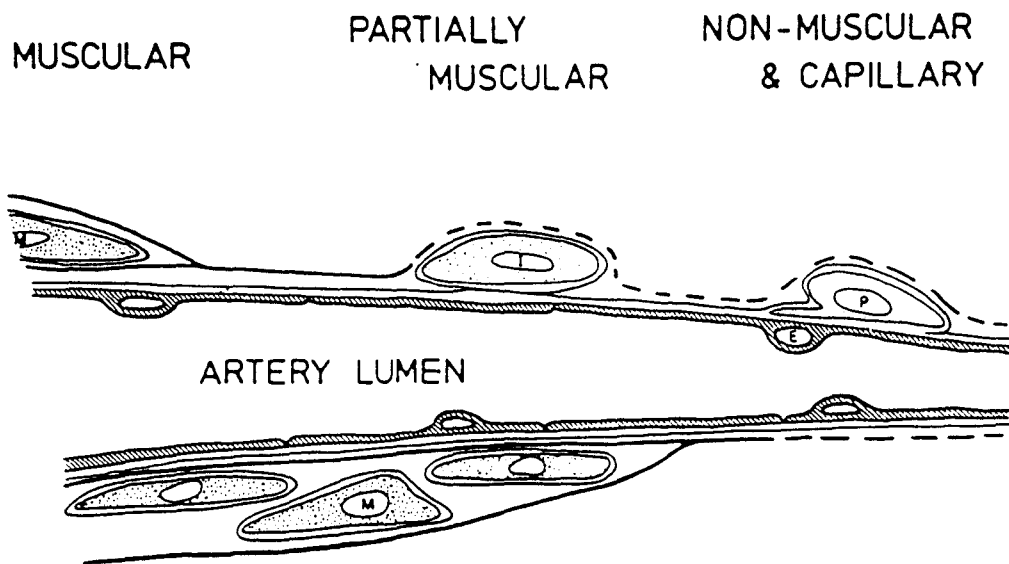


Figure 1 : Représentation schématique des cellules du vaisseau au niveau de la zone distale d'une artère pulmonaire. Les cellules musculaires lisses (M) du manteau musculaire médian sont entourés par une fine membrane basale et sont situées entre une lamina élastique interne et externe (traits noirs épais). Dans la région non musculaire des artères partiellement musclées se retrouvent les cellules intermédiaires (I). Ces cellules sont entourées par une membrane basale qui fusionne par endroits avec celle des cellules endothéliales (E) et est située du côté interne de la lamina élastique (traits hachurés). Au niveau de la région artérielle non musclée et des capillaires alvéolaires se retrouvent les péricytes (P). Ces cellules sont gainées par une membrane basale qui est continue avec celle des associée aux artères (d'après B. Meyrick and L. Reid, *Anat. Rec.*, 193, 71, 1979).

A/ Les aspects structuraux de l'endothélium :

Il existe trois types d'endothéliums : continu, fenestré et discontinu (revu par Mc Donald, 1990). Le tissu continu, le plus abondant, présente de nombreuses jonctions intercellulaires. Il se retrouve dans les capillaires pulmonaires. L'endothélium fenestré se retrouve surtout dans les glandes endocrines et exocrines et le tissu nasal, ne présentant pourtant qu'une perméabilité accrue restreinte à l'eau, aux ions et petits solutés. Le tissu discontinu est le moins abondant.

1) Structure générale de l'endothélium :

L'endothélium vasculaire est constitué de plusieurs types cellulaires (Reid et Meyrick, 1982; Davies *et al.*, 1986) :

- les cellules endothéliales,
- les cellules musculaires lisses,
- les cellules intermédiaires ou péricytes (qui fonctionnent comme des cellules musculaires lisses dans les zones où elles sont absentes,
- une adventice formée de fibroblastes.

La distance séparant une cellule endothéliale d'une cellule contractile est plus grande dans les artères proximales que distales. Dans les artères de gros diamètre, les cellules musculaires lisses sont enveloppées dans une lamina élastique, qui disparaît au fur et à mesure que l'on s'approche des bronchioles. Lors de la formation de l'œdème, l'exsudat se forme derrière les péricytes, confirmant les liens très étroits établis entre les cellules endothéliales et les péricytes. Ces deux cellules sont séparées par une matrice sous-endothéliale composée essentiellement de collagène (Bornstein *et al.*, 1982) (cf Fig. 1).

Les cellules endothéliales se présentent sous la forme d'un tapis unicellulaire de cellules jointives. Ces cellules sont aplaties et fines. Cet aspect morphologique particulier est une adaptation au flux et à la pression sanguine, afin de ne présenter aucune zone de contrainte et éviter les turbulences dues à la circulation sanguine (Davies et Bowyer, 1975).

2) Polarisation des cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales sont polarisées : elles présentent un pôle apical et un pôle basal.

Le pôle basal repose sur la membrane basale. Elle est constituée de collagène (chez l'humain : collagènes de type IV et V) (Madri et Furthmayr, 1980) qui est synthétisé par la cellule endothéliale, sous la forme d'un précurseur soluble (procollagène) qui est ensuite modifié en collagène insoluble. La fibronectine et la laminine sont également deux constituants essentiels de cette lamina basale.

Le pôle apical, ouvert sur la lumière du vaisseau, est recouvert par une structure formée de protéoglycannes et de sialoglycoprotéines (Roth *et al.*, 1984) : la glycocalyx (revu par Luft, 1966). Cette structure, d'une épaisseur de 10 à 20 nm, est formée de chondrotines 4-sulfates et de chondrotines 5-sulfates, de dermatanes sulfates, de keratanes sulfates et surtout d'héparanes sulfates (Simionescu *et al.*, 1981). Elle présente une charge électrique nette négative. La glycocalyx est continue d'une cellule à l'autre, mais absente au niveau des vésicules du plasmalemmes et des "coated pits". Certains auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle cette structure serait responsable, plutôt que les jonctions intercellulaires, du caractère imperméable de l'endothélium (revu par Klynsstra, 1974). Au niveau des capillaires pulmonaires, il est toutefois essentiel de noter que cette surface chargée négativement est absente des zones avésiculaires, essentielles pour les échanges gazeux, afin de permettre l'attachement des érythrocytes et faciliter les échanges gazeux. (Simionescu et Simionescu, 1983).

Les structures sous endothéliales et apicales sont impliquées dans l'orientation cellulaire.

3) Les jonctions intercellulaires :

Les cellules endothéliales présentent de nombreuses jonctions intercellulaires entre-elles. Elles assurent l'intégrité tissulaire, le maintien de la polarité cellulaire et, comme nous le verrons dans la partie C, interviennent dans la régulation des échanges transvasculaires (Scheenberger *et al.*, 1979; Levick et Michel, 1973). Les deux types de jonctions retrouvées dans le système vasculaire sont :

- les jonctions serrées imperméables (ou tight junctions, zonula occludens) (Scheenberger *et al.*, 1981) et,
- les jonctions ouvertes (ou gap junctions) qui permettent des couplages électroniques et métaboliques entre les cellules adjacentes (Claude et Goodenough, 1973).

Les jonctions de type gap sont nombreuses dans les artères et artérioles, intercalées avec des jonctions serrées (alors qu'elles sont isolées dans les veines), tandis que les jonctions de type tight sont localisées préférentiellement dans les artérioles, capillaires et veines et sont discontinues dans les veinules (revu par Larson, 1988). La distribution variable des jonctions serrées est à relier aux différences de perméabilité observées entre les différents vaisseaux. Les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires présentent uniquement des jonctions de type serré, au niveau de la zone apicale (Claude et Goodenough, 1973).

4) *Le cytoplasme des cellules endothéliales :*

En microscopie électronique, les cellules endothéliales présentent de nombreuses vésicules intracytoplasmiques de 60 à 65 nm de diamètre, représentant une grande surface dans la cellule (revu par Palade, 1953). Ces vésicules sont absentes des zones fines de l'endothélium. Elles se situent du côté apical et basal, s'ouvrant sur le milieu extracellulaire (Bundgaard *et al.*, 1979). De nombreuses études ont montré une capture d'éléments circulants par des vésicules de pinocytose, dont certaines permettent l'internalisation de récepteurs (Scheenberger et Karnovski, 1968; Nistor et Simionescu, 1986). Cependant, leur rôle dans la translocation des messages, ainsi que leur cheminement intracellulaire (fusion des vésicules, formation d'une chaîne de vésicules), restent inconnus. Comme nous l'avons précisé auparavant, les zones d'échanges gazeux dans les capillaires pulmonaires sont dépourvues de vésicules.

Le cytosquelette endothélial est formé de trois types majeurs de filaments non musculaires :

- des microfilaments d'un diamètre de 6 nm (Goldman *et al.*, 1979),
- des filaments intermédiaires, d'un diamètre de 10nm (revu par Lazarides, 1980),

- des microtubules d'un diamètre de 24 nm (revu par Dustin, 1978).

Les microfilaments se trouvent du côté basal de la cellule endothéliale, formés d'actine, de myosine, de tropomyosine et de méromyosine (Becker *et al.*, 1975). Ils sont orientés parallèlement aux fibres constituant la matrice sous endothéliale. Ils interviennent dans la contraction des cellules endothéliales (que l'on peut observer en présence d'histamine, (Becker *et al.*, 1975) et dans la motilité des cellules (Kalnins *et al.*, 1981).

Les filaments intermédiaires, dont le constituant principal est la vimentine, se retrouvent sous la forme de liasses de 500 à 1000 filaments, autour du noyau et entre les organites intracellulaires (Gimbrone *et al.*, 1974; Franke *et al.*, 1978; revu par Blose, 1980). Ils ne sont pas désorganisés lors de la mitose, la cytokinésie les divisant en deux lots qui se retrouvent dans les cellules filles (revu par Blose et Meltzer, 1981).

Les microtubules sont constitués de 13 protofilaments, eux-mêmes constitués d'hétérodimères de tubuline α et β (revu par Dustin, 1978). Ils sont dispersés dans tout le cytoplasme de la cellule et sont impliqués dans la migration (revu par Blose *et al.*, 1981), la mitose (revu par Dustin, 1978) et les processus de sécrétion (revu par Allen, 1975).

Les cellules endothéliales possèdent une structure intracytoplasmique spécifique : les corps de Weibel Palade. Ils se présentent sous la forme de corps sphériques (Wagner *et al.*, 1982). Outre le fait que le facteur Von Willebrand soit stocké dans ces granules, leur fonction reste inconnue.

B/ L'endothélium dans l'homéostasie tissulaire :

Comme nous avons déjà pu le souligner dans cet exposé, la localisation des cellules endothéliales leur confère un rôle important dans l'homéostasie tissulaire (Gimbrone *et al.*, 1976). L'endothélium est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques normales comme la formation de néovaisseaux (angiogénèse) normaux ou pathologiques (lors du développement tumoral), de l'athérogénèse, de l'arthrite, du psoriasis et de l'inflammation chronique. Plusieurs voies de régulation de son développement existent : la présence de facteurs de croissance, les

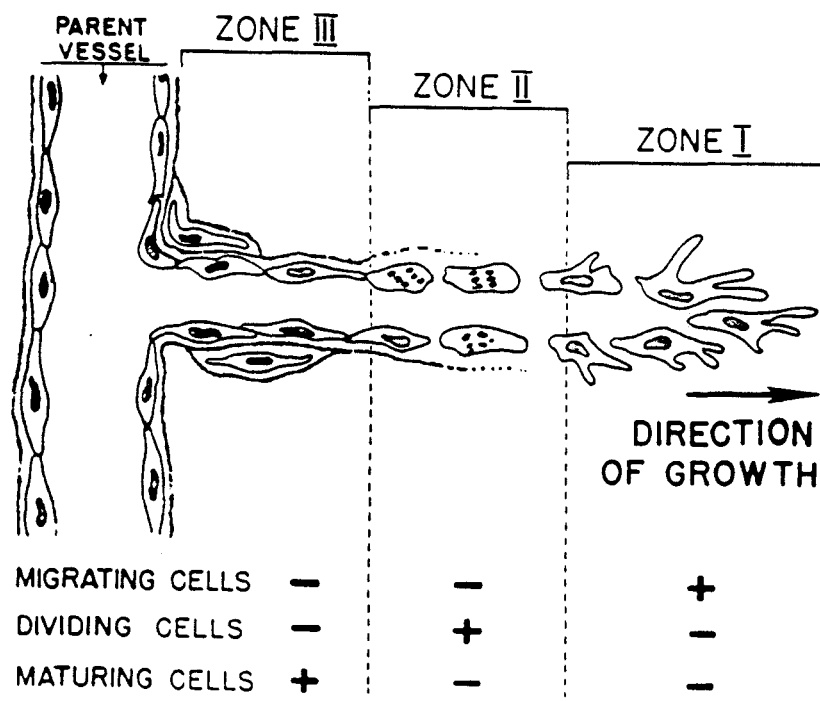


Figure 2 : Représentation schématique des trois zones de croissance au niveau d'une zone bourgeonnante à partir d'un capillaire. Les cellules endothéliales de la zone distale migrent vers le stimulus angiogénique mais ne se divisent pas. Les cellules entre les deux zones distales vont se diviser et produire une lamina basale. Les cellules proches du vaisseau parental sont matures et commencent à être entourées par des péricytes (d'après J. Folkman. Dans *Biology of endothelial cells*, édité par E.A. Jaffe, Martinus Nijhoff Publishers, 1984).

interactions cellulaires et les forces mécaniques externes (revu par Maciag et Burgess, 1988).

Le taux de renouvellement des cellules endothéliales est de l'ordre de 0,01 à 0,1 % par 24 h (Engerman *et al.*, 1967). Ce faible niveau de multiplication cellulaire est régi essentiellement par l'inhibition de contact (ou topoinhibition) des cellules entre-elles (Haudenschild *et al.*, 1976). Cependant, il existe une mobilité résiduelle des cellules endothéliales, au hasard (de l'ordre de 18 $\mu\text{m/h}$), qui réajuste continuellement leurs positions les unes avec les autres.

Lors d'une dénudation endothéliale, les cellules adjacentes migrent de façon à ce qu'il n'y ait jamais perte de la continuité cellulaire, puis elles se divisent (par exemple : dans une culture cellulaire, 6 à 8 h sont nécessaires pour recouvrir la zone dénudée suite à la perte de 10 cellules) (Reidy and Schwartz, 1981). Si la surface dénudée est trop importante, la zone non recouverte par les cellules endothéliales est colonisée par un pseudoendothélium non fonctionnel (cellules musculaires lisses modifiées) qui représente la base anatomique de la lésion athérosclérotique. La topoinhibition agit dans ce cas entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses.

Les mécanismes impliqués dans la régulation de la prolifération endothéliale ont été surtout étudiés dans les processus d'angiogénèse. Ils débutent souvent à partir d'une veinule (Ausprunk et Folkman, 1977), par altération de la membrane basale (suite à la production de protéases d'origine endothéliale) (Gross *et al.*, 1983) suivie par la prolifération d'une population cellulaire endothéliale vers la lumière et formant des anastomoses. Cette prolifération est associée à la production d'une matrice sous endothéliale (cf Fig. 2). Différents facteurs interviennent lors du développement du processus angiogénique :

- des facteurs mitogéniques/angiogéniques : les facteurs appartenant à ce groupe sont les polyamines, l'histamine (Marks *et al.*, 1986), les nucléosides (facteurs nutritionnels non angiogéniques) (Fenselau *et al.*, 1981), des facteurs angiogéniques dérivés des adipocytes (Castellot *et al.*, 1980), le sélénium
- des facteurs chimiotactiques/angiogéniques parmi lesquels l'ADP (Tenscher et Weidler, 1985), l'héparine (Fraser *et al.*, 1979), la

prostaglandine E2 (PGE2) (par augmentation de la concentration locale en Cu) (Owen *et al.*, 1980) et des facteurs dérivés des tumeurs (revu par Folkman, 1974).

Les mécanismes de prolifération endothéliale sont également observés lors d'une destruction de l'endothélium. Cette destruction induit une vasoconstriction qui réduit le flux sanguin avec une augmentation des contacts interplaquettaires (Baumgartner et Muggli, 1976). L'exposition de la matrice sousendothéliale aux plaquettes sanguines permet leur fixation par interaction des molécules de surface plaquettaires GPIa et GPIb à leurs ligands matriciels (respectivement le facteur vW et le collagène). Les plaquettes agrégées libèrent de nombreux facteurs de prolifération pour les cellules endothéliales et surtout les cellules musculaires lisses (comme le facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor, ou PDGF). Après la réendothélisation, les cellules endothéliales peuvent induire une condensation ou une régression des cellules musculaires lisses (Fishman *et al.*, 1975). Dans les vaisseaux quiescents, les cellules endothéliales expriment des héparanes sulfates inhibiteurs de la prolifération des cellules musculaires lisses, tandis que les vaisseaux en prolifération expriment surtout de l'acide hyaluronique (Wight *et al.*, 1983).

Différents facteurs de croissance des cellules endothéliales ont été mis en évidence, définis comme les facteurs de croissance fixés à l'héparine ((heparin-binding growth factor ou HBGF) (Shing *et al.*, 1984) ou le facteur de croissance fibroblastique (fibroblast growth factor ou FGF) acide (aFGF) (Jaye *et al.*, 1986) ou basique (bFGF) (Vlodavski *et al.*, 1987)); et les facteurs de croissance non fixés à l'héparine (non heparin-binding growth factor). Ce dernier groupe est composé de :

- l'angiogénine, de poids moléculaire de 14 kD, présentant une activité ribonucléasique (Shapiro *et al.*, 1986),

- le facteur de croissance des cellules épidermales (epidermal growth factor ou EGF) dont l'activité est potentialisée par la thrombine, l'insuline et les facteurs de type insuline (insulin-like growth factor) (Gospadorowicz *et al.*, 1978).

D'autres facteurs sont mitogéniques pour les cellules endothéliales comme le facteur de croissance des cellules épithéliales (epithelial cell growth factor ou ECGF), et le PDGF qui est un facteur de

prolifération autocrine (King et Buchwald, 1984). Le gène codant pour le PDGF (c sis) est réprimé lorsque les cellules sont en contact (topoinhibition). L'ECGF est un facteur chimioattractant pour les cellules endothéliales dont les activités mitogéniques et chimioattractantes sont potentialisées par les glycosaminoglycannes de type héparine de la matrice extracellulaire.

Les facteurs inhibiteurs connus de la prolifération des cellules endothéliales sont :

- le facteur de croissance des tumeurs de type β (tumoral growth factor β ou TGF β) qui inhibe la prolifération *in vitro* (Heimark *et al.*, 1986) mais se comporte comme un facteur angiogénique *in vivo* (Sporn *et al.*, 1983) (par contre, le TGF α est angiogénique à faible dose (de 0,1 à 1 ng) et mitogénique à forte dose (de 1 à 5 ng)),
- le TNF α , qui induit également la mort des cellules endothéliales *in vitro* par apoptose (Cohen *et al.*, 1983),
- des facteurs retrouvés dans les tissus peu vascularisés (humeur vitrée, cartilage) qui ne sont pas caractérisés (Takigawa *et al.*, 1985).

C/ Le rôle de l'endothélium dans la perméabilité vasculaire

La localisation de l'endothélium implique de sa part un rôle crucial dans le transport transvasculaire. Bien que leurs parts respectives dans les processus de transport soient largement débattues, deux types de voies sont classiquement définies : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire.

Dans des conditions physiologiques normales (intégrité de l'endothélium vasculaire), les flux aqueux et de solutés sont sous le contrôle des forces osmotiques et hydrostatiques. Les protéines ne passant pas à travers la barrière endothéliale, la pression osmotique résultante permet à l'eau de rester dans les vaisseaux.

La diffusion est le mécanisme principal engagé dans les échanges gazeux, d'ions inorganiques et de petits solutés (diffusion de ces éléments des zones de forte concentration vers des zones de faible concentration, sans transfert de volume). Les cations, anions et solutés solubles dans l'eau (glucides, acides aminés) passent entre les cellules (au

niveau des zones de jonctions intercellulaires) (revu par Renkin, 1977). Les éléments comme O₂, N₂ et CO₂, substances solubles dans les lipides, pourraient pénétrer directement à travers les surfaces cellulaires (Scow *et al.*, 1976).

La force osmotique de sortie est augmentée quand le flux sanguin est augmenté ou que la résistance des capillaires diminue. Ce dernier état est essentiellement observé en présence de différents agents d'activation (comme l'histamine, la prostacycline, ...).

Les composés lipidiques passeraient par diffusion latérale à l'intérieur de la bicouche lipidique.

Pour les protéines plasmatiques de taille plus importante, les mécanismes de transport sont multiples, la part respective de chacun d'entre eux restant sujette à caution :

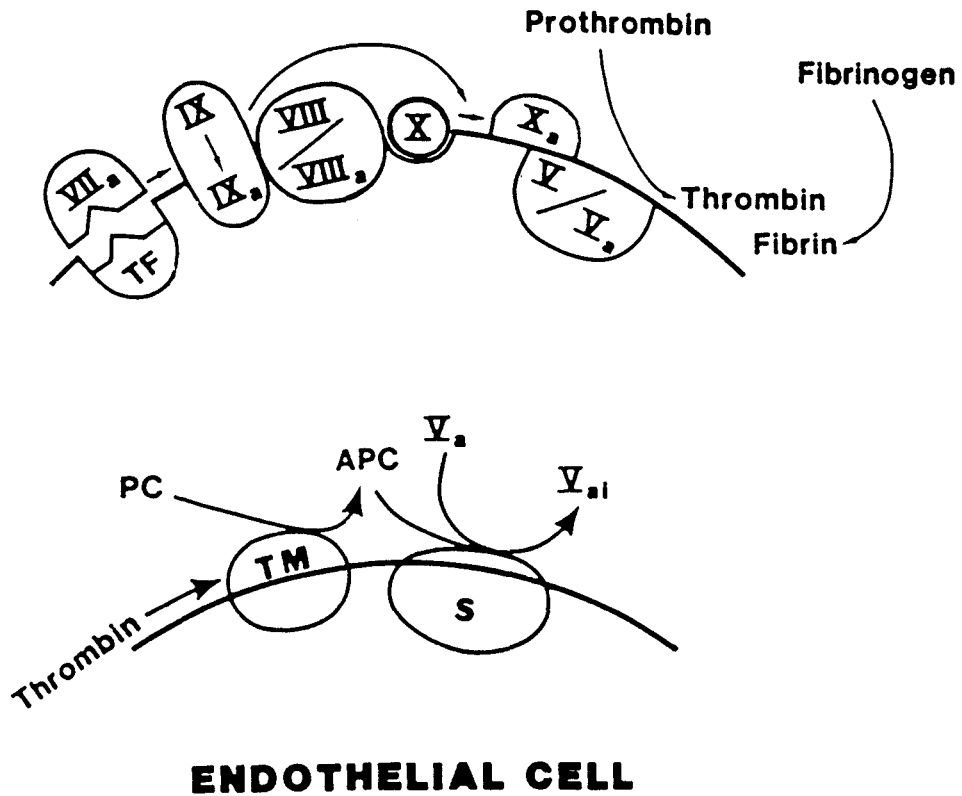
- la convection, par entrainement dans un courant, suite à la formation de pores plus larges entre les cellules (Simionescu *et al.*, 1972),

- par diffusion, suivant un gradient de concentration (Siflinger-Birnboim *et al.*, 1986),

- par des voies d'échange vésiculaires (transcytose entre les deux pôles cellulaires), constituées de canaux formés par la fusion transitoire des vésicules (revu par Frokjaer-Jensen, 1974).

Du fait du caractère électronégatif de la surface endothéliale, il a été avancé l'hypothèse selon laquelle les protéines anioniques seraient capables de traverser l'endothélium par migration, au moins jusqu'au niveau des jonctions serrées (Vehaskari *et al.*, 1984). Il reste cependant essentiel de se souvenir que le transport transvasculaire des protéines peut se faire via l'internalisation de récepteurs spécifiques (Ghitescu *et al.*, 1986).

Les différents éléments structuraux responsables de la régulation de la perméabilité vasculaire sont la glycocalix, les jonctions intercellulaires et la membrane basale. Le maintien d'une perméabilité normale requiert la présence d'albumine et d'orosomucoïdes (par interaction avec la glycocalix) (Curry et Michel, 1980). De nombreux travaux ont montré le rôle essentiel de l'albumine dans les échanges transvasculaires. L'albumine se fixe, de façon spécifique ou non, à la surface de l'endothélium et diminue ainsi sa perméabilité aux fluides et macromolécules. Son accumulation dans le sang ou les tissus contribue beaucoup à la distribution des fluides entre ces deux sites tissulaires.



ENDOTHELIAL CELL

Figure 3 : Régulation schématique des voies procoagulantes (haut) et anticoagulantes (voie de la protéine C) (bas) de la cellule endothéliale. TF: facteur tissulaire; IX, VIII, X, V: facteurs de la coagulation IX, VIII, X, et V; avec un a représentent les formes activées; PS et PC: protéines S et C; APC: protéine activée; TM: thrombomoduline; V_{ai}: facteur Va inactivé (d'après D.M. Stern et P.P. Nawroth. Dans *Endothelial cells*, édité par U.S. Ryan, CRC Press, 1988).

Cependant, comme pour les macromolécules, le mode de transport reste encore hypothétique (transcytose ou convection par de larges pores entre les cellules endothéliales) (Simionescu *et al.*, 1987; revu par Rippe et Haraldsen, 1987).

L'acide hyaluronique, structure macromoléculaire de plusieurs millions de kilodaltons de poids moléculaire, intervient également dans la régulation des mécanismes de transport transvasculaire. En effet, en raison de sa taille, l'acide hyaluronique, en se fixant à des récepteurs présents à la surface de la cellule endothéliale (revu par Turley, 1991), peut exclure toute autre molécule. En augmentant ainsi la concentration locale, ceci a pour résultat d'augmenter la pression osmotique (revu par Bothner et Wik, 1987). L'acide hyaluronique est surtout produit par la peau; au niveau pulmonaire, on le retrouve dans les zones péri-alvéolaires et les tissus péri-bronchiques (Lebel *et al.*, 1988).

D/ L'endothélium et l'hémostase :

A son niveau le plus simple, l'hémostase se compose de trois systèmes interdépendants (revu par Crutchley, 1987) :

- l'agrégation plaquettaire, qui conduit à une occlusion rapide,
- la coagulation sanguine qui forme le caillot,
- le système fibrinolytique, pour la lyse du caillot sanguin.

A l'état basal, la cellule endothéliale se comporte comme une surface antithrombotique. Lorsqu'elle est activée, ou suite à une agression conduisant à une dénudation vasculaire, elle participe activement au développement de la thrombose ainsi qu'à sa modulation (cf Fig. 3).

Lors de la dénudation endothéliale, la matrice extracellulaire est en contact direct avec les plaquette sanguines, qui présentent une affinité importante pour les constituants de la membrane basale. Cette fixation induit une activation plaquettaire, conduisant à une agrégation (Nieuwenhuis *et al.*, 1985). L'activation du système de coagulation se caractérise par un dépôt de fibrine. La cellule endothéliale participe activement à toutes les étapes de formation et de destruction du caillot sanguin, par la production de médiateurs pro ou antiagrégants, ainsi que fibrinolytiques.

Avant de développer les principale fonctions de l'endothélium dans l'hémostase, il est important de remarquer que, quelque-soit la voie

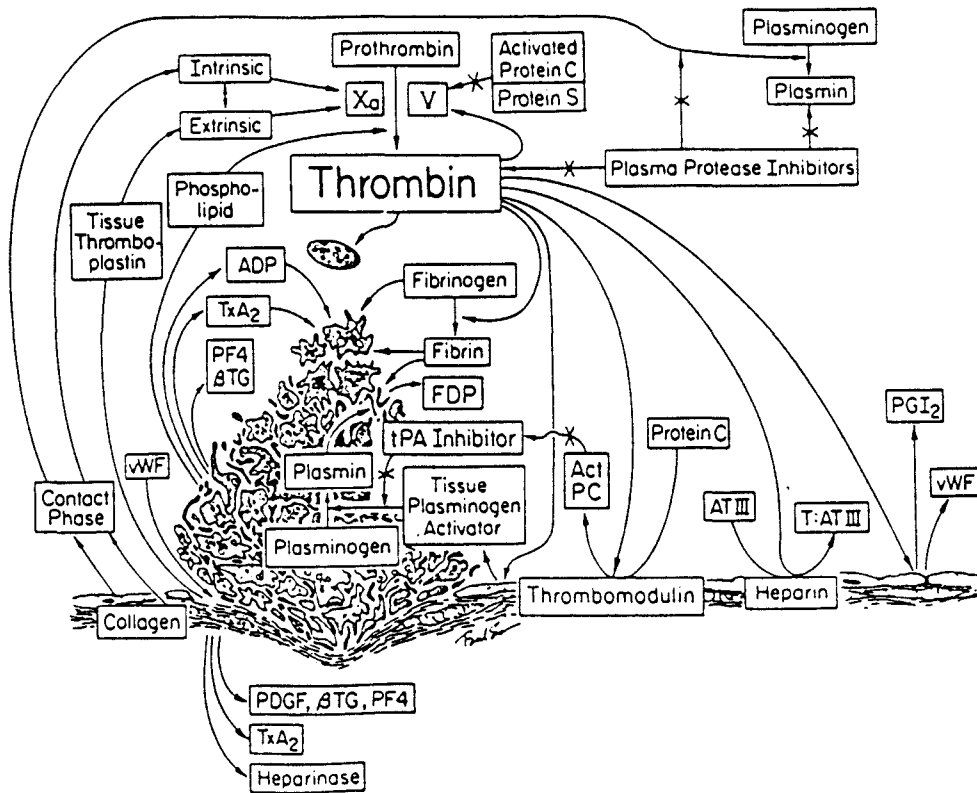


Figure 4 : Mécanismes endothéliaux limitant l'extension de la formation du caillot sanguin. L'endothélium intact résiste activement à l'extension du thrombus. La formation de l'agrégat plaquettaire est limitée par un endothélium intact par inactivation de l'ADP, capture des amines vasoactives, facilitation de la formation du complexe thrombine-antithrombine III, synthèse et libération de PGI₂, libération de l'activateur du plaminogène, activation de la protéine C (qui détruit les facteurs V, Va, C, VII et VIIa) (d'après L. Harker. *Am. J. Cardiol.*, 60, 20B, 1987).

utilisée (pro ou anticoagulante), de nombreux cofacteurs sont localisés à la surface de la cellule endothéliale. L'initiation de la coagulation conduit à la formation du complexe IXa-VIIIa-X, qui aboutit à la génération du facteur Xa (ou facteur X activé). Celui-ci forme un point focal, localisé dans le vaisseau, pour l'activation du système de coagulation et la formation d'un dépôt de fibrine isolé.

1) *Les propriétés antithrombogènes de l'endothélium*

L'endothélium se comporte, à l'état basal, comme une surface antithrombogène passive (par l'expression de la glycocalix formée de protéoglycannes) ou active par la production de facteurs anticoagulants comme la prostacycline, l'adénosine diphosphatase, la thrombomoduline, ou grâce à la capture des amines vasoactives ou de la thrombine (cf Fig. 4). Ce système permet également de limiter la formation du caillot lorsque la coagulation est initiée.

La PGI₂ est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire en plus d'être une prostaglandine vasodilatatrice (le processus de coagulation s'accompagnant d'une vasoconstriction) (Crutchley *et al.*, 1985). Sa production est très nettement augmentée en présence de bradykinine (hormone peptidique vasodilatatrice) (Whorton *et al.*, 1981) ou de thrombine (qui est un activateur de l'agrégation plaquettaire) (Weksler *et al.*, 1978). Sa production est inhibée par les glucocorticoïdes par induction d'inhibiteurs des phospholipases (Cloix *et al.*, 1983).

L'activité adénosine diphosphatase exprimée par les cellules endothéliales constitue également un facteur limitant de l'agrégation plaquettaire (Cooper *et al.*, 1979). L'ADP est libéré par les plaquettes agrégées et constitue un puissant facteur prothrombotique. Il est ensuite dégradé par l'ADPase en adénosine monophosphate, lui-même dégradé en adénosine qui est captée par la cellule endothéliale. L'adénosine est aussi un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire.

La thrombomoduline (également nommée anti-thrombogenic factor) est associée à la surface de la cellule endothéliale (revu par Crutchley, 1987). La formation du complexe thrombine-thrombomoduline active la protéine C plasmatique qui, en combinaison avec la protéine S d'origine endothéliale, inactive le facteur Va (Stern *et al.*, 1986). De plus, l'activation de la protéine C libère le facteur fibrinolytique que constitue

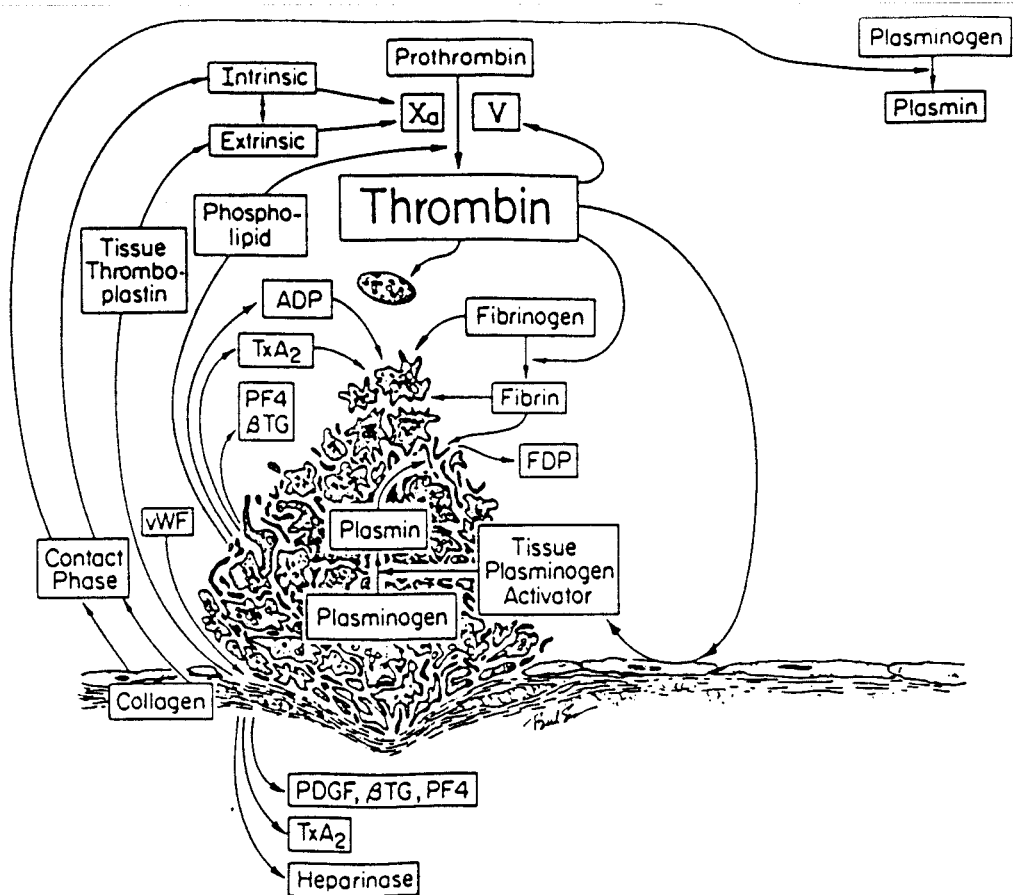


Figure 5 : Formation du caillot sanguin. La destruction endothéliale expose la matrice conjonctive sous endothéliale au flux sanguin. Les plaquettes se fixent à la matrice par interaction des récepteurs plaquettaires GPIa et GPIb respectivement au facteur von Willebrand et au collagène. Un caillot instable se forme par différents mécanismes interactifs mais indépendants, incluant la génération de TxA₂, la libération d'ADP des granules denses, et l'activation plaquettaire par la thrombine. Le recrutement plaquettaire requiert l'expression rapide du complexe membranaire de fixation du fibrinogène (GPIIb/GPIIIa) et leur pontage par fixation du fibrinogène dépendante du Ca²⁺. La fibronectine et la thrombospondine peuvent moduler l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. La thrombine est produite localement à la surface des plaquettes par les voies intrinsèques et extrinsèques. Le facteur V modifié par la thrombine (facteur Va) se fixe aux plaquettes. Le facteur Va fixé aux plaquettes sert de récepteur plaquettaire de haute affinité pour le facteur Xa dans l'assemblage final du complexe prothrombinase (qui convertit la prothrombine en thrombine). La génération de thrombine initie un puissant mécanisme d'amplification sur la surface plaquettaire pour l'activation explosive de la cascade de la coagulation et la formation de fibrine (d'après L. Harker. *Am. J. Cardiol.*, 60, 20B, 1987).

l'activateur du plasminogène, et inhibe les facteurs V, V activé, VIII et VIII activé.

L'antithrombine III, qui se fixe à la cellule endothéliale via les glycosaminoglycannes présents à sa surface, forme un complexe inhibiteur avec la thrombine et de nombreux autres facteurs de la coagulation (Chan et Chan, 1981). Cette inhibition est accélérée par la fixation d'héparine à la thrombine, complexe présentant une affinité plus importante pour le facteur antithrombine III (revu par Rosenberg, 1987).

Comme nous avons pu le mentionner dans la partie A/, la cellule endothéliale présente à sa surface des héparanes sulfates, associés à la glycocalix, et présentant des fonctions anticoagulantes identiques à celles portées par l'héparine. Ces molécules permettent également de fixer l'antithrombine III à la surface de la cellule endothéliale et ainsi de conserver ses propriétés biologiques (Downing *et al.*, 1978).

2) Les activités prothrombotiques de l'endothélium :

Différents médiateurs produits par la cellule endothéliale présentent des activités prothrombotiques. Ce sont essentiellement la thromboplastine (facteur tissulaire ou facteur III) mais également des cofacteurs comme le facteur vonWillebrand, la thrombospondine ou la fibronectine (cf Fig. 5).

La thromboplastine, dont il n'existe pas de forme inactive, est peu exprimée par la cellule endothéliale au repos (constituant à priori le seul mode de régulation de son expression) et reste associée à la surface cellulaire (Maynard *et al.*, 1975). Elle constitue un puissant facteur procoagulant comme activateur de la voie classique de la coagulation (elle accélère le clivage du facteur X en facteur X activé induite par le facteur VIII activé). Elle participe aussi à la voie intrinsèque (accélère le clivage du facteur IX en facteur IX activé induit par le facteur VI activé) (Osterud et Rapaport, 1977). Lors d'une activation de la cellule endothéliale, sa néosynthèse induit une augmentation de son expression détectable à 2 h et maximale 4 à 6 h après le début du stimulus (Thompson *et al.*, 1980).

La thromboplastine permet l'assemblage du complexe prothrombinase à la surface de la cellule endothéliale (Stern *et al.*, 1985).

L'association de la thromboplastine avec les facteurs circulants VI, VIII, IX, et X conduit à l'activation de la prothrombine. Cette activation donne naissance au fibrinopeptide A et au dépôt de fibrine à la surface de la cellule endothéliale.

L'activité de la thromboplastine est augmentée par le lipopolysaccharide (LPS) (Colucci *et al.*, 1983), le phorbol myristate acétate (PMA) (Lyberg *et al.*, 1983), l'interleukine 1 (IL-1) (Bevilacqua *et al.*, 1984), le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) (Galdal *et al.*, 1985) ou la thrombine. Son expression est augmentée quand en parallèle est diminuée l'expression de thrombomoduline. Par contre, son expression est parallèle à l'expression de prostacycline (PGI₂), quoique l'expression de thromboplastine soit, après activation, plus rapide que celle de la PGI₂ (Hopkins *et al.*, 1984).

Le facteur vonWillebrand (vW) est synthétisé exclusivement par la cellule endothéliale et les mégacaryocytes (et donc exprimé également par les plaquettes) (revu par Ruggeri et Ware, 1993). Il présente deux fonctions :

- la médiation de l'adhérence plaquettaire et la formation du caillot aux sites d'agression vasculaire (Sakariassen *et al.*, 1979),
- il sert de protéine porteuse pour le facteur VIII procoagulant dans le sang circulant (revu par Johnson, 1980).

Ce facteur est produit de façon constitutive par la cellule endothéliale, et est libéré vers le pôle apical (dans le sang) (Jaffe *et al.*, 1974; Hormia *et al.*, 1983) ou vers le pôle basal (accumulation dans la matrice extracellulaire) (Rand *et al.*, 1980). Il est stocké dans les corps de Weibel Palade (Sporn *et al.*, 1986) pour la cellule endothéliale, ou dans les granules α plaquettaires (en présence de nombreux autres médiateurs de la coagulation comme le fibrinogène, la thrombospondine ou la fibronectine).

Le facteur vW localisé dans la matrice sous endothéliale médie l'adhérence des plaquettes en agissant comme un pont entre les composants vasculaires ou matriciels (dont les sites de fixation ne sont pas connus) (Sakariassen *et al.*, 1979) et les récepteurs spécifiques présents à la surface des plaquettes (soit la molécule GPIb du complexe GPIb-IX-V, indépendante de l'activation plaquettaire; soit l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou GPIIb-IIIa, qui nécessite une activation plaquettaire). Cette fixation favorise ainsi la formation du caillot.

Le facteur vW circulant se fixe au facteur VIII, prolongeant sa demi-vie. De plus, il agit comme catalyseur de clivage du facteur VIII par la thrombine.

La matrice sous endothéliale, dont les constituants sont synthétisés par la cellule endothéliale, constitue un puissant activateur de la coagulation (collagènes, thrombospondine, laminine, fibronectine, ...) (Nieuwenhuis *et al.*, 1985).

Il est important également de noter que la thrombine, dernière enzyme activée dans le processus de la coagulation, induit la production d'IL-1 par la cellule endothéliale, constituant une boucle d'amplification positive du processus de coagulation (Stern *et al.*, 1985).

3) *Les activités fibrinolytiques de l'endothélium :*

Après la formation du dépôt de fibrine, la restauration d'un endothélium intact nécessite la disparition du caillot fibreux et la recolonisation de la zone par les cellules endothéliales. Cette fibrinolyse est effectuée par un ensemble d'enzymes protéolytiques, essentiellement sous le contrôle des cellules endothéliales environnantes (cf Fig. 4).

Le principal effecteur physiologique de la fibrinolyse est la plasmine, dont la forme inactive est le plasminogène. Deux types d'activateurs du plasminogène sont exprimés par la cellule endothéliale :

- l'activateur du plasminogène de type urokinase (ou uPA), qui ne se fixe pas au caillot pour être actif, et est produit sous forme inactive (Camiolo *et al.*, 1971),

- l'activateur du plasminogène de type tissulaire (ou tPA), dont l'activité enzymatique nécessite qu'il soit fixé au caillot. Il présente la plus grande activité enzymatique (Thorsen *et al.*, 1972).

La séquestration de l'activateur du plasminogène tissulaire par le caillot sert à protéger la plasmine de son inhibiteur qu'est l' α_2 anti-plasmine (revu par Wiman et Collen, 1978). La formation du complexe fibrine-activateur du plasminogène tissulaire-plasmine induit la lyse de la fibrine (revu par Ranby, 1982). Cette étape résulte en une perte d'affinité de l'activateur du plasminogène tissulaire pour la fibrine, se traduisant par

une perte d'activité et d'affinité pour la fibrine. L'activateur du plasminogène tissulaire se détache et est alors détruit par l' α 2 anti-plasmine.

Parallèlement à ces principaux médiateurs sont également produits des activateurs des enzymes uPA et tPA (revu par Levin, 1983), ainsi que des inhibiteurs de fibrinolyse (inhibiteurs des activateurs du plasminogène), qui ne sont pas encore caractérisés (Sprengers *et al.*, 1984).

L'activité fibrinolytique des cellules endothéliales est diminuée après exposition à la thrombine, qui inhibe l'activateur du plasminogène de type urokinase, et active la protéine C (qui diminue la production d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène) (Levin et Loskutoff, 1982). Elle est également diminuée par les glucocorticoïdes ainsi que le LPS et l'IL-1 (revu par Seifert et Gelehrter, 1978).

D/ L'endothélium dans la régulation de la vasomotricité :

La vasomotricité est assurée par les cellules musculaires lisses qui entourent les cellules endothéliales. L'endothélium vasculaire régule le tonus des cellules musculaires lisses sous jacentes, vers une vasoconstriction ou une vasodilatation, par :

- une barrière physique entre les médiateurs véhiculés par le sang et leur cible cellulaire,
- la capture et la dégradation de substances vasoactives,
- la conversion de précurseurs inactifs en produits vasoactifs,
- la synthèse et la libération de substances vasoactives,
- la régulation du tonus vasculaire par le système nerveux autonome.

1) La conversion de précurseurs inactifs en produits vasoactifs :

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ou ECA) est une enzyme exprimée de manière constitutive à la surface de la cellule endothéliale (Ryan *et al.*, 1976). Elle convertit l'angiotensine I en angiotensine II (puissant vasoconstricteur) et dégrade la bradykinine (puissant vasodilatateur), résultant en une augmentation de la pression vasculaire (revu par Ryan, 1985). Sa localisation à la surface de la cellule

endothéliale lui permet de réguler les tonus vasculaires pulmonaires et systémiques. Son activité est augmentée dans des conditions d'hypoxie, mais est diminuée dans des conditions d'hyperoxie, résultant, du fait de la vasoconstriction qu'elle initie, en une hypertension pulmonaire.

2) La capture et la dégradation de substances vasoactives :

Les nucléotides de l'adénine présentent de nombreuses fonctions extracellulaires, avec en particulier de puissants effets vasculaires (sur les fonctions plaquettaires et le tonus vasculaire).

L'adénosine triphosphate (ATP) est un puissant vasodilatateur de la plupart des lits vasculaires : il induit une diminution de la pression sanguine, une bradychardie ainsi qu'une vasodilatation périphérique (revu par Emmelin et Feldberg, 1948). Ses effets sont directs sur les cellules musculaires lisses. L'ATP induit la production du facteur relaxant produit par la cellule endothéliale (endothelium-derived relaxing factor ou EDRF) qui est un puissant myorelaxant (revu par Furchgott, 1984) (les propriétés biologiques de ce médiateur seront exposées dans la partie 3 de ce chapitre) .

L'adénosine diphosphate (ADP) possède les mêmes propriétés vasoactives que l'ATP, en plus d'être un puissant agent agrégant (revu par Born, 1962).

L'origine de ces nucléotides dans le sang reste relativement obscure. Ils proviendraient de destructions cellulaires ou seraient produits lors du processus d'agrégation plaquettaire (Born et Kratzer, 1984; Ugurbil et Holmsen, 1981). Au niveau tissulaire, l'ATP est libéré après activation des terminaisons nerveuses purinergiques (revu par Burnstock, 1979).

Leur action au niveau des cellules cibles se fait par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques (les purinocepteurs) qui sont de deux types :

- les purinocepteurs de type 1 (P₁ ou A) qui fixent l'AMP. Ils sont de deux types : le récepteur A₁ qui inhibe l'adénylate cyclase et le récepteur A₂ qui l'active (Van Calcar *et al.*, 1979).

- les purinocepteurs de type 2 (ou P₂) qui fixent indifféremment l'ATP et l'ADP (dont il existe deux types : P_{2X} et P_{2Y}). Toutes les cellules endothéliales présentent le récepteur P_{2Y} (revu par Gordon, 1986). Certains types de cellules endothéliales exprimeraient également le récepteur P_{2X}

présent essentiellement sur les cellules musculaires lisses, médiateur d'une vasoconstriction sous une activation dépendante de l'ATP.

L'ATP induit également la production de prostacycline (prostaglandine vasodilatatrice et antiagrégante).

Comme nous l'avons déjà mentionné dans la partie B/, les cellules endothéliales expriment à leur surface des ectonucléotidases, enzymes responsables de la dégradation des nucléotides de l'adénine en adénine, qui est captée du sang circulant par la cellule endothéliale (revu par Smith et Ryan, 1971; Pearson *et al.*, 1987)

3) *La synthèse par la cellule endothéliale de substances vasoactives:*

Les cellules endothéliales sont capables de produire des substances vasoactives (constrictrices ou dilatatrices) de manière constitutive ou après stimulation.

Le premier médiateur vasoactif décrit au niveau de la cellule endothéliale est la prostacycline (ou PGI₂). Cette prostaglandine est exprimée après activation de la cellule endothéliale (par la bradykinine ou la thrombine) et possède des propriétés vasodilatatrices. La PGI₂ est également produite par les cellules musculaires lisses vasculaires et non vasculaires.

De nombreux travaux ont montré l'existence d'une vasorelaxation dépendante de l'endothélium. En effet, une dénudation endothéliale suivie d'une stimulation par l'acétylcholine induit une vasoconstriction, alors que normalement on observe une réponse vasodilatatrice. Cette observation, confirmée par l'emploi d'autres substances présumées vasodilatatrices comme l'ATP ou la bradykinine, ont suugéré l'existence d'un facteur relaxant dérivé de la cellule endothéliale (endothelium-derived relaxing factor ou EDRF) (revu par Furchott et Zawadki, 1980).

Ce médiateur est de courte durée de vie et est détruit par les anions superoxydes. Son activité est similaire à l'action du monoxyde d'azote ou NO.

Le monoxyde d'azote présente des fonctions essentielles dans l'hémostase et la défense de l'organisme. Sa demi-vie, comme pour l'EDRF,

est courte (6 secondes) et il ne présente qu'une faible spécificité. Outre ses capacités vasorelaxantes, il induit une inhibition de l'agrégation plaquettaire et se comporte comme un neurotransmetteur des fibres nerveuses non adrénériques et non cholinergiques.

L'enzyme induisant la production de NO est la NO synthétase, qui se présente sous deux formes :

- la NO synthétase constitutive qui est clonée, dont l'activité est dépendante du cation divalent Ca^{2+} et de la calmoduline en tant que cofacteur (Janssens *et al.*, 1992). Elle est exprimée par les cellules endothéliales, les neutrophiles, les mastocytes et les plaquettes,

- la NO synthétase inductible, indépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline, activable par l'interféron gamma ($IFN\gamma$) et le LPS (Xie *et al.*, 1992). Cette enzyme est exprimée par les macrophages, les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales.

Les inhibiteurs des enzymes NO synthétases sont peu connus. Leurs activités sont cependant inhibées par les glucocorticoïdes (Di Rosa *et al.*, 1990) et par des cytokines (le facteur de croissance transformant de type β ou $TGF\beta$, l'IL-4 et l'IL-10) (Ding *et al.*, 1990).

Les fonctions du NO sont maintenant largement documentées : Le NO sert de neuromédiateur dans le système nerveux central (revu par Schuman et Madison, 1991), et de neurotransmetteur dans le système nerveux périphérique (revu par Snyder et Bredt, 1991). Ses fonctions sur le système cardiovasculaire sont multiples : en plus de la régulation de la pression sanguine basale (Rees *et al.*, 1989), il joue un rôle dans l'hypotension associée à l'administration de LPS (Thiemermann et Vane 1990) ou de cytokines (Kilbourn *et al.*, 1990). Il inhibe la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses (Nakaki *et al.*, 1990), l'adhésion des leucocytes à l'endothélium (Kubes *et al.*, 1991) et la génération d'endothéline (Boulangier et Lüscher, 1990). Au niveau pulmonaire, le NO induit une augmentation de la résistance vasculaire induite par l'hypoxie (Persson *et al.*, 1990). Le NO inhibe de plus la prolifération des lymphocytes T induite par les macrophages (Albina *et al.*, 1991).

Après la mise en évidence de la production du premier facteur vasoactif produit par la cellule endothéliale (la prostacycline en 1976) et la mise en évidence d'un facteur relaxant (EDRF/NO en 1980), l'existence d'un médiateur vasoconstricteur, analogue à l'EDRF, a été suspectée (endothelium-derived constricting factor, ou EDCF) (Garland et Keatinge,

1982). Ce médiateur a été purifié et identifié comme un polypeptide de 21 acides aminés : l'endothéline (ou ET) (Yanagisawa *et al.*, 1988).

Trois gènes codent pour des formes différentes de l'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3) (Inoue *et al.*, 1989). Une quatrième forme a été décrite, spécifique de l'intestin : ET β ou VIC (pour vasoactive intestinal-constricting peptide) (Saida *et al.*, 1989).

Un précurseur de 203 acides aminés (la préproendothéline) est clivée en un peptide de 38 acides aminés : la proendothéline (ou big endothelin) donnant naissance ultérieurement à l'endothéline (Yanagisawa *et al.*, 1988). La conversion de la proendothéline en endothéline s'exerce par l'enzyme de conversion de l'endothéline (endothelin converting enzyme ou ECE) (Okada *et al.*, 1990). Malgré le fait qu'elle ne soit pas caractérisée, il s'agirait d'une métalloprotéinase neutre de surface.

La conversion de la proendothéline en endothéline active dépend du tissu ou des conditions de culture *in vitro*, suggérant donc une maturation régulée (revu par Nayler, 1990). Son expression apparaît spécifique de tissu, la cellule endothéliale humaine exprimant l'ET-1 mais pas l'ET-2 et l'ET-3 (Inoue *et al.*, 1989); ET-1 et ET-3 sont fortement exprimés durant le développement embryonnaire mais peu dans les tissus adultes (poumon ou foie).

Par effet autocrine sur la cellule endothéliale, l'endothéline induit la modulation de la prolifération endothéliale (Takagi *et al.*, 1990), de la synthèse de prostacycline et de EDRF/NO (qui inhibent par un effet négatif la production d'endothéline) (De Nucci *et al.*, 1988), et de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Kawaguchi *et al.*, 1990). Par un effet paracrine, l'endothéline (plus puissant agent contracteur connu) induit la contraction et la mitose des cellules musculaires lisses (revu par Rubanyi, 1989). Ces cellules modulent l'effet de l'endothéline en produisant des enzymes de surface détruisant l'endothéline et par la diffusion de substances inhibitrices de la sécrétion d'endothéline par les cellules endothéliales (bien que ces facteurs n'aient pas encore été caractérisés) (Cade *et al.*, 1990).

La production d'endothéline par les cellules endothéliales est augmentée par le TGF β , la thrombine (Yanagisawa *et al.*, 1988), l'angiotensine II et l'IL-1 (Yoshizumi *et al.*, 1990).

L'action de l'endothéline agit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques dont deux formes sont clonées (ET_A et ET_B) : ils appartiennent à la superfamille des récepteurs de type rhodopsine, possédant 7 domaines

transmembranaires, chacun étant couplé à une protéine G. Le récepteur ET_A est spécifique de ET-1 et est exprimé au niveau du système nerveux central, des poumons et du coeur (Sakurai *et al.*, 1990). Le récepteur ET_B fixe les trois formes de l'endothéline (Arai *et al.*, 1990) et participerait à la production de prostacycline et de EDRF/NO induite par l'endothéline de manière autocrine sur la cellule endothéliale (Cade *et al.*, 1990).

4) *Le système nerveux autonome dans la régulation du tonus vasculaire :*

La régulation du tonus vasculaire bronchique est sous le contrôle des systèmes adrénergiques et cholinergiques.

a) Le contrôle adrénergique :

En périphérie, les catécholamines (noradrénaline et adrénaline) sont stockées et libérées à partir de deux sites :

- les neurones adrénergiques postganglionnaires (production de noradrénaline),
- la médula adrénale (production d'adrénaline).

Les adrénoccepteurs (de type α pour la noradrénaline et de type β pour l'adrénaline) se trouvent sur les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les terminaisons nerveuses.

Par l'intermédiaire de leurs récepteurs sur les cellules musculaires lisses, la noradrénaline induit une vasoconstriction, tandis que l'adrénaline induit une vasorelaxation (Lung *et al.*, 1976).

Le système adrénergique induit la production par la cellule endothéliale de plusieurs médiateurs qui agissent sur les cellules musculaires lisses :

- EDRF/NO (Vanhoutte *et al.*, 1986; Grylewski *et al.*, 1986)
- un facteur induisant une hyperpolarisation de la membrane des cellules musculaires lisses (endothelium-derived hyperpolarizing factor ou EDHF) (revu par Komori et Suzuki, 1987).

b) Le contrôle cholinergique :

L'acétylcholine, par fixation aux récepteurs muscariniques, induit une bronchoconstriction et une vasodilatation (Vanhoutte *et al.*, 1981; revu par Duckles et Garcia-Villalon, 1990). Ce médiateur possède le plus un puissant effet inhibiteur sur la production de noradrénaline par les terminaisons nerveuses préjonctionnelles. Paradoxalement, l'acétylcholine peut induire une constriction lorsqu'il n'y a plus intégrité de l'endothélium. Ces deux observations sont à mettre en relation avec les effets connus de l'acétylcholine sur les cellules endothéliales, qui restent limités à la production des médiateurs EDRF/NO et EDHF (revu par Komori et Vanhoutte, 1990).

L'ensemble de ces informations montrent que la cellule endothéliale participe activement aux processus de régulation du tonus vasculaire par la production ou le métabolisme de substances vasoconstrictrices ou vasorelaxantes. Il reste néanmoins essentiel de rappeler que l'hypoxie, plus que toutes les substances vasomodulatrices, reste l'élément le plus important de régulation du tonus vasculaire, par l'induction d'une vasoconstriction réflexe (associée à une augmentation du flux sanguin pulmonaire), pour laquelle les mécanismes de régulation sont mal connus.

E/ L'endothélium et le système immunitaire :

L'implication de la cellule endothéliale dans les mécanismes immunitaires fait suite à la mise en évidence à sa surface de structures impliquées dans ceux-ci (comme les antigènes majeurs d'histocompatibilité de classe II (revu par Pober et Gimbrone, 1982), les récepteurs pour les facteurs du complément ou des immunoglobulines) .

La localisation de la cellule endothéliale entre les leucocytes du sang et les tissus lui confère un rôle crucial de régulation de la migration leucocytaire transvasculaire (observée lors de l'initiation de la réaction immunitaire, du développement de la réaction inflammatoire ou de la localisation tissulaire des leucocytes (encore appelée "homing")) (revu par Issekutz, 1992).

Les propriétés de la cellule endothéliale sont modulables par de nombreux médiateurs immunologiques (prostaglandines, leucotriènes, cytokines), grâce à l'expression de médiateurs spécifiques. Cette cellule produit également de tels médiateurs, suggérant donc une participation active dans les processus de développement de la réaction immune.

1) *Les récepteurs du complément et des immunoglobulines sur la cellule endothéliale :*

La cellule endothéliale fixe les facteurs C1q, C3 et C4 du complément, de façon indépendante à leur combinaison aux immunoglobulines. Le facteur C1q (sous-unité du facteur C1) se combine réversiblement aux immunoglobulines pour former des immunocomplexes, constituant la première étape de la voie classique du complément. Le rôle de cette fixation, qui est effective également sur la matrice extracellulaire, reste inconnu (Ryan *et al.*, 1981).

Les récepteurs pour les immunoglobulines (qui se fixent par l'intermédiaire de leur fragment constant), ainsi que le récepteur pour le facteur C3 du complément, ne sont exprimés que lors de l'activation de la cellule endothéliale (Johnson *et al.*, 1975).

2) *Le pool marginé pulmonaire :*

La membrane alvéolocapillaire médie la jonction du milieu extérieur avec l'espace vasculaire, représentant une grande surface d'échange où le sang est soumis à un flux important sous une pression faible. Peut être du fait de ce contact intime avec le milieu extérieur, le poumon est le siège d'une séquestration importante de leucocytes (constitué essentiellement de polynucléaires neutrophiles), afin de répondre rapidement à toute agression externe (Ambrus *et al.*, 1954; Bierman *et al.*, 1952).

Ce pool est en équilibre dynamique avec les leucocytes circulants et constitue un réservoir cellulaire qui peut être rapidement mobilisé.

Les raisons de la présence de ce pool marginé apparaissent multiples :

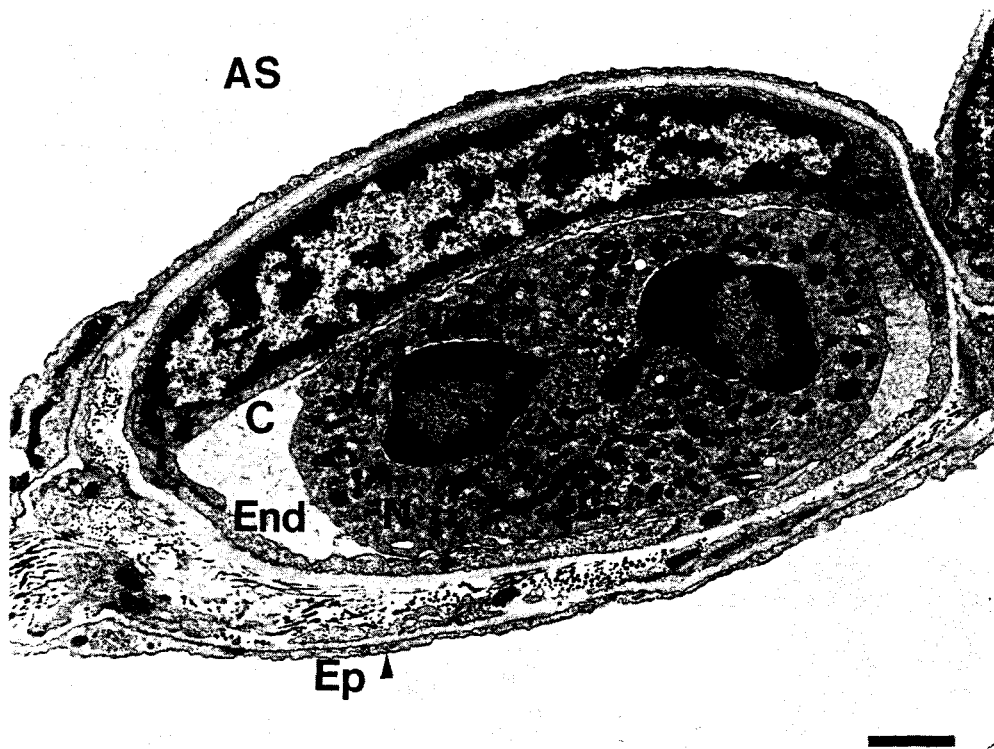


Photo 2 : Vue en microscopie électronique d'un neutrophile (N) localisé dans un capillaire alvéolaire (C) dans une section de poumon de chien. Noter les contacts étroits établis entre le neutrophile et l'endothélium (End). L'épithélium alvéolaire (Ep) est adjacent de l'espace alvéolaire (AS) (Grossissement : x 1080; barre = 1 μ m) (d'après M.G. Tonnesen, G.S. Worthen, D.C. Lien, et P. Henson. Dans *Endothelial cells*, édité par U.S. Ryan, CRC Press, 1988)

- une pression sanguine faible, ce pool recirculant quand la pression augmente (lors d'un exercice par exemple) (revu par Karatzas et Lee, 1969),

- le phénomène de roulement, dû aux dimensions anatomiques des capillaires (4 à 6 μm de diamètre) dans lesquels les leucocytes (environ 10 μm de diamètre) doivent circuler, les forces de frottement (avec la surface endothéliale mais aussi avec les autres cellules du sang) qui en résultent constituant les bases physiques de cette séquestration (Schmid-Schonbein *et al.*, 1980),

- l'adhérence des leucocytes par l'intermédiaire des molécules d'adhésion (cf partie 3) de cette section) (Bevilacqua *et al.*, 1985).

Un équilibre constant s'établit donc entre l'adhérence, les phénomènes de frottement et le flux impliqué par la pression sanguine (cf photo 2).

3) *Les molécules d'adhésion dans les interactions des leucocytes avec les cellules endothéliales :*

Les interactions entre les leucocytes et les cellules endothéliales, phase initiale qui permet la migration transvasculaire des leucocytes, représentent un processus normal dans l'initiation des mécanismes de défense du système immunitaire, de réaction inflammatoire et de métastase. Ces interactions constituent un réseau complexe de coopérations cellulaires:

- l'ensemble des mécanismes d'adhésion cellulaire est sous le contrôle de nombreux médiateurs (prostaglandines, leucotriènes, cytokines) d'origines leucocytaires, endothéliales ou de tout autres types cellulaires qui participent activement à l'initiation et la progression de la réaction immunitaire (entre-autres des cellules tissulaires : cellules épithéliales, mastocytes, macrophages...).

- l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales par l'intermédiaire des molécules d'adhésion cellulaire, suivie par une migration transvasculaire et une diapédèse tissulaire vers les sites où se développe la réaction immune. Les mécanismes de régulation de ce processus, qu'ils soient d'origine leucocytaire ou endothéliale, sont multiples. Ils interviennent à différentes étapes de ce processus par la production de facteurs chimiotactiques, qui vont amener les leucocytes à

TABLE 1 : MOLECULES D'ADHESION EXPRIMEES PAR LA CELLULE ENDOTHELIALE

Famille	Molécules	Exprimées par	en base	Expression augmentée par	maximale à	Ligands
Super famille des Ig	ICAM 1 (CD54)	CE, Ly, M, CI, CDF, Fb, Th	+	TNF, IL-1, IFN, LPS	24 h	LFA 1
	ICAM 2	CE, ly, M, N, CD	+	TNF		MAC 1
	ICAM 3	CE, ly, M, N	?			
	VCAM 1	CE, M, CD, My, Fb	0	TNF, IL-1, IL-4, LPS	6 h	VLA 4
	PECAM 1 (CD31)	Pt, lyT, CE, M, G	+			
Sélectines (S)	E-S. ELAM 1	EC	0	TNF, IL-1, IFN, LPS	6 h	Slalyl-Le ^x
	P-S. GMP 140 (CD62)	EC, Pt	0	PMA, Thrombine, Histamine	15 min	Slalyl-Le ^x
	L-S. LAM 1 ou Leu 8	EC, ly, M, N	?			

proximité de la zone tissulaire dans laquelle ils sont amenés à migrer, ou la modulation de l'expression des molécules d'adhésion.

L'adhérence des leucocytes s'effectue généralement dans les veinules postcapillaires. Par contre, au niveau pulmonaire, cette adhérence apparaît restreinte aux capillaires, dans lesquels se retrouvent le pool marginal (revu par Shaw, 1980). Cette adhérence des leucocytes est médiée par l'interaction entre des molécules d'adhésion exprimées par les leucocytes et les cellules endothéliales (basée sur le principe de l'interaction du récepteur avec son ligand). Ces molécules d'adhésion servent également à l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice sousendothéliale ainsi qu'à l'adhésion entre les cellules (maintien de l'intégrité de l'endothélium).

a) Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales :

Les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales appartiennent à plusieurs familles de molécules, dont la classification est basée sur des caractéristiques structurales et comportementales : la superfamille des immunoglobulines, les sélectines, les adressines et les intégrines (cf tableau 1).

a1) Les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines :

Les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines exprimées par la cellule endothéliale sont l'ICAM-1 (pour intercellular adhesion molecule de type 1, définie comme le marqueur de différenciation n°54 ou CD54) (Marlin et Springer, 1987), ICAM-2 (Staunton *et al.*, 1989) et ICAM-3 (deFougerolles et Springer, 1992), ainsi que la molécules VCAM-1 (pour vascular cell adhesion molecule-1) (Osborn *et al.*, 1989).

La molécule ICAM-1, présentant un poids moléculaire de 95 kilodaltons (kD), première molécule d'adhésion à avoir été mise en évidence sur la cellule endothéliale, présente 5 domaines extracellulaires ayant une conformation du type immunoglobuline (ou immunoglobulin-

like). La molécule ICAM-2 apparait comme une forme tronquée de la molécule ICAM-1, avec seulement 2 domaines de type immunoglobuline. La molécule ICAM-1 existe aussi sous la forme d'une molécule soluble libérée dans le milieu extérieur (Martin *et al.*, 1990).

Le récepteur des molécules ICAM-1 et ICAM-2 est la molécule LFA-1 (pour lymphocyte function-associated antigen de type 1) (revu par Dustin et Springer, 1991), qui appartient à la famille des intégrines (cf b1). Ce ligand est exprimé par tous les leucocytes. Elles peuvent également fixer la molécule Mac-1, qui est une intégrine analogue à la molécule LFA-1.

Les molécules ICAM-1 et ICAM-2 sont exprimées par les cellules endothéliales non activées. Leur expression est très nettement augmentée par le TNF α . L'expression d'ICAM-1 est aussi augmentée par le LPS, l'IL-1 et l'IFN γ . ICAM-1 est exprimée par les fibroblastes, les cellules épithéliales et est inductible par les mêmes médiateurs (Dustin *et al.*, 1988).

Tous les types de leucocytes peuvent adhérer par le biais d'un mécanisme dépendant de la molécule ICAM-1. Ce système apparait responsable de l'adhérence résiduelle (ou de base) des leucocytes à l'endothélium non activé.

La molécule ICAM-1 intervient dans l'activation du lymphocyte T par leur récepteur spécifique à l'antigène et l'adhérence des leucocytes à la cellule endothéliale (Dang *et al.*, 1990; revu par Springer, 1990).

VCAM-1 est une glycoprotéine de 100-110 kD exprimée par les cellules endothéliales et les cellules folliculaires dendritiques. Son expression de base est très faible. Son expression est modulée positivement par le LPS, le TNF α , l'IL-1 ou l'IL-4, mais pas par l'IFN γ (Wellicome *et al.*, 1990; Thornhill *et al.*, 1991). Les cellules capables d'adhérer par le biais d'un mécanisme dépendant de la molécule VCAM-1 sont les monocytes, les lymphocytes T, les éosinophiles et les basophiles (Schleimer *et al.*, 1992). Cette molécule peut également se présenter sous forme soluble (Lobb *et al.*, 1991a).

La molécule endoCAM (endothelial cell adhesion molecule) est impliquée dans les contacts intercellulaires entre les cellules endothéliales, la nature du ligand étant inconnue. Elle est exprimée par les plaquettes et les monocytes. Son rôle est mal défini : endoCAM serait impliquée dans la

polarisation des cellules endothéliales et la formation d'une barrière imperméable (Albelda *et al.*, 1991).

a2) Les molécules d'adhésion de la famille des sélectines

Les sélectines (ou LEC-CAM pour lectin cell adhesion molecule) sont des molécules qui présentent, au niveau extracellulaire, un domaine aminoterminal homologue aux lectines animales dépendantes du calcium (lectines de type C). Elles possèdent également un domaine du type facteur épithélial (EGF-like) qui présente des fonctions de régulation, et une série de domaines homologues aux protéines de régulation du complément (CRP-like, pour complement regulatory protein-like) (revu par Springer, 1990; Bevilacqua *et al.*, 1991).

Les molécules caractérisées appartenant à cette famille sont : E-sélectine, P-sélectine et L-sélectine .

La molécule E-sélectine, également appelée ELAM-1 (pour endothelial leukocyte adhesion molecule de type 1), d'un poids moléculaire de 95-115 kD, présente six domaines CRP et n'est exprimée que lors d'une activation de la cellule endothéliale (par le LPS, l'IL-1 ou le TNF α) (Bevilacqua *et al.*, 1987). Le TGF β inhibe l'expression d'ELAM-1 induite par le TNF α (alors que l'expression des autres molécules d'adhésion n'apparaît pas modifiée) (Gamble *et al.*, 1993) .

Son expression est transitoire : elle est détectable à 2 h, maximale à 4-6 h et retourne à son niveau basal à 24 h. Elle nécessite une synthèse d'ARN messenger (ARNm) spécifique ainsi qu'une néosynthèse protéique. E-sélectine est impliquée dans l'adhésion cellulaire hétérotypique (Bevilacqua *et al.*, 1989). Elle est également exprimée par les cellules épithéliales. Une forme soluble de la E-sélectine a été décrite (Lobb *et al.*, 1991b).

La molécule L-sélectine, encore appelée LAM-1 (leucocyte-adhesion molecule) ou Leu-8 (homologue à la molécule murine gp90^{me114}, reconnue par l'anticorps me114) présente un poids moléculaire de 85-95 kD avec deux domaines homologues aux CRP. C'est une structure impliquée dans la localisation des leucocytes dans les organes lymphoïdes périphériques. Cette migration tissulaire s'effectue au niveau de cellules endothéliales spécialisées : les veinules endothéliales hauts (high

endothelial venules ou HEV) (Kishimoto *et al.*, 1989b; Jutila *et al.*, 1989). Ces cellules sont situées au niveau des veinules postcapillaires. Le terme d'adressines (ou "homing receptor") a été attribué à ces molécules impliquées dans le trafic des leucocytes entre le sang et les organes lymphoïdes périphériques (revu par Butcher, 1990).

D'autres adressines portant des fonctions similaires ont été mises en évidence (bien que n'appartenant pas à la famille des sélectines). Ce sont la molécule CD44 (ou HCAM) (mise en évidence sur les cellules endothéliales hautes des muqueuses) ainsi que les intégrines LFA-1 et $\alpha_4\beta_1$ (situées sur les plaques de Peyer).

L'adressine L-sélectine est exprimée par les lymphocytes T naïfs. Par contre, les lymphocytes T matures (ayant rencontré l'antigène) expriment soit la molécule MLA (pour mucosal lymphocyte associated antigen) soit la molécule CLA (pour cutaneous lymphocyte associated antigen) en fonction du site où le lymphocyte T a rencontré l'antigène.

Cet antigène est exprimé par les neutrophiles circulants mais est absent des neutrophiles tissulaires, sur lesquels est exprimée l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (ou Mac-1). Son expression est diminuée sur les neutrophiles activés par le PMA.

La L-sélectine serait associée au "homing" dans les nodules périphériques de la peau (Berg *et al.*, 1991). ELAM-1 se comporterait comme une adressine des tissus cutanés pour les lymphocytes T porteurs des marqueurs CLA (Picker *et al.*, 1991).

La molécule P-sélectine (ou GMP140 pour granule membrane protein, ou PADGEM pour platelet activation-dependant granule and external membrane protein, ou CD62) présente un poids moléculaire de 140 kD avec neuf domaines CRP. Elle est localisée dans les granules de sécrétion plaquettaires (granules α) et endothéliaux (corps de Weibel Palade). La P-sélectine est exprimée de façon très transitoire (quelques minutes) après leur activation par le PMA, la thrombine ou l'histamine (elle n'apparaît pas modulée par les cytokines) (Geng *et al.*, 1990, Zimmerman *et al.*, 1990). Son ligand est la molécule CD15 correspondant à une structure de type lacto-N-fucopentaose III (Larsen *et al.*, 1990). Une forme soluble de la P-sélectine devrait intervenir dans les mécanismes de régulation de l'adhésion dépendante de cette sélectine. Elle médie essentiellement l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales activées (Zimmerman *et al.*, 1990).

Son implication dans les phénomènes de migration transvasculaire n'est pas connue.

a3) Les molécules d'adhésion de la famille des cadhérines

Ces molécules d'adhésion sont associées aux nombreux types de jonctions intercellulaires (jonctions de type "tight junction", "adherens" et "gap") ainsi qu'aux desmosomes qui en composent certaines (revu par Takeichi, 1988). L'adhésion de ces molécules est dépendante du Ca^{2+} et basée sur des interactions homophiliques (Hirano *et al.*, 1987). Leur segment intracytoplasmique est associé à la vinculine, constituant du cytosquelette. Elles ont un rôle important dans les processus de développement et d'organisation du cytosquelette.

Cette famille est divisée en trois sous familles :

- E-cadhérines, retrouvées dans les tissus épithéliaux (Yoshida et Takeichi, 1982),
- N-cadhérines, localisées dans le tissu nerveux (Hatta et Takeichi, 1986),

Ces deux sous familles sont préférentiellement localisées dans le tissu nerveux adulte et les tissus musculaires.

- P-cadhérines, exprimées dans le placenta et par les cellules épithéliales (Nose et Takeichi, 1986).

a4) Les autres systèmes d'adhésion cellulaire exprimés par la cellule endothéliale :

L'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales peut être médiée par l'expression membranaire de facteur activateur des plaquettes ou PAF acéther (pour platelet activating factor) (Lorant *et al.*, 1991) . Cette expression est rapide (moins de trente minutes) et fait suite à l'activation de la cellule endothéliale par l'histamine, la thrombine ou l'IL-1. Cependant, le rôle exact de ce mécanisme d'adhésion, comme celui relativement concomitant de l'expression de P-sélectine, demeure inconnu.

Table 2 : LES MOLECULES D'ADHESION EXPRIMEES PAR LES LEUCOCYTES

Famille	Sous-unité		molécule	Exprimé par	Expression en base	Ligands
	β	α				
Intégrines (hétérodimère) (α , β)	$\beta 1$ (CD29)	$\alpha 4$	VLA-4 (CD49d/CD29)	Ty, ly, My, M	+	fibronectine VCAM-1
	$\beta 2$ (CD18)	αL : CD11a	LFA-1	LK	+	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
		αM : CD11b	Mac-1	M, N, Ly -NK	+	ICAM-1, fibrinogène, C3bi
$\beta 3$ (CD61)	αX : CD11c	p150,95 CD41 et CD51			+	?
Carbohydate				Sialyl-Lewis x	+	E-Sélectines P-Sélectines

Abréviation : CE : cellule endothéliale; Ly : lymphocyte; My : monocyte; Cl : cellule épithéliale; CD : cellule dendritique; M : macrophage;
Pt : plaquette; N : polynucléaire neutrophile; Ty : thymocyte; NK : natural killer; G : granulocytes

b) Les molécules d'adhésion exprimées par les leucocytes :

Si l'on considère que les récepteurs sont les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales, leurs ligands sont exprimés par les leucocytes. Leur modulation (quantitative ou qualitative tout au long du processus de différenciation ou d'activation des leucocytes) apparait aussi essentiel que la régulation d'expression des molécules d'adhésion de la cellule endothéliale. Les molécules d'adhésion leucocytaire appartiennent essentiellement à deux familles de protéines que sont les intégrines et certaines formes de sucres (cf tableau 2).

b1) Les molécules d'adhésion de la famille des intégrines

Les mécanismes dans lesquels sont impliquées les intégrines sont l'adhérence cellulaire hétérophilique (adhérence avec les cellules endothéliales ou épithéliales), l'adhérence cellulaire homophilique (par la reconnaissance intermédiaire d'un substrat), et leur fonction la plus importante qui est l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (revu par Ruoslahti, 1991).

Les intégrines sont constituées de deux sous unités (α et β) qui se comportent comme des hétérodimères non covalents. Elles sont très étroitement liées aux protéines du cytosquelette, essentiellement la taline. 14 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été caractérisées. L'association d'une même sous unité α avec différentes sous-unités β définit des spécificités différentes. L'adhérence, surtout médiée par des séquences RGD (acide aspartique-glycine-acide glutamique) (revu par Ruoslahti et Pierschbacher, 1987) et nécessitant des cations divalents (Ca^{2+} ou Mg^{2+}), présente de faibles affinités (constantes d'association $K_a=10^{-6}\text{M}$).

Trois sous familles d'intégrines ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$) sont impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire :

- La sous famille $\beta 1$, dont les constituants sont également nommés VLA (pour very late antigen) du fait que les deux premiers constituants de cette sous classe (VLA-1 et VLA-2) aient été mis en évidence sur les lymphocytes 2 à 4 semaines après leur stimulation. Les intégrines de type

β_1 sont impliquées dans l'organisation des tissus musculaires et nerveux, ainsi que des endothéliums et des épithéliums.

La seule structure de cette sous classe à ne pas se fixer sur une séquence RGD est l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ ou VLA-4 (CD49d/CD29) qui présente deux ligands: la fibronectine (en se fixant sur la région CS-1) et la molécule VCAM-1 (qui ne se fixe pas à la région CS-1) (Hemler *et al.*, 1990; Elices *et al.*, 1990). L'antigène VLA-4 est exprimé par les cellules hématopoïétiques, les lymphocytes, les monocytes, les éosinophiles et les basophiles, mais pas par les neutrophiles.

- La sous famille β_2 , la plus importante dans l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, n'est exprimée exclusivement que par les leucocytes (Springer *et al.*, 1987). La chaîne β_2 (CD18) peut être associée à trois chaînes α :

α_L (ou CD11a) pour former la molécule LFA-1, qui présente un poids moléculaire de 180 kD. La molécule CD18/CD11a médie l'adhésion des leucocytes entre eux et des leucocytes avec les cellules endothéliales. Ses ligands sont ICAM-1 et ICAM-2,

α_M (ou CD11b) pour former la molécule Mac-1 de poids moléculaire 17 kD (qui se fixe à la molécule ICAM-1 et au fragment inactivé du complément C3bi). Mac-1 est exprimée par les neutrophiles, les monocytes et quelques sous classes de lymphocytes,

α_X (ou CD11c) pour former la molécule p150/95, qui présente un poids moléculaire de 150 kD. Aucun ligand de la molécule p150/95 n'est connu (revu par Stacker et Springer, 1991).

Les β_2 intégrines sont exprimées en base à la surface des leucocytes et dans les vésicules monocytaires et granulocytaires.

Une activation par le PMA, le leucotriène B4 (LTB4) ou le PAF induit une augmentation très rapide de l'expression du complexe CD11/CD18 à la surface de ces cellules.

- La sous famille β_3 dont les structures ne sont impliquées que dans l'adhésion des cellules aux composants des matrices extracellulaires.

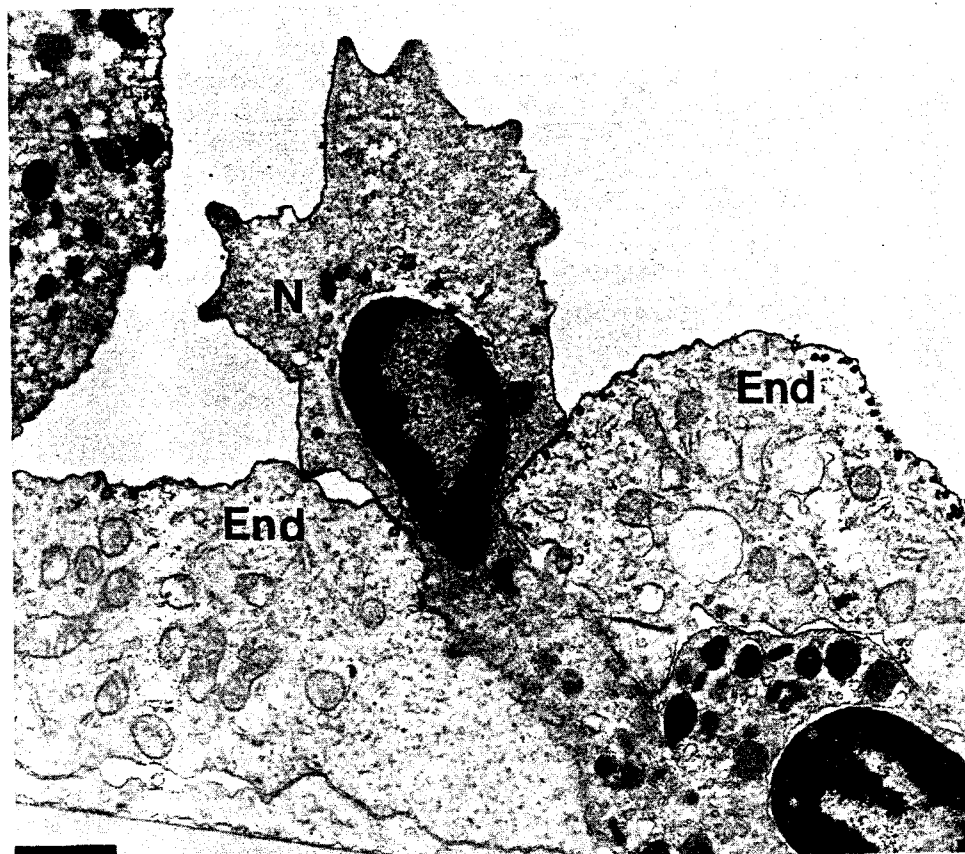


Photo 3 : Vue en microscopie électronique de la migration *in vitro* d'un neutrophile à travers une monocouche endothéliale. L'endothélium d'une artère pulmonaire bovine est cultivé sur une surface plastique puis les neutrophiles sont ajoutés. La monocouche est fixée à la glutaraldéhyde pendant 30 min avant d'être sectionnée. (N: neutrophile, End: cellule endothéliale) (grossissement : x 14000, barre = 1 μ m) (d'après G.S. Worthen, M.G. Tonessen, D.C. Lien, et P.M. Hensen. Dans *Pulmonary endothelium in health and disease*, édité par U.S. Ryan, Marcel Dekker Inc, 1987).

b2) Les sucres dans l'adhésion cellulaire :

Les ligands des sélectines sont des sucres (Brandley *et al.*, 1990; revu par Springer et Laski, 1991). La E-sélectine se lie aux structures Lewis^X ou sialyl-Lewis^X, qui sont des dérivés $\alpha(1-3)$ fucosylés des polylectosamines. Leur expression est corrélée avec la capacité à adhérer à l'endothélium.

Le ligand de la P-sélectine (présent sur les monocytes et les neutrophiles) présenterait au moins une structure Lewis^X et pourrait se fixer au sialyl-Lewis^X (Polley *et al.*, 1991).

Le niveau quantitatif d'expression de ces molécules ne serait pas modulé; par contre lors de l'activation des leucocytes, des modifications structurales (qualitatives) augmenteraient l'affinité de ces sucres pour leurs ligands respectifs.

4) La migration transvasculaire des leucocytes :

L'adhérence des leucocytes peut s'accompagner ou non de l'activation des leucocytes et/ou de l'endothélium. Suite à cette adhérence, les leucocytes peuvent soit se détacher, soit migrer à travers l'endothélium. Les mécanismes à la base de ce processus sont relativement peu connus. Il apparait néanmoins que la migration nécessite l'activation des cellules endothéliales (au contraire de l'adhérence qui peut intervenir indépendamment de leur activation) (Wegner *et al.*, 1990; Gundel *et al.*, 1991). Les cellules endothéliales, normalement jointives, vont se disjoindre temporairement, former des "trouées", bien que restant en contact à certains endroits. Les leucocytes projettent des pseudopodes grâce auxquels ils vont pouvoir quitter la lumière du vaisseau. Le mécanisme de diapédèse est à la base du mouvement des leucocytes. La migration s'effectue sans aucun dommage pour la cellule endothéliale et sans dilatation entre les cellules (cf photo 3).

Une observation primordiale est que la migration des leucocytes entre les cellules endothéliales non activées ne s'accompagne pas d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, suggérant que migration et perméabilité sont deux phénomènes indépendants (Meyrick *et al.*, 1984). Par contre, si les cellules endothéliales sont activées, la migration

TABLE 3 : MEDIEATEURS IMMUNOLOGIQUES PRODUITS PAR LA CELLULE ENDOTHELIALE

Famille	Médiateur	Inhibiteur	activateur	rôle
			de la production	
Dérivés de l'acide arachidonique	LTC4 PGI2 PAF	Aspirine, PGI2	Thrombine, bradykinine, ATP Thrombine, histamine, PMA	chimioattractant, bronchoconstric vaso et broncho dilatateur broncho et vaso contracteur
proinflammatoires	IL-1 (α) membranaire		TNFα	
Cytokines	IL-6 IL-8 GM-CSF G-CSF M-CSF		IL-1 LPS TNFα IL-1 LPS	pléiotropique chémoattractant B, N, Ly
	CSF			

FACTEURS CHIMIOATTRACTANTS EXPRIMES EN SURFACE DE LA CELLULE ENDOTHELIALE

Expression membranaire de	Expression en base	Expression augmentée par	rôle
PAF	0	PMA, Thrombine, histamine	activation, adhésion, migration des N
IL-8	?	TNF, IL-1, LPS	activation, adhésion, migration des N

s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité (Wedmore et Williams, 1981).

La deuxième barrière physique que rencontrent les leucocytes est la matrice sous endothéliale. Elle serait digérée localement par la libération d'enzymes d'origines endothéliales et/ou leucocytaires (Harlan *et al.*, 1985). Les leucocytes rejoignent ensuite le site inflammatoire par diapédèse à travers les cellules de structure constituant le tissu.

La migration des leucocytes vers le site inflammatoire apparaît dirigée par des médiateurs chimiotactiques, qui vont guider ces cellules. Ces facteurs chimiotactiques apparaissent selon un gradient de concentration croissant depuis les cellules productrices de cette activité (les cellules résidentes ou tissulaires) vers les leucocytes périphériques.

La nature des facteurs chimiotactiques identifiés est très diverse (ces facteurs pouvant porter d'autres fonctions non apparentées) : des facteurs activés du complément (C5a et C3a) ou des leucotriènes (LTB₄). Ces facteurs chimiotactiques augmentent également les propriétés adhésives des cellules endothéliales pour les leucocytes.

5) *Les médiateurs immunologiques produits par la cellule endothéliale :*

La cellule endothéliale n'est pas seulement capable de répondre aux différents médiateurs immunologiques mais elle peut également en produire. Ce sont des dérivés de l'acide arachidonique ou des cytokines (cf tableau 3).

a) Les dérivés de l'acide arachidonique

Les eicosanoïdes, dérivés oxygénés de l'acide arachidonique, sont les leucotriènes, les prostaglandines et le PAF.

Les leucotriènes sont produits suite à l'activation de la voie métabolique de l'enzyme 5 lipoxigénase. Les granulocytes en constituent la source la plus abondante (Radmark *et al.*, 1980). L'action de cette enzyme sur l'acide arachidonique conduit à la production d'un époxyde instable : le leucotriène A₄ (LTA₄) (Samuelson *et al.*, 1987). Celui ci est converti

rapidement en LTB₄ ou en LTC₄ (Maycock *et al.*, 1982). La cellule endothéliale ne possède pas la 5 lipoxigénase. Par contre, par un métabolisme transcellulaire, elle convertit essentiellement le LTA₄, produit par d'autres cellules, en LTC₄ (Feinmark et Cannon, 1986). Le LTC₄ est un puissant bronchoconstricteur, cent fois plus puissant que l'histamine, et active le chimiotactisme des neutrophiles (revu par Samuelsson, 1983). Il est également produit par les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles.

Les cellules endothéliales convertissent le LTC₄ en LTD₄, qui présente les mêmes fonctions biologiques que le LTC₄, mais une étape supplémentaire vers l'inactivation.

Les prostaglandines sont produites à partir de l'acide arachidonique par la voie de la cyclooxygénase. Les cellules endothéliales, comme les monocytes, produisent la prostaglandine I₂ (PGI₂ ou prostacycline), par l'enzyme PGI₂ synthétase (DeWitt et Smith, 1983). Il s'agit d'un puissant inhibiteur de la synthèse des leucotriènes, un broncho et un vasodilatateur ainsi qu'un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Nowak et Fitzgerald, 1989). Sa production est inhibée par les inhibiteurs de la cyclooxygénase, en particulier l'aspirine, mais est augmentée par la thrombine.

Par un effet de rétrocontrôle négatif, la prostacycline inhibe sa propre production par la cellule endothéliale.

Les cellules endothéliales produisent le PAF (Prescott *et al.*, 1984) Ce médiateur induit essentiellement une bronchoconstriction (par action directe sur les cellules musculaires lisses ou indirecte par la production d'autres médiateurs comme le LTCA ou le tromboxane A₂) ainsi qu'une vasoconstriction (Barnes *et al.*, 1988).

b) Les cytokines d'origine endothéliale :

La cellule endothéliale produit, après activation, différentes cytokines proinflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8, et stimulatrices de la prolifération des cellules hématopoïétiques (colony stimulating factor ou CSF) comme le G-CSF, le M-CSF et le GM-CSF (Sief *et al.*, 1988). La production par les cellules endothéliales des facteurs de croissance est induite par de nombreux stimuli comme le LPS, l'IL-1 et le TNF α . Ces

différents médiateurs vont réguler l'hématopoïèse ainsi que l'activation des cellules inflammatoires et leur recrutement au niveau du site inflammatoire (Bussolino *et al.*, 1989).

L'IL-1 est produite par les cellules endothéliales en réponse au LPS (Libby *et al.*, 1986), au TNF α (Locksley *et al.*, 1987) et à l'IL-1 elle-même. La majorité de l'activité IL-1 produite reste associée aux membranes cellulaires (forme α de l'IL-1 ou IL-1 α). L'IL-1 intervient comme un cosignal d'activation/prolifération des lymphocytes T lors de la présentation de l'antigène et se comporte comme un facteur d'activation de nombreuses cellules inflammatoires.

La capacité de la cellule endothéliale à exprimer une activité IL-1, d'exprimer la molécule majeure d'histocompatibilité de classe II (ou HLA II) en réponse à une activation (essentiellement l'IFN γ), et des molécules impliquées dans l'adhésion des lymphocytes T aux cellules présentatrices d'antigène (essentiellement l'interaction LFA-1/ICAM-1) ont fait suspecter un rôle de cellule présentatrice d'antigène aux cellules endothéliales. Cependant la preuve directe d'une telle activité n'a jamais été clairement établie.

L'IL-6 est produite en réponse aux stimuli classiques de la cellule endothéliale comme le LPS, l'IL-1, le TNF α (Jirik *et al.*, 1989) et l'IFN γ (Leeuwenberg *et al.*, 1990). Cependant, contrairement à l'IL-1, aucune activité autocrine de l'IL-6 sur la cellule endothéliale n'a été mise en évidence. L'IL-6 est une cytokine pléiotropique : elle intervient dans la synthèse des protéines de l'inflammation (produites par le foie), la régulation de la synthèse des immunoglobulines, ... (revu par Kishimoto, 1989; revu par Le, 1992)

L'IL-8, de découverte plus récente, est produite par la cellule endothéliale après son activation par le LPS, l'IL-1 ou le TNF α (Strieter *et al.*, 1989). Ce facteur présente essentiellement des propriétés chimiotactiques pour le neutrophile (Baggiolini *et al.*, 1989). Une forme membranaire de l'IL-8 a été mise en évidence sur les cellules endothéliales (Smith *et al.*, 1993). Aucune activité autocrine sur les cellules endothéliales n'a été observée.

L'énumération des différentes propriétés biologiques de l'endothélium soulignent son importance dans l'homéostasie tissulaire. La cellule endothéliale participe ainsi activement à de nombreuses fonctions physiologiques essentielles.

Du fait de son importance qualitative et de par sa position, les cellules endothéliales doivent continuellement être régulées afin de préserver une intégrité structurale et fonctionnelle.

Cependant, et sûrement à cause de cette multiplicité fonctionnelle, elle se présente comme une cible privilégiée de nombreux désordres physiologiques et immunitaires.

**ETUDES SUR LA PARTICIPATION
DE LA
CELLULE ENDOTHÉLIALE DANS
L'ASTHME BRONCHIQUE**

I/ RAPPELS

L'asthme est une pathologie caractérisée par une bronchoconstriction réversible (revu par Barnes, 1987; Woolcock, 1988).

Deux formes d'asthme sont généralement décrites sur la base des facteurs étiologiques responsables de leurs manifestations :

- l'asthme allergique, causé par une hyperréactivité bronchique du sujet allergique vis-à-vis de substances exogènes appelées allergènes,
- l'asthme non allergique, dont l'étiologie n'est pas définie.

L'implication de l'endothélium dans la physiopathologie de l'asthme bronchique est une notion largement décrite, grâce à la mise en évidence de (revu par Laitinen et Laitinen, 1991):

- la modulation du tonus vasculaire lors de la réaction allergique (caractérisée par une importante vasodilatation),
- l'augmentation de la vasoperméabilité, à l'origine de la formation de l'oedème,
- l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, associée à la réaction inflammatoire,
- la production de facteurs chimiotactiques ou modulateurs de l'activation des cellules impliquées dans le développement de la réaction inflammatoire (éosinophiles, neutrophiles, monocytes, lymphocytes T).

Ces quelques caractéristiques étiologiques soulignent l'importance de la participation de l'endothélium en général, et de la cellule endothéliale en particulier, dans l'asthme.

L'apport dans le laboratoire de la culture de cellules endothéliales de cordon ombilical humain par le Dr. Ph. Lassalle a permis au groupe de s'impliquer très largement dans un nouveau pôle de recherche sur la pathologie asthmatique, consistant en l'étude de l'interface active que constitue cette structure entre les cellules du tissu bronchique et les cellules du sang périphérique.

L'étude du rôle de cette cellule endothéliale dans l'asthme bronchique s'est orientée selon deux axes :

- l'asthme non allergique (associé à une intolérance à l'aspirine), par la recherche de facteurs étiologiques impliquant la cellule endothéliale et,

- l'asthme allergique, par l'étude des mécanismes de coopérations cellulaires établies entre la cellule endothéliale et deux autres cellules impliquées essentiellement soit dans la réaction précoce observée après l'introduction de l'allergène (les mastocytes) soit dans la réaction tardive (les lymphocytes T).

A/ L'ASTHME ALLERGIQUE : données cliniques et biologiques

1) Les données cliniques de l'asthme :

L'asthme allergique bronchique est une pathologie qui touche environ 10 % de la population totale. La crise d'asthme est caractérisée par un bronchospasme qui se développe dans les minutes qui suivent l'introduction de l'allergène. Cette réaction est largement dépendante de la production de médiateurs mastocytaires (Scott et Kaliner, 1993). Parfois, cette réaction précoce est suivie par une réaction retardée (survenant 6 à 8 heures après le contact avec l'agent sensibilisant), pouvant durer plusieurs jours, caractérisée par un infiltrat cellulaire dans les tissus (réaction inflammatoire) (Booij-Noord *et al.*, 1972).

L'asthme peut être considéré comme une combinaison de trois caractéristiques :

- une obturation des voies aériennes, réversible spontanément ou pharmacologiquement (par l'emploi de β_2 mimétiques bronchodilatateurs) (Venables *et al.*, 1984),

- une augmentation de l'hyperréactivité bronchique (vis-à-vis de stimuli exogènes ou endogènes), corrélée avec la sévérité de la maladie et le recours aux traitements (Hargreave *et al.*, 1981; revu par Woolcock, 1988),

- une inflammation des voies aériennes (Kaliner *et al.*, 1976; deMonchy *et al.*, 1985).

Les allergènes véhiculés par l'air (aéroallergènes) sont principalement les acariens (retrouvés dans la poussière de maison) et les pollens de graminées. Puisque ces agents sont véhiculés par l'air, les réactions allergiques sont localisées préférentiellement dans les voies aériennes (nez et bronches, donnant lieu respectivement à des rhinites et

de l'asthme). D'autres facteurs sont également impliqués dans le développement de l'asthme comme les facteurs environnementaux (pollution atmosphérique, produits volatiles toxiques ou irritants) ou psychologiques.

La plupart des connaissances sur les changements morphologiques des voies aériennes chez l'asthmatique ont été obtenues grâce aux autopsies *post mortem* effectuées chez des patients décédés d'un asthme (revu par Sobonya, 1984; Laitinen *et al.*, 1985). Celles-ci montrent :

- une occlusion de la lumière par du mucus, des protéines d'origine plasmatique et des débris cellulaires (revu par Persson, 1988),

- une destruction épithéliale associée à un épaississement de la membrane basale sous épithéliale (Lundgren *et al.*, 1988),

- un oedème et un infiltrat leucocytaire dans les tissus sous-muqueux (Laitinen *et al.*, 1990),

- une hyperplasie des cellules glandulaires (productrices du mucus) et une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Takizawa et Thurlbeck, 1971).

Des biopsies bronchiques effectuées chez des asthmatiques allergiques en dehors de tout signe clinique d'asthme ont permis de confirmer un infiltrat d'éosinophiles et de lymphocytes T activés, ainsi qu'un dépôt de collagène au niveau de la membrane basale.

La production exagérée de mucus est souvent la cause de la mort due à l'asthme (bien qu'elle puisse être la résultante d'un spasme des cellules musculaires lisses) (revu par Reid, 1987). Cette production de mucus est augmentée du fait de l'accroissement du nombre de cellules le produisant. Son élimination est diminuée par la perte des cellules épithéliales ciliées, et de l'exsudation plasmatique résultant de l'augmentation de la vasoperméabilité (revu par Wanner, 1977). La rétention de mucus s'observe plusieurs jours après la fin du bronchospasme (Allegra *et al.*, 1983).

L'implication de l'endothélium vasculaire dans la réaction précoce est liée aux fuites microvasculaires conduisant à la formation d'un oedème muqueux (revu par Dunnill, 1960; revu par Ryley et Brogan, 1968; revu par Hogg, 1984). L'oedème constitue une importante caractéristique de l'asthme en limitant le flux aérien et en augmentant la sensibilité bronchique. Les médiateurs responsables de la formation de l'exsudat sont

l'histamine, la bradykinine et la métacholine (induisant un épaissement de la membrane basale), ainsi que la substance P ou la prostaglandine E2 (qui n'induisent pas de variation de l'épaisseur de la membrane basale). L'oedème a pour conséquence directe une augmentation du taux protéique plasmatique dans les voies aériennes (Brogan *et al.*, 1975). L'exsudation jouerait deux rôles :

- un rôle de protection par la chélation des ions ferreux, inhibant les radicaux hydroxyles impliqués dans la destruction épithéliale (Lamm *et al.*, 1988),

- un rôle négatif par une augmentation de la viscosité du mucus (Forstner *et al.*, 1977).

L'inflammation bronchique est caractérisée par une infiltration cellulaire abondante du tissu bronchique. Les principales cellules sont les éosinophiles, les plus abondants, qui envahissent aussi les couches musculaires et les cartilages (Dunnill *et al.*, 1969), et les lymphocytes T (revu par Corrigan et Kay, 1992). Cet infiltrat apparaît toutefois indépendant du transport de médiateurs locaux entraînés dans le flux d'exsudation (revu par Persson, 1986).

Cette inflammation bronchique est également caractérisée par une desquamation épithéliale et une diminution de la fréquence des battements ciliaires (retrouvée dans les asthmes allergiques et non allergiques). Dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de sujets asthmatiques sont retrouvées des cellules épithéliales en paquets, ayant conservé leurs cils, suggérant un défaut d'adhérence à la membrane basale (Djukanovic *et al.*, 1990). Cette desquamation est à l'origine de l'hyperréactivité bronchique non spécifique (Boushey *et al.*, 1980) par :

- l'accès direct des irritants aux terminaisons nerveuses,
- un accès direct des allergènes aux cellules productrices de médiateurs induisant la réaction allergique (comme le mastocyte),
- une diminution de production de substances bronchodilatatrices et d'endopeptidases par les cellules épithéliales.

La membrane basale sous épithéliale est épaissie (cet élément est également retrouvé dans de nombreuses pathologies pulmonaires) (Bealey *et al.*, 1989). L'épaisseur de cette membrane basale chez un sujet sain est de l'ordre de 7 μm (valeur médiane), composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibonectine (Karre *et al.*, 1958),

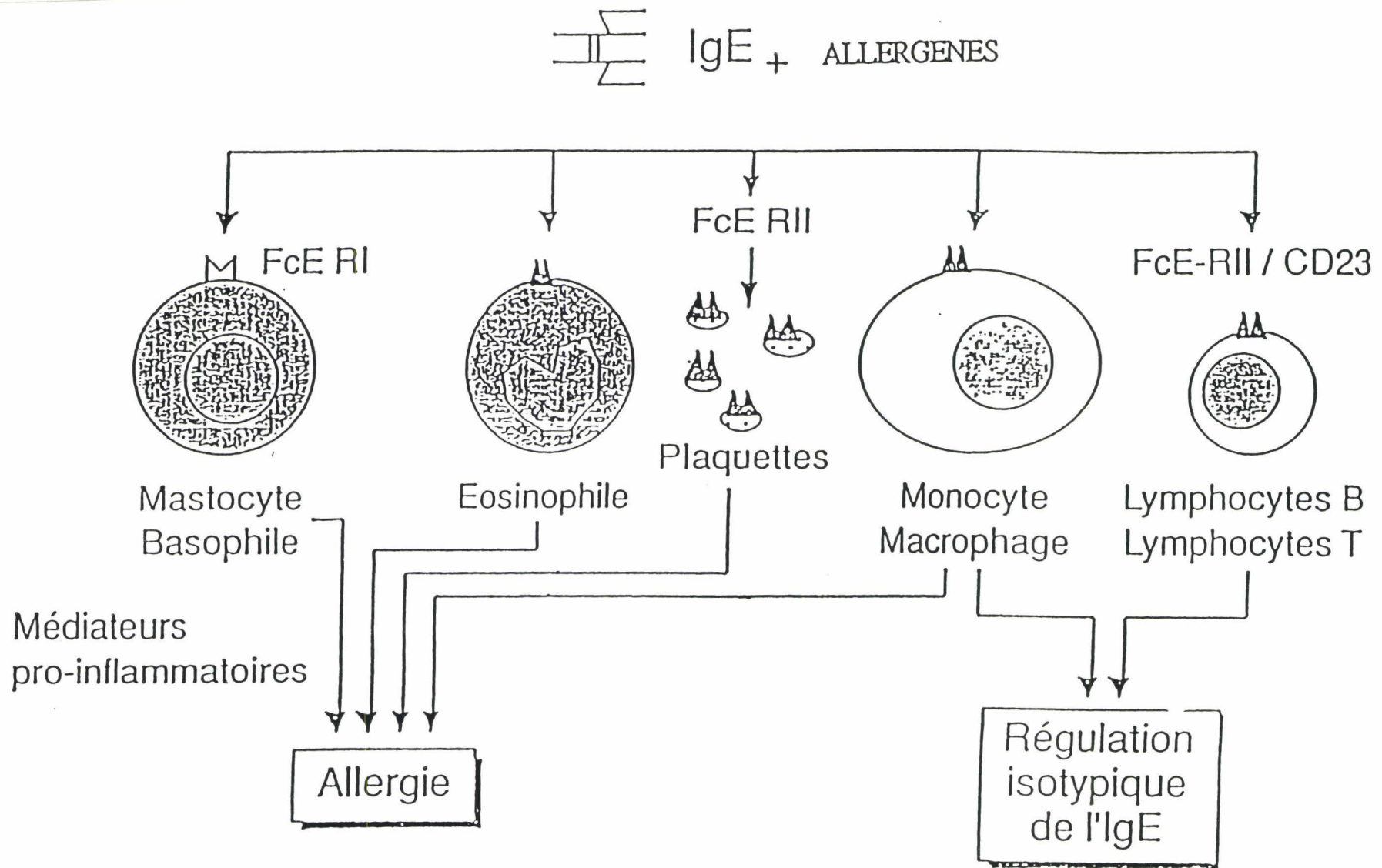


Fig. 1 : LES PARTENAIRES DE LA REACTION ALLERGIQUE

(D'après Capron A. Médecine et Sciences 1990, 10, 961)

alors qu'elle est de 17,5 μm chez les asthmatiques, et composée de collagène de type III et V, et de fibronectine (Callerame *et al.*, 1971). Cette membrane basale épaissie ne contient pas de laminine, absence liée à l'excès de fibroblastes (Brewster *et al.*, 1990).

2) Les données biologiques :

Les études morphologiques et cliniques de la réaction allergique bronchique ont permis de définir les médiateurs et les cellules responsables des manifestations de l'asthme (bronchoconstriction et réaction inflammatoire). Ce sont ces différents éléments que nous allons présenter dans cette section. Les données correspondant à la réaction précoce ont été étudiées dans l'asthme allergique. Celles concernant la réaction retardée sont applicables aux asthmes allergiques et non allergiques.

a) La réaction précoce :

Les patients allergiques présentent des taux élevés d'immunoglobuline E (IgE) comparativement aux sujets témoins. Les IgE spécifiques du (ou des) allergène(s) vis-à-vis duquel (ou desquels) le sujet est sensible (quantifiées en unités RAST (pour radio-immuno allerge sorbent test)) ne sont présentes que chez les sujets allergiques (Burrows *et al.*, 1989). Les IgE sont fixées à la surface des cellules porteuses d'un récepteur pour la chaîne lourde des IgE (Fc_ϵ). Ces récepteurs pour les IgE sont de forte affinité ($\text{Fc}_\epsilon\text{RI}$) (exprimés par les mastocytes et les basophiles) (Kinet *et al.*, 1987; Kinet *et al.*, 1988) ou de faible affinité ($\text{Fc}_\epsilon\text{RII}$) (exprimés par les éosinophiles, les plaquettes, les neutrophiles, les monocytes/macrophages et les lymphocytes) (Capron *et al.*, 1981; Joseph *et al.*, 1983; revu par Spiegelberg, 1984) (cf Fig. 1).

Les mastocytes, cellules exclusivement tissulaires, sont abondants autour des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des terminaisons nerveuses (Metcalf *et al.*, 1981). Ils sont nombreux dans le poumon (500 à 4000 dans 10 mm^3 de tissu) (Wasserman, 1980) et se situent à proximité des cellules épithéliales, à quelques microns de la lumière (Friedman et Kaliner, 1987).

Les mastocytes peuvent être activés par la réticulation des $Fc_{\epsilon}RI$, via le pontage des IgE par les allergènes (Ishizaka *et al.*, 1972) (cf Fig. 2). Il existe d'autres médiateurs capables de les activer, comme la substance P (Hägemark *et al.*, 1978), le C5a (Gorski *et al.*, 1979), les interleukines IL-1, IL-3 et IL-8, ou les facteurs induisant la libération d'histamine (histamine releasing factor ou HRF) (White *et al.*, 1989) (cf tableau 1).

Leur activation conduit à la libération de médiateurs préformés ou néoformés. Les médiateurs préformés sont essentiellement :

- l'histamine, libérée 5 à 10 min après l'activation dépendante de l'IgE (revu par Theoharides, 1989) (cf Fig. 2),
- des protéoglycannes, comme l'héparine qui se comporte comme un élément limitatif de la réaction allergique (Dolowitz et Dougherty, 1965) (inhibition de l'augmentation de la vasoperméabilité (Needham *et al.*, 1988), inhibition de l'activation lymphocytaire (Sy *et al.*, 1983), inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses (Clowes et Karnovski, 1977)),
- des facteurs chimiotactiques pour l'éosinophile et le neutrophile (comme l'histamine, le LTB₄ (Smith *et al.*, 1980) et le PAF (Shaw *et al.*, 1981)),
- des protéases comme la tryptase (Smith *et al.*, 1984), qui dégrade *in vitro* le VIP, et la chymase (Schechter *et al.*, 1983) qui dégrade l'angiotensine I, le VIP et la bradykinine,
- des cytokines, comme le TNF α (Gordon *et al.*, 1991).

Les médiateurs néoformés sont :

- des dérivés de l'acide arachidonique (localisés dans la membrane cytoplasmique et les corps lipidiques denses aux électrons) (Dvorak *et al.*, 1983) : les leucotriènes LTB₄ et LTC₄, la PGD₂ et le PAF (Peters *et al.*, 1984),
- des cytokines comme le TNF α et l'IL-4 (Bradding *et al.*, 1992).

L'histamine agit par l'intermédiaire de trois types de récepteurs (Bull *et al.*, 1992) (cf Fig. 3)

- les récepteurs de type H₁, qui sont impliqués dans la contraction des cellules musculaires lisses et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Rosenthal *et al.*, 1977; revu par Wasserman, 1980),

TABLE 1 : FACTEURS ACTIVANT LES MASTOCYTES

D'après White M. The mast cell and health disease, Kaliner M. A., Metcalfe D. D. eds, Dekker M. Inc., New York, 1993, 601)

-
- IgE
 - C3a, C4a, C5a
 - Substance P
 - Opioids, endorphins
 - Physical stimuli: vibration, cold, pressure
 - Histamine-releasing activities from lymphocytes, neutrophils, platelets, endothelial cells, human lung macrophages, eosinophils, and human nasal washings
 - Cytokines: IL-1, IL-3, IL-8; granulocyte macrophage-colony stimulating factor, connective tissue activating peptide III
-

TABLE 2 : LES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'ASTHME ET LES MEDIATEURS IMPLIQUES

(D'après White M. The mast cell and health disease, Kaliner M. A., Metcalfe D. D. eds, Dekker M. Inc., New York, 1993, 601)

Pathologic feature	Proposed mediator
Bronchospasm	Histamine (H ₁) Leukotriene C ₄ , D ₄ , and E ₄ Prostaglandins and thromboxane A ₂ Bradykinin Platelet-activating factor
Mucosal edema	Histamine (H ₁) Leukotriene C ₄ , D ₄ , and E ₄ Prostaglandin E Bradykinin Platelet-activating factor
Airway inflammation	Eosinophil chemotactic factor Neutrophil chemotactic factor Leukotriene B ₄ Platelet-activating factor
Mucus secretion	Leukotriene C ₄ , D ₄ , and E ₄ Prostaglandin-generating factor 5- and 15-HETE

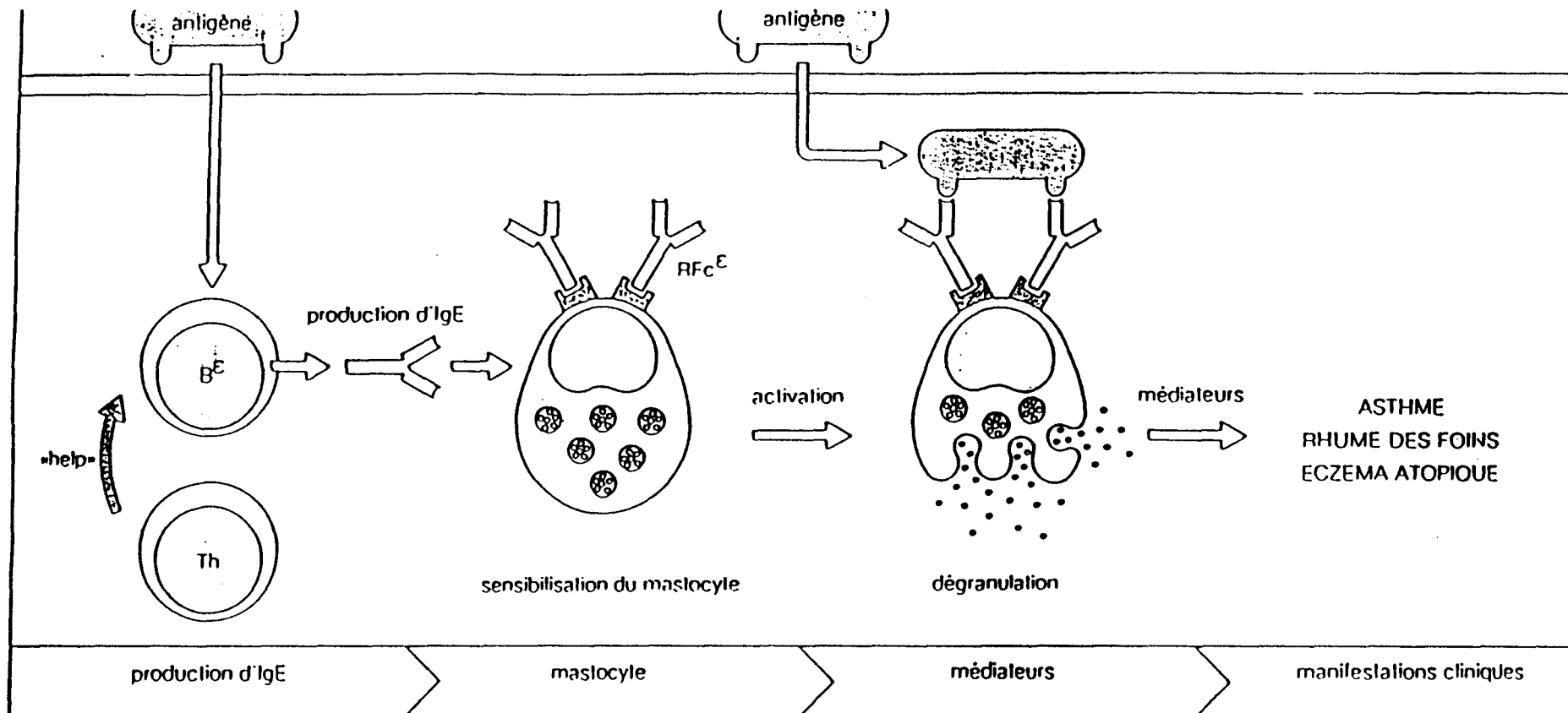


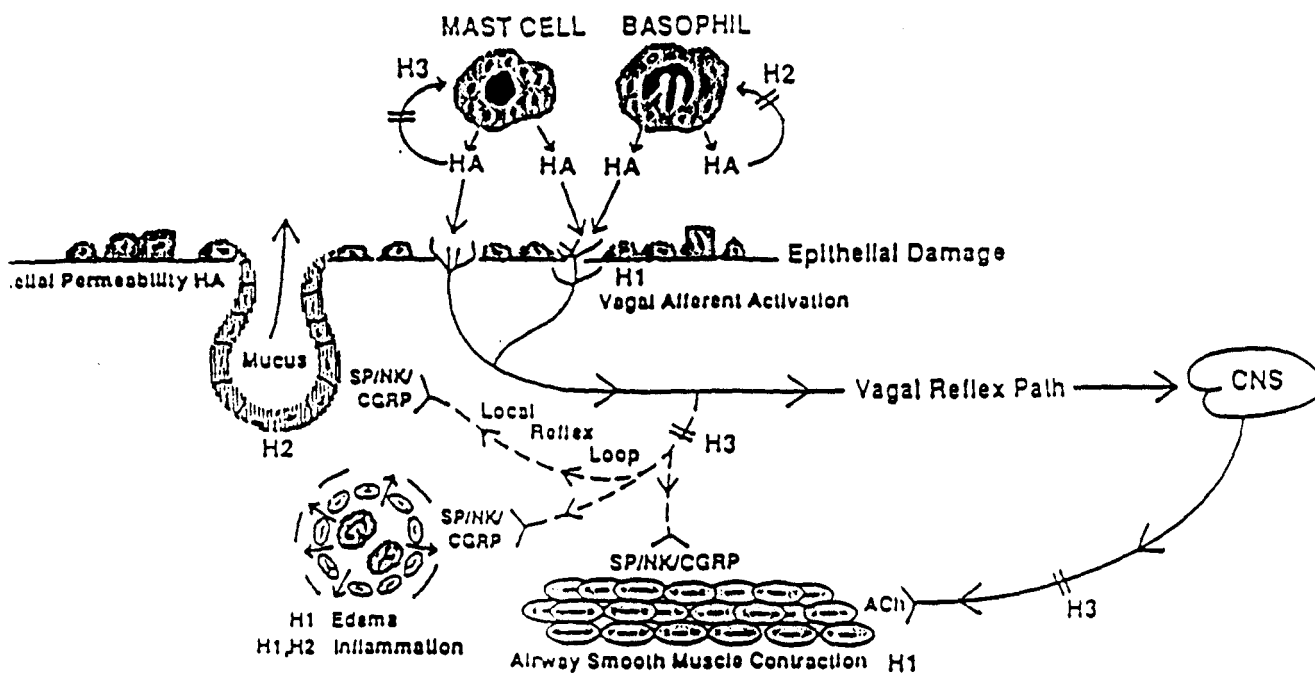
Fig. 1 : ACTIVATION PAR UN ANTIGÈNE SPÉCIFIQUE DE MASTOCYTES SENSIBILISÉS PAR DES IgE

(D'après Roitt I. Immunology, MEDSI ed, 1993, 19.2)

L'allergène stimule, avec l'aide des lymphocytes T, la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B. Ces IgE spécifiques se lient aux récepteurs mastocytaires (Fc ϵ R1) par leurs extrémités Fc. Les allergènes atteignant le mastocyte ainsi sensibilisé établissent un pontage entre les IgE liées à sa surface. Ceci déclenche la dégranulation du mastocyte qui libère les médiateurs responsables des symptômes cliniques de l'hypersensibilité de type I.

Fig. 3 : EFFETS DE L'HISTAMINE SUR LE SYSTEME RESPIRATOIRE

(D'après Cavanah DK. The mast cell and health disease, Kaliner M. A., Metcalfe D. D. eds, Dekker M. Inc., New York, 1993, 601)



Histamine's effects in asthma. Mast cell and basophil degranulation results in histamine (HA) release. Histamine through the indicated receptors can cause epithelial permeability, vagal afferent nerve activation, airway smooth muscle contraction, edema and mucus release, and modulate inflammatory responses. Stimulation of vagal afferents results in activation of the vagal reflex path and the antidromic release (dashed lines) of substance P (SP), neurokinin A (NK), and calcitonin gene-related peptide (CGRP). These neuropeptides can then also lead to the above effects. Stimulation of H₂ receptors on basophils and H₃ receptors on mast cells may inhibit further histamine release. H₃ receptor activation can also inhibit both vagal reflex and local reflex loop-mediated release of acetylcholine (ACh) and neuropeptides, respectively.

- les récepteurs de type H2, qui sont responsables de la sécrétion de mucus et de la contraction de l'oesophage (revu par Rafferty et Holgate, 1989),

- les récepteurs de type H3, détectés sur les terminaisons nerveuses présynaptiques et postsynaptiques, médient un rétrocontrôle négatif de la production d'histamine (revu par Barnes et Ichinose, 1989).

L'histamine seule n'apparaît pas responsable de la réaction allergique précoce (par exemple, l'histamine seule n'apparaît pas capable de maintenir une augmentation de la vasoperméabilité, suggérant donc l'intervention d'autres médiateurs) (cf tableau 1). Elle résulterait de la production de médiateurs néosynthétisés très rapidement (comme les dérivés de l'acide arachidonique) dont certains sont capables de reproduire tout ou partie de ses signes cliniques caractéristiques. Par exemple, des substances comme le LTB₄, le LTC₄ et le LTE₄ (Joris *et al.*, 1987) ainsi que la bradykinine (revu par Garcia-Leme, 1978) sont capables d'induire l'augmentation de la vasoperméabilité. La PGD₂ (revu par White et Kaliner, 1992) et le LTC₄ (Leitch *et al.*, 1983) participent au bronchospasme, et leurs effets sont plus longs que ceux induits par l'histamine. Le PAF est le plus puissant facteur chimioattractant des éosinophiles (Lellouch-Tubiana *et al.*, 1988) et des neutrophiles (Wardlaw *et al.*, 1988); il induit également une augmentation de la perméabilité vasculaire (Evans *et al.*, 1987) et une contraction des cellules musculaires lisses (Popovich *et al.*, 1988). Le PAF est un médiateur capable d'induire les quatre caractéristiques majeures de l'asthme bronchique (cf tableau 2).

b) La réaction retardée :

La réaction retardée apparaît 4 à 8 h après la réaction précoce. Les symptômes d'obstruction bronchique peuvent durer de 12 à 24 h. Les liquides de lavage bronchoalvéolaire de sujets allergiques asthmatiques effectués lors d'un test de provocation bronchique à l'allergène après la phase retardée présentent, en plus des macrophages, de nombreux éosinophiles et de lymphocytes (Gerblich *et al.*, 1984; Frew et Kay, 1988) et des mastocytes (Wardlaw *et al.*, 1988).

Cette inflammation muqueuse est caractérisée par un ensemble d'évènements physiopathologiques :

- l'atteinte et la destruction tissulaire, entraînant une désorganisation épithéliale et l'endommagement des structures sous épithéliales,

- une production de médiateurs par les cellules endommagées, ou provenant du plasma et des tissus,
- une réponse vasculaire, caractérisée par une augmentation du flux sanguin et la formation d'un oedème (Persson *et al.*, 1987),
- un infiltrat cellulaire, à l'origine de l'inflammation (Laitinen et Laitinen, 1990),
- une phase de réparation, par l'activation des propriétés de division cellulaire de l'épithélium et la reconstruction d'une matrice sous épithéliale (revu par Dunnill, 1982).

L'infiltrat cellulaire, qui est la caractéristique essentielle qui nous intéresse dans ce propos, est le résultat de la production de médiateurs chimioattractants durant la phase précoce de la réaction allergique comme le PAF, le LTB₄, le facteur chimiotactique des neutrophiles (NCF pour neutrophil chemotactic factor) ou des éosinophiles (ECF pour eosinophil chemotactic factor), ainsi que de nombreux autres dérivés de l'acide arachidonique.

Les populations cellulaires impliquées dans la réaction inflammatoire sont :

- le macrophage alvéolaire,
- les plaquettes,
- le neutrophile,
- l'éosinophile,
- le lymphocyte T.

1. Le neutrophile :

Le neutrophile est normalement peu abondant dans les alvéoles et le parenchyme pulmonaire. La mobilisation rapide des neutrophiles provenant du pool marginal permet une réponse rapide à toute agression extérieure. Son accumulation dans le poumon est observée essentiellement durant le syndrome de détresse respiratoire aigue ou les pneumonies dues à des agents bactériens (revu par Tate et Repine, 1983). Cependant avec les allergènes communs, il n'est pas observé d'afflux important de neutrophiles (Wardlaw *et al.*, 1988). L'activation du neutrophile induit la production de dérivés de l'acide arachidonique (LTB₄, 5 HETE, et PGE₂), le LTB₄ constituant un puissant agent autocrine chimiotactique (O'Byrne *et al.*, 1985). Les métabolites de l'oxygène (anions superoxydes et H₂O₂)

constituent des médiateurs cytotoxiques pour les agents exogènes mais également pour les cellules résidentes. Les protéases du neutrophile activent le complément, participent à la formation et à la lyse du dépôt de fibrine, ainsi qu'à la digestion de la matrice sous endothéliale (revu par Tate et repine, 1983).

La participation du neutrophile dans les réactions inflammatoires liées aux réactions allergiques a surtout été montré chez l'animal (Marsh *et al.*, 1985). Chez l'homme, lors d'un test de provocation allergénique, une activité chimioattractante pour les neutrophiles (NCF) est retrouvée dans les sérums de patients, ainsi que la production accrue de médiateurs cytotoxiques.

2. L'éosinophile :

L'implication de l'éosinophile dans la réaction inflammatoire est une notion largement établie. Lors d'un test de provocation allergénique, un afflux massif d'éosinophiles (objectivé par leur présence dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire) est détecté dès la quatrième heure, pouvant persister durant 24 h, et qui est associé à une éosinophilie circulante (revu par Gleich et Adolphson, 1986; Capron et Tonnel, 1991; Corrigan et Kay, 1992)).

Les éosinophiles sont attirés au site inflammatoire par de nombreux facteurs chimioattractants (comme le PAF (Wardlaw *et al.*, 1986), le C5a, le LTB4 (Hakasson *et al.*, 1987) et l'IL-8, et s'accumulent dans la muqueuse bronchique. L'activation des éosinophiles de sujets sains par l'IL-3 et l'IL-5 apparaît nécessaire pour leur permettre d'adhérer aux cellules endothéliales. Par contre, les éosinophiles de sujets allergiques adhèrent de façon spontanée aux cellules endothéliales suggérant donc leur activation dans le sang périphérique.

L'activation des éosinophiles par des médiateurs solubles (PAF ou LTB4) ou après engagement de leurs récepteurs aux immunoglobulines induit leur dégranulation, libérant de nombreuses substances activatrices et/ou agressives pour les cellules des tissus infiltrés. Citons d'une part des médiateurs lipidiques : LTC4 (sécrétagogue du mucus), LTD4 et PAF (responsables d'une bronchoconstriction) (Lee *et al.*, 1984) et d'autre part des protéines basiques contenues dans les granules denses (Egesten *et al.*,

1986) : la protéine basique majeure (MBP pour major basic protein), la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN pour eosinophil-derived neurotoxin), la protéine cationique de l'éosinophile (ECP pour eosinophil cationic protein) et la peroxydase de l'éosinophile (EPO pour eosinophil peroxydase). MBP et EPO sont des médiateurs cytotoxiques et ciliostatiques pour les cellules épithéliales bronchiques et les pneumocytes (Ayars *et al.*, 1985; Frigas *et al.*, 1981; Gleich *et al.*, 1988). La MBP est retrouvée dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques (au niveau de l'épithélium) et dans le mucus (Frigas *et al.*, 1981).

3. Les cellules phagocytaires mononucléées :

Les macrophages alvéolaires sont des cellules phagocytaires appartenant au système réticulohistiocytaire. Ces cellules ont pour fonction essentielle la phagocytose des antigènes particulaires. L'activation des monocytes circulants (seules cellules phagocytaires circulantes avec le neutrophile) induit leur migration dans les tissus où ils se différencient (morphologiquement et fonctionnellement) en macrophages.

Les macrophages des voies aériennes tapissent la muqueuse de la lumière de l'arbre bronchique (au niveau des bronches, bronchioles et alvéoles) et sont en contact direct avec les allergènes inhalés. Les macrophages alvéolaires, recueillis par lavage bronchoalvéolaire, ont été particulièrement bien étudiés *in vitro*. Porteurs d'un récepteur $Fc_\epsilon RII$ (revu par Spiegelberg, 1984), l'activation des macrophages alvéolaires d'asthmatiques par l'allergène spécifique ou avec un anticorps anti-IgE conduit à la libération de bêta-glucuronidase (une enzyme lysosomiale), d'anions superoxydes (cytocydes), et de médiateurs dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique : le thromboxane B2 (TxB2), la $PGF2\alpha$ (inducteur de la sécrétion de mucus), le LTB4, le PAF et un facteur chimioattractant pour les neutrophiles et les éosinophiles (Joseph *et al.*, 1983; Gosset *et al.*, 1984; Fuller *et al.*, 1986). Cette stimulation dépendante de l'IgE induit également la production de monokines comme le $TNF\alpha$ et l'IL-6 (Gosset *et al.*, 1992). Contrairement aux stimulations classiques du macrophage alvéolaire (LPS), cette activation dépendante de l'IgE ne produit pas d'activité IL-1 mais un facteur inhibiteur de l'IL-1 (Gosset *et al.*, 1988).

L'activation du macrophage alvéolaire contribue au recrutement des leucocytes dans les voies aériennes par l'intermédiaire du LTB₄ et du PAF; dans différentes conditions d'activation, il produit également de l'IL-8 (facteur chimioattractant pour les granulocytes), du GM-CSF et de l'IL-5. Le TNF α se présente comme le plus puissant activateur proinflammatoire de la cellule endothéliale (induction de l'expression des molécules d'adhésion et production de cytokines).

4. Les plaquettes sanguines :

Des récepteurs de faible affinité pour l'IgE (Fc ϵ RII) ont été mis en évidence sur les plaquettes (Joseph *et al.*, 1983; Cines *et al.*, 1986)) Les plaquettes de patients allergiques ou de sujets sains, préincubées avec un sérum d'allergique, libèrent, après contact avec l'allergène vis-à-vis duquel ils sont sensibles (ou avec un anticorps anti-IgE) des médiateurs cytotoxiques pour des larves de parasites, ainsi que des radicaux libres. Différentes observations suggèrent l'implication des plaquettes dans l'allergie (Knauer *et al.*, 1981, revu par Durham *et al.*, 1985; Joseph *et al.*, 1988) :

- des plaquettes sont retrouvées dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire immédiatement après un challenge allergénique et pendant la phase retardée,

- des biopsies *post mortem* ont permis de mettre en évidence de nombreux mégacaryocytes dans les poumons de patients asthmatiques,

- les plaquettes libèrent très rapidement, lors d'une activation dépendante de l'IgE, de nombreux médiateurs potentiellement impliqués dans la physiopathologie de l'asthme : le facteur plaquettaire 4 (PF4), le PAF, et des facteurs induisant la libération d'histamine (histamine releasing factor).

5. Le lymphocyte T :

L'asthme et les maladies allergiques sont accompagnées d'une inflammation chronique des muqueuses concernées. Cette inflammation serait en partie la conséquence d'une activation par les lymphokines

produites par les lymphocytes T spécifiques d'allergènes (revu par Corrigan et Kay, 1992).

Les lymphocytes T retrouvés dans les lavages bronchoalvéolaires de sujets asthmatiques allergiques après un test de provocation à l'allergène auquel ils sont sensibles, présentent une expression accrue des marqueurs d'activation (en surface) : la molécule HLA DR, le récepteur pour l'interleukine 2 (CD25), et la molécule d'expression tardive VLA-1 (ou very late antigen-1) .

Les lymphocytes T activés de sujets allergiques présents dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire ou localisés dans l'épithélium bronchique (Jeffery *et al.*, 1989) sont surtout de classe CD4 (Metzger *et al.*, 1987), et expriment préférentiellement les ARNm codant pour les interleukines IL-3, IL-4, IL-5 et GM-CSF (Kay *et al.*, 1991). Ces lymphocytes T possèdent un profil de sécrétion d'interleukine dit de type Th2, par analogie au deux sous populations lymphocytaires T retrouvées dans le modèle murin (Th1, exprimant préférentiellement les lymphokines IL-2 et IFN γ , et Th2 exprimant préférentiellement les lymphokines citées ci-dessus) (Mossmann *et al.*, 1986; Parronchi *et al.*, 1991). Cependant, cette dichotomie n'est pas aussi claire chez l'homme que chez la souris. Néanmoins, les interleukines de type Th2 sont largement impliquées dans la réaction allergique : L'IL-4 est un facteur impliqué dans la régulation de la production des IgE par les lymphocytes B (De Vries *et al.*, 1990). De plus, cette lymphokine induit l'expression préférentielle de la molécule d'adhésion VCAM-1 par la cellule endothéliale (impliquée dans l'adhérence des lymphocytes T, des éosinophiles et des monocytes) (Schleimer *et al.*, 1992). L'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF sont des facteurs chimiotactiques, activateurs et de survie des éosinophiles (revu par Weller, 1992).

B/ L'ASTHME NON ALLERGIQUE

L'asthme non allergique est d'étiologie inconnue et de forme plus grave que l'asthme allergique. Les patients sont généralement traités par une corticothérapie au long court.

Ces patients sont soumis à une réaction inflammatoire chronique sévère; les conséquences physiopathologiques d'une telle inflammation ont été présentées dans la section A/. Le nombre de lymphocytes T

périphériques activés augmente chez les patients présentant un asthme non allergique (Bentley *et al.*, 1992; Corrigan et Kay, 1991). Le taux de CD25 soluble plasmatique est corrélé avec l'éosinophilie circulante et inversement proportionnel à la fonction respiratoire des patients asthmatiques (Lassalle *et al.*, 1992a).

De nombreuses études ont tenté de caractériser les facteurs étiologiques associés à cette forme grave de l'asthme.

Dans la forme d'asthme non allergique associé à une intolérance à l'aspirine et aux antiinflammatoires non stéroïdiens, une première hypothèse avait été émise : la voie de la cyclooxygénase (à l'origine de la production des prostaglandines) étant bloquée, il existerait une quantité relative plus importante de leucotriènes produite, potentiellement bronchodilatateurs (Patrono *et al.*, 1978). Dans cette même forme d'asthme, Ameisen *et al* (1985) avaient montré l'existence d'une anomalie plaquettaire, se caractérisant par la production, en présence d'aspirine, de médiateurs plaquettaires cytotoxiques pour des larves de *Schistosoma mansoni*. Les plaquettes de sujets sains n'étaient pas activées en présence d'aspirine.

Cependant, malgré l'originalité de ces diverses hypothèses originales, aucune n'apparaît suffisante.

II/ La cellule endothéliale dans l'asthme bronchique non allergique associé à une intolérance à l'aspirine

Mise en évidence d'une réponse immune anormale vis-à-vis d'un antigène de 55 kD exprimé par les cellules endothéliales et les plaquettes

1) *Introduction :*

La cellule endothéliale joue un rôle essentiel dans la régulation du processus inflammatoire. L'important état d'hyperréactivité bronchique, (associé à une inflammation tissulaire excessive) observée chez les patients présentant un asthme non allergique tendait à suggérer qu'une activation anormale (ou excessive) de la cellule endothéliale pourrait être à l'origine du mécanisme pathologique. La recherche d'un désordre immunologique impliquant la cellule endothéliale, sous la forme de l'existence d'anticorps anti-cellules endothéliales a été initiée par le Dr. Ph. Lassalle.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre ont été collectés conjointement par le candidat et le Dr. Ph. Lassalle et ont donné lieu à une publication dans la revue *European Journal of Immunology* (Lassalle *et al*, 1993).

2) *Données biologiques et cliniques :*

L'existence d'anticorps dirigés contre un antigène de cellule endothéliale présentant un poids moléculaire de 55 kD a pu être mise en évidence par la technique des immunoempreintes dans les sérums de patients présentant un asthme non allergique (cf Fig. 1).

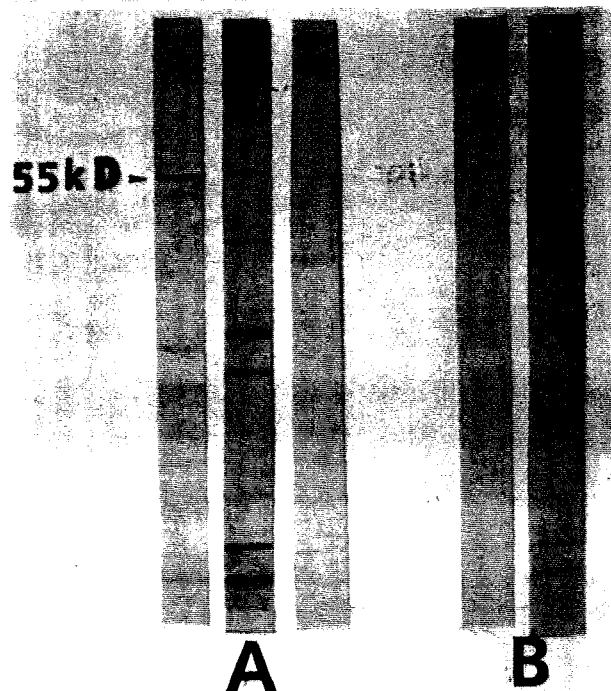


Fig. 1 : Mise en évidence d'anticorps anti-55 kD dans trois sérums de patients présentant un asthme non allergique (A) comparativement à des sérums de sujets témoins (B). Immunoempreintes réalisées sur des antigènes de cellules endothéliales.

Ces anticorps ne sont pas retrouvés dans les sérums de sujets sains (n=38), de patients présentant un asthme allergique ou présentant une atteinte vasculaire caractéristique (artérite temporale dite de Horton). Ils sont présents chez 3/30 et 2/36 patients présentant une maladie systémique (respectivement un lupus érythémateux disséminé et une polyarthrite rhumatoïde) (cf tableau 2).

	Patients	Anticorps anti-55 kD
Asthmatiques	110	34
Lupus éryth.	30	3
Polyarthrite	36	2
Artérite	10	0
Sujets sains	28	0

Tableau 2 : Fréquence de présence des anticorps anti-55 kD parmi 214 sérums

Majoritairement d'isotype G, deux patients présentaient néanmoins des anticorps anti-55 kD d'isotype E. Les autres isotypes (A et M) n'étaient retrouvés chez aucun patient.

L'étude biologique et clinique des patients montrait que l'âge, le sexe et le taux d'immunoglobuline E (IgE) n'étaient pas discriminatifs. Par contre, la présence des anticorps anti-55 kD était associée à un asthme grave, dépendant d'une corticothérapie, et surtout associé à une idiosyncrasie vis-à-vis de l'aspirine et des antiinflammatoires non stéroïdiens (cf tableau 3).

	Présence d'anticorps anti-55 kD	Absence d'anticorps anti-55 kD
Nombre de patients	34	76
Age (Moy. ± SD)	44 ± 13	39 ± 18
Sexe (F/M)	21/13	39/37
Tests cutanés positifs aux allergènes (positifs/négatifs)	9/25	40/36
Asthme associé à une intolérance à l'aspirine	10	11
Asthme dépendant d'une corticothérapie	20	28

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients asthmatiques présentant ou non des anticorps anti-55 kD

La mise en évidence d'une réponse lymphocytaire B dirigée contre la cellule endothéliale dans ce groupe de patients présentant un asthme non allergique (caractérisé par la production d'anticorps anti-55 kD), suggérait l'existence d'une réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de cet antigène.

Afin de vérifier cette hypothèse, des tests de transformation lymphoblastique ont été réalisés avec les cellules mononucléées périphériques de sujets présentant ces anticorps et de sujets témoins (sujets sains et patients présentant un asthme allergique).

L'antigène n'étant pas purifié, une suspension d'antigène particulaire fut préparée selon la technique décrite dans la section matériel et méthodes. L'antigène est incubé pendant trois jours avec $0,5 \cdot 10^6$ cellules mononucléées. L'antigène témoin correspondait soit à une membrane de nitrocellulose vierge, soit à une bande portant des protéines de cellule

endothéliale non reconnues par les sérums de patients ni de témoins (antigènes irrelevantes). Les index de prolifération ont été définis comme le rapport entre le taux d'incorporation de thymidine tritiée des cellules mononucléées en présence de l'extrait particulaire comportant l'antigène de 55 kD (T₅₅) et le taux d'incorporation des cellules en présence de l'antigène particulaire irrelevant (T₀) :

$$\text{index de prolifération lymphoblastique} = (T_{55} - T_0)/T_0 \times 100.$$

Une prolifération a été mise en évidence uniquement si les cellules mononucléées de patients avaient été, préalablement à la mise en culture avec l'antigène particulaire, cultivées pendant 24 h en présence de doses suboptimales de concanavaleine A (activateur non spécifique des lymphocytes T). Des index de prolifération significatifs (supérieurs au seuil minimal arbitrairement défini à 2) ont été obtenus chez 7/15 patients présentant un asthme grave et des anticorps anti-55 kD et 3/8 patients présentant un asthme grave sans anticorps anti-55 kD. Aucune prolifération n'a été obtenue avec des cellules mononucléées de sujets sains ou de patients présentant un asthme allergique (cf Fig. 2).

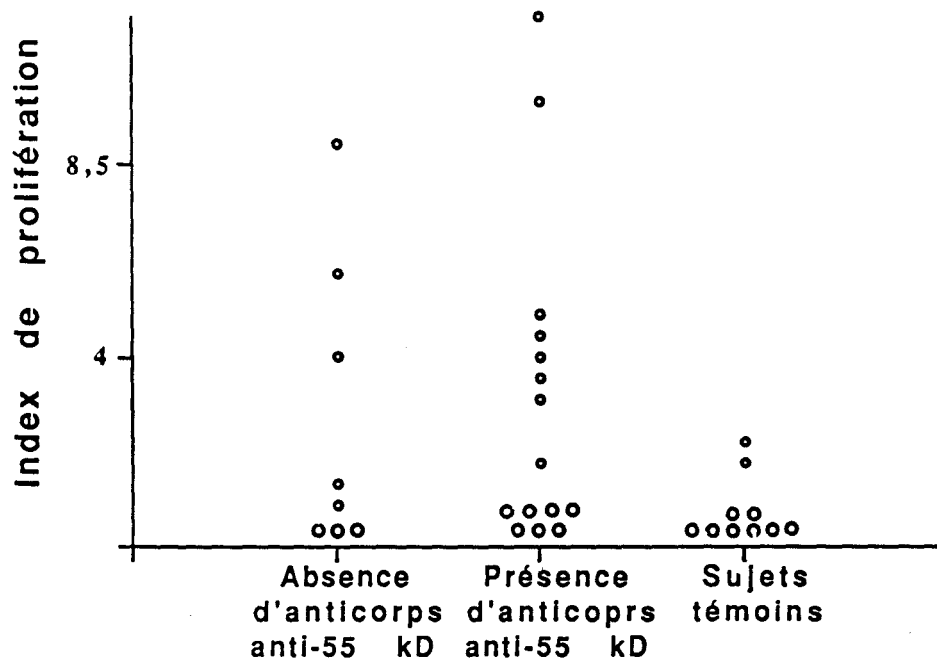


Fig. 2 : Mise en évidence d'une réponse lymphocytaire T dirigée contre un antigène endothélial de 55 kD. Les lymphocytes proviennent de sujets ayant un asthme non allergique, présentant (n=15) ou non (n=8) des anticorps anti-55 kD, ou de sujets témoins (n=10). Les résultats sont exprimés en index de prolifération.

De plus, chez un patient présentant des anticorps anti-55 kD, un index de prolifération de 3,9 était obtenu avec ses cellules collectées lors d'une poussée de la maladie. Cet index retournait à des valeurs non significatives (index de 1,8) après 3 semaines de traitement par corticoïdes et en l'absence de tout signe clinique d'asthme.

Les index de prolifération lymphocytaire T étaient corrélés à la mesure de la fonction respiratoire des patients (définie par la force expiratoire mesurée en une seconde ou FEV₁) (cf Fig. 3).

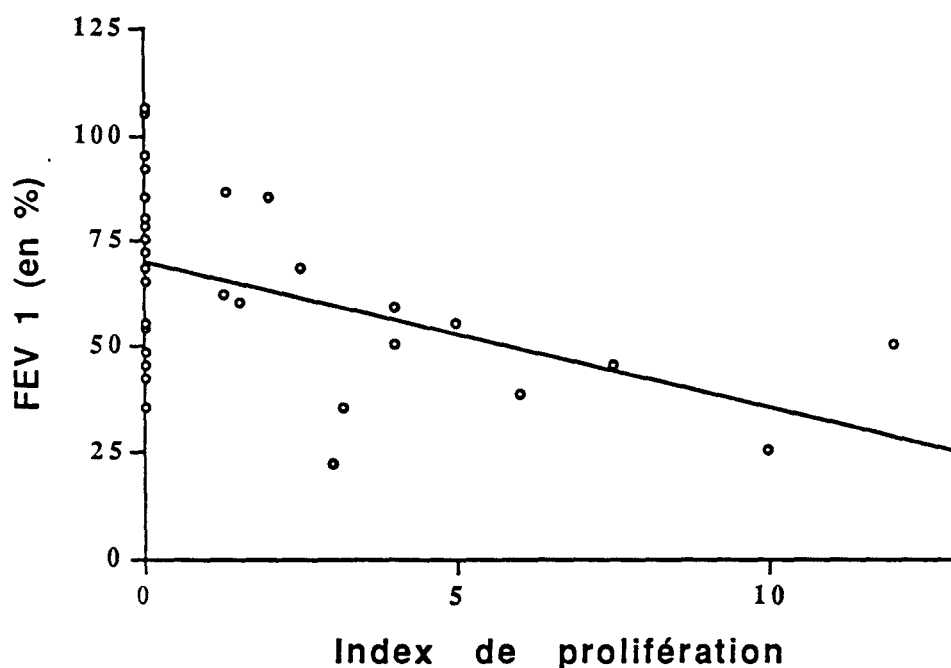


Fig. 3 : Corrélation entre les index de prolifération de lymphocytes T vis-à-vis d'un antigène de 55 kD et les données de la fonction respiratoire (FEV₁), mesurée le jour du prélèvement sanguin.

L'ensemble de ces données biologiques montrent l'existence d'une réactivité de type autoimmune chez des patients présentant un asthme non allergique dirigée contre une structure de 55 kD endothéliale.

Les anticorps anti-55 kD sont retrouvés chez des patients présentant une intolérance à l'aspirine. De plus, les patients ayant des autoanticorps anti-55 kD présentent une réactivité lymphocytaire T vis-à-vis d'un antigène de 55 kD d'origine endothéliale. La réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de cet antigène est corrélée à la fonction respiratoire des patients.

3) Données biochimiques :

a) Expression de l'antigène de 55 kD :

La préparation des extraits antigéniques dans des conditions réductrices ou non réductrices (présence ou non de β 2-mercapto-éthanol) ne modifie pas la reconnaissance de l'antigène de 55 kD par les sérums de patients. Le traitement des cellules endothéliales par la tunicamycine (inhibiteur de la O-glycosylation) n'entraîne pas de modification du poids moléculaire apparent de cet antigène.

Des extraits antigéniques de différents types cellulaires ont été analysés par immunoempreinte pour leur capacité à exprimer l'antigène de 55 kD. Les résultats ont montré que son expression était équivalente au niveau des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical et des cellules endothéliales transfectées par le plasmide pSV1 dérivé de SV40 (simian virus 40) (Lassalle *et al.*, 1992b) ainsi que des plaquettes sanguines (cf Fig. 4).

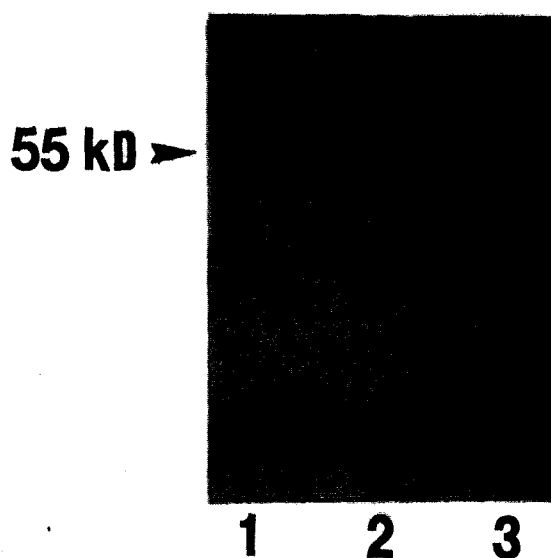


Fig. 4 : Mise en évidence de l'antigène de 55 kD dans des extraits antigéniques de plaquettes humaines (1), de cellules endothéliales de cordon ombilical humain (2) et de cellules endothéliales transfectées par SV40 (3). Les immunoempreintes ont été réalisées avec un sérum de patient présentant des anticorps anti-55 kD et un asthme non allergique associé à une intolérance à l'aspirine.

Cet antigène était relativement peu exprimé par les cellules K562 et Cos, et non détectable dans les autres types cellulaires testés (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, MRC5 (fibroblastes de poumon d'embryon humain) et les lignées cellulaires : U937 (lignée monocyttaire) et Hela (lignée de cellules épithéliales)). Un antigène de 55 kD reconnu par les sérums de patients est également présent dans des cellules endothéliales de boeuf.

Il est important de noter que les plaquettes de sujets sains et de sujets présentant des anticorps anti-55 kD expriment de façon équivalente l'antigène de 55 kD (telle que cette expression peut être appréhendée par la technique des immunoempreintes). Ce résultat suggère que les plaquettes autologues peuvent être une cible privilégiée des autoanticorps

Les sérums de patient contenant les anticorps anti-55 kD reconnaissent des antigènes de poids moléculaires équivalents dans les extraits antigéniques de cellules endothéliales et de plaquettes. Afin d'appréhender une éventuelle communauté antigénique entre ces antigènes de 55 kD, le protocole suivant a été suivi : un extrait antigénique total de plaquettes a été séparé par électrophorèse et transféré sur une membrane de nitrocellulose. La bande de nitrocellulose portant l'antigène de 55 kD a été repérée à l'aide d'un sérum de patient contenant des anticorps anti-55 kD. Après l'avoir isolée, cette bande a servi de support pour adsorber les anticorps anti-55 kD présents dans un sérum de patient (choisi comme sérum de référence car présentant la meilleure immunoréactivité vis-à-vis de l'antigène de 55 kD en immunoempreinte). Le sérum épuisé ne reconnaît plus l'antigène de 55 kD plaquettaire (la bande au poids moléculaire de 50 kD correspondant aux chaînes lourdes d'immunoglobulines), ni l'antigène de 55 kD exprimé par la cellule endothéliale (cf Fig. 5).

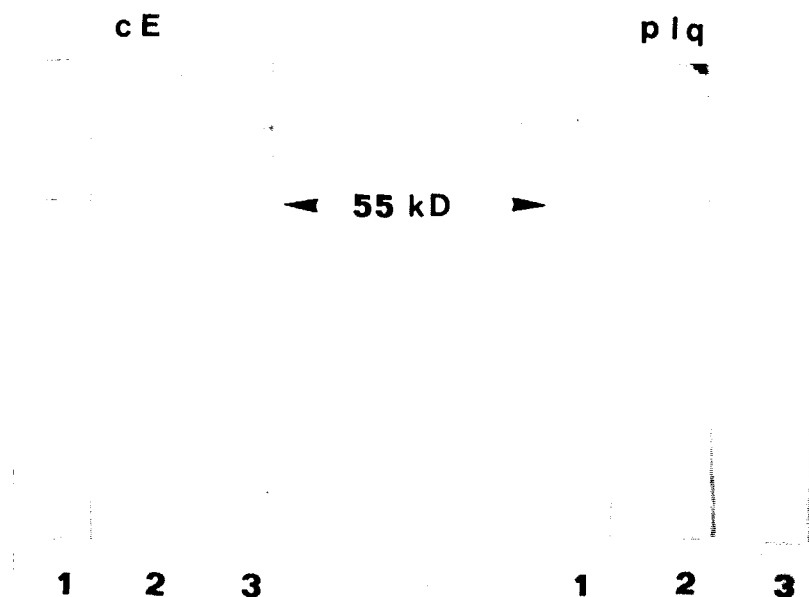


Fig. 5 : Mise en évidence d'une immunoréactivité croisée entre l'antigène de 55 kD exprimé par les plaquettes (plq) et les cellules endothéliales (ce). Un sérum de patient, reconnaissant l'antigène de 55 kD plaquettaire et endothélial (1) épuisé en anticorps anti-55 kD plaquettaire ne reconnaît plus l'antigène de 55 kD plaquettaire ni l'antigène de 55 kD endothélial (2). Ce sérum épuisé contre un autre antigène plaquettaire reconnaît toujours l'antigène de 55 kD (3).

Afin de conforter ce résultat, des extraits antigéniques des trois types cellulaires exprimant l'antigène de 55 kD ont été séparés par électrophorèse bidimensionnelle puis transférés sur membrane de nitrocellulose. Les immunoempreintes effectuées avec un sérum de patient possédant des anticorps anti-55 kD ont montré que l'antigène reconnu était identique dans les trois types cellulaires, et présentait un point isoélectrique (pHi) voisin de 8 (cf Fig. 6).

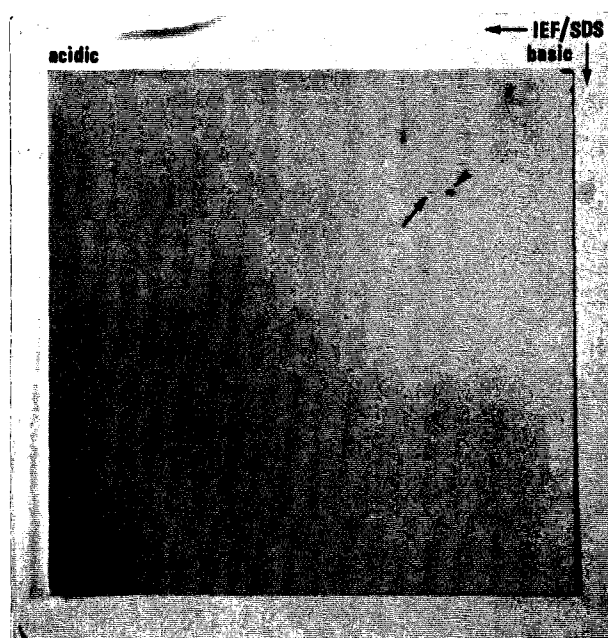


Fig. 6 : Immunoempreinte sur électrophorèse bidimensionnelle d'extraits antigéniques de cellule endothéliale, révélée avec un sérum contenant des anticorps anti-55 kD. La petite flèche correspond à l'antigène de 55 kD; la grande flèche doit correspondre à une isoforme.

Ces résultats montrent que les antigènes de 55 kD exprimés par les cellules endothéliales et les plaquettes présentent une immunoréactivité croisée. Cet antigène présente un pHi voisin de 8,0.

b) Purification biochimique

Des extraits antigéniques de plaquettes et de cellules endothéliales ont été séparés par chromatographie liquide sous haute pression en phase inversée (réalisée en collaboration avec le Pr. H. Gras-Masse de l'unité U344, laboratoire de chimie des biomolécules du Pr. A. Tartar, Institut Pasteur de Lille). Les fractions recueillies ont été séparées par électrophorèse monodimensionnelle, les gels étant soit colorés (bleu de Coomassie) soit transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les immunoempreintes réalisées avec un sérum de patient ont montré que l'antigène se retrouvait dans deux fractions correspondant à des niveaux de faible hydrophobicité (cf Fig. 7).

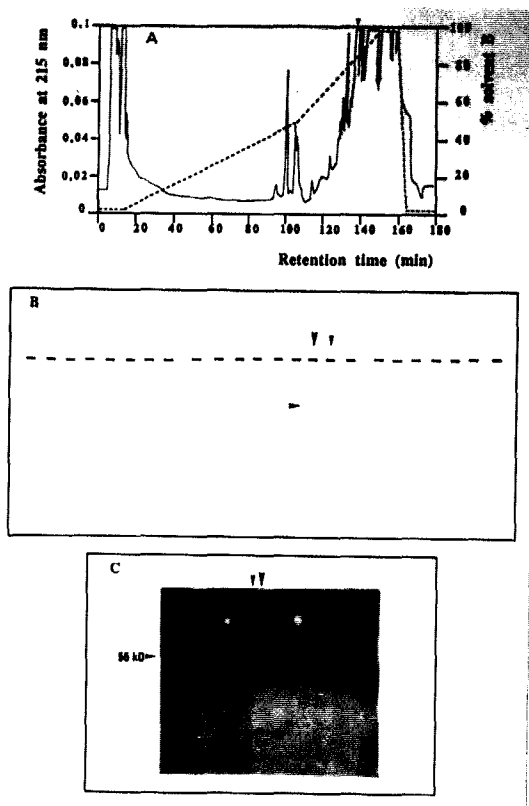


Fig. 7 : Caractérisation de l'antigène de 55 kD par HPLC en phase inverse (A). Les fractions sont séparées par électrophorèse monodimensionnelle (C) et l'antigène est localisé par immunoempreinte (B) dans deux fractions (flèches verticales), la flèche horizontale désigne le poids moléculaire de 55 kD).

Cependant, les faibles rendements de purification par cette technique n'ont pas permis d'obtenir l'antigène en quantité suffisante pour réaliser un microséquençage protéique.

4) *Caractéristiques cellulaires :*

Un marquage métabolique de cellules endothéliales de cordon ombilical a été réalisé avec l'acide aminé méthionine marqué au ^{35}S (^{35}S -Met). Les extraits antigéniques obtenus ont été séparés par électrophorèse bidimensionnelle puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'immunoempreinte, réalisée avec un sérum de patient, a ensuite été mise en autoradiographie. La superposition des images d'immunoempreinte et d'autoradiographie a permis de localiser très exactement le spot correspondant à l'antigène de 55 kD, et de vérifier qu'il s'agissait d'une

protéine très faiblement exprimée par les cellules endothéliales non activées (cf Fig. 8).

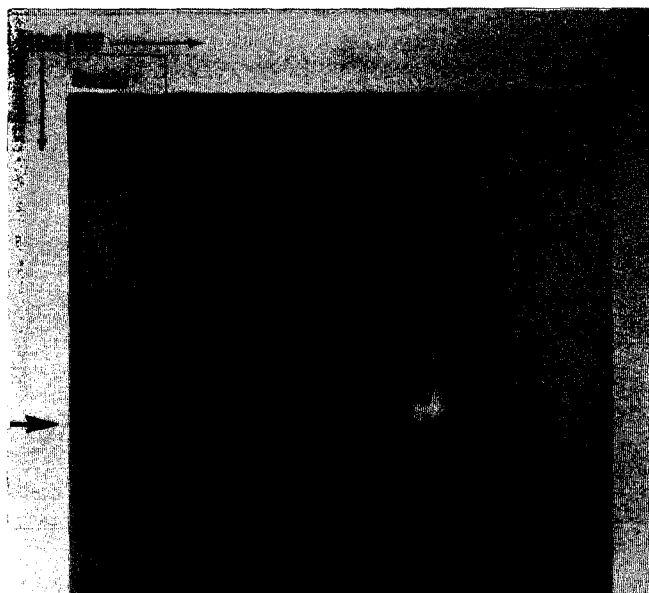


Fig. 8 : Autoradiographie d'une électrophorèse bidimensionnelle d'extraits de cellules endothéliales marquées au ^{35}S -Met. L'antigène de 55 kD est localisé par la petite flèche (la flèche horizontale localise le poids moléculaire 55 kD).

Ce résultat montre que l'antigène de 55 kD est peu exprimé par les cellules endothéliales en culture non activées.

Les différentes données concernant l'asthme associé à une intolérance à l'aspirine montrent qu'il est caractérisé par une réactivité anormale des plaquettes de patients vis-à-vis de l'aspirine ainsi que par l'existence d'anticorps (entre-autres) anti-plaquettaires. Nous avons donc étudié la relation entre ces deux observations.

Des plaquettes de patients intolérants à l'aspirine et de sujets sains libèrent en présence de doses non agrégantes de thrombine (puissant activateur plaquettaire) l'antigène de 55 kD dans le milieu extracellulaire. Par contre, en présence d'aspirine, seules les plaquettes des patients étaient capables de libérer cet antigène. Cette libération de l'antigène de 55 kD était inhibée par un traitement des plaquettes avec le salicylamide. La

présence de l'antigène dans le surnageant de culture est décelable à une heure et maximale à deux heures (cf Fig. 9).

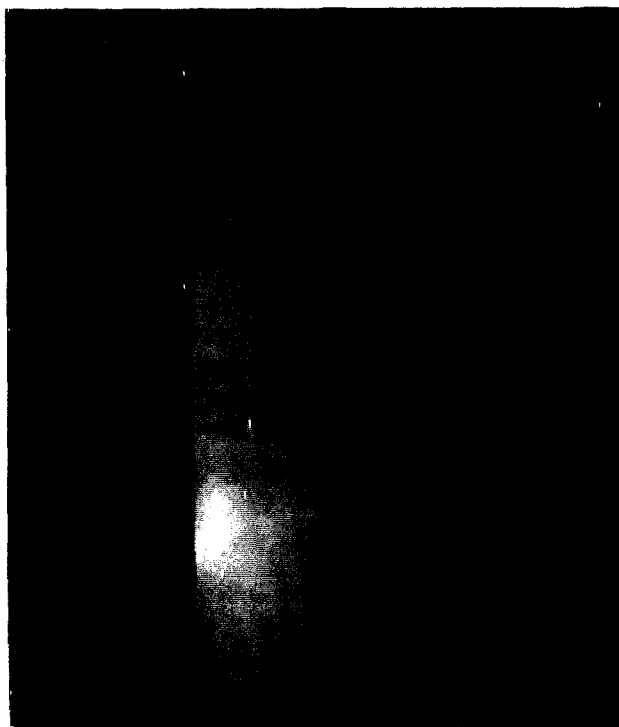


Fig. 9 : Les plaquettes de patients présentant une intolérance à l'aspirine (Pa) et stimulées par l'aspirine (2), libèrent l'antigène de 55 kD. Les plaquettes de sujets sains (Te) et de patients libèrent l'antigène de 55 kD sous stimulation par la thrombine (1). Ces résultats ont été obtenus par immunoempreinte, après électrophorèse monodimensionnelle des surnageants lyophilisés.

Des expériences d'immunoprécipitation des protéines sécrétées par la cellule endothéliale ont été réalisées par immunoabsorption des protéines marquées au ^{35}S -Met libérées dans le milieu extracellulaire. La colonne d'immunoabsorption était constituée de fractions immunoglobuliniques G de sérums de patients (obtenues par la technique de précipitation au sulfate d'ammonium) immobilisées sur Sépharose®. Cependant, les résultats n'ont pas clairement établi la sécrétion de cet antigène de 55 kD dans le milieu extracellulaire par les cellules endothéliales.

Il apparait donc que :

- les sujets souffrant d'un asthme grave associé à une intolérance à l'aspirine présentent des anticorps anti-55 kD,
- l'antigène de 55 kD est exprimé par les cellules endothéliales et les plaquettes
- les plaquettes de sujets intolérants à l'aspirine expriment, comme les sujets témoins, l'antigène de 55 kD, et fait très intéressant,
- seules les plaquettes de sujets intolérants à l'aspirine libèrent l'antigène de 55 kD en présence d'aspirine.

5) L'approche moléculaire :

Les différentes techniques de purification de l'antigène de 55 kD (immunoprécipitation, fractionnement par chromatographie) ayant échoué, le clonage moléculaire a été envisagé.

Deux banques d'ADNc de cellules endothéliales de cordon ombilical ou transfectées, ont été construites à partir d'amorces oligo-dT (désoxythymine) dans un vecteur procaryotique (vecteur λ ZAP II).

La sonde ayant servi au criblage des banques provenait d'un sérum de patient présentant la meilleure immunoréactivité en immunoempreinte vis-à-vis de l'antigène de 55 kD. Ce sérum a été préalablement épuisé en anticorps anti-*Escherichia coli*. Les différents criblages ont permis d'isoler deux clones issus de la banque de cellules endothéliales transfectées, présentant des tailles respectives de 0,7 et 0,9 kilobases (kb). La comparaison des séquences nucléotidiques partielles (selon la technique de Maxam et Gilbert) avec celles contenues dans les banques de données ne montrait d'homologie avec aucune séquence connue.

Cependant, bien que la reconnaissance de ces deux clones soit restreinte à un sérum présentant des anticorps anti-55 kD, il n'a jamais pu être clairement mis en évidence qu'ils codaient pour des épitopes de l'antigène de 55 kD. En effet :

- les protéines de fusion produites par les bactéries n'étaient pas reconnues par les autres sérums de patients présentant les anticorps anti-55 kD et surtout,

- des épuisements du sérum du patient ayant servi au criblage des banques en anticorps anti-55 kD n'annulaient pas complètement sa réactivité vis-à-vis des clones.

D'autres tentatives de criblage des banques avec le même type de sondes a échoué. Ceci tenait essentiellement à la mauvaise qualité des sondes qui étaient à notre disposition (sérum humain).

Une nouvelle approche a consisté en la préparation d'une autre sonde immunologique par immunisation d'un lapin avec l'antigène de 55 kD. Pour cela, l'isolement de l'antigène en quantité plus importante s'est basé sur son comportement biologique. La stimulation plaquettaire par des doses non agrégantes de thrombine induisant sa libération dans le milieu extracellulaire, son enrichissement a été réalisé par immunoprécipitation sur une colonne d'immunoabsorption constituée de fractions immunoglobuliniques G d'un patient. La présence de l'antigène 55 kD dans la fraction immunoprécipitée a été contrôlée par immunoempreinte avec un autre sérum de patient.

Un lapin a été immunisé avec un éluat concentré de la colonne. Le sérum de lapin reconnaît l'antigène de 55 kD de plaquette et de cellule endothéliale. Le criblage des banques d'ADNc a été réalisé après épuisement du sérum immunisé en anticorps anti-*Escherichia coli*. Les résultats préliminaires ont permis d'isoler deux clones de tailles respectives 1,3 et 1,5 kb. Des expériences de transfert des inserts dans un vecteur d'expression plus performant (pGEX 4T3) sont en cours, afin de purifier les protéines de fusion codées par ces deux clones.

CONCLUSION:

Le premier volet de notre étude a permis de montrer l'existence, chez des patients présentant un asthme grave non allergique, d'autoanticorps dirigés contre une structure de 55 kD exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales. Cet antigène présente un pHi voisin de 8,0, un caractère d'hydrophobicité moyenne et n'est pas glycosylé. Il apparait peu exprimé par les cellules non activées. Il est exprimé par les cellules des patients présentant ces anticorps.

Après activation par l'aspirine, l'antigène de 55 kD n'est libéré que par les plaquettes de sujets présentant une intolérance à l'aspirine.

De plus, il existe une corrélation inverse entre la réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de l'antigène de 55 kD et la fonction respiratoire des patients asthmatiques.

III/ La cellule endothéliale dans l'asthme allergique :

Etude de modèles d'interactions cellulaires établies entre la cellule endothéliale et les cellules inflammatoires

A/ Introduction :

Le deuxième axe de ce travail a consisté en l'étude de coopérations cellulaires établies entre la cellule endothéliale et deux autres types cellulaires intervenant dans les phases précoce et tardive de la réaction allergique. Notre étude s'est limitée aux coopérations réalisées par des médiateurs solubles produits par le mastocyte (histamine) et le lymphocyte T (interleukines).

Comme nous l'avons précédemment cité, la cellule endothéliale est directement impliquée dans la réaction allergique bronchique, lors du développement des phases précoce (vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire) et tardive (expression des molécules d'adhésion, production de cytokines).

Du fait de sa localisation dans les tissus et de l'absence de récepteurs $Fc_\epsilon R$ à sa surface, la cellule endothéliale n'est pas directement stimulée par l'allergène. Son activation, et donc sa participation dans les processus physiopathologiques de l'asthme, devra être initiée par des médiateurs produits par des cellules directement activées par l'allergène comme les mastocytes, les macrophages alvéolaires et les lymphocytes T (Mantovani *et al.*, 1992). Les médiateurs produits par la cellule endothéliale seront alors capables de moduler les fonctions d'autres cellules (dont celles qui les ont activées). Ce mode d'activation séquentielle de plusieurs types cellulaires qui interagissent entre-elles est à la base de la notion de réseau de coopération cellulaire.

Les travaux menés dans le laboratoire se sont, dans un premier temps, plus particulièrement attachés à analyser les coopérations cellulaires établies entre la cellule endothéliale et le macrophage alvéolaire. Le macrophage alvéolaire est la première cellule, avec la cellule épithéliale, à être en contact avec les éléments véhiculés par les airs. De précédents

travaux ont montré que les macrophages alvéolaires de sujets allergiques produisent lors d'une activation *in vitro* par l'allergène vis-à-vis duquel ils sont sensibles, du TNF α et de l'IL-6, contrairement aux macrophages alvéolaires de sujets témoins qui ne produisent pas de monokines. Cette production est dépendante de l'IgE et détectable à des niveaux élevés dès la troisième heure après le contact avec l'allergène (Gosset *et al.*, 1992).

Des surnageants de culture de macrophages alvéolaires de sujets allergiques, activés par un allergène, ont été analysés pour leur capacité à activer les cellules endothéliales. Les résultats ont montré qu'ils induisent une expression accrue d'ICAM-1 (maximale à 24h) et de E-sélectine (maximale à 6h) par les cellules endothéliales. L'activation endothéliale était dépendante du TNF α .

La production de monokines par les macrophages alvéolaires activés par un allergène est détectable à des niveaux élevés dès la troisième heure. Une nouvelle stimulation de trois heures est également nécessaire pour induire une augmentation d'expression des molécules d'adhésion (essentiellement la E-sélectine) sur la cellule endothéliale. Ces cinétiques d'activation sont en parfaite concordance avec le temps requis pour le développement de la réaction inflammatoire qui débute 6 à 8 heures après l'introduction de l'allergène (Lassalle, Gosset, Delneste *et al.*, 1993).

Notre intérêt s'est ensuite porté sur les coopérations cellulaires établies entre le mastocyte et le lymphocyte T. Nous rappellerons d'abord brièvement les rôles respectifs du mastocyte et du lymphocyte T dans la réaction allergique.

L'activation du mastocyte, par le biais de ses récepteurs Fc ϵ RI, conduit à la libération de nombreux médiateurs préformés (5 à 15 min) dont l'histamine.

Les effets connus de l'histamine sur la cellule endothéliale sont limités à la phase précoce de la réaction allergique (Lorant *et al.*, 1991; Bull *et al.*, 1992):

- une vasodilatation,
- une augmentation de la perméabilité transvasculaire à l'origine de la formation de l'œdème,
- l'expression transitoire de la P-sélectine.

Notre étude a porté sur les effets que pourrait avoir un tel médiateur préformé sur les fonctions de la cellule endothéliale associées à la phase retardée.

De nombreux travaux ont montré que la réaction inflammatoire était caractérisée essentiellement par un infiltrat constitué de lymphocytes et d'éosinophiles activés. L'activation des éosinophiles induit la libération de nombreux médiateurs cytotoxiques ou cytostatiques associés à la destruction épithéliale observée chez les asthmatiques. Les conséquences de l'activation des lymphocytes T sont relativement bien connues grâce à l'emploi de lymphokines recombinantes ou de surnageants de culture de clones spécifiques d'allergènes. Ces clones lymphocytaires produisent de l'IL-3, et de l'IL-5, facteurs de croissance et d'activation des éosinophiles, ainsi que de l'IL-4 qui induit l'expression de VCAM-1 par la cellule endothéliale.

Cependant, puisque l'ensemble de la population est exposée de façon équivalente aux allergènes, les sujets témoins comme les sujets allergiques présentent des lymphocytes T périphériques spécifiques d'allergène.

Le but de notre étude a consisté à comparer les effets d'une stimulation lymphocytaire T par l'allergène (de sujets témoins et de patients allergiques) sur l'activation de la cellule endothéliale. Les paramètres étudiés ont été l'expression des molécules d'adhésion et la production de cytokines.

B/ Etude de l'activation de la cellule endothéliale par l'histamine. Résultats :

Lors d'une stimulation de la cellule endothéliale par l'histamine seule, nous n'observons pas de modulation d'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, à l'exception de la P-sélectine comme cela a déjà été rapporté dans la littérature. L'induction d'expression de la P-sélectine est maximale à 15 min et redevient nulle dans les minutes qui suivent (résultats non présentés).

Par contre, il est apparu que l'histamine induisait la production des cytokines IL-6 et IL-8.

Le dosage biologique de l'IL-6 a été réalisé avec la lignée cellulaire 7TD1 dont la croissance est dépendante de l'IL-6 (en collaboration avec le Dr. Ph. Gosset, CJF INSERM 90-06). Les résultats du dosage de l'IL-6 sont exprimés en U/ml. Le dosage de l'IL-8 est effectué par dosage ELISA et les résultats exprimés en $\mu\text{g/ml}$. Les expériences ont été réalisées avec des cellules au second passage de culture (confluentes après 4 jours de culture). Les différences de résultat peuvent provenir de comportements différents d'un lot de cellule à l'autre.

1) La production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale est dépendante de la dose d'histamine

Les doses d'histamine utilisées sont de 10^{-7} M à 10^{-3} M. La production des cytokines a été appréciée dans les surnageants de culture collectés après 6 heures d'incubation ($n=8$). Les résultats sont présentés dans les figures 10A et 10B. Les productions des deux cytokines sont induites de façon significative par une dose activatrice d'histamine de 10^{-5} M (production d'IL-6 : $24,1 \pm 3,1$ comparées à $15 \pm 2,7$ U/ml en base; production d'IL-8 : $4,88 \pm 0,55$ comparés à $3 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ en base; moyenne \pm SEM; $p < 0,05$). Cette production croît jusqu'à la dose maximale utilisée de 10^{-3} M ($35 \pm 5,9$ U/ml d'IL-6 produite; $8,3 \pm 0,52$ $\mu\text{g/ml}$ d'IL-8 produite).

L'histamine induit donc la production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale, effective dès la concentration de 10^{-5} M.

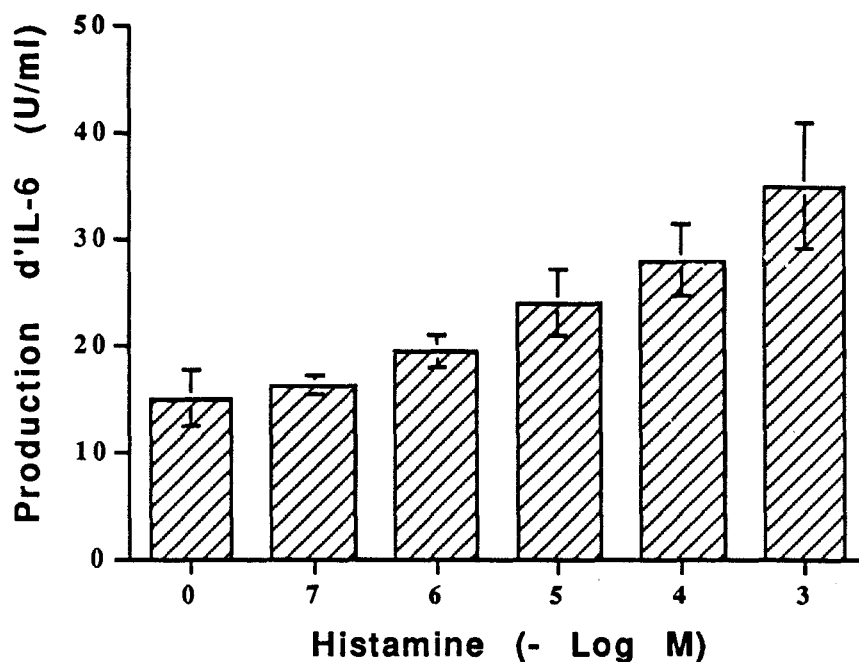


Fig. 10A : Production d'IL-6 par les cellules endothéliales en réponse à une stimulation par l'histamine. Les dosages sont effectués dans les surnageants collectés à 6 heures. Les résultats sont exprimés en U/ml \pm SEM (* $p < 0,05$).

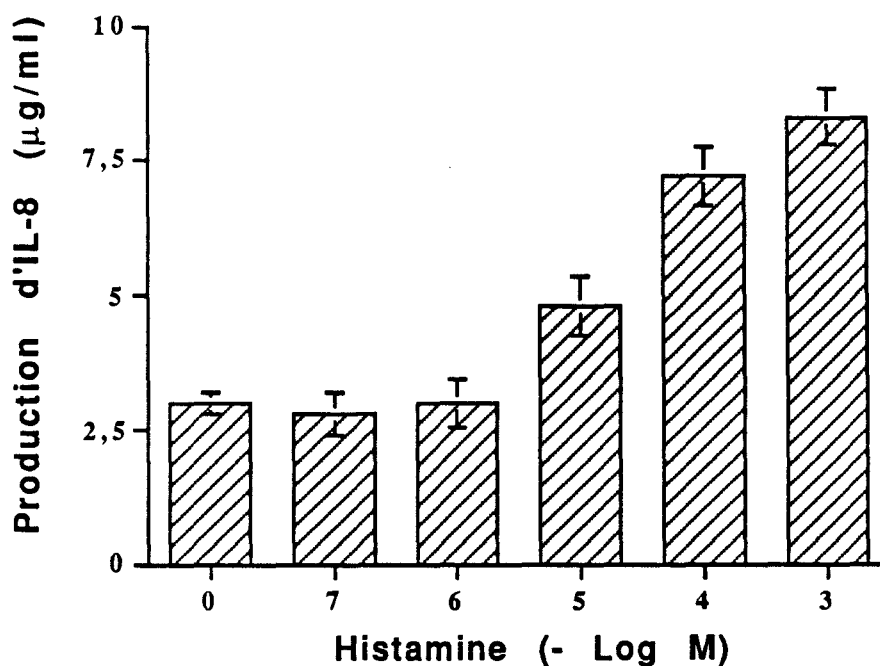


Fig. 10B : Production d'IL-8 par les cellules endothéliales en réponse à une stimulation par l'histamine. Les dosages sont effectués dans les surnageants collectés à 6 heures. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml} \pm$ SEM (* $p < 0,05$).

2) *Cinétique de production des cytokines après activation de la cellule endothéliale par l'histamine :*

Les expériences de cinétique (n=8) ont été réalisées avec une dose d'histamine de 10^{-4} M. Les surnageants de culture ont été collectés aux temps 2h, 4h, 6h, 12h et 24h.

Les résultats, présentés dans les figures 11A et 11B, montrent que les productions des cytokines IL-6 et IL-8 sont significativement plus élevées sous stimulation par l'histamine dès la quatrième heure d'incubation (IL-6 produite : $6,75 \pm 0,25$ comparées à $0 \pm 0,5$ U/ml sans stimulation; IL-8 produite : $3,9 \pm 0,8$ comparés à $1,8 \pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$; $p < 0,05$). Cette production croît régulièrement pour être maximale au temps le plus long que nous ayons testé qui est de 24h (27 ± 9 comparées à $11,5 \pm 2$ U/ml pour la production d'IL-6; $18,4 \pm 1,5$ comparés à $8,3 \pm 0,9$ $\mu\text{g/ml}$ pour la production d'IL-8). Notons que l'amplitude de production des cytokines (différence entre la production induite par l'histamine et la production en base) est maximale à 24h pour les deux cytokines.

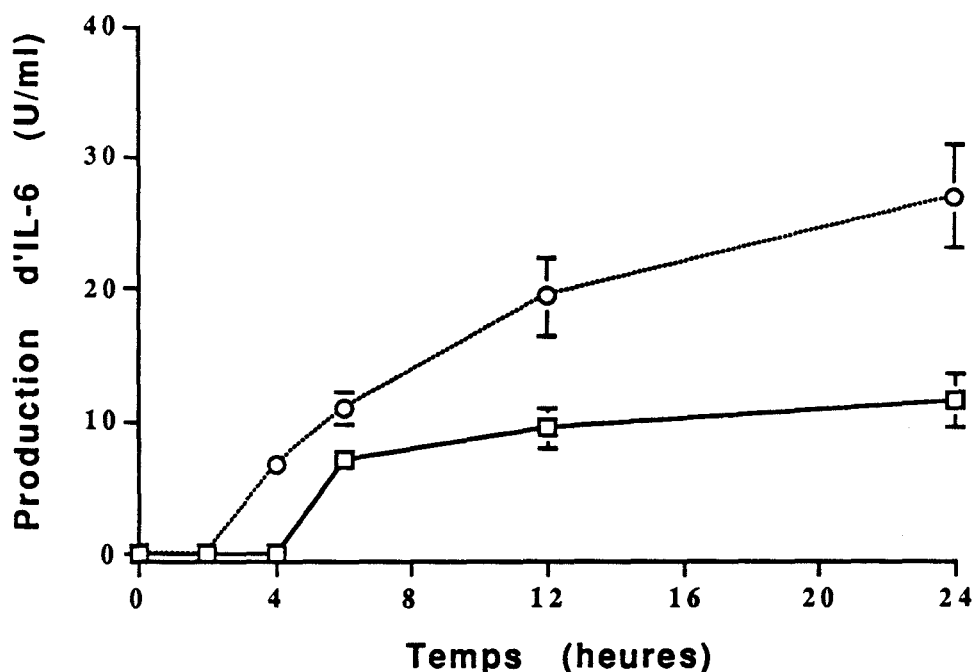


Fig. 11A : Cinétique de production de l'IL-6 par la cellule endothéliale sous une stimulation par l'histamine (ronds) comparativement à la production sans stimulation (carrés). Les résultats sont exprimés en U/ml \pm SEM.

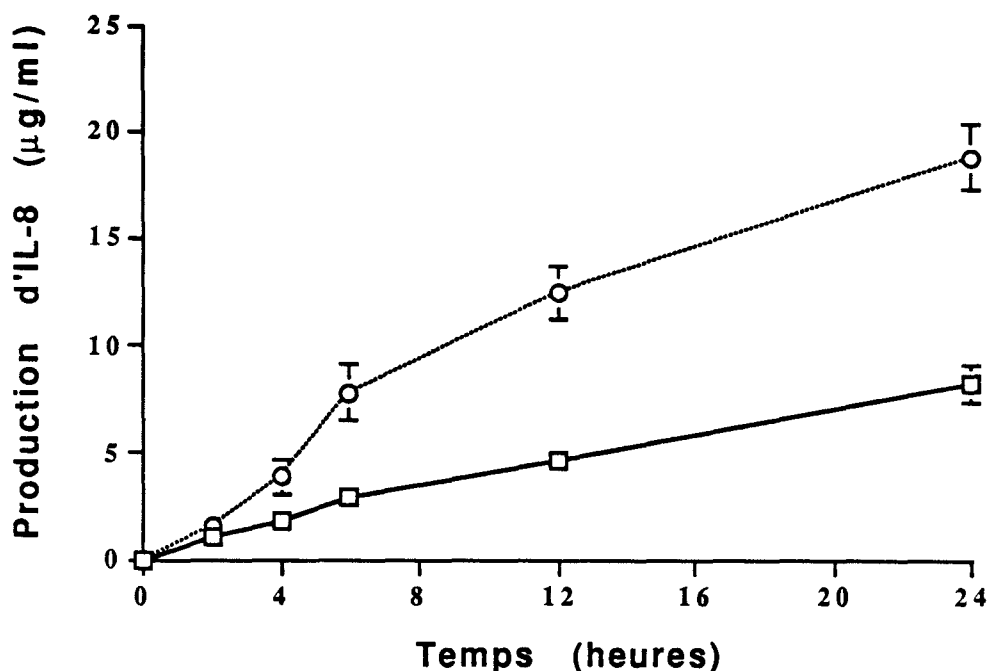


Fig. 11B : Cinétique de production de l'IL-8 par la cellule endothéliale sous une stimulation par l'histamine (ronds) comparativement à la production sans stimulation (carrés). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml} \pm \text{SEM}$.

La production de cytokines induite par l'histamine est fonction du temps d'activation (détectable à 4h et maximale à 24h).

3) Inhibition de la production d'IL-6 et d'IL-8 par les antagonistes des récepteurs à l'histamine :

Les cellules endothéliales présentent des récepteurs à l'histamine de type H1, H2 et H3. Ne disposant pas d'antagonistes des récepteurs de type H3, notre étude s'est limitée à l'emploi des antagonistes des récepteurs de type I (maléate de dexchlorphéniramine, dont le nom commercial est Polaramine®) aux concentrations de 10^{-12} M à 10^{-2} M, et des antagonistes des récepteurs de type II (dichlorisoprotérénol, dont le nom commercial est Atarax®) aux concentrations de 10^{-13} M à 10^{-3} M. Ces expériences d'inhibition ont été réalisées 6 fois et évaluées à 6h sous une stimulation avec une dose unique d'histamine de 10^{-4} M. Le calcul du pourcentage d'inhibition tient compte de la production de cytokines par les cellules non activées.

Les antagonistes inhibent de manière dépendante de la dose les productions d'IL-6 et d'IL-8 induites par l'histamine (cf Fig. 12A et 12B).

Les doses d'antagonistes induisant une inhibition de 50 % de la production de cytokines étaient de :

- pour l'IL-6 : $5 \cdot 10^{-4}$ M pour l'antagoniste des récepteurs de type I
 $4 \cdot 10^{-5}$ M pour l'antagoniste des récepteurs de type II
- pour l'IL-8 : $3 \cdot 10^{-5}$ M pour l'antagoniste des récepteurs de type I
 $5 \cdot 10^{-7}$ M pour l'antagoniste des récepteurs de type II.

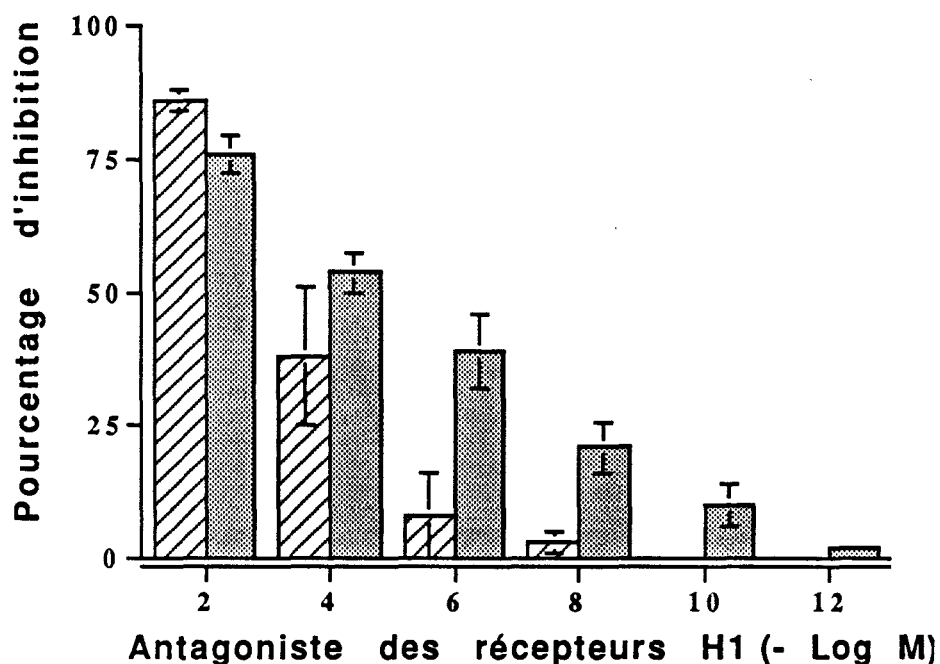


Fig. 12A : Inhibition par un antagoniste des récepteurs de type H1 des productions d'IL-6 (hachurés) et d'IL-8 (grisés) induites par l'histamine. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition de la production de cytokines.

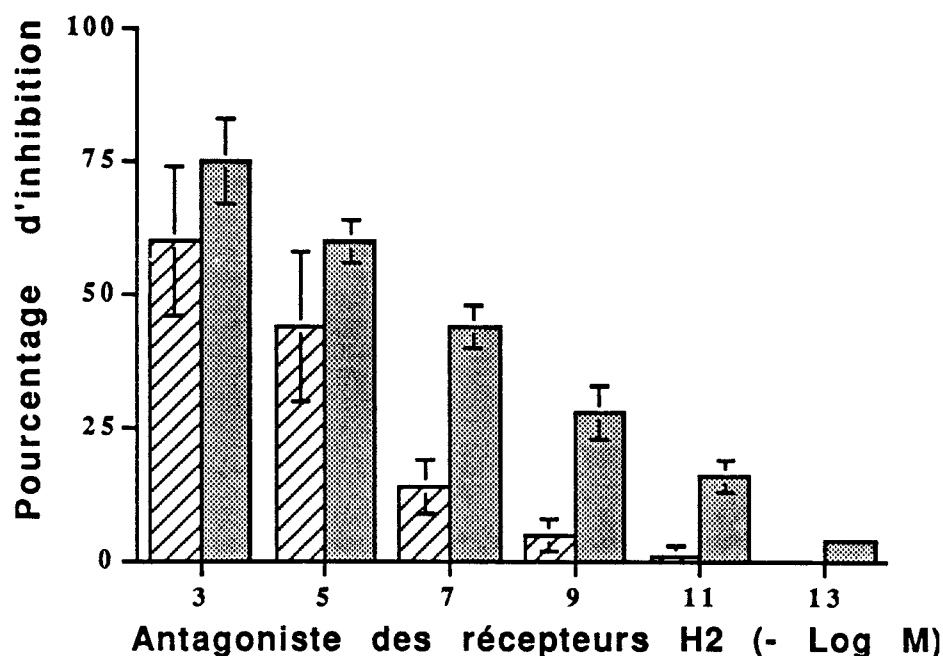


Fig. 12B : Inhibition par un antagoniste des récepteurs de type H2 des productions d'IL-6 (hachurés) et d'IL-8 (grisés) induites par l'histamine. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition de la production de cytokines.

La production de cytokine induite par l'histamine est inhibée préférentiellement par les antagonistes des récepteurs de type 1 plutôt que par les antagonistes des récepteurs de type 2.

4) *Potentialisation par le TNF α de la production de cytokines induite par l'histamine :*

Le TNF α existe préformé dans les granules mastocytaires. Lors d'une activation, il est libéré dans le milieu extracellulaire de façon pratiquement contemporaine de l'histamine.

La production d'IL-6 et d'IL-8 a été mesurée à 6 h sous une stimulation par une dose activatrice mais faible de TNF α (50 U/ml) et des doses croissantes d'histamine (de 10^{-7} M à 10^{-3} M). Ces expériences ont été menées 8 fois.

Les résultats ont montré que :

- le TNF α , conformément aux données de la littérature, induit la production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale (respectivement 48,5

± 5 comparées à $15 \pm 2,7$ UI/ml en base; 10 ± 1 comparés à $3 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ en base),

- le $\text{TNF}\alpha$ potentialise l'effet de l'histamine sur les productions d'IL-6 et d'IL-8. Ces productions sont significativement plus élevées à 10^{-6} M en présence de $\text{TNF}\alpha$, alors qu'elles ne le sont qu'à 10^{-5} M en histamine seule :

pour l'IL-6 : $62,2 \pm 4,4$ U/ml en présence de 10^{-6} M d'histamine + $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml comparées à 20 ± 3 U/ml en présence d'histamine seule (cf Fig. 13A),

pour l'IL-8 : $13 \pm 1,5$ $\mu\text{g/ml}$ en présence de 10^{-6} M d'histamine + $\text{TNF}\alpha$ 50 U/ml comparés à $2,8 \pm 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ de 10^{-6} M d'histamine seule (cf Fig. 13B)

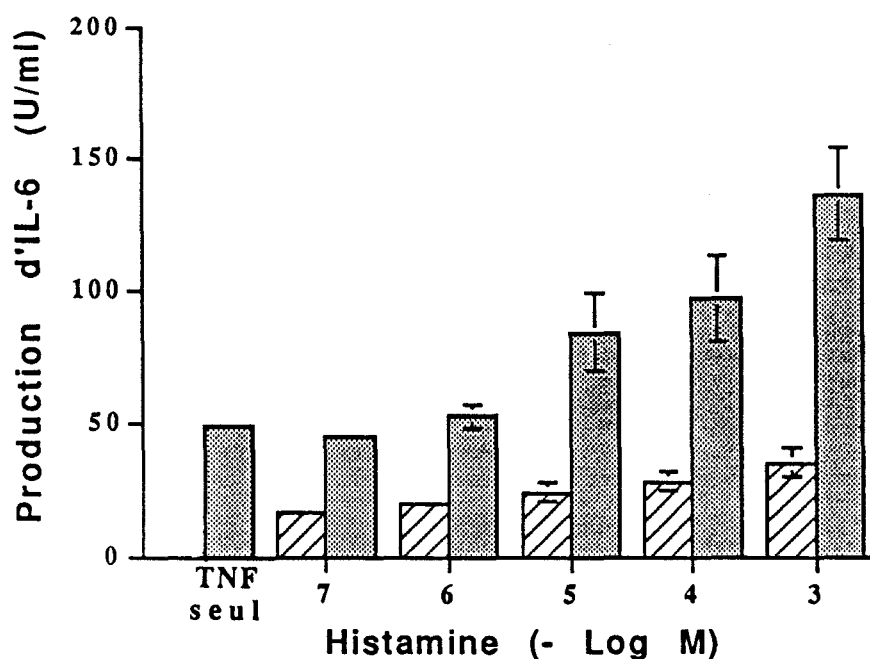


Fig. 13A : Potentialisation par le $\text{TNF}\alpha$ (50 U/ml) (grisés) de la production d'IL-6 induite par l'histamine, comparativement à la production induite par l'histamine seule (hachurés). Les résultats sont exprimés en U/ml \pm SEM

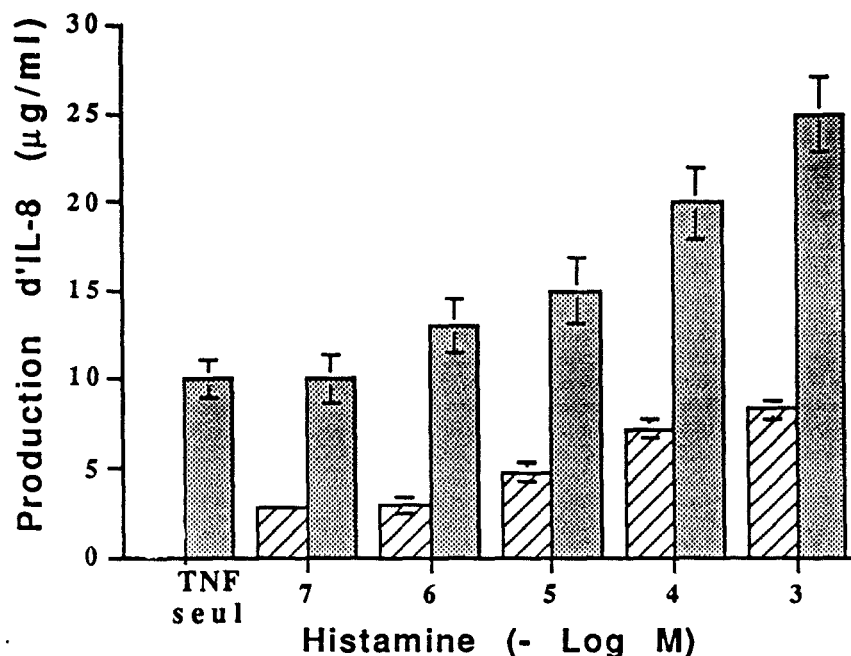


Fig. 13B : Potentialisation par le TNF α (50 U/ml) (grisés) de la production d'IL-8 induite par l'histamine, comparativement à la production induite par l'histamine seule (hachurés). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml} \pm \text{SEM}$.

CONCLUSION.

L'histamine induit la production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale. Cette production est :

- fonction de la dose d'histamine (efficace de 10^{-5} à 10^{-3} M),
- croit en fonction du temps (maximale au temps le plus long retenu pour l'étude qui est de 24 h),
- est inhibée plus efficacement par les antagonistes des récepteurs pour l'histamine de type II que les antagonistes de type I,
- est potentialisée par le TNF α qui est un médiateur mastocytaire produit en même temps que l'histamine.

Ces travaux ont été soumis pour publication dans les revues *European Journal of Immunology* (Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells, Delneste *et al.*) et *Blood* (Histamine induces IL-8 production by human endothelial cells, Jeannin, Delneste *et al.*)

C/ Etude sur les coopérations cellulaires établies entre le lymphocyte T et la cellule endothéliale. Résultats

Le lymphocyte T apparait comme une cellule essentielle dans la régulation de la réaction inflammatoire qui peut accompagner la réaction allergique (et des pathologies à composante inflammatoire en général). Les lymphocytes T infiltrant les tissus produisent des cytokines activatrices des éosinophiles (IL-3, IL-5 et GM-CSF) (Kay *et al.*, 1991) mais également d'autres lymphokines qui ne sont pas classées parmi les lymphokines inflammatoires comme l'IL-2 et l'IFN γ (Gagnon *et al.*, 1993).

Puisque les lymphocytes T infiltrant les tissus ne sont pas accessibles à l'expérimentation ou en trop petit nombre, les études portant sur ces cellules ont été réalisées à partir des cellules périphériques. De nombreux travaux ont ainsi porté sur la caractérisation de clones lymphocytaires T spécifiques d'allergène, et leur profil de sécrétion des lymphokines après activation par l'allergène (Parronchi *et al.*, 1992).

Cependant, ces clones ne représentent qu'une fraction de la population lymphocytaire T spécifique d'allergène, alors qu'*in vivo* l'ensemble de ces lymphocytes T sont potentiellement activables par l'allergène.

L'activation spécifique des cellules présentatrices d'antigène (monocytes et lymphocytes B) apparait nécessaire pour analyser la réponse lymphocytaire T totale. Cependant, l'introduction de ces cellules présentatrices d'antigène (et surtout des monocytes) dans le système d'activation conduit à la production de monokines (comme le TNF α) qui vont interférer avec les effets des lymphokines. De plus, les endotoxines contenues dans les allergènes induisent une production non spécifique mais très significative de cytokines par les cellules présentatrices d'antigène et les cellules endothéliales.

Un artifice technique permettant la présentation d'antigène aux lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigène, sans introduire de production de monokine, a permis de surmonter cette difficulté. Après une étape de culture avec ou sans allergène, les cellules présentatrices d'antigène sont fixées par le paraformaldéhyde (voir détails dans l'annexe matériel et méthodes), cette fixation les rendant inactifs en terme de

production de monokines (Kurt-Jones *et al.*, 1985). Par contre, l'antigène est présenté par les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, les monokines de surface (IL-1 et TNF α) apportant le second signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T.

Notre étude a porté sur une population de 30 sujets allergiques (sélection basée sur des données biologiques (IgE spécifiques : 28 ± 25 unités RAST) et une histoire clinique caractéristique). 27 patients étaient sensibles à l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Dpt*) et présentaient un asthme et/ou une rhinite, 13 étaient également sensibles aux pollens de graminées. 3 patients présentaient une sensibilité restreinte aux pollens de graminées.

Les cellules endothéliales ont été activées avec des surnageants de culture de lymphocytes cultivés en présence de cellules présentatrices d'antigène non activées (définis comme des surnageants de culture de lymphocytes T non activés) ou de cellules présentatrices d'antigène activées par un allergène (définis comme des surnageants de culture de lymphocytes T activés).

La modulation d'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, et E-sélectine) ainsi que la production d'IL-6, ont été les marqueurs d'activation mesurés.

1) *Les lymphocytes T d'allergiques stimulés par l'allergène relevant induisent l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales.*

Une étude préliminaire a été menée afin de connaître la meilleure cinétique de production de lymphokines par les lymphocytes T capables d'induire une activation de la cellule endothéliale (le marqueur étant l'expression de VCAM-1). Cette étude a porté sur les lymphocytes T de 5 patients allergiques à l'acarien *Dpt*, stimulés ou non par cet allergène. Les résultats ont montré que l'expression de VCAM-1 était maximale avec des surnageants de culture de lymphocytes T collectés à 48 h (DO de $0,305 \pm 0,06$) ou 72 h (DO de $0,472 \pm 0,03$) comparativement à des surnageants collectés à 24 h (DO de $0,201 \pm 0,04$) (cf Fig. 14).

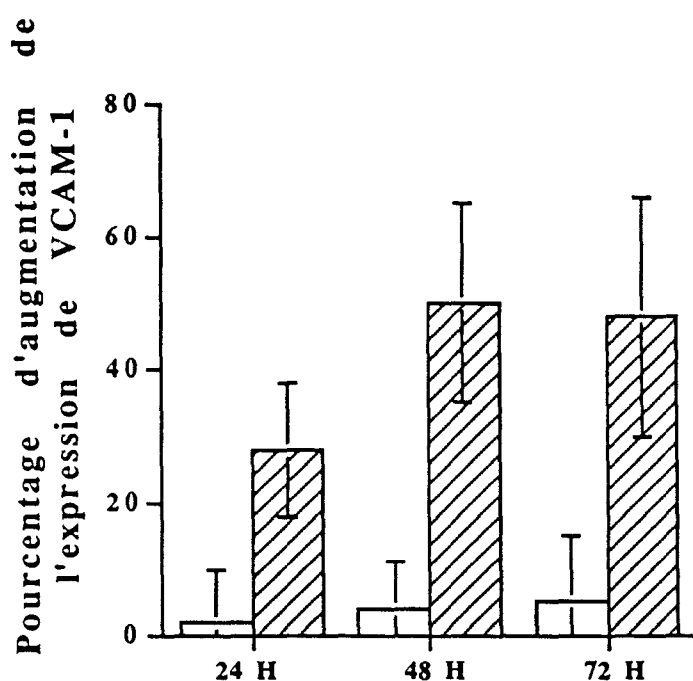


Fig. 14 : Cinétique de production de lymphokines par les lymphocytes T de sujets allergiques stimulés par l'allergène relevant induisant une augmentation de l'expression de VCAM-1. Les résultats sont présentés en pourcentages d'augmentation de l'expression de VCAM-1 induite par les lymphocytes T de sujets allergiques activés par l'allergène relevant comparativement aux lymphocytes T non activés (colonne hachurée). Les colonnes blanches représentent le pourcentage d'augmentation d'expression de VCAM-1 induite par les mêmes lymphocytes T activés par un allergène non relevant par rapport aux lymphocytes T non activés.

Puisqu'il donne la meilleure différence d'induction de l'expression de VCAM-1 entre les surnageants de lymphocytes T activés par l'allergène et non activés, le temps 48 h a été retenu pour l'ensemble de l'étude.

Les résultats d'expression des molécules d'adhésion induite par les lymphocytes T, activés ou non, sont présentés dans le tableau 3. Les valeurs de densité optique obtenues pour les cellules endothéliales non activées sont de $0,307 \pm 0,087$; $0,096 \pm 0,05$ et $0,085 \pm 0,026$ pour respectivement ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1.

En tant que contrôles positifs, le $\text{TNF}\alpha$ (DO de $0,204 \pm 0,04$, correspondant à 140 % d'augmentation) et l'IL-4 (DO de $0,139 \pm 0,04$,

correspondant à 48 % d'augmentation) induisent une expression de VCAM-1 par la cellule endothéliale, dans chaque expérience et pour chaque lot de cellule endothéliale utilisé. L'IFN γ n'induit pas d'expression de VCAM-1. Les surnageants des cellules présentatrices d'antigène n'induisent jamais d'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales.

Surnageants de lymphocytes T de :					
	Sujets allergiques			Sujets témoins	
	Non activés	Activés par l'allergène relevant	Activés par l'allergène non relevant	Non activés	Activés par l'antigène
ICAM-1	0,465 \pm 0,09	0,504 \pm 0,09	0,487 \pm 0,09	0,672 \pm 0,03	0,692 \pm 0,03
E-sélectine	0,239 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,244 \pm 0,02	0,261 \pm 0,04	0,280 \pm 0,05
VCAM-1	0,212 \pm ,03	0,322 \pm 0,07 *	0,227 \pm 0,09	0,213 \pm 0,103	0,203 \pm 0,10

Tableau 4 : Expressions de ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 par la cellule endothéliale, induites par les surnageants de lymphocytes T de sujets allergiques et de sujets témoins, activés ou non par l'allergène. Les résultats sont exprimés en valeur de densité optique \pm SEM (* $p < 0,05$).

En résumé, seuls les lymphocytes T de sujets allergiques, spécifiquement activés par l'allergène relevant (vis-à-vis duquel ils sont sensibilisés), induisent l'expression de VCAM-1 sur la cellule endothéliale (cf * dans tableau 4).

2) *Les lymphocytes T d'allergiques stimulés par l'allergène relevant induisent la production d'IL-6 par les cellules endothéliales.*

L'IL-6 a été dosée dans les surnageants de culture des cellules endothéliales activées par les lymphocytes T activés et non activés (collectés à 6 heures). Cette étude a porté sur 15 patients allergiques et sur 7 sujets témoins.

L'IL-6 n'est détectable ni dans les surnageants de culture des cellules présentatrices d'antigène, ni dans les surnageants des lymphocytes T, quelques soient les conditions d'activation (résultats non présentés).

Comme témoins positifs de la production d'IL-6 par la cellule endothéliale, le TNF α et l'IFN γ induisent une augmentation de la synthèse d'IL-6 dans chaque manipulation et pour chaque lot de cellule de respectivement 86 ± 12 et 65 ± 13 % d'augmentation. Par contre, l'IL-4 n'induit pas de production d'IL-6 détectable à 6 heures.

Les résultats de production d'IL-6 par les cellules endothéliales activées par les surnageants de culture des lymphocytes activés et non activés sont présentés dans le tableau 5.

Surnageants de culture de lymphocytes T de :				
Sujets allergiques			Sujets témoins	
Non activés	Activés par l'allergène relevant	Activés par un allergène non relevant	Non activés	Activés par un allergène
410 \pm 117	707 \pm 122	459 \pm 168	742 \pm 66	817 \pm 80

Tableau 5 : Production d'IL-6 par les cellules endothéliales activées par les surnageants de culture de lymphocytes T activés et non activés. Les résultats sont exprimés en U/ml.

Chez les sujets allergiques, bien que les niveaux de production d'IL-6 par la cellule endothéliale soient plus élevés lorsqu'elles sont activées par les lymphocytes stimulés par l'allergène relevant, comparativement aux lymphocytes T non stimulés ou stimulés par un allergène non relevant, les différences ne sont pas significatives.

Par contre, si les résultats sont exprimés en pourcentages d'augmentation de production d'IL-6 (définis pour chaque patient comme l'augmentation entre la production d'IL-6 induite par les lymphocytes T activés comparativement aux lymphocytes T non activés), il apparait que seuls les lymphocytes T de sujets allergiques et spécifiquement activés par l'allergène vis-à-vis duquel ils sont sensibles, induisent une augmentation de production d'IL-6 (cf Fig. 16). Cette augmentation n'est pas retrouvée

avec les lymphocytes activés par un allergène non relevant. Pour la population témoin, les lymphocytes T stimulés ou non par l'antigène induisent des productions d'IL-6 équivalentes.

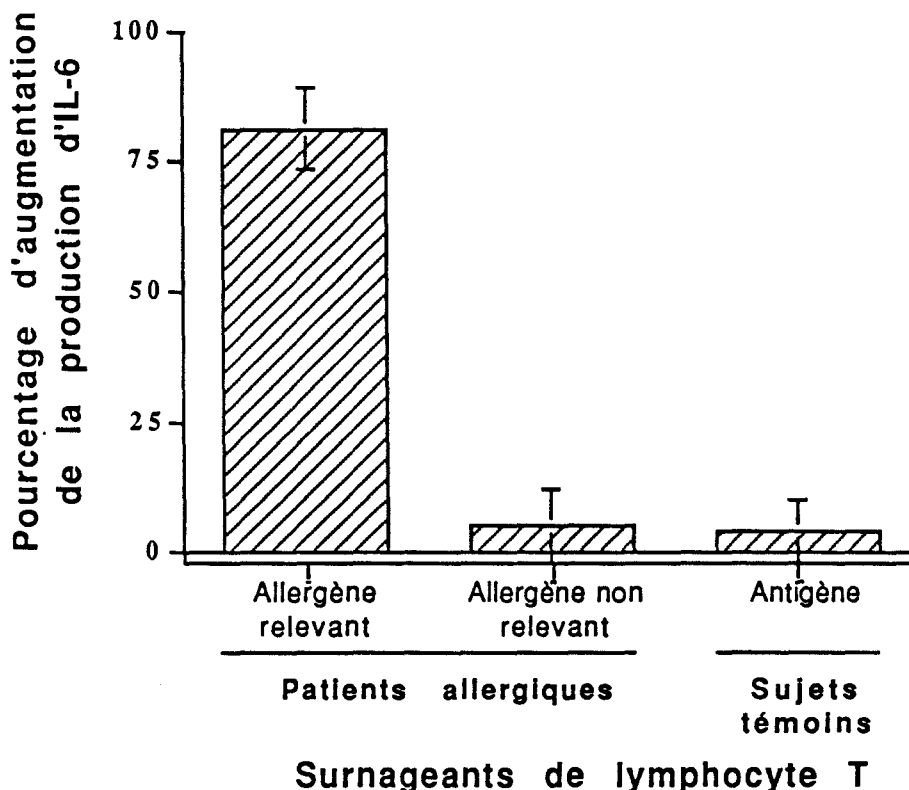


Fig. 16 : Augmentation de la production d'IL-6 induite par les surnageants de lymphocytes activés, comparativement aux lymphocytes non activés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation \pm SEM.

En résumé, seuls les lymphocytes T de sujets allergiques, spécifiquement activés par l'allergène relevant (vis-à-vis duquel ils sont sensibilisés), induisent la production d'IL-6 par la cellule endothéliale.

3) *L'IL-4 et l'IFN γ apparaissent comme les principaux médiateurs lymphocytaires T responsables de l'induction d'expression de VCAM-1 et de production d'IL-6.*

Afin de définir exactement la nature des médiateurs lymphocytaires responsables de l'activation des cellules endothéliales, une sélection de 5 surnageants de culture de lymphocytes T de sujets allergiques stimulés par l'allergène relevant ont été incubés avec des anticorps neutralisants dirigés contre le TNF α , l'IL-4 et l'IFN γ .

L'efficacité des anticorps a été vérifiée en inhibant l'activation des cellules endothéliales par des doses optimales des cytokines en présence de l'anticorps neutralisant correspondant.

L'anticorps neutralisant anti-TNF α n'a été efficace sur aucun des paramètres mesurés, confirmant donc l'absence de TNF α dans les surnageants de culture de lymphocytes T.

L'expression de VCAM-1 est inhibée dans les 5 cas par l'anticorps anti-IL-4 (moyenne de 85 %) et dans 2 cas par l'anticorps anti-IFN γ (moyenne de 58 %). La production d'IL-6 n'est jamais inhibée par l'anticorps anti-IL-4, mais dans tous les cas par l'anticorps anti-IFN γ (moyenne de 95 % d'inhibition) (cf Fig. 17).

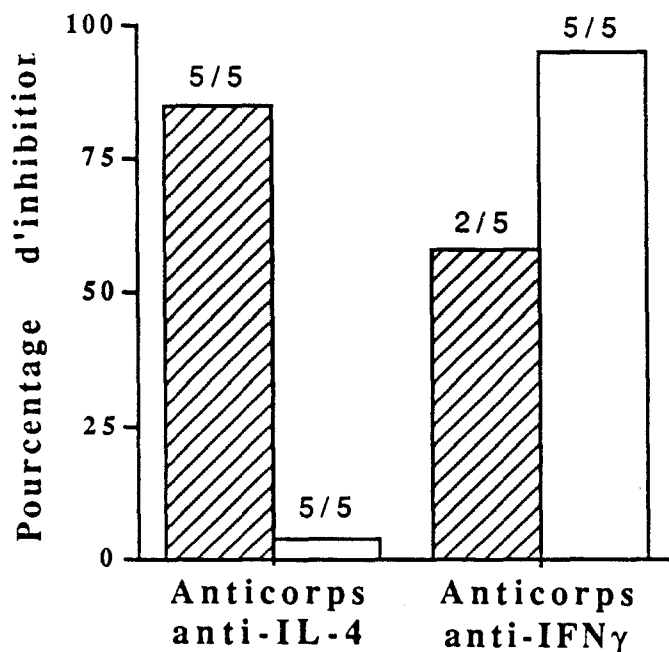


Fig. 17 : Inhibition de l'expression par les cellules endothéliales de VCAM-1 (barres hachurées) et de la production d'IL-6 (barres claires) induites par 5 surnageants de lymphocytes de sujets allergiques stimulés par l'allergène relevant.

L'IL-4 et l'IFN γ apparaissant comme les deux cytokines essentielles de l'activation de la cellule endothéliale par les lymphocytes T de sujets allergiques activés par l'allergène relevant, leur dosage a été effectué dans l'ensemble des surnageants de culture des lymphocytes T. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

	Surnageants de culture de lymphocytes T de :				
	Patients allergiques			Sujets témoins	
	Non activés	Activés par l'allergène relevant	Activés par un allergène non relevant	Non activés	Activés par un allergène
IL-4 pg/ml	8,9 \pm 1,1	38,9 \pm 2,1 *	10,2 \pm 1,5	9,9 \pm 3,2	5,8 \pm 2,8
IFN γ pg/ml	117 \pm 31	178 \pm 36	161 \pm 36	133 \pm 41	187 \pm 46

Tableau 6 : Quantification de l'IL-4 et de l'IFN γ dans les surnageants de culture de lymphocytes T. Les résultats sont exprimés en pg/ml, moyenne \pm SEM. (* p<0,05).

La production d'IL-4 par les lymphocytes T de sujets allergiques stimulés par l'allergène relevant est plus élevée que celle des lymphocytes non stimulés ou stimulés par un allergène non relevant. La production par les lymphocytes de sujets témoins (stimulés et non stimulés) est équivalente à celle des lymphocytes de sujets allergiques stimulés par l'allergène non relevant.

Par contre, bien que les différences ne soient pas significatives, les lymphocytes d'allergiques et de témoins stimulés produisent plus d'IFN γ que les cellules non stimulées.

CONCLUSION.

De notre étude, il ressort que :

- les lymphocytes T de sujets allergiques, spécifiquement activés par l'allergène vis-à-vis duquel ils sont sensibles, induisent une augmentation d'expression de VCAM-1 et d'IL-6 par la cellule endothéliale,

- les lymphocytes T de sujets allergiques activés par un allergène non relevant, comme les lymphocytes T de sujets sains activés par un allergène, n'induisent pas d'expression de VCAM-1 et d'IL-6 par la cellule endothéliale,

- l'IL-4 et l'IFN γ apparaissent comme les principaux médiateurs induisant respectivement l'augmentation de l'expression de VCAM-1 et de la production d'IL-6,

- malgré le fait que les lymphocytes T témoins activés par un allergène produisent de l'IFN γ , ils n'activent pas les cellules endothéliales.

Ce travail a été soumis pour publication dans la revue *Journal of Immunology* (Allergen-stimulated T lymphocytes from allergic patients induce VCAM-1 expression and Il-6 production by human endothelial cells, Delneste *et al.*).

IV/ Discussion

L'étude présentée dans ce mémoire a porté sur le rôle et la participation de la cellule endothéliale dans la physiopathologie de l'asthme bronchique :

- dans l'asthme non allergique associé à une intolérance vis-à-vis de l'aspirine et des antiinflammatoires non stéroïdiens, nos résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme autoimmun dirigé contre la cellule endothéliale, qui pourrait être responsable en partie des manifestations cliniques d'asthme grave observées chez ces patients. La mise au point d'un protocole technique d'obtention de lignées lymphocytaires B productrices d'anticorps anti-cellules endothéliales par coculture avec des cellules endothéliales est également présenté.

- Dans l'asthme allergique, nos travaux ont consisté à appréhender les mécanismes de régulation du développement de la réaction inflammatoire (parfois associée à la réaction allergique) établis autour de la cellule endothéliale. La première approche a consisté en l'analyse des conséquences de l'activation de la cellule endothéliale par l'histamine. Ce médiateur est produit par le mastocyte, cellule longtemps associée au développement de la réaction précoce. Le deuxième axe a été l'analyse des coopérations établies entre la cellule endothéliale et le lymphocyte T, qui apparaît comme une cellule pivot dans le développement de la réaction inflammatoire.

La discussion successive de ces deux grands thèmes s'attachera à analyser les aspects méthodologiques de notre approche, ainsi que les aspects théoriques.

A/ Mise en évidence d'une réactivité de type autoimmun dans les asthmes non allergiques :

L'existence d'un désordre immunologique de type autoimmun caractérisé par la présence d'anticorps et d'une réponse lymphocytaire T dirigés contre une protéine de 55 kD exprimée par les cellules endothéliales

et les plaquettes, nous a permis de définir parmi les patients asthmatiques un sous groupe d'asthme caractérisé par :

- un asthme grave, non allergique, souvent dépendant d'une corticothérapie,

- un asthme associé à une intolérance vis-à-vis de l'aspirine et des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

L'existence d'anticorps anti-cellules endothéliales a déjà été décrite, essentiellement dans des cas de maladies de système ou autoimmunes comme le syndrome de Kawasaki (Leung *et al.*, 1986a et 1986b), le lupus érythémateux diffus (Cines *et al.*, 1984) ou la polyarthrite rhumatoïde (Rosenbaum *et al.*, 1988; Heurkens *et al.*, 1989). Cependant, nous ne savons pas si la présence des anticorps anti-55 kD constitue la cause ou la conséquence d'un désordre immunologique. Ils constituent le signe d'un désordre immunologique de type autoimmunitaire, et l'implication directe de tels autoanticorps dans la pathologie n'a jamais été clairement établie. Cependant, il est à noter que ces pathologies, où se retrouvent de tels anticorps, sont toutes caractérisées par une réaction inflammatoire locale ou diffuse, ce qui suggère la participation active de l'endothélium. La présence de signes d'inflammation chronique chez les patients atteints d'asthme grave confortent cette observation. Par contre les anticorps anti-plaquettaires n'ont été principalement retrouvés que dans des pathologies hématologiques sévères.

La présence des anticorps anti-55 kD anti-endothéliaux et anti-plaquettaires n'est pas toujours associée à une intolérance à l'aspirine, et inversement. Ces différences de réponse pourraient être expliquées par le fait que les anticorps seraient un marqueur précoce de la maladie, l'intolérance vis-à-vis de l'aspirine et des antiinflammatoires non stéroïdiens constituant un caractère d'évolutivité vers la sévérité. Dans le deuxième cas, ce serait l'apparition des anticorps anti-55 kD qui constituerait un critère d'évolution vers la sévérité. Dans l'état actuel de nos connaissances, aucune des deux hypothèses ne peut être vérifiée.

Comme nous avons pu le préciser précédemment, l'implication des anticorps dans la physiopathologie de la maladie reste du domaine de l'hypothèse. Cependant, la suspicion selon laquelle un facteur circulant, en l'occurrence des autoanticorps anti-55 kD ou des complexes immuns (anticorps anti-55 kD/antigène de 55 kD) puisse être à l'origine des

manifestations cliniques observées dans certaines formes graves d'asthme non allergique, provient des résultats d'une étude clinique menée à l'hôpital Calmette par le Dr. Lassalle, en collaboration avec le Pr. Tonnel et le Pr. Wallaert. Le protocole consistait en des plasmaphérèses, relayées par un traitement immunosuppresseur. Cette étude a porté sur un groupe de 12 patients atteints d'asthme grave, de sujets allergiques (n=3) ou non (n=9), présentant (n=5) ou non (n=7) des anticorps anti-55 kD. L'état clinique du patient était évalué par une mesure quotidienne de la fonction respiratoire (mesure du débit de pointe) et de l'efficacité du traitement (par une codification des symptômes réalisée par le patient lui-même).

Deux groupes ont été définis en fonction des améliorations observées :

- un groupe de patients non répondeurs (n=6), dans lequel se retrouvent les trois sujets allergiques,

- un groupe de patients répondeurs (n=6), pour lequel le traitement a entraîné une amélioration clinique nette (diminution de la consommation médicamenteuse (β 2 mimétiques), augmentation du débit de pointe matinal).

Dans ce deuxième groupe, 4 patients présentaient des anticorps anti-55 kD. Ces autoanticorps n'étaient plus détectables après les séances de plasmaphérèse, disparition associée à l'amélioration clinique du patient.

Par contre, une aggravation de l'état clinique était associée à une réapparition des anticorps anti-cellules endothéliales et une éosinophilie périphérique importante (Lassalle *et al.*, 1991).

La notion d'un désordre immunologique caractérisé par les anticorps anti-55 kD suggérait l'existence d'une réponse lymphocytaire T vis-à-vis de la même structure.

L'existence d'une réactivité lymphocytaire T dirigée contre une structure endothéliale de 55 kD a été retrouvée chez certains patients porteurs d'anticorps anti-55 kD. L'obtention de cette réponse a nécessité la préincubation des cellules T avec des doses suboptimales de concanavaleine A pendant 24 heures avant leur stimulation antigénique. Cette approche était justifiée par les éléments suivants :

- Cohen *et al.* (1982) ont émis l'hypothèse selon laquelle une préincubation des cellules sanguines périphériques de sujets présentant une maladie autoimmune (sclérose en plaques) avec des doses

suboptimales de concanavaline A permet la sélection *in vitro* des lymphocytes T préactivés *in vivo* (en particulier en prolongeant leur durée de vie),

- la plupart des patients sont soumis à une corticothérapie *per os*, afin de moduler la réponse inflammatoire, l'emploi de concanavaline A permettant de lever cette inhibition,

- il n'a jamais été observé de prolifération lymphocytaire T vis-à-vis de l'antigène de 55 kD avec des cellules non traitées.

La plupart des patients possédant des anticorps anti-55 kD présentaient des lymphocytes T réactifs vis-à-vis d'un antigène de 55 kD, suggérant donc une relation entre la réactivité lymphocytaire B et la réactivité lymphocytaire T spécifique de l'antigène.

L'absence chez certains patients possédant des anticorps anti-55 d'une réactivité proliférative anti-55 kD peut s'expliquer de différentes manières :

- la faible antigénicité de certaines suspensions particulières,
- le nombre restreint de lymphocytes T réactifs dans le sang périphérique,
- l'effet prolongé de doses élevées de corticostéroïdes.

De même, des index de prolifération positifs ont été obtenus chez trois patients n'ayant pas d'anticorps anti-55 kD. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette observation :

- une faible production d'anticorps difficilement détectables par notre technique,
- une haute réactivité des lymphocytes T provenant de patients au début ou au cours d'une poussée évolutive de la maladie.

L'activation lymphocytaire T dans le cadre de l'asthme non allergique est une notion largement acceptée (Corrigan *et al.*, 1988). Dans le laboratoire, il a pu être mis en évidence que les taux plasmatiques de récepteur soluble pour l'interleukine 2 (CD25 soluble, qui constitue un marqueur d'activation des lymphocytes T) sont corrélés à une éosinophilie sanguine et inversement proportionnels à la mesure de la fonction respiratoire (Lassalle *et al.*, 1992a). Ces éléments sont à rapprocher des observations faites dans le cadre de l'étude de la réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de l'antigène de 55 kD et d'une éosinophilie circulante dans les cas de poussées évolutives de la maladie. En effet, il a été montré, pour un patient, l'existence d'une relation étroite entre son état clinique et la

réactivité lymphocytaire T vis-à-vis de l'antigène de 55 kD. De plus, la réactivité lymphocytaire pour chaque patient est corrélée avec les mesures de la fonction respiratoire effectuées le jour même du prélèvement sanguin (qu'il y ait ou non présence d'anticorps anti-55 kD dans les sérums).

L'expression de l'antigène de 55 kD apparaissant constante, l'agression des cellules exprimant cet antigène serait à la base du développement et de la chronicité de l'asthme grave. L'association d'une intolérance à l'aspirine avec la sécrétion de l'antigène de 55 kD par les plaquettes de ces patients activées par l'aspirine, suggère qu'une relation étroite doit exister entre ces deux observations, bien qu'aucune argumentation ne puisse être formulée quant à sa signification.

L'ensemble de ces données suggère donc qu'il existerait une association entre un processus autoimmun dirigé essentiellement contre une structure endothéliale, et un sous groupe d'asthme grave associé à une intolérance à l'aspirine. Cependant, bien que la mise en évidence d'un désordre immunologique de type autoimmun apparaisse séduisante, de nombreux travaux restent nécessaires afin d'apprécier le rôle éventuel de ce processus dans la physiopathologie de cette forme d'asthme.

L'existence d'anticorps anti-cellule endothéliale a été décrite dans de nombreuses pathologies caractérisées essentiellement par une réaction inflammatoire chronique. Cependant, à notre connaissance et à l'exception de l'antigène de 55 kD dans les asthmes graves, aucun antigène, spécifique de cellule endothéliale, cible d'autoanticorps, n'a été caractérisé.

Afin de sélectionner des lymphocytes B producteurs d'anticorps anti-cellules endothéliales, nous avons élaboré un protocole technique basé sur des cocultures de lymphocytes B et de cellules endothéliales.

Le principe de cette technique était le suivant : les lymphocytes B producteurs d'anticorps anti-cellules endothéliales seraient capables, par leurs immunoglobulines de surface, d'adhérer aux cellules endothéliales en culture (par interaction de l'antigène avec l'anticorps). Les cellules B adhérentes sont ensuite clonées par dilution limite en coculture avec des cellules endothéliales. La production d'anticorps anti-cellules endothéliales est détectée soit par une technique ELISA sur cellules endothéliales

préalablement fixées, soit par immunoempreinte sur des extraits de cellules endothéliales. Ce travail a donné lieu à publication dans la revue *Cellular Immunology* (Delneste *et al.*, 1993).

Notre étude a consisté en un clonage par dilution limite sur des cellules endothéliales en culture de lymphocytes B d'un patient présentant un syndrome de Churg et Strauss (1951). Les lymphocytes B avaient été transformés par le virus d'Epstein Barr. Ce syndrome est caractérisé par un asthme grave associé à une vascularite. Nous avons émis l'hypothèse que dans cette pathologie, la fréquence de lymphocytes B producteurs d'anticorps anti-cellules endothéliales devait être élevée.

Le clonage a été réalisé avec la lignée cellulaire EC-pSV1 car :

- ces cellules sont maintenues en culture à long terme,
- elles produisent spontanément de grandes quantités d'IL-6, qui est un puissant facteur de prolifération lymphocytaire B (Tosato *et al.*, 1988a et 1988b).

Par contre, la détection des anticorps anti-cellules endothéliales produits par les lignées lymphocytaires B clonées par adhérence ont été réalisés sur des antigènes provenant de primo-cultures de cellules endothéliales. En effet, il était essentiel d'éviter la sélection d'antigènes non spécifiques (comme les antigènes de groupe sanguin).

Nos résultats ont montré que :

- seuls les lymphocytes B adhérents aux cellules endothéliales produisent des anticorps anti-cellules endothéliales (essentiellement d'isotype M),
- l'adhérence des lymphocytes B sélectionnés par coculture avec des cellules endothéliales est spécifique de cellules endothéliales,
- la prolifération et la production des anticorps par les lignées cellulaires B est dépendante de la coculture avec les cellules endothéliales,
- une lignée lymphocytaire B produit des anticorps reconnaissant par immunoempreinte une structure de 192 kD exprimée par les cellules endothéliales.

En conclusion, cette méthode, sur la base d'une adhérence cellulaire, permet de sélectionner des lymphocytes B producteurs d'anticorps anti-cellules endothéliales. Cette technique peut être adaptée au

clonage de lymphocytes B produisant des anticorps dirigés contre d'autres types cellulaires.

Cependant, puisque la structure de 192 kD n'est pas définie et que son implication dans la pathologie n'est pas démontrée, nous n'approfondirons pas ce travail dans cette discussion.

B/ Etude des coopérations établies avec la cellule endothéliale dans la réaction inflammatoire :

Le deuxième volet de notre étude a porté sur les coopérations établies entre les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire associée aux réactions allergiques. Notre intérêt s'est porté sur :

- l'histamine : par l'analyse d'une potentielle activation de la cellule endothéliale par ce médiateur mastocytaire largement impliqué dans l'initiation de la réaction précoce (revu par White, 1990; revu par Naclerio, 1990, revu par Cavanah et Casale, 1993) par l'évaluation de la modulation de paramètres endothéliaux associés à une réaction retardée,

- le lymphocyte T puisque les résultats obtenus au cours de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* suggèrent qu'il joue un rôle essentiel dans la régulation du développement de la réaction inflammatoire. Cependant, ces études se sont limitées à l'emploi de cytokines et/ou de surnageants de clones lymphocytaires. Notre approche a consisté à évaluer l'activation de la cellule endothéliale lors d'une activation par l'allergène des lymphocytes T périphériques de sujets allergiques.

Ce travail a permis de montrer que :

- l'histamine induit la production d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale,

- l'activation des lymphocytes T d'allergiques par les cellules présentatrices d'antigène présentant l'allergène, induit l'augmentation de l'expression de VCAM-1 et la production d'IL-6 par la cellule endothéliale.

Ces deux points seront successivement discutés.

1) *Mise en évidence d'une production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales activées par l'histamine :*

La production d'IL-6 et d'IL-8 est dépendante de la dose d'histamine (efficace de 10^{-6} M à 10^{-3} M), détectable dès 4h d'activation et maximale à 24h. Ces productions sont inhibées par des antagonistes spécifiques des récepteurs de type 1 et 2. Le $\text{TNF}\alpha$ potentialise les effets de l'histamine sur la production des deux cytokines.

La dose la plus faible d'histamine induisant une production significative d'IL-6 et d'IL-8 est de 10^{-5} M. En combinaison avec le $\text{TNF}\alpha$ cette dose n'est plus que de 10^{-6} M. Les quantités d'histamine détectées dans les sérums ou dans les liquides de lavage bronchoalvéolaire de sujets allergiques, lors d'un test de provocation allergénique auquel ils sont sensibles, sont de l'ordre de 10^{-7} M à 10^{-8} M (Casale *et al.*, 1987). Sachant que l'histamine diffuse rapidement dans les tissus et qu'elle est rapidement métabolisée, sa concentration locale doit être plus élevée. Les doses utilisées dans cette étude pour activer les cellules endothéliales apparaissent donc physiologiques.

La production des cytokines débute dès la quatrième heure d'activation par l'histamine, croît de façon constante en fonction du temps pour atteindre son maximum au temps le plus long retenu pour cette étude qui est de 24h. Le début de la production des cytokines, induite par l'histamine, est contemporain de l'initiation de la réaction inflammatoire qui intervient 6 à 8h après le contact avec l'allergène (revu par Falus et Meretey, 1992). Compte tenu des propriétés biologiques de ces deux cytokines (qui seront détaillées dans cette discussion), cette information apparaît essentielle si l'on replace le rôle de la cellule endothéliale en tant que partenaire actif dans l'initiation de cette réaction inflammatoire et non pas comme une simple cellule régulant les flux cellulaires entre le sang et les tissus.

Les médiateurs induisant la production d'IL-6 (comme le $\text{TNF}\alpha$, l'IL-1, le LPS ou, comme nous le montrons dans ce travail, l'histamine) induisent également, selon la même cinétique, la production d'IL-8. Les raisons d'une telle production concomitante ne sont pas connues. Cependant, il est à noter que les régions promotrices des gènes codant pour

l'IL-6 et l'IL-8 (régions 5' hautement conservées) présentent quelques caractéristiques communes comme les sites potentiels de fixation pour différents facteurs nucléaires de régulation de la transcription (la protéine AP-1 ou la séquence NF-kB). Cependant, la présence dans les régions promotrices de telles séquences relativement peu spécifiques de gène apparaissent comme des éléments nécessaires mais non suffisants pour expliquer la simultanéité de production d'IL-6 et d'IL-8.

La production des cytokines induite par l'histamine est inhibée plus efficacement par les antagonistes des récepteurs de type 2 que ceux de type 1. Ce résultat suggère que la voie d'activation de la cellule endothéliale par l'histamine induisant la synthèse de cytokines passe préférentiellement par les récepteurs de type H2. Toutefois, les doses d'antagonistes induisant une inhibition de 50 % de la production d'IL-8 sont plus faibles que celles induisant une inhibition identique de la production d'IL-6, surtout pour les récepteurs de type H2. Les raisons d'une telle différence sont relativement peu claires (citons néanmoins que l'antagoniste des récepteurs de type H2 est toxique pour les cellules 7TD1).

La production des cytokines est potentialisée par le TNF α . Tous les paramètres immunologiques connus exprimés par la cellule endothéliale sont modulés positivement par le TNF α (production de cytokines, modulation d'expression des molécules d'adhésion) (revu par Mantovani, 1992).

Le TNF α est un puissant facteur proinflammatoire de par ses nombreuses propriétés physiologiques. Parmi celles-ci, notons :

- une augmentation de la production de radicaux libres (évoqués dans les destructions épithéliales) par les macrophages alvéolaires,
- l'induction de l'infiltrat leucocytaire,
- l'induction de la prolifération des fibroblastes (observée dans la matrice sous-muqueuse bronchique chez les patients allergiques),
- l'augmentation de la production de PAF par les cellules endothéliales et les monocytes, ainsi que de leucotriènes par les granulocytes.

Le TNF α existe préformé dans les granules mastocytaires (Plaut *et al.*, 1989; Galli *et al.*, 1991). Sa libération lors d'une activation du mastocyte est quasiment contemporaine de celle de l'histamine, agissant donc dès l'initiation de la réaction précoce.

L'IL-6 est une cytokine aux effets pléiotropiques, produite par de nombreuses cellules comme les cellules épithéliales, les fibroblastes et les monocytes/macrophages. Ses principaux effets connus sont (Gauldi *et al.*, 1987; Heinrich *et al.*, 1990; revu par Kishimoto, 1986 et Le, 1992)

- l'induction de la prolifération et de la différenciation lymphocytaire B, ainsi que la potentialisation de la synthèse d'IgE dépendante de l'IL-4,
- la production des protéines de la phase aiguë par les cellules hépatiques (comme la protéine C réactive ou l'amyloïde A),
- l'induction de la vasoperméabilité,
- l'augmentation d'expression de la molécule CD23 à la surface des cellules inflammatoires,
- l'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales,
- la régulation de l'infiltrat des granulocytes, en induisant l'apoptose des neutrophiles (qui ne sont généralement pas retrouvés dans l'infiltrat leucocytaire observé dans le tissu bronchique au cours de l'asthme bronchique).

Par contre l'IL-6 n'induit aucun infiltrat leucocytaire et ne module pas l'expression des molécules d'adhésion.

Les deux dernières propriétés évoquées dans ce bref rappel des fonctions de l'IL-6 apparaissent importantes dans les mécanismes physiopathologiques de l'asthme, puisqu'elles permettent d'amplifier le processus de desquamation épithéliale observée dans l'asthme bronchique (revu par Dunnill, 1982). Celle-ci serait à l'origine de l'hyperréactivité bronchique non spécifique observée dans les asthmes (allergiques et non allergiques).

Cependant, bien que la production d'IL-6 apparaisse comme un facteur souvent associé à la réaction inflammatoire, aucun rôle précis, pro ou antiinflammatoire, n'est dévolu à cette cytokine.

L'IL-8, encore appelée la protéine chimioattractante et activatrice du neutrophile (NAP-1 pour neutrophil attractant/activator protein-1) est produite par de nombreux types cellulaires généralement identiques à ceux produisant de l'IL-6, comme les monocytes/macrophages, les cellules épithéliales, ainsi que les cellules endothéliales (Strieter *et al.*, 1989). La première fonction décrite de l'IL-8 est son pouvoir chimioattractant pour les neutrophiles (Baggiolini *et al.*, 1989). Plus récemment, cette activité a également été observée sur les lymphocytes

(Larsen *et al.*, 1989) et les basophiles (Kuna *et al.*, 1991; White *et al.*, 1989), ainsi que sur les éosinophiles préalablement stimulés par l'IL-3 ou le GM-CSF (Leonard *et al.*, 1990).

De récents travaux ont montré que les éosinophiles de sujets allergiques étaient activées dans le sang périphérique (comme les lymphocytes T). Ceci suggère donc que ces deux types cellulaires caractéristiques de l'infiltrat bronchique observé dans l'asthme, peuvent être attirés vers le site inflammatoire, entre-autre par l'IL-8 produite par les cellules résidentes. Quant aux basophiles, ils se différencient dans le tissu en mastocytes afin d'en renouveler le pool cellulaire.

En plus de ses propriétés chimioattractantes, l'IL-8 a également été montrée capable d'induire *in vitro* la migration transvasculaire des neutrophiles (Huber *et al.*, 1991). Cependant, ce résultat a été contesté par les expériences menées *in vivo* par Hechtman qui montraient qu'une injection d'IL-8 chez l'animal inhibait la migration transvasculaire des neutrophiles (Hechtman *et al.*, 1993). L'hypothèse proposée par ces auteurs était que seule la forme membranaire de l'IL-8 permettrait d'induire la migration transvasculaire, tandis que la forme soluble, chimioattractante, inhiberait cette migration. Cette dichotomie de fonction de l'IL-8, bien que séduisante, n'apparaît toutefois pas compatible avec les nombreux résultats obtenus *in vitro*. Ainsi, Smith *et al.* (1993) ont avancé une nouvelle hypothèse, montrant que l'activation par de fortes doses d'IL-8 provoque un état de désactivation des neutrophiles, comme cela avait été précédemment décrit avec le fMLP ou le C5a. Ceci empêcherait toute nouvelle activation des neutrophiles par ce même activateur. Dans le modèle proposé par Hechtman, l'injection d'IL-8 entraînerait une désactivation des neutrophiles, leur permettant d'être attirés dans le sang mais en empêchant leur migration transvasculaire, étape qui nécessite une activation des neutrophiles.

Ainsi, la confrontation de ces résultats tend à suggérer que l'IL-8 se comporte comme un facteur chimioattractant et initiateur de la migration transvasculaire des neutrophiles (revu par Rot, 1992). Cette propriété de migration n'a pas été montrée pour les autres types cellulaires, pour lesquels seule une propriété de chimiotactisme a été montrée (lymphocytes, basophiles et éosinophiles).

L'histamine apparait donc comme un médiateur intégral de la réaction inflammatoire, impliqué dans le développement de la phase précoce et de la phase tardive (Soderberg *et al.*, 1989)

2) *Mise en évidence d'une activation des cellules endothéliales par les lymphocytes T de sujets allergiques activés par l'allergène relevant :*

Le deuxième axe d'étude des coopérations cellulaires établies entre les leucocytes et les cellules endothéliales concerne l'activation du lymphocyte T par un allergène. Dans ce contexte, la plupart des études concernant l'activation des cellules endothéliales a été surtout réalisée par l'emploi de cytokines recombinantes ou par immunohistochimie (Charlesworth *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1991; Kyan-Aung *et al.*, 1991). Il nous est apparu intéressant de pouvoir analyser la capacité de lymphocytes T périphériques de sujets allergiques spécifiquement activés par un allergène à moduler le comportement des cellules endothéliales. Les deux paramètres mesurés de l'activation de la cellule endothéliale ont été la modulation d'expression des molécules d'adhésion et la production de cytokines (et plus précisément de l'IL-6). Les résultats ont montré que :

- les lymphocytes T périphériques de sujets allergiques, spécifiquement activés par l'allergène vis-à-vis duquel ils sont sensibles, induisent une expression accrue de VCAM-1 et une production d'IL-6 par la cellule endothéliale,

- cette activation des lymphocytes T apparaît spécifique d'allergène, puisque leur stimulation par des allergènes non pertinents n'induit pas d'activation de la cellule endothéliale,

- les lymphocytes T de sujets témoins stimulés par un allergène n'activent pas la cellule endothéliale,

- l'IL-4 et l'IFN γ apparaissent comme les principaux médiateurs responsables respectivement de l'induction de l'expression de VCAM-1 et de la production d'IL-6.

La fixation des cellules présentatrices d'antigène par le PFA a été utilisée afin d'étudier les effets *in vitro* de la réponse lymphocytaire T à une stimulation allergénique (Kurt-Jones *et al.*, 1985; Bailly *et al.*, 1990). En effet, il était essentiel de bloquer la production de cytokines par ces cellules



d'une manière qui permette encore la présentation d'antigène aux lymphocytes T. Il faut rappeler que les monokines, et plus particulièrement le TNF α , sont de puissants activateurs de la cellule endothéliale (revu par Mantovani, 1991). Cependant, comme cela a pu être démontré pour l'IL-1, une partie des cytokines de surface (Kriegler *et al.*, 1988), qui servent de cofacteurs à l'activation des cellules T, peut être libérée dans le milieu 12 à 24 heures après la fixation par le PFA, et donc interférer avec les lymphokines produites (Streck *et al.*, 1988). De ce fait, les cellules présentatrices ont été lavées plusieurs fois afin d'éliminer toute trace de monokines dans le milieu de culture. Dans ces conditions, il n'a jamais pu être mis en évidence de TNF α ni d'IL-6 dans les surnageants de culture des cellules présentatrices d'antigène et de lymphocytes T. De plus, le profil d'activation des cellules endothéliales, tel qu'il peut être observé avec les surnageants de culture de lymphocytes T, diffère de celui classiquement obtenu avec les monokines (absence de modulation d'expression de l'ICAM-1 par exemple).

Nous pouvons donc considérer que dans notre modèle, les modifications observées sur les cellules endothéliales sont dues aux médiateurs dérivés des lymphocytes T.

L'inflammation est une caractéristique majeure des pathologies allergiques. Dans l'asthme allergique, l'infiltrat leucocytaire est composé essentiellement d'éosinophiles et de lymphocytes T activés (Azzawi *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1991; revu par Corrigan et Kay, 1992; revu par Calderon et Lockey, 1992).

L'adhérence des leucocytes à l'endothélium représente une étape prérequis pour la migration cellulaire dans les tissus (revu par Swerlick et Lawley, 1993). Cette adhérence peut exister lorsque les deux cellules ne sont pas activées, mais dans ce cas, elle n'est pas associée à une migration transendothéliale. Afin que ce processus puisse se réaliser, il faut que les cellules expriment des molécules d'adhésion qui vont intervenir dans la phase d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine) (revu par Springer, 1990; revu par Osborn, 1990). L'implication de telles molécules d'adhésion dans la physiopathologie de l'asthme a été démontrée chez le singe par les travaux de Wegner (1989) et de Gundel (1990) qui ont montré que l'injection d'anticorps dirigés contre les molécules d'adhésion ICAM-1 et E-sélectine étaient capables d'inhiber la réaction inflammatoire retardée ainsi que l'hyperréactivité bronchique

Parmi ces molécules d'adhésion, seule la molécule VCAM-1 apparaît spécifique de l'adhérence des éosinophiles et des lymphocytes T (Schleimer *et al.*, 1992). Une expression accrue de VCAM-1 est observée dans les tissus soumis à une inflammation chronique (dans les cas de polyarthrite chronique par exemple) (Postigo *et al.*, 1992) ou après un test de provocation allergénique cutané ou nasal (Charlesworth *et al.*, 1989; Montefort *et al.*, 1992). La molécule VCAM-1 a été impliquée dans le processus d'adhérence, mais aucun argument expérimental ne permet d'évoquer son implication dans les phénomènes de migration transendothéliale. L'expression de VCAM-1 est augmentée par le LPS, le TNF α (Briscoe *et al.*, 1992) et l'IL-1 (Walsh *et al.*, 1991). Parmi les lymphokines, seule l'IL-4 apparaît capable de moduler positivement l'expression de VCAM-1 (Thornhill *et al.*, 1990, 1991; Schleimer *et al.*, 1992). Ainsi, dans un modèle animal de réaction inflammatoire cutanée, l'injection d'IL-4 induit un infiltrat de lymphocytes T, associé à une augmentation de l'expression de la molécule VCAM-1 par les cellules endothéliales (Pelletier *et al.*, 1992; Weg *et al.*, 1993).

Dans notre étude, nous observons que seuls les lymphocytes T de sujets allergiques et stimulés par l'allergène vis-à-vis duquel ils sont sensibilisés, induisent l'expression de VCAM-1. De plus, l'IL-4 n'est détectée que dans ces mêmes surnageants, et l'implication de cette lymphokine est renforcée par le fait que les anticorps neutralisants anti-IL-4 sont capables d'inhiber l'expression de VCAM-1 induite par ces lymphocytes T.

Par contre, en ce qui concerne l'expression d'ICAM-1 et de E-sélectine, nous observons que leurs expressions sont faiblement ou peu modulées par les surnageants de lymphocytes T de sujets allergiques et de témoins. De précédents travaux ont montré que les expressions d'ICAM-1 et de E-sélectine étaient augmentées sur les cellules endothéliales lors de tests de provocation allergénique cutanés. Dans ce cas, il peut être suggéré que la modulation de leur expression soit essentiellement sous le contrôle des monokines plutôt que des lymphokines.

L'IL-4 est produite par les lymphocytes T présentant un profil de sécrétion de type Th2, plus particulièrement associés aux pathologies allergiques. Il apparaît dans cette étude que seuls les sujets allergiques présentent, en réponse à une activation par un allergène, un profil de sécrétion de type Th2 (Kay *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1992). Ce résultat est en accord avec de précédents travaux qui ont montré l'obtention de

clones lymphocytaires T spécifiques d'allergène ayant un profil de sécrétion de cytokines de type Th2 provenant uniquement de cellules de sujets allergiques (Parronchi *et al.*, 1991).

Le deuxième paramètre d'activation des cellules endothéliales que nous avons mesuré est la production d'IL-6. Il a été montré, comme pour l'induction de l'expression de VCAM-1, que seuls les lymphocytes T de sujets allergiques et activés par l'allergène relevant, induisent la production d'IL-6.

Comme l'IFN γ est la seule lymphokine capable d'induire la production d'IL-6 (Leeuwenberg *et al.*, 1990), son dosage dans les surnageants de lymphocytes T a été réalisé. Des quantités importantes d'IFN γ ont été retrouvées dans les surnageants de lymphocytes T de patients allergiques stimulés par l'allergène relevant. De plus, les anticorps anti-IFN γ inhibent la production d'IL-6 induite par ces surnageants, démontrant une relation directe entre cette production d'IL-6 et l'activation par l'IFN γ . Nous montrons également que des quantités d'IFN γ équivalentes à celles produites dans le cas cité ci-dessus, sont retrouvées dans les autres surnageants (lymphocytes T de sujets allergiques stimulés par un allergène non relevant et lymphocytes T de sujets témoins stimulés). Malgré cette production d'IFN γ , il n'est pas observé de production d'IL-6 par les cellules endothéliales. Cette différence pourrait être expliquée par la production :

- d'autres cytokines capables d'inhiber les effets de l'IFN γ sur la cellule endothéliale (ex : IL-10, TGF β),
- d'inhibiteur(s) de l'IFN γ .

D'autres investigations seront nécessaires pour valider l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Il apparaît donc que tous les sujets, allergiques et non allergiques, présentent des lymphocytes T de type Th1 capables de répondre à une activation par les allergènes sous la forme d'une production d'IFN γ . Ce résultat apparaît logique si l'on considère que l'exposition de tous les sujets aux allergènes/antigènes doit induire une réponse immunitaire adéquate. Cependant, il ressort qu'en réponse à une stimulation par un allergène :

- les lymphocytes de sujets sains en réponse à un allergène, ainsi que les lymphocytes T de sujets allergiques vis-à-vis d'un allergène non

relevant, sont uniquement de profil Th1, et n'apparaissent pas capables, du moins seuls, d'activer les cellules endothéliales,

- les lymphocytes de sujets allergiques sont de profil Th1 et Th2 et sont capables d'activer les cellules endothéliales.

Les lymphocytes de type Th2 constituent la majorité de la population lymphocytaire T retrouvée dans le tissu bronchique après un test de provocation à l'allergène. Les résultats présentés dans ce travail montrent que ces lymphocytes T de type Th1 sont également capables, en réponse à une activation spécifique d'allergène relevant, d'activer *in vitro* les cellules endothéliales.

Notre étude des interactions entre les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires activés par l'allergène chez les sujets allergiques ont permis de préciser certains des mécanismes qui initient la réaction inflammatoire. Le schéma 1 présente de manière synthétique différentes voies d'activation des cellules endothéliales qui ont pu être mises en évidence au cours de ce travail.

L'ensemble de ce travail a permis :

- de mettre en évidence une réponse de type autoimmune contre un antigène de 55 kD endothélial dans les asthmes non allergiques associés à une intolérance à l'aspirine,

- de contribuer à l'étude des coopérations mises en jeu dans le développement de la réaction inflammatoire associée à l'asthme allergique, en particulier entre la cellule endothéliale d'une part, et le mastocyte et le lymphocyte T d'autre part.

Cette étude a mis l'accent essentiellement sur le rôle de la cellule endothéliale dans les mécanismes physiopathologiques associés à l'asthme tout en montrant qu'un réseau complexe de coopérations cellulaires est établi avec de nombreuses autres cellules dans le développement de la réaction inflammatoire.

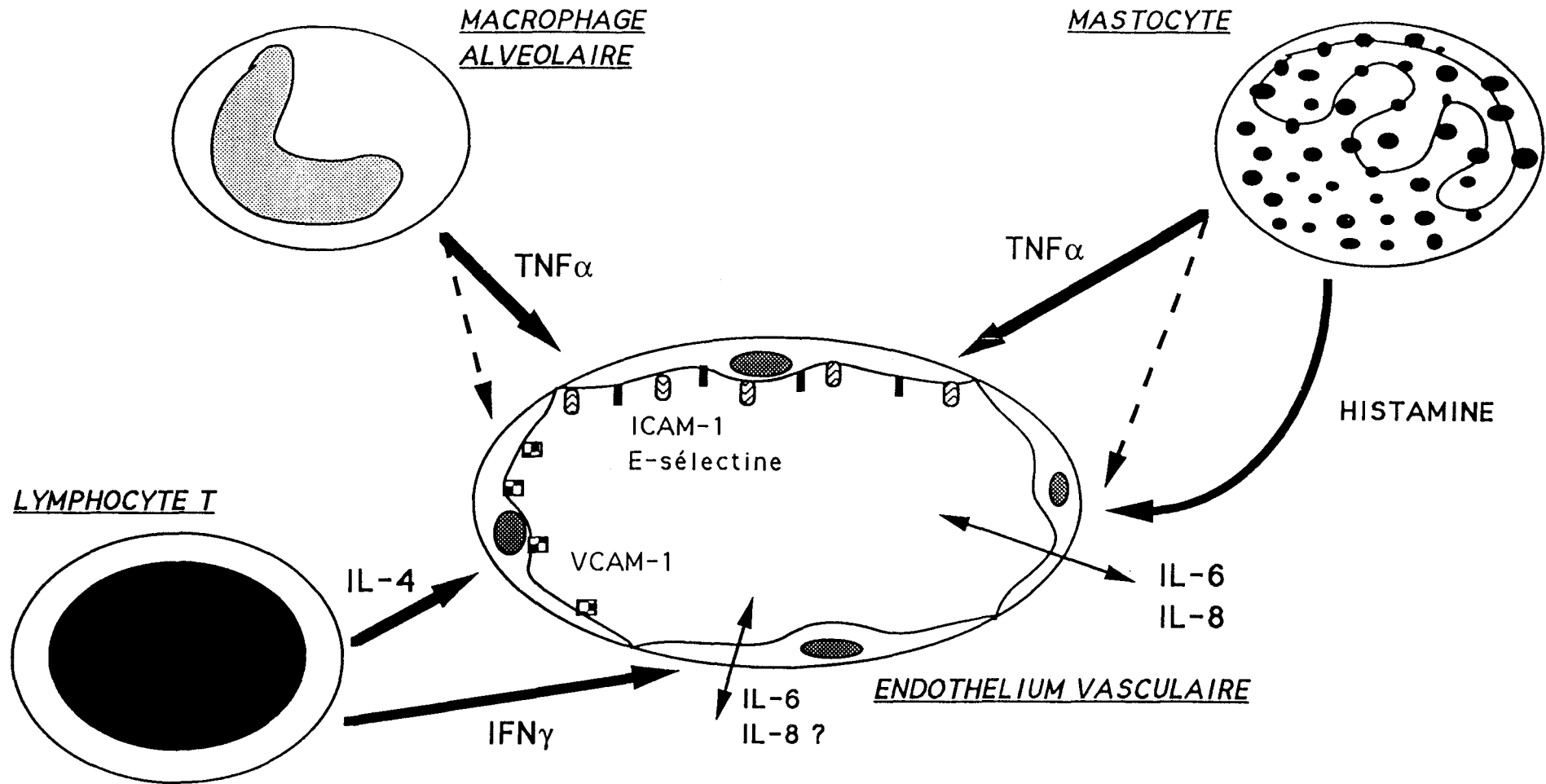


Schéma 1 : Schématisation des coopérations cellulaires établies lors de la réaction inflammatoire entre la cellule endothéliale et les cellules inflammatoires : le macrophage alvéolaire, le mastocyte et le lymphocyte T, lors de l'introduction d'un allergène chez un patient allergique

V/ Perspectives

Comme pour la discussion générale, les perspectives de ce travail concernant l'étude du rôle de la cellule endothéliale dans l'asthme bronchique seront présentées successivement pour l'asthme non allergique et pour l'asthme allergique.

Afin de poursuivre l'étude concernant la mise en évidence d'une anomalie de type autoimmune dans certains asthmes graves non allergiques, il apparaît premièrement essentiel de pouvoir purifier l'antigène de 55 kD et d'en caractériser les fonctions. Du fait des nombreuses difficultés inhérentes à la qualité de la sonde immunologique utilisée, l'antigène de 55 kD n'est pas cloné. L'obtention récente d'un sérum immun animal dirigé contre cet antigène a grandement facilité le criblage des banques d'ADNc. Les suites favorables de ce travail restent néanmoins toujours liées à l'isolement d'un ou plusieurs clones codant pour tout ou partie de cet antigène.

La purification d'une protéine recombinante permettra :

- l'obtention de sérums immuns dirigés contre cet antigène et présentant des titres en anticorps élevés,
- la purification de l'antigène natif à partir d'extraits antigéniques plaquettaires et endothéliaux à l'aide de ces sérums immuns (cette purification de l'antigène devra conduire à la définition de sa fonction),
- l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre la structure de 55 kD native.

La disposition de ces sérums monoclonaux et polyclonaux anti-55 kD ainsi que la protéine native ou recombinante permettront :

- de doser les taux d'anticorps anti-55 kD circulants chez les patients, ainsi que le suivi de l'évolution de ce taux en fonction du temps et de l'état clinique des patients,
- de doser la forme soluble plasmatique chez les patients, et d'en préciser les modalités de production,

- d'analyser la réponse lymphocytaire T vis-à-vis de l'antigène de 55 kD purifié, et l'évolution de cette réponse en fonction du temps et de l'état clinique du patient (suivi longitudinal),
- de rechercher l'expression potentielle de tels anticorps dans d'autres pathologies caractérisées par un processus inflammatoire important.

Dans une optique plus fondamentale, les sondes immunologiques et moléculaires serviront à l'analyse de la (ou des) fonction(s) de cet antigène, des modalités de son expression par les cellules endothéliales et les plaquettes (dans le cadre d'activations par des médiateurs immunologiques comme les cytokines et la régulation de son expression par des substances pharmacologiques), ainsi que de sa répartition et de son expression dans les différents tissus de l'organisme (sains ou pathologiques).

L'ensemble de ces informations biologiques et cliniques permettront de répondre à la question du rôle de l'antigène et/ou des anticorps anti-55 kD dans la physiopathologie de certains asthmes graves non allergiques. Si l'ensemble de ce travail aboutit à terme, il sera alors possible d'envisager chez ces patients certaines formes d'immunothérapie spécifique identiques à celles proposées pour le traitement d'autres maladies autoimmunes.

En ce qui concerne l'analyse du réseau de coopérations cellulaires entre la cellule endothéliale et les leucocytes, notre projet visera essentiellement à définir les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant l'adhérence et la migration transvasculaire des leucocytes du sang vers le site inflammatoire, en réponse à une agression allergénique.

Cette étude s'attachera principalement à évaluer les capacités des cellules de patients allergiques comparativement aux cellules de sujets sains à induire l'activation de la cellule endothéliale. Compte tenu de nos propres résultats, il apparaît essentiel de pouvoir analyser plus finement les coopérations entre le lymphocyte T et la cellule endothéliale au cours de l'initiation de la réaction inflammatoire et des modalités de sa régulation. Le modèle d'activation de lymphocytes T que nous avons développé constitue de ce point de vue un support technologique intéressant.

Le but de notre étude sera de répondre à plusieurs réponses essentielles, les paramètres d'activation de la cellule endothéliale restant la modulation d'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et P-sélectine) et la production de cytokines (IL-1, IL-6 IL-8 et GM-CSF) :

1) Quels sont les facteurs spécifiquement produits par les lymphocytes stimulés par un allergène, qui modulent l'activation de la cellule endothéliale. Nous utiliserons dans une première approche des combinaisons de cytokines ou des médiateurs purifiés (histamine, PGD₂, ...). Un accent particulier sera porté sur les effets synergiques ou antagonistes de ces différents médiateurs entre-eux. Une deuxième partie de ce travail consistera en une coculture des leucocytes activés avec les cellules endothéliales afin d'apprécier les coopérations cellulaires réciproques et directes entre ces cellules.

Une étude complémentaire s'attachera à étudier la dichotomie de réponse observée lors d'une activation par un antigène classique comme la toxine tétanique ou celle obtenue lors d'une activation par un allergène. Il apparaît essentiel de savoir si l'existence de lymphocytes Th2 est une caractéristique générale des lymphocytes de sujets allergiques, ou si leur existence n'est restreinte qu'à une réponse vis-à-vis des allergènes. Si ces lymphocytes Th2 spécifiques d'antigène existent, sont-ils capables d'activer les cellules endothéliales ou si, comme pour les lymphocytes de type Th1 spécifiques d'allergène chez les sujets sains, ils ne peuvent les activer.

2) Lors d'une activation de la cellule endothéliale par les lymphocytes Th1 versus Th2, quels sont les leucocytes qui ne vont qu'adhérer et ceux qui vont adhérer puis migrer? Pour cela, différentes approches sont possibles :

- l'analyse des populations leucocytaires adhérentes. Les différentes sous-classes de lymphocytes ainsi que les types de granulocytes seront définis grâce à l'emploi d'anticorps spécifiques de chaque famille de cellules. Des expériences de neutralisation par des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules d'adhésion permettront de définir les voies préférentiellement utilisées par les leucocytes,

- l'analyse des populations cellulaires migrantes. Les puits de culture seront séparés en deux chambres par une membrane de nitrocellulose sur laquelle seront disposées les cellules endothéliales. Afin d'apprécier la migration trans-endothéliale, les cellules migrantes seront collectées dans la chambre de culture inférieure. Les sous-populations lymphocytaires T seront définies (par analyse en cytométrie de flux ou par immunocytochimie et/ou hybridation *in situ* afin de connaître leur profil Th1 versus Th2) ainsi que les éosinophiles (état d'activation, contenu en cytokines). Les cellules adhérentes seront caractérisées par un test ELISA classique tel que nous avons pu l'utiliser dans notre étude.

3) Chez un patient allergique, les populations lymphocytaires T de type Th1 ou Th2 agissent-elles de manière synergique ou antagoniste sur l'initiation de la migration transendothéliale? Pour répondre à cette question, il sera utilisé des clones lymphocytaires Th1 et Th2 spécifiques de *Dpt*. Les cellules endothéliales seront activées par des surnageants d'activation de l'un et/ou de l'autre clone. L'adhérence et la migration de ces mêmes cellules sera ensuite appréciée, ainsi que celle des éosinophiles comparativement aux neutrophiles.

4) Quels sont les mécanismes régissant la sélection des cellules migrantes? En effet, généralement, les lymphocytes T qui infiltrent le tissu bronchique après un test de provocation à l'allergène sont préférentiellement de type Th2. Il apparaît donc intéressant de pouvoir analyser les mécanismes d'adhérence et de migration des lymphocytes T périphériques de sujets allergiques comparativement aux cellules de sujets sains. Ces cellules d'allergiques seront activées par un allergène relevant ou non relevant, ainsi que par un antigène classique.

L'ensemble de ce travail s'oriente donc largement vers l'analyse de coopérations cellulaires établies entre la cellule endothéliale d'une part et les leucocytes d'autre part, dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire associée aux pathologies allergiques.

Production of Anti-endothelial Cell Antibodies by Coculture of EBV-Infected Human B Cells with Endothelial Cells¹

Y. DELNESTE,* P. LASSALLE,* P. JEANNIN,* L. MANNESSIER,†
J.-P. DESSAINT,‡ M. JOSEPH,* AND A.-B. TONNEL*

**Contrat Jeune Formation (INSERM 90-06), Institut Pasteur, 59019, Lille, France; †Laboratoire d'immunologie-érythrocytaire, Centre Régional de Transfusion de Lille, Rue Camille-Guérin, 59012 Lille, France; and ‡Service d'Immunologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, 1 place de Verdun, 59000 Lille, France*

Received January 15, 1993; accepted February 21, 1993

Vascular endothelial cells are suspected of being the target of autoimmune processes seen in many connective tissue diseases and in systemic vasculitis as evidenced by the detection of circulating autoantibodies against endothelial cell antigens. In order to select B cells recognizing endothelial cells antigens, Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells, obtained from one patient presenting a systemic vasculitis, were cocultured with human endothelial cells concurrently with a human endothelial cell line (EC-pSV1 cells). This coculture consisted of a first step of expansion of B cells specifically selected by adherence onto human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The adherence of selected B cells was specific to endothelial cells because no rosette formation around control cells (HeLa cells or COS cells) was observed. Adherent B cells were cloned by limiting dilution by coculture onto EC-pSV1 cells and screened for anti-HUVEC antibody production by endothelial cell ELISA. An increase in anti-HUVEC antibody production of IgM isotype was detected by endothelial cell ELISA, peaking at Day 9 and remaining constantly elevated, relative to B cell expansion. Among 21 B cell lines producing IgM, 6 presented high levels of anti-HUVEC antibodies, whereas 1 of 52 B cells cloned without EC-pSV1 cells showed such antibody production. Anti-HUVEC antibody production and B cell proliferation were dependent on the presence of endothelial cells. Two of these 6 B cell lines produced antibodies directed against an endothelial cell antigen with an apparent molecular weight of 192 kDa as determined by immunoblotting analysis. Our results demonstrate that adherence of EBV-infected B cells to endothelial cells and further cloning by adherence can efficiently select anti-HUVEC antibody-producing human B cells and might help to define antigens potentially involved in autoimmune diseases. © 1993 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Vascular damage is a common feature in many connective tissue diseases and in systemic vasculitis. The presence of circulating autoantibodies directed against endothelial cell components has led to attractive hypotheses involving these antibodies in the pathogenesis of many diseases such as systemic lupus erythematosus (1-3), rheumatoid arthritis (3, 4), progressive systemic sclerosis (3, 5), autoimmune hypoparathyroidism (6), episodic angioedema and eosinophilia syndrome (7), systemic

¹ This work was supported in part by CJF (INSERM) No. 90-06, the Société d'enseignement et de recherche en pneumologie et allergologie (Hopital Calmette), and the Association Recherche et Partage.

vasculitis (8), allergic and granulomatous angiitis (9), and Kawasaki disease (10, 11). However, a close relationship between the presence of such antibodies and the development of the underlying disease remains unclear, which justifies a more precise evaluation of recognized endothelial cell epitopes.

Attempts to characterize the endothelial cell target antigens have met with some difficulties for two reasons: (i) the limited quantity of cultured human endothelial cells available for biochemical purification and (ii) the large diversity of serum antibodies. Due to these technical problems, the characterization of endothelial cell antigens remains a difficult issue.

The ability of human B cells to proliferate and to produce antibodies following infection with Epstein-Barr virus (EBV) has been widely used to study human antibodies putatively involved in autoimmune diseases. In this way, human monoclonal antibodies have been raised against DNA (12, 13), immunoglobulin (14), tetanus toxoid (15, 16), thyroglobulin (16), blood group antigens (17), or acetylcholine esterase (18). However, the relative paucity of circulating B cells with a given specificity strongly reduces the probability of obtaining B cell lines secreting antibodies of interest.

One alternative approach to selecting specific B cells is to take advantage of the fact that B lymphocytes express immunoglobulins on their surface. Thus, specific B cells have been successfully separated from irrelevant B cells using the antigen as a probe (16).

In this report, we used the method of selection by cellular adherence to identify antigenic determinants from endothelial cells with human B cell lines. EBV-infected B cells were selected by adherence to human endothelial cells and then cocultured. Coculture of adherent B cells in limiting dilution led to the generation of a number of antibodies against endothelial cells. Two of them were able to recognize an endothelial cell antigen of 192 kDa.

MATERIAL AND METHODS

Immortalization of B Lymphocytes by EBV Infection

B cells were provided by a patient suffering from allergic granulomatous and angiitis, also called Churg and Strauss syndrome (19). This syndrome is characterized by severe asthma, diffuse symptoms of systemic vasculitis, and blood and tissue eosinophilia. The clinical diagnosis was confirmed in this patient by neuromuscular biopsy, which demonstrated necrotic, perivascular, and extravascular granulomas rich in eosinophils.

Mononuclear leukocytes were prepared from 60 ml heparinized peripheral blood by density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biochemicals, Inc., Upsala, Sweden) (20). Following monocyte depletion by 2 hr of adherence to plastic dishes (Becton-Dickinson, Grenoble, France), T lymphocytes were depleted by density sedimentation of rosette formation with sheep red blood cells treated with 2-aminoethylisothiouonium bromide. The B lymphocytes were cultured in 24-well cell culture plates to a concentration of 1×10^5 cells/well in 1 ml of RPMI medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL, Cergy Pontoise, France), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 10 μ g/ml streptomycin. To each well, 100 μ l of supernatant from a dense culture of an EBV-infected marmoset cell line (B 95-8) (ATCC, Rockville, MD) was added (21, 22). B lymphocytes were cultured 2 weeks until colony formation was observed and were expanded one more week before selection by coculture.

Cell Cultures

Human endothelial cells were derived from umbilical vein (HUVEC), according to the method previously described (23, 24). Briefly, HUVEC were collected after treatment of umbilical vein by 0.2% collagenase in Hanks' balanced salt solution for 15 min (M. A. Bioproducts, Walkerville, MD) and pelleted by centrifugation (800g, 10 min). HUVEC were resuspended at 1.2×10^5 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 10 μ g/ml streptomycin, 20% FCS (v/v), 100 μ g/ml heparin, and 25 μ g/ml endothelial cell growth supplement (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). HUVEC were cultured in 35-mm-diameter tissue culture wells at 37°C in 5% CO₂. The culture reached confluency within 3 to 5 days. Only endothelial cell cultures obtained after the second to the fourth passage were used.

Simian virus 40-transfected endothelial cell line (EC-pSV1 cells) (25) was cultured, as well as HeLa cells, in RPMI 1640 supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% (v/v) FCS. COS cells and MRC5 cells were cultured in Dulbecco's medium supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% (v/v) FCS.

Coculture and Cloning Procedure

In order to select B cells able to recognize endothelial cell antigens, EBV-infected B cells were cocultured with EC-pSV1 cells, which were used because they are easy to obtain in large amounts in comparison with classical HUVEC culture. In the first step, EBV-infected B cells (2×10^7 cells) were added to three 100-mm-diameter petri dishes containing confluent EC-pSV1 cells (in EC-pSV1 cell culture medium) and then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 14 days. Medium containing the nonadherent B cells was removed by three washings every 2 to 3 days. Following centrifugation, supernatants were aliquoted and stored at -20°C until tested for the presence of immunoglobulins.

In a second step, adherent B cells recovered after vigorous washings were seeded twice a week, in order to expand the EBV-infected B cells. The resuspension was controlled by optical microscopy examination of the petri dishes, which confirmed the dramatic decrease in the number of B cell-EC-pSV1 cell rosettes. An aliquot of the adherent B cells was used for limiting dilution assay at 0.5 cell/well in four 96-well flat-bottom microculture plates containing confluent EC-pSV1 cells. The medium was changed twice a week. Detection of anti-HUVEC antibodies in culture supernatants was performed each week during three consecutive weeks of coculture. B cells in wells containing anti-HUVEC antibodies, or derived from wells not containing such antibodies but presenting a strong proliferative response, were expanded in 16- and then 36 mm-diameter culture plates. B cells cultured and further cloned by limiting dilution without coculture with EC-pSV1 cells as described above were used as controls.

Quantification of Immunoglobulin Production by ELISA

Microtiter plates were coated with anti-human heavy-chain goat antibodies specific for human IgG, IgA, and IgM (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France). One hundred microliters of coculture supernatants was incubated for 1 hr at room temperature in duplicate. After extensive washes in PBS containing 0.05% (v/v) Tween 20, wells were then incubated for 1 hr with affinity-purified and peroxidase-conjugated anti-human heavy-chain goat antibodies (Tago, Burlingame, CA). Following extensive

washings, the wells were allowed to react with 2 mg/ml of the substrate *o*-phenylenediamine in 10 mM citrate buffer, pH 4.2, containing 0.075% (v/v) H₂O₂. The reaction was stopped by adding 100 μ l 4 N HCl per well. The standards were made of various dilutions of purified human IgA, IgG, and IgM (Sigma Chemical Co.). The optical density was read at 492 nm and the results were expressed in nanograms per milliliter.

Adherence Assay

A total of 0.1×10^6 cells (HUVEC, EC-pSV1 cells, COS cells, and HeLa cells) were seeded on gelatin-coated 8-well tissue culture chamber slides in duplicate for 24 hr (Nunc Inc., Naperville, IL). The slides were washed by dipping them in a glass flask containing 100 ml RPMI 1640 prewarmed to 37°C. Then, 10^5 EBV-transformed B cells were added immediately to each well. Following 5 min of incubation at 37°C, the slides were washed again three times in order to remove the nonadherent B cells and immediately fixed in PBS/glutaraldehyde [0.5% (v/v)] for 30 min at 4°C. After extensive washes, the slides were examined under microscope to quantify the number of rosettes. A rosette was taken in account when more than five B cells were fixed around target cells (endothelial cells or control cell lines COS and HeLa). In order to identify the mechanism of the adherence pathway, the same adherence experiments were repeated with a previous 2-hr incubation of endothelial cells with 2 μ g/well monoclonal anti-ICAM-1 or anti-ELAM-1 antibodies (British Biotechnology Ltd, Oxford, UK).

Detection of Anti-HUVEC Antibodies by ELISA

Confluent cultures of HUVEC on gelatin-coated 96-well flat-bottom microculture plates were washed twice with PBS and then fixed with 0.05% glutaraldehyde in PBS for 10 min at 4°C (26). Following four washings in PBS containing 1% BSA and 5 mM EDTA, the plates were incubated at room temperature for 1 hr in the same buffer. After washings, 100 μ l of coculture supernatants was incubated for 1 hr at room temperature and then washed four times before incubation with affinity-purified and peroxidase-conjugated anti-human IgA, IgM, or IgG goat antibodies. Following extensive washings, the wells were allowed to react with 2 mg/ml of the substrate *o*-phenylenediamine in 10 mM citrate buffer, pH 4.2, containing 0.075% H₂O₂. The reaction was stopped by adding 100 μ l 4 N HCl per well. The optical density values were read at 492 nm and the results were expressed as follows: OD (sample) – mean value of all OD (0.135 ± 0.107 ; mean of 288 values subtracted from OD values up to 1.0). Purified human IgG, IgA, and IgM were used as standards. In our system, purified immunoglobulins at concentration levels fivefold greater than those found in coculture supernatants did not efficiently bind to HUVEC.

Control was established by anti-MRC5 cell ELISA; this ELISA was used under the same conditions as those described for endothelial cells.

Analysis of Antigens Recognized by Anti-HUVEC Antibodies

Antigenic extracts from EC-pSV1 cells, HUVEC, monocytes, lymphocytes, neutrophils, HeLa cells, COS cells, and MRC5 cells were prepared. After cell collection, the cells were centrifuged and resuspended at a concentration of 2×10^8 cells/ml in ice-cold lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) containing

0.5% (v/v) Nonidet-P40. The extracts devoided of nucleus fraction were fractionated on a 13% polyacrylamide slab gel containing 0.1% SDS under reducing conditions as described by Laemmli (27). After transfer of separated proteins onto nitrocellulose (0.45 μm BA85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) (28), sheets were saturated in quenching buffer (5% nonfat dry milk in PBS, pH 7.4) for 30 min at room temperature and after several washings incubated with coculture supernatants diluted at 1:2 or with the patient serum diluted at 1:100 in PBS for 18 hr at 4°C under constant agitation. After washings, bound human immunoglobulins were detected with peroxidase-conjugated anti-human immunoglobulin goat antibodies. After a final washing step, nitrocellulose membrane was stained with 0.06% (v/v) 4-chloro-1-naphthol/0.075% (v/v) H_2O_2 in PBS, pH 7.4 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The anti-192-kDa antibodies were tested for their putative blood group antigen recognition. The search for anti-A and anti-B blood group antibodies and abnormal blood group antigens was realized by Coomb's method and the papain method using standardized panels of red blood cells obtained from the Centre Regional de Transfusion Sanguine (CRTS de Lille, Lille, France).

RESULTS

Proliferation of Adherent B Cells Was Associated with the Production of Anti-HUVEC Antibody

During the first 2 weeks of selection, the evolution of the IgM anti-HUVEC antibody response of B cells adherent to EC-pSV1 cells was analyzed (Fig. 1). At the beginning of the coculture, we observed a critical decline in anti-HUVEC antibody activity at Day 4. The optical microscopic examination at that time revealed that up to 90% of B cells were removed by washings. Only few rosettes of B cells around EC-pSV1 cells could be seen. At Day 6, anti-HUVEC antibodies increased and reached a plateau at Day 9. In contrast, anti-HUVEC antibodies found in supernatants of EBV-transformed B cells cultured alone were lower than those found in coculture supernatants, without any change during the time of culture. In this case, no band could be evidenced by

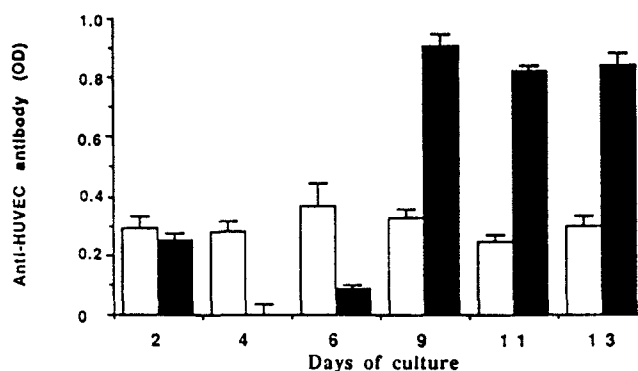


FIG. 1. Time course of the appearance of human IgM anti-endothelial cell antibodies in the supernatants of EBV-infected B cells cocultured with EC-pSV1 (■). Controls supernatants were made of supernatants from EBV-infected B cells cultured alone (□). The results are given in optical density values (OD) as means \pm SD of three experiments.

immunoblotting analysis against HUVEC extracts. Immunoblot analysis of the co-culture cell supernatants collected at Day 9 against endothelial cell extracts revealed the presence of 23 bands ranging from 17 to 200 kDa (data not shown). This increase of anti-HUVEC antibody level at Day 9 corresponded to a strong rise in B cell rosette formation around EC-pSV1 cells. This observation was confirmed by an adherence assay of EBV-transformed B cells collected at Day 9 to EC-pSV1 cells, HUVEC, COS cells, or HeLa cells. The results demonstrated that $91 \pm 5\%$ EC-pSV1 cells and HUVEC formed rosettes, while only $4 \pm 2\%$ HeLa cells and COS cells did (Fig. 2). Moreover, addition of anti-ICAM-1 antibody dramatically decreased the adhesion of B cells onto EC-pSV1 or HUVEC ($5 \pm 2\%$), whereas no variation was observed on addition of anti-ELAM-1 antibody (data not shown).

Production of Immunoglobulins and Anti-HUVEC Antibodies by Adherent B Cells

Among a total of 288 wells tested, only 28 produced detectable anti-HUVEC antibodies. During clonal expansion, 7 clones ceased to proliferate (Fig. 3A). Among these 21 remaining lines, the majority produced immunoglobulins of IgM isotype, except for 4 B cells that produced antibodies of IgA and IgG classes (Fig. 3B). Twenty-one clones were maintained for up to 3 months, and 4 of them showed strong proliferative responses for up to 8 months (3G9, 3G11, 3G12, 4D4). Numerous supernatants of B cell clones demonstrated a low binding activity to MRC5 cells in contrast to the binding activity observed with HUVEC (Fig. 3A). Moreover, nonadherent B cells, also cloned by the limiting dilution technique without EC-pSV1 cells, failed to produce

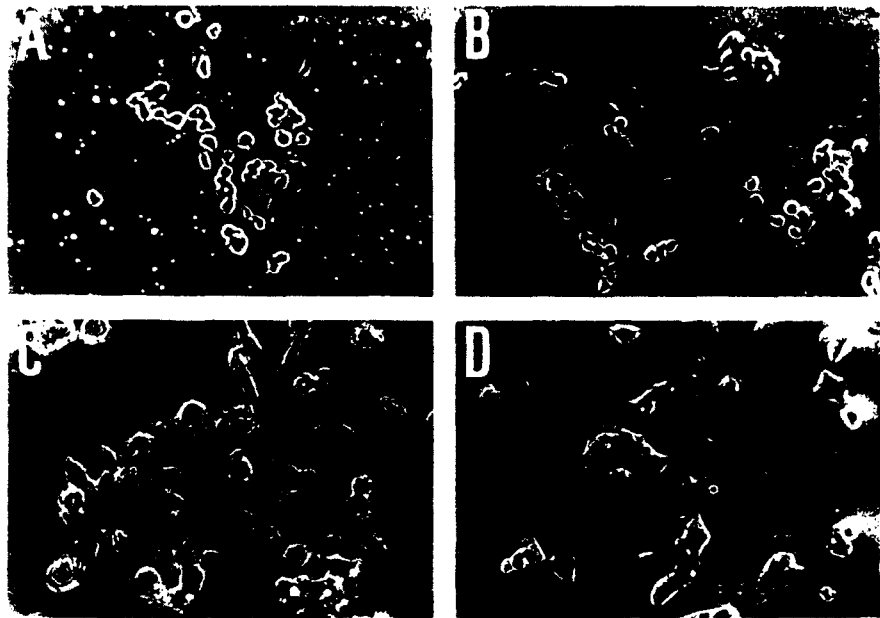


FIG. 2. Binding of the EBV-infected B cells on HUVEC (A), EC-pSV1 cells (B), HeLa cells (C), and COS cells (D). Five minutes of incubation of adherent B cells allowed the formation of typical rosettes with $91 \pm 5\%$ HUVEC or EC-pSV1 cells. COS cells and HeLa cells did not support such adhesion properties ($4 \pm 2\%$).

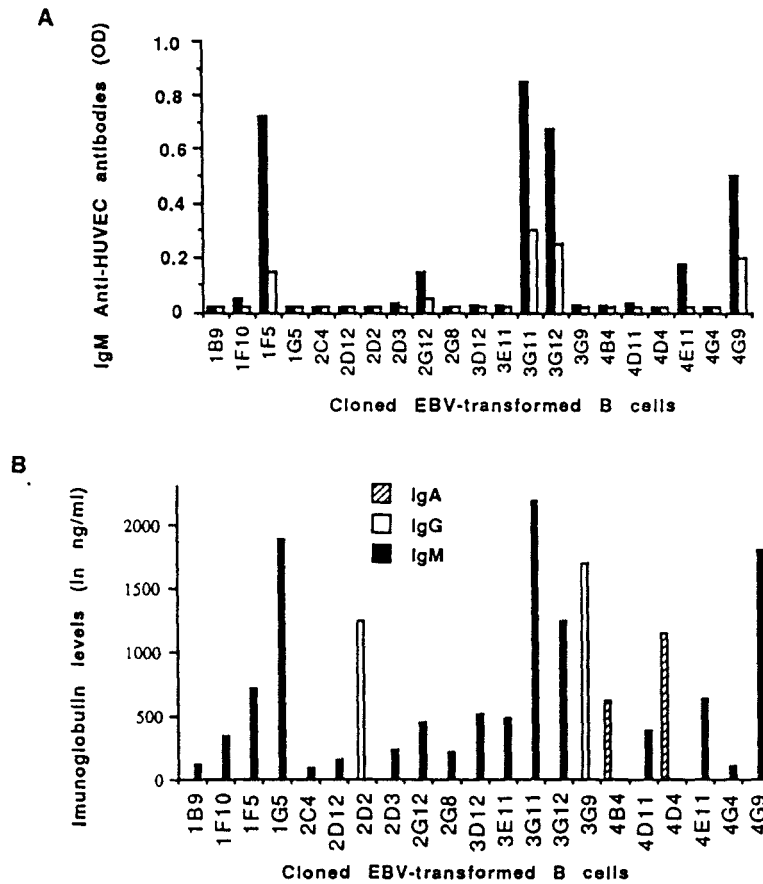


FIG. 3. Production of antibodies by the selected EBV-transformed B cells cloned by the limiting dilution technique. (A) The human IgM antibodies produced by the 21 B cell lines were directed against HUVEC (■) but not to MRC5 cells (□) as detected by ELISA, in which results are expressed as the mean OD from a duplicate after subtraction of the mean value of all OD (0.135 ± 0.107). (B) Isotype analysis of immunoglobulins produced after 72 hr of culture, in which results are expressed in ng/ml of immunoglobulin and are representative of three measurements.

anti-endothelial cell antibodies: after 21 days of culture, 52 proliferative lines among 576 wells were obtained. Although the majority of these cell lines produced immunoglobulin of μ class, only 1 of the 52 cell lines showed a weak anti-HUVEC antibody level (OD values range: 0.1–0.2) (data not shown).

Endothelial Cell-Dependent Growth and Immunoglobulin Production by Cloned EBV-Infected B Cells

When B cells cloned by coculture with EC-pSV1 cells were cultured alone, the anti-HUVEC antibody production decreased quickly, and the B cells no longer proliferated as well as they did under coculture conditions (Fig. 4A). The inability of cloned B cells to proliferate without the presence of endothelial cells led us to investigate a putative role for EC-pSV1-derived mediators, such as interleukin 6 (IL-6), which is

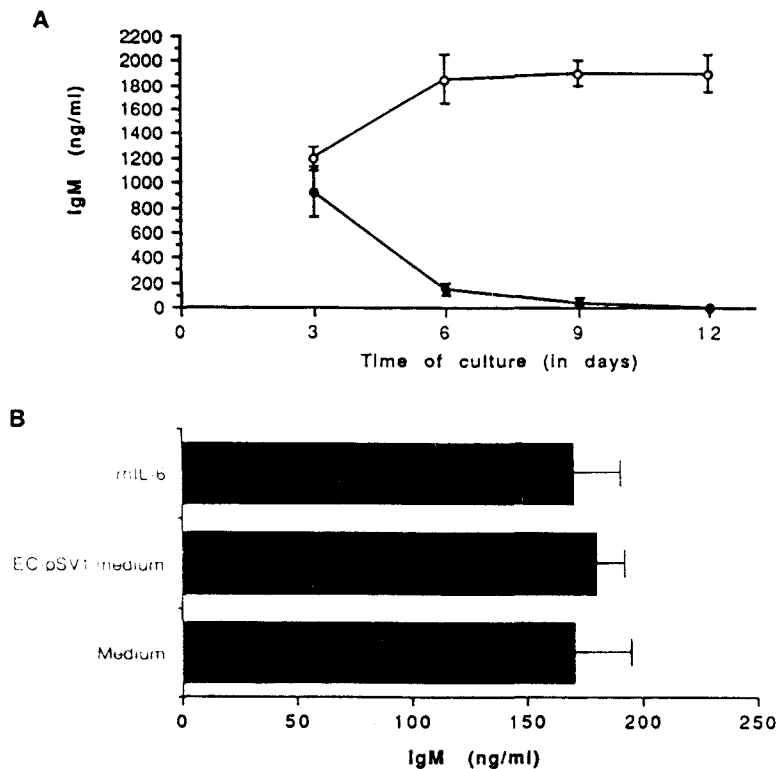


FIG. 4. Role of EC-pSV1 in the proliferation of B cells. (A) Time course of IgM production by the B cell line 3G11 cultured with EC-pSV1 (O) or alone (●); supernatants were collected at 72 hr and results are expressed in ng/ml. Results are similar for the other B cell lines tested. (B) Inability of rhIL-6 or EC-pSV1 conditioned medium to replace EC-pSV1 in IgM production by the cloned B cell lines. Results are expressed in ng/ml.

known to be an autocrine B cell growth factor produced by EBV-infected B cells and to be produced in large quantities by EC-pSV1 cells (25). The proliferation and the immunoglobulin production of the 3G11 cloned B cell line, when cultured without EC-pSV1 cells, quickly decreased at Day 3. Addition of recombinant human IL-6 (5000 U/ml), or EC-pSV1-conditioned medium (collected from a 72-hr culture of EC-pSV1 cells), was unable to stimulate proliferation and immunoglobulin production of cloned B cells regardless of the time of culture (Fig. 4B). At Day 12, no viable B cells could be detected. Similar results have been obtained with 4 other B cell lines (1G5, 3G9, 3G12, and 4D4) producing IgM antibodies against HUVEC.

Detection of Human Anti-192-kDa Endothelial Cell Antigen Antibody

The presence of a high antibody level in supernatants of some cloned B cells has led to the identification of the endothelial cell target antigens recognized by these antibodies. The immunoblot analysis of supernatants of B cell lines against HUVEC extracts revealed the presence of an endothelial cell antigen with an apparent molecular weight of 192 kDa, as observed with two B cell lines (3G11 and 3G12) (Fig. 5). A

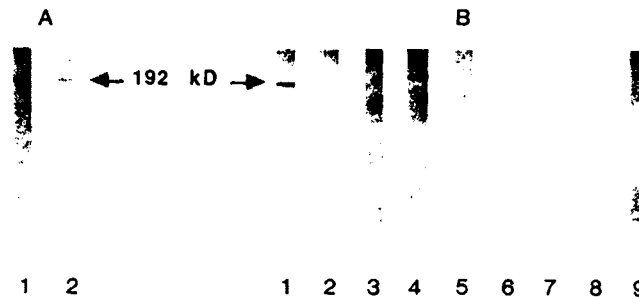


FIG. 5. Detection of an endothelial cell antigen as a target for antibodies of isotype produced by the B cell lines. (A) Immunoblotting analysis against HUVEC extracts revealed that a 192-kDa endothelial cell antigen was recognized by the anti-HUVEC antibodies of IgM isotype produced by the B cell lines 3G11 (1) and 3G12 (2). (B) A 192-kDa antigen was detected by the anti-HUVEC antibodies contained in the coculture supernatant of the B cell line 3G11 in EC-pSV1 (1), in HUVEC (2), and in nonadherent PBMC antigenic extracts (3). A 200-kDa antigen and a 160-kDa antigen were detected by these supernatants in mononuclear cell extracts (4) and platelet extracts (5), respectively. No other antigens were evidenced in cellular extracts including COS cells (6), MRC5 cells (7), HeLa cells (8), or PMN cells (9).

band of the same molecular weight was detected when the immunoblots were performed with cell samples prepared under reducing and unreducing conditions (data not shown). This 192-kDa antigen was also detected in EC-pSV1 cells. The anti-HUVEC antibody present in supernatant 3G11 was demonstrated to recognize an adherent PBMC antigen with an apparent molecular weight of 200–210 kDa, a platelet antigen of 160–170 kDa, and an antigen with the same molecular weight of 192 kDa present in lymphocytes (Fig. 5). Further separation of T and B lymphocytes by rosette formation followed by T and B cell sampling under reducing conditions showed that the 192-kDa antigen was present on both resting T and B cells (data not shown). This antigen was not detected in neutrophils or HeLa cell, COS cell, or MRC5 cell extracts and no blood group antigen was recognized by the anti-192-kDa antibody (data not shown).

DISCUSSION

Until now, to our knowledge, no human B cell epitope from endothelial cells recognized by autoantibodies has been identified. Our goal was to favor the production of such antibodies used as probes to identify the endothelial cell antigens that might putatively be involved in human autoimmune diseases. In the present study, we used a method of producing antibodies to human endothelial cells from a human B cell repertoire, selected by adherence to endothelial cells. Two of the B cell lines produced antibodies of IgM isotype which recognized an endothelial cell antigen with an apparent molecular weight of 192 kDa.

Whether the anti-HUVEC antibody-producing B cells selected in our system reflect the anti-HUVEC serum antibodies detected in different autoimmune diseases remains unresolved. The B cell population used in this study was obtained from a patient who suffered from Churg and Strauss syndrome (19). We speculated that in this syndrome, as in systemic vasculitis, the probability of anti-HUVEC antibody production was higher than that in healthy subjects (9).

The first aim was to efficiently select EBV-transformed B cells able to produce anti-HUVEC antibodies. In this study, EC-pSV1 cells were used as a source of antigens able to interact with immunoglobulin receptors on the surface of B cells. This human endothelial cell line transfected by SV40 was used for several reasons: (i) the EC-pSV1 cells can be maintained in long-term cultures, (ii) the growth of EC-pSV1 cells is effective without addition of heparin and endothelial cell growth factors, and (iii) the EC-pSV1 cells produce spontaneously high levels of biologically active interleukin-6, which is one of the more effective B cell growth factors (29, 30). In contrast, HUVEC cultures, obtained from different umbilical veins, were chosen as a source of antigen extracts for anti-endothelial antibody screening by ELISA, instead of EC-pSV1 cells, in order to discard the selection of nonrelevant antigenic determinants such as blood group antigens. Human IgM was found not to bind onto HUVEC even at high concentrations. A B cell line (1G5) that produced high levels of IgM did not show any anti-HUVEC antibody-binding activity in comparison with other clones, even with identical levels of IgM (as for the 3G11 B cell line). Thus it is unlikely that IgM antibodies bind through the Fc fragment.

Among the adherent B cells, the frequency of anti-HUVEC antibody-producing B cells increased, in comparison with the level observed with nonselected EBV-transformed B cell populations. Anti-HUVEC antibodies of IgM isotype were clearly detected in supernatants after the ninth day of coculture. The immunoglobulins produced by the selected B cells recognized HUVEC but not MRC5 cells, demonstrating that the augmentation of IgM anti-HUVEC antibody production was not related to an increase of total immunoglobulin production, but to a selection of anti-HUVEC antibody-producing B cells by specific adherence to endothelial cells. Of 21 wells from cloned B cells, 6 demonstrated a strong production of anti-HUVEC antibodies, whereas only 1 of 52 wells from unselected B cells produced low amounts of anti-endothelial cell antibodies. The use of these supernatants on immunoblots against endothelial cell extracts revealed the appearance of 23 bands ranging from 17 to 200 kDa. In contrast, no bands could be detected in supernatants from unselected B cells, even when the coculture supernatants were diluted to adjust the immunoglobulin level to those observed in supernatants of unselected B cells. More interestingly, the frequency of anti-endothelial cell antibody-producing B cell lines was higher in the coculture than in the nonselected culture.

B cell adhesion to endothelial cells involves multiple mechanisms of interaction, including cellular adhesion molecule pathways (intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)/lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) (31-38) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)/very late antigen 4 (VLA-4) (39)) and antigen-antibody recognition (39-41). VCAM-1 is not spontaneously expressed on both HUVEC and EC-pSV1 cells (42-44), and the fact that B cells adhere strongly in a few minutes to these endothelial cells suggests that in our system, the VCAM-1/VLA-4 interaction pathway was not involved in B cell adhesion. By contrast, adherence of B cells was inhibited by the addition of anti-ICAM-1 antibodies, clearly indicating that this cellular adhesion pathway was involved in the adherence of selected B cells to endothelial cells. This point suggests that a combination of this pathway with the antigen-antibody recognition was implied in the selection by adherence of B cells.

The interaction of B cells with endothelial cells led to their selection, activation, and expansion. The growth of these B cells selected by adherence was found to be dependent on the presence of EC-pSV1 cells, as judged by proliferation, immuno-

globulin production, and anti-HUVEC antibody synthesis. IL-6 is a B cell growth factor produced by EC-pSV1 cells, but also by EBV-infected B cells in an autocrine manner. Thus, we speculated that IL-6 could be involved in the growth of B cells (29, 30). In fact, our data showed that neither soluble EC-pSV1-derived mediators nor rhIL-6 was able to stimulate the growth and the Ig production of selected B cells. These results indicate that cell-cell interactions led to the maintenance of high growth rates and immunoglobulin production for B cells. We cannot exclude the participation of membrane-associated IL-6.

The last point of this study was to define the target antigen recognized by the anti-endothelial cell antibody produced by the cloned B cells selected by adherence. Antibodies produced by the 3G11 and 3G12 lines recognized only a 192-kDa endothelial cell antigen. This antigen was not related to a blood group antigen as it could be sometimes observed. The anti-192-kDa antibodies also recognized antigens in other cellular extracts with different molecular weights. This difference in apparent molecular weight of the antigenic structure recognized by these antibodies may be due to (i) a different glycosylation state or (ii) the recognition of different antigens sharing cross-reactive epitopes. Nevertheless, the characterization of this 192-kDa antigen is now under investigation.

In conclusion, without previous knowledge of the endothelial cell-derived B cell epitopes, we developed a method based on cell-cell adhesion that efficiently selects adherent EBV-infected B cells in cells producing antibodies directed against endothelial cell antigens. In addition, a human antibody of IgM isotype recognizing an endothelial cell antigen with an apparent molecular weight of 192-kDa has been produced under these conditions. This method can represent a powerful tool for investigating the human B cell repertoire in various autoimmune diseases in which the vascular endothelium is thought to play a central role.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank G. Marchandise and P. Marquillies for their expert technical assistance and Dr. P. Gosset, Dr. A. Tsiopoulos, and Dr. J. Pestel for their helpful discussion.

REFERENCES

1. Cines, D. B., Lyss, A. P., Reeber, M., Bina, M., and De Horatius, R. J., *J. Clin. Invest.* **73**, 611, 1984.
2. Penning, C. A., French, A. H., Rowel, N. R., and Hughes, P., *J. Clin. Lab. Invest.* **17**, 125, 1985.
3. Rosenbaum, J., Pottinger, B. E., Woo, P., Black, C. M., Loizou, S., Byron, M., and Pearso, M., *Clin. Exp. Immunol.* **72**, 450, 1988.
4. Heurkens, A. H. M., Hiemsta, P. S., Lafeba, G. J. M., Daha, M. R., and Breedveld, F. C., *Clin. Exp. Immunol.* **78**, 7, 1989.
5. Penning, C. A., Cunningham, J., French, M. A. H., Harrison, G., Rowel, N. R., and Hughes, F., *Clin. Exp. Immunol.* **57**, 548, 1984.
6. Fattorossi, A., Aurbach, G. D., Sakaguchi, K., Cama, K., Marx, S. J., Streeten, E. A., Fitzpatrick, L. A., and Brandi, M. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4015, 1988.
7. Lassalle, P., Gosset, P., Gruart, V., Prin, L., Capron, M., Lagrue, G., Kusnierz, J. P., Tonnel, A. B., and Capron, A., *Clin. Exp. Immunol.* **82**, 38, 1990.
8. Brasile, L., Kremer, J. M., Clarke, J. M., and Cerilli, J., *Am. J. Med.* **87**, 74, 1989.
9. Lassalle, P., Gosset, P., Tonnel, A. B., Dessaint, J. P., Delecour, M., and Capron, M., *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**, 227, 1989.
10. Leung, D. Y., Collins, T., Lapiere, L. A., Geha, R. S., and Pober, J. S., *J. Clin. Invest.* **77**, 1428, 1986.
11. Leung, D. Y., Geha, R. S., Newburger, J. W., Burns, J. C., Fiers, W., Lapiere, L. A., and Pober, J. S., *J. Exp. Med.* **164**, 1958, 1986.

12. Hochs, S., Schur, P. H., and Schwaber, J. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **27**, 28, 1983.
13. Nakamura, M., Burastero, S. E., Veki, Y., Larrick, J. W., Notkis, A. L., and Casali, P., *J. Immunol.* **141**, 4165, 1986.
14. Steinitz, M., Izak, G., Cohen, S., Ehrenfeld, E., and Flechner, I., *Nature* **287**, 443, 1980.
15. Zurawski, V. R., Haber, E., and Black, P. H., *Science* **199**, 1439, 1978.
16. Casali, P., Inghirami, G., Nakamura, M., Davies, T. F., and Notkins, A. B., *Science* **234**, 476, 1986.
17. Goossen, D., Champonier, F., Rouge, P., and Salmon, C., *J. Immunol. Methods* **101**, 193, 1987.
18. Lefvert, A. K., and Holm, G., *Scand. J. Immunol.* **26**, 573, 1978.
19. Churg, J., and Strauss, L., *Am. J. Pathol.* **27**, 277, 1951.
20. Boyum, A., *Nature* **204**, 793, 1964.
21. Steinitz, M., Klein, G., Koshimies, S., and Makel, O., *Nature* **269**, 420, 1977.
22. Tosato, G., Blaese, R. M., and Yarchoan, Y., *J. Immunol.* **135**, 959, 1985.
23. Jaffee, E. A., Nachman, R. L., Becher, C. G., and Minick, C. R., *J. Clin. Invest.* **52**, 274, 1973.
24. Gimbrone, M. A., Jr., *Prog. Pemo. Thromb.* **3**, 1, 1976.
25. Lassalle, P., Lagrou, C., Delneste, Y., Sanceau, J., Coll, J., Torpier, G., Wietzerbin, J., Stehelin, D., Tonnel, A. B., and Capron, A., *Eur. J. Immunol.* **22**, 425, 1992.
26. Pober, J. S., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., Lapierre, L. A., Fiers, W., and Gimbrone, M. A., Jr., *J. Immunol.* **136**, 1680, 1986.
27. Laemmli, U. K., *Nature* **227**, 680, 1970.
28. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350, 1979.
29. Tosato, G., Sehgal, K. B., May, L. T., Washington, O. C., Jones, K. D., and Pike, S. E., *Science* **239**, 502, 1988.
30. Tosato, G., Gerrard, T. L., Goldman, N. G., and Pike, S. E., *J. Immunol.* **140**, 4329, 1988.
31. Dustin, M. L., Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., and Springer, T. A., *J. Immunol.* **137**, 245, 1986.
32. Mantovani, A., and Dejana, E., *Immunol. Today* **10**, 370, 1989.
33. Figdor, C. G., Kooyk, Y., and Keizer, G. D., *Immunol. Today* **11**, 277, 1990.
34. Springer, T. A., *Nature* **346**, 425, 1990.
35. Martz, E., *Hum. Immunol.* **18**, 3, 1987.
36. Altman, D. M., Hogg, N., Trowsdale, J., and Wilkinson, D., *Nature* **338**, 512, 1989.
37. Haskard, D., Cavender, D., Beatty, P., Springer, P., and Ziff, M., *J. Immunol.* **137**, 2901, 1986.
38. Pals, S. T., den Otter, A., Miedema, F., Kabel, P., Keiser, G. D., Scheper, R. J., and Meijer, C. J. L. M., *J. Immunol.* **140**, 1851, 1988.
39. Koopman, G., Parmentier, H. K., Schuurman, H. J., Newman, W., Meijer, C. J. L. M., and Pals, S. T., *J. Exp. Med.* **173**, 1297, 1991.
40. Haskard, D. O., Strobel, S., Thornhill, M., Pitzalis, C., and Levinsky, R. J., *Immunology* **66**, 111, 1989.
41. Schwartz, B. R., Wayner, E. A., Carlos, T. M., Ochs, H. D., and Harlan, J. M., *J. Clin. Invest.* **85**, 2019, 1990.
42. Osborn, L., Hession, C., Tisard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R., *Cell* **59**, 1203, 1989.
43. Carlos, T. M., Schwartz, B. R., Kovach, N. L., Yee, E., Rosso, M., Osborn, L., Newman, B., Lobb, R., and Harlan, J. M., *Blood* **76**, 965, 1990.
44. Schleimer, R. P., Sterbinsky, S. A., Kaiser, J., Bickel, C. A., Klunk, D. A., Tomioka, K., Newman, W., Luscinskas, F. W., Gimbrone, M. A., Jr., McIntyre, B. W., and Bochner, B. S., *J. Immunol.* **148**, 1086, 1992.

V/ ANNEXE

Matériel et méthodes

Les principales techniques utilisées dans ce travail seront présentées dans l'ordre de leur apparition dans les sections résultats.

A/ Techniques utilisées dans la mise en évidence des anticorps anti-55 kD dans les asthmes non allergiques :

1) Culture de cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales sont issues du cordon ombilical humain (Jaffe *et al.*, 1973; Gimbrone *et al.*, 1974). Après cathétérisation, les cellules endothéliales sont détachées de la matrice sous-endothéliale par un traitement de 15 min avec une suspension de collagénase à 0,2 % en milieu RPMI. Les cellules sont lavées puis mises en culture dans des plaques de culture 6 puits dans le milieu de culture :

RPMI

20 % de sérum de veau foetal décomplémenté

2 mM L-glutamine

25 µg/ml de facteurs de croissance pour cellules endothéliales (sous la forme d'extraits hypophysaires de boeuf)

100 µg/ml d'héparine

100 U/ml de pénicilline

10 µg/ml de streptomycine.

Les cellules sont mises en culture dans une étuve à 37°C, 5 % de CO₂. Les cultures sont généralement confluentes après une semaine. Les cellules sont collectées par traitement à la trypsine à 0,5 % pendant 5 min à température ambiante.

2) Isolement des populations leucocytaires :

Le sang veineux est collecté par veniponction sur anticoagulant (calciparine). Le sang, dilué au demi dans le milieu RPMI, est centrifugé sur un coussin de Ficoll pendant 30 min., 1800g à température ambiante (Boyum, 1964).

Les cellules mononucléées sont récupérées à l'interface entre les Ficoll et le plasma, les granulocytes et les globules rouges sont collectés au fond du tube.

La suspension de granulocytes est diluée au demi dans le plasma et mise à sédimenter sur une solution de dextran à 3 % dans de l'eau physiologique (30 min. à 20°C, tube incliné à 45°). Le surnageant est centrifugé à 800g et les hématies contaminantes sont éliminées par choc hypotonique (NaCl à 0,5 % puis stabilisation avec NaCl à 1,5 %). Les cellules ne subissent pas plus de trois chocs hypotoniques.

Les lymphocytes T sont séparés des monocytes et des lymphocytes B (cellules présentatrices d'antigène ou CPAg) grâce à leur capacité à former des rosettes avec des globules rouges de mouton traités au 2-amino éthylisothiuronium bromide (AET). Les globules de mouton sont traités avec une solution d'AET à 3 mg dans 15 ml de milieu RPMI. Les cellules mononucléées sont ajustées à la concentration de 5×10^6 cellules/ml et mises en présence du même volume de globules rouges traités (5 ml de milieu RPMI pour 1 ml de globules rouges). La suspension leucocyte-globules rouges est incubée à 37°C pendant 15 minutes. Les deux populations cellulaires sont ensuite séparées par centrifugation sur coussin de Ficoll. Les lymphocytes T sont collectés au fond du tube, les CPAg sont collectées à l'interface entre le Ficoll et le milieu. Les érythrocytes de mouton sont éliminés par choc hypotonique. Les monocytes sont enrichis par adhérence (2 h) dans des plaques de culture 6 puits (à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml en milieu RPMI, 5 % de SVF; 2 ml par puits).

Les plaquettes sont isolées de sang veineux collecté sur citrate. Après une centrifugation à 500g, le plasma riche en plaquettes est centrifugé à 3500g; les plaquettes sont ensuite lavées dans un tampon contenant un anti-agrégant (PGE2 0,05 U/ml).

3) Préparation des extraits antigéniques cellulaires :

Les cellules sont lysées dans un tampon (Tris HCl 10 mM, pH 6,8) additionné de 0,5 % de Nonidet P40 et d'inhibiteurs protéasiques (aprotinine) (1 %), pendant 20 min à 4°C.

Les extraits antigéniques de cellules nucléées sont préparés à la concentration de $200 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les noyaux sont éliminés par centrifugation à 1500g pendant 10 min à 4°C.

La quantité de protéine des préparations antigéniques de plaquettes et d'hématies est déterminé par un dosage colorimétrique (coloration au biuret). La concentration protéique est ajustée à 1 mg/ml dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4 (PBS).

3) *L'électrophorèse monodimensionnelle :*

La technique utilisée dérive de celle décrite par Towbin (1976). Brièvement, nous utilisons le système des gels discontinus : les gels sont coulés dans un support pour électrophorèse monodimensionnelle :

- minicuve entre une plaque d'alumine et une plaque de verre
- grande cuve entre deux plaques de verre.

Les solutions d'acrylamide sont préparées de la façon suivante :

- un gel de séparation de 8 ou 10 % d'acrylamide en tampon (Tris HCl 0,375 M, pH 8,8, sodium dodecyl sulfate 0,1 %) (10 ml pour un minigel; 30 ml pour un grand gel)

- un gel de séparation de 5 % d'acrylamide préparé dans le tampon (Tris HCl 0,12 M, pH 6,8, sodium dodecyl sulfate 0,1 %) (15 ml pour un grand gel, 5 ml pour un minigel).

La solution du gel de séparation est coulée jusqu'au 2/3 de la cuve. Après polymérisation, le gel de concentration est coulé par dessus. La polymérisation s'effectue par adjonction extemporanément d'une solution de persulfate (10 mg/ml) et de TEMED aux solutions d'acrylamide.

Les extraits antigéniques sont dilués au demi dans le tampon d'échantillon Tris HCl 0,0625 M, sodium dodecyl sulfate 0,3 %, sucrose 10 % et bleu de bromophénol 0,005 %. L'anode et la cathode baignent dans le tampon d'électrophorèse Tris HCl 0,025 M, glycine 0,192 M, sodium dodecyl sulfate 0,1 %, pH 8,3. Les échantillons sont soumis à une migration sous un champ électrique continu de 30 mA.

4) *L'électrophorèse bidimensionnelle :*

Les échantillons sont repris dans le tampon échantillon sans sodium dodecyl sulfate, contenant du dithiotréitol et du β -mercaptoéthanol.. La migration s'effectue en gel de polyacrylamide 27 % (coulé dans des capillaires de 1,5 mm de diamètre) contenant de l'urée et des ampholines de pH 3,5 à 8,0 (Garrels, 1979). La migration s'effectue de la façon suivante:

- une migration sous une tension d'un total de 9000 volts sur une durée d'environ 10h,
- une migration sous une tension de 1000 volts pendant une heure.

Les gels sont ensuite sortis des capillaires et équilibrés pendant 10 min dans un tampon contenant du sodium dodecyl sulfate (Tris HCl 10 mM, pH 8,8; SDS 25 mM). Les gels sont ensuite déposés au sommet d'un gel de polyacrylamide à 13 % pour la deuxième dimension. Les conditions d'électrophorèse sont identiques à celles décrites précédemment. Les gels sont ensuite colorés (bleu de Coomassie ou nitrate d'argent) soit soumis à un électrotransfert sur nitrocellulose (technique des immunoempreintes).

5) *La technique des immunoempreintes :*

Cette technique dérive de celle décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Le gel de polyacrylamide est déposé sur une membrane de nitrocellulose de porosité 45 μm , le tout étant entouré de papier Whatman 3. Les protéines sont ensuite transférées sous l'action d'un champ électrique dans le tampon (Tris HCl 0,02 M, glycine 0,15 M, 20 % de méthanol) (240 mA pendant trois heures). La membrane est ensuite saturée par une solution de lait à 5 % en PBS (30 min sous agitation constante). La membrane est abondamment lavée avant utilisation.

Les sérums humains à étudier sont incubés une nuit à 4°C sous agitation à la dilution de 1/100. Les membranes sont ensuite lavées en PBS. La détection des anticorps s'effectue avec des anticorps anti-immunoglobulines humaines couplées à la peroxydase (dirigés contre les isotypes voulus) à la dilution de 1/500 pendant 3 h à température ambiante. Après lavage, la détection des anticorps s'effectue avec le substrat 4 chloro 1-naphtol en présence de H_2O_2 (40 mg de substrat dissout dans 10 ml de méthano froid; la solution est complétée à 50 ml avec du PBS à 37 °C à laquelle est ajoutée 50 μl d' H_2O_2).

6) *Technique de transformation lymphoblastique :*

Les antigènes de cellule endothéliale sont séparés par électrophorèse monodimensionnelle puis transférés sur nitrocellulose. L'antigène de 55 kD est localisé par un sérum de patient présentant des anticorps anti-55 kD. La bandelette de nitrocellulose correspondant au poids de 55 kD est découpée et dissoute dans 200 μl de diméthylsulfoxyde pendant 1h à température ambiante. Les particules de nitrocellulose sont précipitées par 200 μl de tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M, pH 9,6 pendant 30 min à température ambiante. Elles sont centrifugées à 10000g, lavées puis remises en suspension dans le milieu de culture (RPMI contenant 5 % de sérum de veau foetal cdécomplémenté et 2 mM de L-glutamine) (Abou-Zeid *et al.*, 1987).

$10 \cdot 10^6$ cellules mononucléées sont incubées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de concanavaline A pendant 24h dans des plaques de culture 6 puits (2ml par puits). Les cellules non adhérentes sont abondamment lavées et remises en suspension dans le milieu de culture. Elles sont ensuite réparties en plaques de culture 96 puits à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits sous un volume de 100 μl . La suspension particulière est ajoutée sous un volume de 100 μl . La prolifération cellulaire est appréciée à trois jours par incorporation de ^3H -thymidine.

7) Préparation des colonnes d'immunoabsorption :

Les sérums de patients sont dilués au quart dans un tampon Tris HCl pH 4,0. Les protéines non immunoglobuliniques sont précipitées par addition de 50 μ l d'acide caprilique et éliminées par centrifugation à 1500g pendant 20 min à 20 °C. Les immunoglobulines sont précipitées par addition au surnageant de sulfate d'ammonium (0,237 mg par ml de surnageant). Après une incubation d'une heure à 4°C, la fraction riche en immunoglobulines est récupérée par centrifugation (12000g pendant 30 min. à 4°C). Après dialyse contre de l'eau, cette fraction est fixée sur une colonne de Sépharose par couplage au bromure de cyanogène selon les instructions du fabricant (Pharmacia).

8) Construction de banques d'ADN complémentaire :

Les détails techniques concernant la construction de banques d'ADN complémentaire (ADNc) sont disponibles dans l'ouvrage *Molecular cloning a laboratory manual*, édité par J. Sambrook, E.F. Fritsch et T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Brièvement, les ARN sont purifiés des cellules endothéliales après lyse dans un tampon au thiocyanate de guanidium et ultracentrifugation sur coussin de chlorure de caesium.

Les ARNm sont purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne oligo-dT. Ils sont ensuite transcrits inversement en ADNc monobrin par l'enzyme transcriptase inverse. L'ADNc monobrin est dupliqué en ADNc double brin par l'enzyme ADN polymérase.

Les brins d'ADNc double brin sont flanqués d'adapteurs :

- EcoRI du côté 5',
- XhoI du côté 3'.

Ce système permet une intégration orientée des ADNc dans le vecteur phagique λ ZAP II (Stratagène) (dans ce cas, les chances d'obtenir des clones dans le bon cadre de lecture est de 1/3).

Les bactéries *Escherichia coli* (souche BB4) sont ensuite infectées par les phages. Les bactéries sont incluses dans une gélose d'agar à 3 pour 1000 et cultivées pendant une nuit à 37°C. L'expression des protéines phagiques est induite par le sucre isopropyl β -thiogalactoside (10 mM en H₂O). Une réplique des boîtes de culture est faite sur une membrane de nitrocellulose. Ces membranes sont ensuite saturées par une solution de lait à 5 % dans du PBS puis lavées. Ces membranes sont ensuite incubées avec les sérums humains ou animaux (1/100 en PBS) préalablement épuisés en anticorps anti-*Escherichia coli* (l'épuisement s'effectue par passage sur des colonnes d'antigènes de bactéries *Escherichia coli* fixés sur des billes de Sépharose; les antigènes sont obtenus par sonication 4 x 10 sec de suspensions bactériennes en phase logarithmique de croissance (DO de 0,6

à 600 nm)). Les anticorps fixés sont détectés par des anticorps anti-IgG humaines ou anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase.

B/ Techniques utilisées dans l'étude de l'activation de la cellule endothéliale par l'histamine :

Les cellules endothéliales sont collectées comme décrit précédemment et cultivées en plaques de culture 96 puits préalablement gélatinées (100 µl par puits d'une solution de gélatine à 0,5 % en milieu RPMI; la saturation des plaques s'effectue pendant deux heures à 37°C). Seules les cellules endothéliales au second passage sont utilisées dans ces manipulations. La confluence est atteinte en 4 à 6 jours. Les milieux de culture sont changés avant toute nouvelle expérience.

L'histamine et le TNF α sont mis en suspension dans le milieu RPMI. Les solutions concentrées d'histamine sont conservées à -80°C et utilisées dans le mois. Les solutions concentrées de TNF α sont conservées à -80°C.

Les cellules endothéliales sont incubées pour des périodes de 2, 4, 6, 12 et 24h avec différentes concentrations d'histamine. Les surnageants de culture sont collectés et conservés à -20°C pour le dosage des interleukines; les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde à 0,05 % en PBS pour l'évaluation de l'expression des molécules d'adhésion (après deux lavages en PBS à 37 °C, la fixation s'effectue pendant 10 min à 4°C).

L'inhibition de la production d'interleukines est évaluée par prétraitement des cellules avec les antagonistes des récepteurs H1 et H2 2h avant addition de l'histamine. Les antagonistes sont préparés en milieu RPMI. Les solutions sont conservées à -80°C et utilisées dans le mois. Les surnageants de culture sont prélevés à 6h d'incubation.

1) Dosage des interleukines :

L'IL-6 produite par les cellules endothéliales est évaluée par un dosage biologique à l'aide de la lignée 7TD1 (lignée dont la prolifération est dépendante de l'IL-6) (Van Snick *et al.*, 1986). Les cellules 7TD1 sont incubées avec des séries de dilutions des surnageants de culture de cellules endothéliales dans des plaques de culture 96 puits. La prolifération des cellules 7TD1 est appréciée par une méthode colorimétrique. Une solution à 4 mg/ml de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)2,5-diphényl-tétrazolium bromide (MTT) à la dilution finale de 10 % est ajoutée à 4 jours. Après 4h, les surnageants sont enlevés et le précipité remis en suspension dans 0,2 ml de la solution 0,04 N HCl/isopropanol. Les densités optiques sont lues à 570 nm. Tous les dosages sont effectués en double. La concentration en IL-6 est évaluée par comparaison avec une courbe standard réalisée avec de l'IL-6

humaine recombinante. La spécificité du test est vérifiée en inhibant la prolifération par addition d'anticorps neutralisants anti-IL-6 aux surnageants. L'inhibition de la prolifération est toujours supérieure à 90 %. Les résultats sont exprimés en U/ml.

L'IL-8 est dosée par un test ELISA (R&D Systems) selon les recommandations du fabricant. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/ml}$.

2) Evaluation de l'expression des molécules d'adhésion :

La modulation d'expression des molécules d'adhésion est évaluée par un test ELISA sur cellules fixées. Après la fixation par la glutaraldéhyde, les plaques sont saturées une nuit à 4°C en présence du tampon PBS/0,1 % de sérum albumine bovine/5 mM EDTA. Après lavages avec le même tampon, les plaques sont incubées une heure à température ambiante avec 100 μl /puits d'anticorps monoclonaux anti-molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine ou P-sélectine) à la concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Après 4 lavages en tampon PBS/BSA/EDTA, le deuxième anticorps est ajouté (100 μl d'anti-IgG de souris marqué à la peroxydase à la concentration de 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Après quatre lavages en tampon PBS/BSA/EDTA et deux lavages en PBS seul, les anticorps fixés sont détectés par le substrat o-phénylène diamine en présence de H_2O_2 (15 mg de substrat dissous dans 25 ml de tampon citrate 0,1 M, pH 5,5, avec 25 μl d' H_2O_2 ajoutés extemporanément). La coloration est stoppée par 100 μl /puits d'acide chlorhydrique 4 N. La densité optique est lue à 492 nm et les résultats sont exprimés en valeurs de densité optique. Toutes les analyses sont effectuées en triple.

Le témoin positif de l'induction d'expression des molécules d'adhésion est le $\text{TNF}\alpha$ à la concentration de 200 U/ml.

c/ Techniques utilisées dans l'étude des coopération cellules endothéliales/lymphocytes T :

1) Activation des lymphocytes T :

Les CPAg sont mises en culture pendant 4h dans des tubes en polypropylène à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml, 1 ml par tube, à 37°C, 5 % de CO_2 , avec les allergènes :

- extrait de *Dermatophagoides pteronyssinus* à raison de 10 IR/ml (quantification basée sur leur réactivité en tests cutanés, codification du laboratoire des Stallergènes),

- le pollen de graminées (10 IR/ml),

- le venin d'hyménoptère (10^{-4} $\mu\text{g/ml}$).

Après cette activation, les CPAg sont fixées par la paraformaldéhyde à 1 % en milieu RPMI pendant 20 min à 37°C. Après lavages en milieu RPMI, les cellules sont incubées une nuit dans le milieu de culture RPMI, 5 % de sérum de veau foetal décomplémenté.

Les lymphocytes T sont mis en culture avec les CPAg autologues à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules/ml avec $0,5 \cdot 10^6$ CPAg, dans des plaques de culture 24 puits, 1 ml par puits. Les cultures durent 24, 48 et 72 heures. Les surnageants sont collectés et congelés à -80°C.

2) Activation des cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales, cultivées en plaques 96 puits gélatinées, sont incubées 6h avec les surnageants de culture de lymphocytes (ajoutés à la dilution finale de 1/4 dans le milieu de culture pour cellules endothéliales, 100 μ l par puits). Les surnageants de culture sont récupérés pour le dosage des interleukines produites, et les cellules fixées par la glutaraldéhyde pour l'évaluation de la modulation d'expression des molécules d'adhésion.

Le dosage de l'IL-6 et l'évaluation d'expression des molécules d'adhésion s'effectuent comme décrit précédemment.

Les témoins d'activation de l'expression de la molécule VCAM-1 sont le TNF α à la concentration de 200 U/ml et l'IL-4 à la concentration de 200 U/ml. Le témoin d'induction de l'expression d'IL-6 est le TNF α à la concentration de 200 U/ml.

3) Dosage du TNF α :

Le TNF α est dosé dans les surnageants de culture de lymphocytes T + CPAg avant activation des cellules endothéliales. La concentration en TNF α est évaluée par un test de cytotoxicité pour la lignée fibroblastique murine L929. L'activité biologique est déterminée comme la quantité de TNF α nécessaire pour tuer en 18 h 50 % de L929 traitées à l'actinomycine D. Les concentrations sont définies à partir d'une courbe standard réalisée pour chaque expérience avec du TNF α humain recombinant. La spécificité du test est contrôlée par l'inhibition de la mort cellulaire par addition d'anticorps neutralisant anti-TNF α . Dans tous les cas, l'addition de l'anticorps induit une inhibition supérieure à 90 %.

4) *Quantification de l'IL-4 et de l'IFN γ* :

L'IL-4 et l'IFN γ sont dosés dans les surnageants de lymphocytes T activés et non activés par des tests ELISA spécifiques (Genzyme) selon les instructions du fabricant. Les résultats sont exprimés en pg/ml.

5) *Tests statistiques :*

L'analyse statistique est réalisée avec les tests de Wilcoxon et de Mann Whitney.

BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Zeid, C., Filley, E., Steele, J., and Rook, G.A.W. 1987. A simple method for using antigens separated by polyacrylamid gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands cut from Western blots into antigen-bearing particles. *J. Immun. Meth.* 98 : 5.
- Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A., and Newman, P.J. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J. Cell. Biol.* 5 : 1059.
- Albina, J.E., Abate, J.A., and Henry, W.L. 1991. Nitric oxide production is required for murine resident preitoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T-cell proliferation. Role of IFN- γ in the induction of nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol.* 147 : 144.
- Allegra, L., Abraham, W.M., Chapman, G.A., and Wanner, A. 1983. Duration of mucociliary dysfunction following allergen challenge in allergic sheep. *J. Appl. Physiol.* 55 : 726.
- Allen, R.D. 1975. Evidence for firm linkages between microtubules and membrane-bound vesicles. *J. Cell. Biol.* 64 : 497.
- Ambrus, C.M., Ambrus, J.L., Johnson, G.C., Packman, E.W., Chernick, W.S., Back, A.N., and Harrison, J.W.E. 1954 Role of the lung in the regulation of the white blood cell levels. *Am. J. Physiol.* 178 : 34.
- Ameisen, J-C., Capron, A., Joseph, M., Maclouf, F.J., Vorng, H., Pancré, V., Fournier, E. Walleart, B., and Tonnel, A.B. 1985. Aspirin-sensitive asthma : abnormal platelet response to drug inducing asthmatic attacks. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 78 : 438.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H., Nakanishi, S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 348 : 730.
- Ausprunk, D.H., and Folkman, J. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14 : 53.
- Ayars, G.H., Altman, L.C., Gleich, G.J., Loegering, D.A., and Baker, C.B. 1985. Eosinophil and eosinophil granule-mediated pneumocyte injury. *J. Allergy Clin. Immunol.* 76 : 595.
- Azzawi, M., Bradley, B., Jeffery, P.K., Frew, A.J., Wardlaw, A.J., Knowles, G., Assoufi, B., Collins, J.V., Durham, S., and Kay, A.B. 1990. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142 : 1407.
- Baggiolini, M., Walz, A., and Kunkel, S.L. 1989. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 84 : 1045.
- Bailly, S., Ferrua, B., Fay, M., and Gougéro-Pacidalo, M-A. 1990. Paraformaldehyde fixation of LPS-stimulated human monocytes: technical parameters permitting the study of membrane IL-1 activity. *Eur. Cytokine. Netw.* 1 : 47.
- Barnes, P.J. 1987. The changing face of asthma. *Q. J. Med.* 241 : 359.

- Barnes, P.J., Chung, K.F., and Page, C.P. 1988. Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81 : 919.
- Barnes, P.J., and Ichinose, M. 1989. H3 receptors in airways. *Trends Pharmacol. Sci.* 10 : 264.
- Baumgartner, H.R., and Muggli, R. 1976. Adhesion and aggregation: morphological demonstration and quantification in vivo and in vitro. Dans *Platelets in biology and pathology*. Edité par J.L. Gordon, Elsevier, Amsterdam, 23.
- Bealey, R., Roche, W.R., Roberts, J.A., and Holgate, S.T. 1989. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139 : 806.
- Becker, C.G., Hardy, A.M., and Dubin, T. 1975. Contractile and relaxing proteins of smooth muscle, endothelial cells and platelets. *Thrombosis and Diathesis Haemorrhagica*, Supp. 60 : 25.
- Bentley, A.M., Menz, G., Storz, C., Robinson, D.S., Bradley B., Jeffery, P.K., Durham, S.R., and Kay, A.B. 1992. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 : 500.
- Berg, E.L., Robinson, M.K., Warnock, R.A., and Butcher, E.C. 1991. The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor. *J. Cell Biol.* 114 : 343.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Majeau, G.R., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. 1984. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 160 : 618.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. Jr. 1985. Interleukin-1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J. Clin. Invest.* 76 : 2003.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., and Gimbrone, M.A. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 9238.
- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., and Seed, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complementary regulatory proteins and lectins. *Science.* 243 : 1160.
- Bevilacqua, M.P., Butcher, E., Furie, B. et al. 1991. Selectins: a family of adhesion molecules. *Cell.* 67 : 223.
- Bierman, S.A., Kelly, K.H., Cordes, F.L., Byron, R.L., Polhemus, J.A., and Rappart, S. 1952. The release of leukocytes and platelets from the pulmonary circulation by epinephrine. *Blood.* 7: 683.
- Blose, S.H. 1981. The distribution of 10 nm filaments and microtubules in endothelial cells during mitosis; double-label immunofluorescence study. *Cell Motility.* 1 : 417.
- Booij-Noord, H., deVries, K., Sluiter, H.J., and Orie, N.G. 1972. Late bronchial obstructive reaction to experimental inhalation of house dust mite extract. *Clin. Allergy* 2 : 43.

- Born, G.V.R. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 194 : 927.
- Born, G.V.R., and Kratzer, M.A.A. 1984. Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man. *J. Physiol.* 354 : 419.
- Bornstein, P., McPherson, J., and Sage, H. 1982. Synthesis and secretion of structural macromolecules by endothelial cells in culture. Dans *Pathobiology of the endothelial cell*. Edité par H.L. Nossel et H.J. Vogel. Academic Press. New York, pp 215-228.
- Bothner, H., and Wik, O. 1987. Rheology of hyaluronate. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 442 : 25.
- Boulanger, C., and Lüscher, T.F. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 85 : 587.
- Boushey, H.A., Holtzman, M.J., Sheller, J.R., and Nadel, J.A. 1980. Bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121 : 389.
- Boyum, A. 1964. Separation of white blood cells. *Nature*. 204 : 793.
- Bradding, P., Feather, I.H., Howarth, P.H., Mueller, R., Roberts, J.A., Britten, K., Bews, J.P.A., Hunt, T.C., Okayama, Y., Heusser, C.H., Bullock, G.R., Church, M.K., and Holgate, S.T. 1992. Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *J. Exp. Med.* 176 : 1381.
- Brandley, B.K., Swiedler, S.J., and Robbins, P.W. 1990. Carbohydrate ligands of the LEC cell adhesion molecule. *Cell*. 63 : 861.
- Brewster, C.E., Howarth, P.H., Djukanovic, R., and Roche, W.R. 1990. Myofibroblasts in bronchial asthma are responsible for "basement membrane" thickening in bronchial asthma (abstract). *J. Pathol.* 160 : 153.
- Briscoe, D.M., Cotran, R.S., and Pober, J.S. 1992. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. *J. Immunol.* 149: 2954.
- Brogan, T.D., Ryley, H.C., Neale, L., and Yass, J. 1975. Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma and bronchitis. *Thorax*. 30 : 72.
- Bull, H.A., Courtney, P.F., Rustin, M.H.A., and Dowd, P.M. 1992. Characterization of histamine receptor sub-types regulating prostacyclin release from human endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 107 : 276.
- Bundgaard, M., Frojkaer-Jensen, J., and Crone, C. 1979. Endothelial plasmalemmal vesicular profiles as elements in a system of branching interdigitating invagination from the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 76 : 6439.
- Burnstock, G. 1979. Past and current evidence for the purinergic nerve hypothesis. Dans *Physiological and regulator functions for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*. Edité par R.W. Straub et L. Bolis. New York, Raven Press? pp 3-32.
- Burrows, B., Martinez, F.D., Halonen, M., Barbee, R.A., and Cline, M.G. 1989. Association of asthma with serum IgE levels and skin test reactivity to allergens. *N. Eng. J. Med.* 320 : 271.

- Bussolino, F., Wang, J.M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C-J, Aglietta, M., Arese, P., and Mantovani, A. 1989. Granulocyte- and Granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*. 337 : 471.
- Butcher, E.C. 1990. Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Am. J. Pathol.* 136 : 3.
- Cade, C., Ilozue, V., Rubanyi, G.M., and Parker-Bothelo, L.H. 1990. Smooth muscle cells release a diffusible factor responsible for decreasing big endothelin and endothelin produced produced by cultured endothelial cells. *J. Vasc. Med. Biol.* 2 : 174.
- Calderon, E., and Lockey, R.F.. 1992. A possible role for adhesion molecules in asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 90: 852.
- Callera, M.L., Condemi, J.J., Bohrod, M.G., and Vaughan, J.H. 1971. Immunological reactions of bronchial tissue in asthma. *N. Engl. J. Med.* 284 : 459.
- Camiolo, S.M., Thorsen, S., and Astrup, T. 1971. Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin, and plasmin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138 : 277.
- Capron, M., Capron, A., Dessaint, J.P., Torpier, G., Johansson, S.G.O., and Prin, L. 1981. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *J. Immunol.* 126 : 2087.
- Capron, M., and Tonnel, A.B. 1991. Participation of Fc epsilon RII-positive macrophages and eosinophils in asthma. Dans *Asthma, its pathology and treatment*. Edité par M.A. Kaliner, P.J. Barnes et C.G.A. Persson. New York, Marcel Dekker, pp 457-502.
- Casale, T. B., Wood, D., Richerson, H.B., Trapp S., Metzger, W.J., Zavala, D., and Hunninghake, G. 1987. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with metacholine bronchial hyperresponsiveness. *J. Clin. Invest.* 79 :1197.
- Castellot, J.J., Karnovski, M.J., and Spiegelman, B.M. 1980. Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 6007.
- Cavanah, D.K., and Casale T.B. 1993. Histamine. In "*The mast cell in health and disease*" Edité by M.A. Kaliner and D.D. Metcalfe, Marcel Decker, Inc. 321.
- Chan, T.K., and Chan, V. 1981. Antithrombin III, the major modulator of intravascular coagulation, is synthesized by human endothelial cells. *Thromb. Haemostasis.* 46 : 504.
- Charlesworth, E.N., Hood, A.F., Soter, N.A., Kagey-Sobotka, A., Norman, P.S., and Lichtenstein, L.M. 1989. Cutaneous late-phase responses to allergen. Mediator release and inflammatory cell infiltration. *J. Clin. Invest.* 83 : 1519.
- Churg, J., and Strauss, L. 1951. Allergic granulomatosis allergic angiitis and periarteritis nodosa. *Am. J. Pathol.* 27 : 277.
- Cines, D.E., Lyss, A.P., Reeber, M., Bina, M., and Dehoratius, J. 1984. Presence of complement-fixing anti-endothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 73 : 611.
- Cines, D.B., van der Keyl, H., and Levinson, A.I. 1986. In vitro binding of an IgE protein to human platelets. *J. Immunol.* 136 : 3433.

- Claude, P., and Goodenough, D.A. 1973. Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J. Cell. Biol.* 58 : 390.
- Cloix, J.F., Colard, O., Rothhut, B., and Russo-Marie, F. 1983. Characterization and partial purification of rencortin: two polypeptides formed in renal cells causing the anti-phospholipase-like action of glucorticoids. *Br. J. Pharmacol.* 79 : 313.
- Clowes, A.W., and Karnovsky, M.J. 1977. Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature.* 265 : 625.
- Cohen, DC., Massoglia, S.L., and Gospdarowicz, D. 1982. Correlation between two effects of high density lipoprotein on vascular endothelial cells. *J. Cell. Chem.* 257 : 9429.
- Colucci, M., Balconi, G., Lorenzet, R., Pietra, A., Locati, D., Donati, M.B., and Semeraro, N. 1983. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J. Clin. Invest.* 71 : 1893.
- Cooper, D.R., Lewis, G.P., Lieberman, G.E., Webb, H., and Westwick, J. 1979. ADP metabolism in vascular tissue, a possible thromboregulatory mechanism. *Thrombosis Res.* 14 : 901.
- Corrigan, C.J., Hartnell, A., and Kay, A.B. 1988. T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet.* 1 : 1129.
- Corrigan, C.J., and Kay, A.B. 1991. CD4 lymphocyte-T activation in acute severe asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 94 : 248.
- Corrigan, C.J. 1992. Allergy of the respiratory tract. *Cur. Opin. Immunol.* 4 : 798.
- Corrigan, C.J., and Kay, A.B. 1992. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol Today* 13 : 501.
- Crutchley, D.J., Conanan, L.B., and Ryan, U.S. 1985. Endotoxin induction of a plasminogen activator inhibitor in bovine pulmonary endothelium. *Fed. Proc.* 44 : 1844.
- Crutchley, D.J. 1987 Hemostatic potential of the pulmonary endothelium. Dans *Pulmonary endothelium in health and disease*. Edité par U.S. Ryan, Marcel Dekker, Inc, New York, p 237.
- Curry, F.E., and Michel, C.C. 1980. A fiber matrix model of capillary permeability. *Microvasc. Res.* 20 : 96.
- Curry, F.E. 1984. Mechanics and thermodynamics of transcapillary exchange. Dans *Handbook of Physiology Section 2, the cardiovascular system Vol IV : Microcirculation*, Bethesda: American Physiological Society, édité par E.M. Renkin et C.C. Michel. pp 309-374.
- Davies, P.F., and Bowyer, D.E. 1975. Scanning electron microscopy of arterial endothelial cells after fixation at physiological pressure. *Atherosclerosis.* 21 : 463.
- Davies, P., Burke, G., and Reid, L. 1986. The structure of the wall of the rat intraacinar pulmonary artery: an electron microscopic study of microdissected preparations. *Microvasc. Res.* 32 : 50.

- Dang, L.H., Michaklek, M.T., Takei, F., Benaceraff, B., and Rock, K.L. 1990. Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *J. Immunol.* 144 : 4082.
- deFougerolles, A.R., and Springer, T.A. 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175 : 185.
- Delneste, Y., Lassalle, P., Jeannin, P., Mannessier, L., Dessaint, J.-P., Joseph, M., and Tonnel, A.B. 1993. Production of anti-endothelial cell antibodies by coculture of EBV-infected human B cells with endothelial cells. *Cell. Immunol.* 150 : 15.
- deMonchy, J.G.R., Kauffman, H.F., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., Sleuter, H.J., and deVries, K. 1985. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 : 373.
- DeNucci, G., Thomas, R., D'Orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T.D., and Vane, J.R. 1988. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 9797.
- DeVries, J.E., Gauchat, J.F., Aversa, G.C., Punnonen, J., Gascan, J., and Hyssel, G. 1991. Regulation of IgE synthesis by cytokines. *Cur. Opin. Immunol.* 3 : 851.
- DeWitt, D.L., and Smith, W.L. 1983. Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 258 : 3285.
- Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., and Srinivasan, S. 1990. Macrophage deactivation factor and transforming growth factor- β -1, -2 and -3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon- γ . *J. Immunol.* 145 : 940.
- Di Rosa, M., Radomski, M., Carnuccio, R., and Moncada, S. 1990. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 : 1246.
- Djukanovic, R., Roche, W.R., Wilson, J.W., Beasley, C.R.W., Twentyman, O.P., Howarth, P.H., and Holgate, S.T. 1990. Mucosal inflammation in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142 : 434.
- Dolowitz, D.A., and Dougherty, T.F. 1965. The use of heparin in the control of allergies. *Ann. Allergy* 23 : 309.
- Downing, M.R., Bloom, J.W., and Mann, K.G. 1978. Comparison of the inhibition of thrombin by three plasma protease inhibitors. *Biochemistry* 17 : 2649.
- Duckles, S.P., and Garcia-Villalon, L. 1990. Characterization of vascular muscarinic receptors: rabbit ear artery and bovine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253 : 608.
- Dunnill, M.S. 1960. The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J. Clin. Pathol.* 13 : 27.
- Dunnill, M.S., Massarella, G.R., and Anderson, J.A. 1969. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmaticus, in chronic bronchitis and in emphysema. *Thorax.* 24 : 176.

- Dunnill, M.S. 1982. *Pulmonary pathology*. Edinburgh/London/Melbourne/New York, Churchill Livingstone.
- Durham, S.R., Dawes, J., and Kay, A.B. 1985. Platelets in asthma. *Lancet*. 2 : 36.
- Dustin, P. 1978. *Microtubules*. Springer-Verlag, New York.
- Dustin M.L., Staunton, D.E., and Springer, T.A. 1988. Supergene families meet the immune system. *Immun. Today*. 9 : 213.
- Dustin, P., and Springer, T.A. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9 : 27.
- Dvorak, A.M., Dvorak, H.F., Peters, S.P., Schulman, E.S., MacGlashan, D.W., Pyne, K., Harvey, V.S., Galli, S.J., and Lichtenstein, L.M. 1983. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J. Immunol.* 131 : 2965.
- Egesten, A., Alumets, J., von Mecklenburg, C., Palmegren, M., and Olsson, I. 1986. Localization of eosinophil cationic protein, major basic protein, and eosinophil peroxydase in human eosinophils by immunoelectron microscopic technique. *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 1399.
- Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*. 60 : 577.
- Emmelin, N., and Feldberg, W. 1948. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br. J. Pharmacol.* 3 : 273.
- Engerman, R.L., Pfaffenbach, D., and Davis, M.D. 1967. Cell turnover of capillaries. *Lab. Invest.* 17 : 738.
- Evans, T.W., Chung, K.F., Rogers, D.F., and Barnes, P.J. 1987. Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 63 : 479.
- Falus A., and Meterey, K. 1990. Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions. *Immunology today* 13 :154.
- Feinmark, S.J., and Cannon, P.J. 1986. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 261 : 16466.
- Fenselau, A., Kaiser, D., and Wallis, K. 1981. Nucleoside requirements for the in vitro growth of bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 108 : 375.
- Fishman, J.A., Ryan, G.B., and Karnovsky, M.J. 1975. Endothelial regeneration in the rat carotid therapy and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab. Invest.* 32 : 339.
- Folkman, J. 1974. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 19 : 331.
- Forstner, J.F., Jabbal, I., Findlay, B.P., Forstner, G.G. 1977. Interaction of mucins with calcium, H⁺ ion and albumin. *Mod. Probl. Paediatr.* 19 : 54.

- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M., and Weber, K. 1978. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 : 5034.
- Fraser, R.A., Ellis, M., and Stalker, A.L. 1979. Experimental angiogenesis in the chorioallantoic membrane. Dans *Current Advances in Basic and Clinical Microcirculatory research*. Edité par D.H. Lewis, S. Karger, Basel, 25.
- Frew, A.J., and Kay, A.B. 1988. The relationship between infiltrating CD4+ lymphocytes, activated eosinophils and the magnitude of the allergen-induced late phase cutaneous reaction. *J. Immunol.* 141 : 4158.
- Friedman, M.M., and Kaliner, M.A. 1987. Mast cells and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 : 157.
- Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, G.O., Farrow, G.M., and Gleich, G.J. 1981. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* 56 : 345.
- Frigas, E., and Gleich, G.J. 1986. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77 : 527.
- Frokjaer-Jensen, J. 1984. The plasmalemmal vesicular system in striated muscle arteries and in pericytes. *Tissue Cell.* 16 : 31.
- Fuller, R.W., Morris, P.K., Richmond, R., Sykes, D., Varndell, I.M., Kemeny, D.M., Cole, P.J., Doller, C.T., and MacDermot, J. 1986. Immunoglobulin E-dependent stimulation of human alveolar macrophages: significance in type I hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.* 65 : 416.
- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288
- Galdal, K.S., Lyberg, T., Evensen, S.A., Nilsen, E., and Prydz, H. 1985. Thrombin induces thromboplastin synthesis in cultured vascular endothelial cells. *Thromb. Haemostasis* 54 : 373.
- Gagnon, R., Akoum, A., and Hebert, J. 1993. *Lol p* I-induced IL-4 and IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells in atopic and nonatopic subjects during and out of the pollen season. *J. Allergy Clin. Immunol.* 91 : 950.
- Galli S.J., Gordon, J.R., and Wershil, B.K. 1991. Cytokine production by mast cells and basophils. *Current opinion in immunology* 3 1 : 865.
- Gamble, J.R., Khew-Goodall, Y., and Vadas, M.A. 1993. Transforming growth factor- β inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J. Immunol.* 150 : 4494.
- Garcia-Leme, J. 1978. Bradykinin system. Dans *Handbook of experimental pharmacology*, vol 50. Inflammation. Edité par J.R. Vane, et S.H. Ferreira. Berlin, Springer-Verlag, pp; 464-522.
- Garland, C.J., and Keatinge, W.R. 1982. Constrictor actions of acetylcholine, 5-hydroxytryptamine and histamine on bovine coronary artery inner and outer muscle. *J. Physiol.* 327 : 363.
- Garrels, J.I. 1979. Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *J. Biol. Chem.* 254 : 7961.

- Gauldi, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., and Baumann, H. 1987. Interferon β 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 7251.
- Gehr, P., Bachofen, M., and Weibel, R.E., 1978. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir. Physiol.* 32 : 121.
- Geng, J-G., Bevilacqua, M.P., and Moore, K.L. 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature.* 343 : 757.
- Gerblich, A.A., Campbell, A.E., and Schuyler, M.R. 1984. Changes in T lymphocyte subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N. Engl. J. Med.* 310 : 1349.
- Ghitescu, L., Fixman, A. Simionescu, M., and Simionescu, N. 1986. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* 102 : 1304.
- Gimbrone, M.A. 1976. Culture of vascular endothelium. *Prog. Pemostr. Thromb.* 3:12.
- Gimbrone, M.A., Cotran, R.S., and Folkman, J. 1974. Human vascular endothelial cells in culture. *J. Cell. Biol.* 60 : 673.
- Gleich, C.J., and Adolphson, C.R. 1986. The eosinophilic leukocyte. *Adv. Immunol.* 39 : 177.
- Gleich, G.J., Flavahan, N.A., Fujisawa, T., and Vanhoutte, P.M. 1988. The eosinophil as a mediator of damage to respiratory epithelium: a model for bronchial hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 81 : 776.
- Goldman, R.D., Milsted, A., Schloss, J.A., Starger, J., and Yerna, M.J. 1979. Cytoplasmic fibers in mammalian cells: cytoskeletal and contractile elements. *Ann. Rev. Physiol.* 41 : 703.
- Gordon, J.L. 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233 : 309.
- Gordon, J.R., Post, T., Schulman, E.S., and Galli, S.J. 1991. Characterization of mouse mast cell TNF- α induction *in vitro* and *in vivo*, and demonstration that purified human lung mast cells contain TNF- α . *FASEB J.* 5 : A1009.
- Gorski, J.P., Hugli, T.E., and Muller-Eberhard, H.J. 1979. The third anaphylatoxin of the human complements system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 5299.
- Gospadorowicz, D., Brown, K.D., Birdwell, C.R., and Zetter, B.R. 1978. Control of proliferation of human vascular endothelial cells. *J. cell Biol.* 77 : 774.
- Gosset, P., Tonnel, A.B., Joseph, M., Prin, L., Mallart, A., Charon, J., and Capron, A. 1984. Secretion of a chemotactic factor for neutrophils and eosinophils by alveolar macrophages patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 74 : 827.
- Gosset, P., Lassalle, P., Tonnel, A.B., Dessaint, J.P., Wallaert, B., Prin, L., Pestel, J., and Capron, A. 1988. Production of an interleukin 1 inhibitory factor by human alveolar macrophages from normal and allergic patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138 : 40.
- Gosset, P., Tscopoulos, A., Walleart, B., Joseph, M., Capron, A., and Tonnel, A.B. 1992. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear

- phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 146 : 768.
- Grilewski, P.J., Palmer, R.M., and Moncada, S.A. 1986. Superoxyde anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 320 : 454.
- Gross, J.L., Moscatelli, D., and Rifkin, D.B. 1983. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 2623.
- Gundel, R.H., Wegner, C.D., Torcellini, C.A. 1991. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and the late phase airway obstruction in monkeys. *J. Clin. Invest.* 88 : 1407.
- Hägermark, O.E., Hoekfelt, T., and Pernow, B. 1978. Flare and itch induced by substance P in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 71 : 233.
- Hakasson, L., Westerlund, D., and Venge, P. 1989. A new method for the measurement of eosinophil migration. *J. Leukoc. Biol.* 42 : 689.
- Hargreave, F.E., Ryan, G., Thomson, N.C. et al. 1981. Bronchial responsiveness and inflammation to histamine or metacholine in asthma: measurement and clinical significance. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 68 : 347.
- Harlan, J.I., Schwartz, B.R., Reidy, M.A., Schwartz, S.M., Ochs, H.D., and Harker, L.A. 1985. Activated neutrophils disrupt endothelial monolayer integrity by an oxygen radical-independent mechanism. *Lab. Invest.* 52 : 141.
- Hatta, K., and Takeichi, M. 1986. Expression of N-cadherin adhesion molecule associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature* 320 : 447.
- Haudenschils, C., Zahniser, D., Folkman, J., and Klagsbrun, M. 1967. Human vascular endothelial cells in culture: lack of response to serum growth factors. *Exp. Cell Res.* 98 : 175.
- Hechtman, D.H., Cybulski, M.I., Fuchs, H.J., Baker, J.B., and Gimbrone, M.A. 1991. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J. Immunol.* 147 : 883.
- Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265 : 621.
- Hemler, M.E., Elices, M.J., Parker, C., and Takada, Y. 1990. Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.* 114 : 45.
- Hemler, M.E. 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 8 : 365.
- Heurkens, A.H.M., Hiemstra, P.S., Lafeber, G.J.M., Daha, M.R., and Breedveld, F.C. 1989. Anti-endothelial cell antibodies in patients with rheumatoid arthritis complicated by vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 78 : 7.
- Heimark, R.L., Twardzik, D.R., and Schwartz, S.M. 1986. Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. *Science.* 233 : 1078.

- Hirano, S., Nose, A., Hatta, K., Kawakami, A., and Takeichi, M. 1987. Calcium-dependent cell-cell adhesion molecules (cadherins): subclass specificities and possible involvement of actin bundles. *J. Cell Biol.* 105 : 2501.
- Hogg, J.C. 1984. The pathology of asthma. *Clin. Chest. Med.* 5 : 567.
- Hopkins, N.K., Oglesby, T.D., Bundy, G.L., and Gorman, R.R. 1984. Biosynthesis and metabolism of 15-hydroperoxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid by human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 259 : 14048.
- Hormia, M., Lehto, V.P., and Virtanen, I. 1983. Factor VIII-related antigen. A pericellular matrix component of cultured human endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 149 : 483.
- Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., Weiss, S.J. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254 : 99.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Kobayashi, M., and Masaki, T. 1989. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 2863.
- Ishizaka, T., Chang, T.H., Taggart, M., and Ishizaka, K. 1972. Histamine release from rat mast cells by antibodies against rat basophilic leukemic cell membrane. *J. Immunol.* 108 : 339.
- Issekutz, T.B. 1992. Lymphocyte homing to sites of inflammation. *Cur. Opinion Immunol.* 4 : 287.
- Jaffe, E.A., Nachman, R., Becher, C.G., and Minick C. R. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins : identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 52 : 2745.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., and Nachman, R.L. 1974. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71 : 1906.
- Janssens, S.P., Shimouchi, A., Quertemous, T., Bloch, D.B., and Bloch, K.D. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 267 : 14159.
- Jaye, M. Howk, R., Burgess, W.H., Ricca, G.A., Chiu, L.M., Ravera, M., O'Brien, S.J., Maciag, T., and Drohan, W.N. *Science.* 233 : 541.
- Jeffery, P.K., Wardlaw, A.J., Nelson, F.C., Collins, J.V., and Kay, A.B. 1989. Bronchial biopsies in asthma: an ultrastructural quantitative study and correlation with hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 : 1745.
- Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D.J., Carson, D.A., and Lotz, M. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* 142 : 144.
- Johnson A.R. 1980. Human pulmonary endothelial cells in culture. Activities of cells from arteries and cells from veins. *J. Clin. Invest.* 65 : 841.
- Johnson, P.M., Trenchev, P., and Fault, W.P. 1975. Immunological studies of human placentae. Binding of complexed immunoglobulin by stromal endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 22 : 133.

- Joris, I., Majno, G., Corey, E.J., and Lewis, R.A. 1987. The mechanism of vascular leakage induced by leukotriene E4: endothelial contraction. *Am. J. Pathol.* 126 : 19.
- Joseph, M., Auriault, C., Capron, A., Vorng, H., Viens, P. 1983. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature.* 303 : 810.
- Joseph, M., Tonnel, A.B., Torpier, G., Capron, A., Arnoux, B., and Benveniste, J. 1983. Involvement of IgE in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J. Clin. Invest.* 71 : 221.
- Joseph, M. 1988. Platelets in allergy: assays and interpretation. *Clin. Rev. Allergy.* 6 : 191.
- Jutila, M.A., Rott, L., Berg, E.L., and Butcher, E.C. 1989. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J. Immunol.* 143 : 3318.
- Kaliner, M., Blennerhassett, J., and Austen, K.F. 1976. Bronchial asthma. Dand *Textbook of immunopathy.* Edité pa P.A. Meischer et H.J. Muller-Eberhard, Grune & Stratton, New York, pp 387-402.
- Kalnins, V.I., Subrahmanyam, L., and Gotlieb, A.V. 1981. The reorganization of cytoskeletal fiber systems in spreading porcine endothelial cells in culture. *Eur. J. Cell. Biol.* 24 : 36.
- Karatzas, N.B. and Lee, G. deJ. 1969. Propagation of blood flow pulse in the normal human pulmonary arterial system analysis of the pulsatile capillary flow. *Circ. Res.* 25 : 11.
- Karre, H.E. 1958. The fine structure of connective tissue in the tunica propria of bronchioles. *J. Ultrastruct. Res.* 2 : 96.
- Kawaguchi, H., Sawa, H., and Yasuda, H. 1990. Endothelin stimulates angiotensin I to angiotensin II conversion in cultured pulmonary artery endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 22 : 839.
- Kay, A.B., Sun Ying, Varney, V., Gaga, M., Durham, S.R., Moqbel, R., Wardlaw, A.J., and Hamid, Q. 1991. Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* 173 : 775.
- Kilbourn, R.G., Gross, S.S., Jubran, A., Adams, J., Griffith, O.W., Levi, R., and Lodato, R. 1990. NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 3629.
- Kinet, J.P., Metzger, H., Hakimi, J., and Kochan, J. 1987. A cDNA presumptively coding for the alpha subunit of the receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Biochemistry.* 26 : 4605.
- Kinet, J.P., Blank, U., Ra, C., Metzger, H., and Kochan, J. 1988. Isolation and characterization of cDNAs coding for the beta subunit of the high-affinity receptor for immunoglobulin E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 : 6483.
- King, G.L., and Buchwald, S. 1984. Characterization and partial purification of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J. Clin. Invest.* 73 : 392.
- Kishimoto, T. 1989. The biology of interleukin-6. *Blood.* 74: 1.

- Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., and Butcher, E.C. 1989b. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*. 245 : 1238.
- Klynstra, F.B. 1974. On the passage-restricting role of acid mucopolysaccharides in the endothelium of pig aortas. *Atherosclerosis*. 19 : 215.
- Knauer, K.A., Lichtenstein, L.M., Adkinson, N.F., and Fish, J.E. 1981. Platelet activation during antigen-induced airway reactions in asthmatic subjects. *N. Engl. J. Med.* 304 : 1404.
- Komori, K., and Vanhoutte, P.M. 1990. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels*. 27 : 238.
- Komori, K., and Suzuki, H. 1987. Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilatation in the rabbit saphenous artery. *Circ. Res.* 61 : 586.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I., and Lu, S.D. 1988. A novel form of TNF: cachectin is a cell surface transmembrane protein : Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*. 53 : 45.
- Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D.N. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88 : 4651.
- Kuna, P., Reddigiari, S.R., Kornfeld, D., and Kaplan, A.P. 1991. IL-8 inhibits histamine release from human basophils induced by histamine-releasing factors, connective tissue activating peptide III, and IL-3. *J. Immunol.* 147 : 1920.
- Kurt-Jones, E.A., Beller, D.I., Mezel, S.B. and Unanue, E.R. 1985. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82 : 1204.
- Kyan-Aung, U., Haskard, D.O., Poston, M.H., Thornhill, M.H., and Lee, T.H. 1991. Endothelial leukocyte molecule 1 and intercellular molecule 1 mediate the adhesion of eosinophils to endothelial cells in vitro and are expressed by endothelium in allergic cutaneous inflammation in vivo. *J. Immunol.* 146 : 521.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 76 : 4350.
- Laitinen, L.A., Heino, M., Laitinen, A., Kava, T., and Haahtela, T. 1985. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 : 599.
- Laitinen, L.A., and Laitinen, A. 1990. Histology and electronmicroscopy. Dans *The bronchial circulation in health and disease*. Edité par J. Butler, Marcel Dekker, New York.
- Laitinen, L.A., and Laitinen, A. 1991. Pathology of asthma. Dans *Asthma. Its pathology and treatment*. Edité par M.A. Kaliner, P.J. Barnes et C.G.A. Persson. Marcel Dekker New York.
- Lamm, W.J.E., Selfe, S., and Albert, R.K. 1988. Pharmacologic and pulmonary physiologic effects of leukotrien binding to albumin (abstract). *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 (Part 2: 398).

- Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, E., Oppenheim, J.J., and Matsushima, K. 1989. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 243 : 1464.
- Larsen, E., Palabrica, T., Sajer, S., Gilbert, G.E., Wagner, D.D., Furie, B.C., and Furie, B. 1990. PADGEM-dependent adhesion of platelets to monocytes and neutrophils is mediated by a lineage-specific carbohydrate, LNF III (CD15). *Cell*. 63 : 467.
- Larson, D.M. 1988. Intercellular junctions and junctional transfer in the blood vessel wall. Dans *Endothelial cells*. Edité par U.S. Ryan, CRC Press, Florida.
- Lassalle, P., Joseph, M., Ramon, P., Dracon, M. Tonnel, A.B., and Capron, A. 1990. Plasmapheresis in a patient with severe asthma associated with auto-antibodies to platelets. *Clin. Exp. Immunol.* 20 : 707.
- Lassalle, P., Sergeant, M., Delneste, Y., Gosset, P., Wallaert, B., Zandecki, M., Capron, A., Joseph, M., and Tonnel, A.B. 1992a. Levels of soluble IL-2 receptor in plasma from asthmatics. Correlations with blood eosinophilia, lung function, and corticosteroid therapy. *Clin. Exp. Immunol.* 87 : 266.
- Lassalle, P., Lagrou, C., Delneste, Y., Sanceau, J., Coll, J., Torpier, G., Wietzerbin, J., Stehelin, D., Tonnel, A.B., and Capron, A. 1992b. Human endothelial cells transfected by SV40 T antigens : characterization and potent use as a source of normal endothelial factors. *Eur. J. Immunol.* 20 : 425.
- Lassalle, P., Gosset, P., Delneste, Y., Tsiopoulos, A., Capron, A., Joseph, M., and Tonnel, A.B. 1993a. Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells during the late asthmatic reaction: role of macrophage-derived tumour necrosis factor-alpha. *Clin. Exp. Immunol.* 94 : 105.
- Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P., Gras-Masse, H., Wallaert, B., and Tonnel, A.B. 1993b. T and B cell immune response to a 55-kDa endothelial cell-derived antigen in severe asthma. *Eur. J. Immunol.* 23 : 796.
- Lazarides, E. 1980. Intermediate filaments at mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283 : 249.
- Le, J. 1992. Interleukin 6: a review. *EOS-J. Immunol. Immunopharmacol.* 12 : 16.
- Lebel, L. Smith, L., Risberg, B., Gerdin, B. and Laurent, T.C. 1988. Effect of increased hydrostatic pressure on lymphatic elimination of hyaluronan from sheep lung. *J. Appl. Physiol.* 64 : 1327.
- Lee, T.C., Lenihan, D.J., Malone, B., Roddy, L.L., and Wasserman, S.I. 1984. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated eosinophils. *J. Biol. Chem.* 259 : 5526.
- Leeuwenberg, J.F.M., Von Asmuth, E.J.U., Jeunhomme, T.M.A.A., and Buurman, W.A. 1990. IFN- γ regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J. Immunol.* 145 : 2110.
- Leitch, A.G., Austen, K.F., and Drazen, J.M. 1983. Effects of indomethacin on the guinea pig pulmonary response to intravenous leukotriene C4 and D4. *Clin. Sci.* 65 : 281.
- Lelouch-Tubiana, A., Lefort, J., Simon, M.T., Pfister, A., and Vargaftig, B.B. 1988. Eosinophil recruitment into guinea pig lungs after PAF-acether and allergen administration: modulation by prostacyclin, platelet depletion and selective antagonists. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 : 948.

- Leonard, E.J., Skeel, A., Yoshimura, T., Noer, K., Kutvirt, S., and Ven Apps, D. 1990. Leukocyte specificity and binding of human neutrophil attractant/activation protein-1. *J. Immunol.* 144 : 1323.
- Leung, D.Y., Collins, T., Lapierre, L.A., Geha, R.S., and Pober, J.S. 1986a. Immunoglobulin M antibodies present in acute severe phase of Kawasaki syndrome lyse cultured vascular endothelial cells stimulated by gamma interferon. *J. Clin. Invest.* 77 : 1428.
- Leung, D.Y., Geha, R.S., Newburger, J.W., Burns, J.C., Fiers, W., Lapierre, L.A., and Pober, J.S. 1986b. Two monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, render cultured vascular endothelial cells susceptible to lysis by antibodies circulating during Kawasaki syndrome. *J. Exp. Med.* 164 : 1958.
- Leung, D.Y., Pober, J.S., and Cotran, R.S. 1991. Expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in elicited late phase reactions. *Blood.* 87 : 1805.
- Levick, J.R., and Michel, C.C. 1973. The effect of bovine serum albumin on the permeability of frog mesenteric capillaries. *Q. J. Physiol.* 58 : 87.
- Levin, E.G. 1973. Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme-inhibitor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 6804.
- Levin, E.G., and Loskutoff, D.J. 1982. Regulation of plasminogen activator production by cultured endothelial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 401 : 184.
- Libby, P., Ordovas, J.M., Birinyi, L.K., Auger, K.R., and Dinarello, C.A. 1986. Inducible interleukin-1 expression in human vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* 78 : 1432.
- Lobb, R., ChiRosso, G., Leone, D., Rosa, M., Newman, B., Luhowskyj, S., Osborn, L., Schiffer, S., Benjamin, C., Douglas, I., Hession, C., and Chow, P.C. 1991a. Expression and functional characterization of a soluble form of vascular cell adhesion molecule-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178 : 1498.
- Lobb, R., Chi-Rosso, G., Leone, D., Rosa, M., Bixler, S., Newman, B., Luhowskij, S., Benjamin, C., Douglas, I., Goelz, S., Hession, C., and Chow, P.C. 1991b. Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial adhesion molecule 1 (ELAM-1). *J. Immunol.*
- Locksley, R.M., Heinzl, F.P., Shepard, H.M., Agosti, J., Eessalu, T.E., Aggarwal, B.B., and Harlan, J.M. 1987. Tumor necrosis factors differ in their capacities to generate interleukin-1 release from human endothelial cells. *J. Immunol.* 139 : 1891.
- Lorant, D.E., Patel, K.D., McIntyre, T.M., McEver, R.P., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. 1991. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* 115 : 223.
- Luft, J.R. 1966. Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed. Proc.* 25 : 1773.
- Lundgren, R., Söderberg, M., Hörstedt, M., and Stenling, R. 1988. Morphological studies of bronchi mucosal biopsies from asthmatics before and after ten years of treatment with inhaled steroids. *Eur. Respir. J.* 1 : 883.

- Lung, M.A., Wang, J.C.C., and Cheng, K.K. 1976. Bronchial circulation: an autoperfusion method for assessing its vasomotor activity and the study of alpha and beta-adrenoceptor in the bronchial artery. *Life science*. 19 : 577.
- Lyberg, T., Galdal, K.S., Evensen, S.A., and Prydz, H. 1983. Cellular cooperation in endothelial cell thromboplastin synthesis. *Br. J. Haematol.* 53 : 85.
- Maciag, T., and Burgess, W.H. 1987. The structural and functional properties of endothelial cell growth factor and its receptor. In *Endothelial cells*. Edited par U.S. Ryan, CRC Press, Florida.
- Madri, J.A. and Furthmayr, H. 1980. Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Hum. Pathol.* 11 : 4529-4537.
- Mantovani, A.F., Bussolino, F., and Dejana, E. 1992. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* 6 : 2591.
- Marks, R.M., Roche, W.R., Czerniecki, M., Penny, R., and Nelson, D.S. 1986. Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cells. *Lab. Invest.* 55 : 289.
- Marlin, S.D., and Springer, T.A. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 51 : 813.
- Marlin, S.D., Staunton, D.E., Springer, T.A., Stratowa, C., Sommergruber, W., and Merluzzi, V.J. 1990. A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature.* 344 : 70.
- Marsh, W.R., Irvin, C.G., and Murphy, K.R. 1985. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131 : 875.
- Maycock, A.L., Anderson, M.S., DeSousa, D.M., and Kuehl, F.A. 1982. Leukotriene A₄: preparation and enzymatic conversion in a cell-free system to leukotriene B₄. *J. Biol. Chem.* 257 : 13911.
- Maynard, J.R., Heckman, C.A, Pitlick, F.A., and Nemerson, Y. 1975. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *J. Clin. Invest.* 55 : 814.
- McDonald, D.M., The ultrastructure and permeability of tracheobronchial blood vessels in health and disease. *Eur. Resp. J.* 3 : Suppl 12 572s.
- Metcalf, D.D., Kaliner, M.A., and Dolon, M.A. 1981. The mast cell. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 3 : 23.
- Metzger, W.J., Zavala, D., Richerson, H.B., Moseley, P., Iwamoto, P., Monick, M., Sjoerdsma, K., and Hunninghake, G.W. 1987. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 : 433.
- Meyrick, B., Hoffman, L., and Brigham, K.L. 1984. Chemotaxis of granulocytes across bovine pulmonary artery intimal explants without endothelial injury. *Tissue Cell.* 16 : 1.
- Montefort, S., Feather, I.H., Wilson, S.J., Haskard, D.O., Lee, T.H., Holgate, S.T., and Howarth, P.H. 1992. The expression of leukocyte-endothelial adhesion molecules is increased in perennial allergic rhinitis. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 7 : 393.

- Mossmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136 : 2348.
- Nakaki, T., Nakayama, M., and Kato, R. 1990. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1898 : 347.
- Naclerio, R. M. 1990. The role of histamine in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 86 : 628.
- Nayler, W.G. 1990. Endothelin: isoforms, binding sites and possible implications in pathology. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11 : 96.
- Needham, L., Hellewell, P.J., Williams, T.J., and Gordon, J.L. 1988. Endothelial cell functional responses and increased vascular permeability induced by polycations. *Lab. Invest.* 59 : 538.
- Nieuwenhuis, H.K., Akkerman, J.W.N., Houdjik, W.P.M., and Sixma, J.J. 1985. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature.* 318 : 470.
- Nistor, A., and Simionescu, M. 1986. Uptake of low density lipoproteins by the hamster lung. Interactions with capillary endothelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 : 1266.
- Nose, A., and Takeichi, M. 1986. A novel cadherin adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *EMBO J.* 6 : 3655.
- Nowak, J., and Fitzgerald, G.A. 1989. Redirection of prostaglandin endoperoxide metabolism at the platelet-vascular interface in man. *J. Clin. Invest.* 83 : 380.
- O'Byrne, P.M., Leikauf, G.D., Aizawa, H., et al. 1985. Leukotriene B4-induced airway hyperresponsiveness in dogs. *J. Appl. Physiol.* 59 : 1941.
- Okada, K., Miyazaki, Y., Takada, J., Matsuyama, K., Yamaki, T., and Morimoto, S. 1990. Conversion of big endothelin-1 by membrane-bound metalloendopeptidase in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171 : 1192.
- Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. 1989. Direct expression cloning of vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1), a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 59 : 1203.
- Osborn, L. 1990. Leukocyte adhesion in inflammation. *Cell.* 62 : 3.
- Osterud, B., and Rapaport, S.I. 1977. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 5260.
- Owen, K., Gomolda, D., and Droller, M.J. 1980. Production of prostaglandin E2 by tumor cells in vitro. *Cancer Res.* 40 : 3167.
- Palade, G.E. 1953. Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Physiol.* 24 : 1424 (Abstract).
- Parronchi, P., Macchia, D., Piccini, M-P., Biswas, P., Simonelli, C., Maggi, E., Ricci, M., Ansari, A.A., and Romagnani, S. 1991. Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell

- clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 4538.
- Patrono, C., Crabattoni, G., Venuti, A., Pugliese, F., Schiavino, D., and Patriarca, G. 1978. Aspirin intolerance: unaltered susceptibility of platelet cyclooxygenase to inhibition by aspirin in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 62 : 271.
- Pearson, J.D., Carlton, J.S., Hutchings, A., and Gordon, J.L. 1987. Adenosin nucleotides and pulmonary endothelium. In *The pulmonary endothelium in health and disease*. Edited par U.S. Ryan, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Pelletier, R.P., Ohye, R.G., Vanbuskirk, A., Sedmak, D.D., Kincade, P., Ferguson, R.M., and Orosz, C.G. 1992 Importance of endothelial VCAM-1 for inflammatory leukocytic infiltration in vivo. *J. Immunol.* 149 : 2473.
- Persson, C.G.A. 1986. Role of plasma exudation in asthmatic airways. *Lancet.* 2 ; 1126.
- Persson, C.G.A., Erjefält, J., and Sundler, F. 1987. Airway microvascular and epithelial leakage of plasma induced by PAF-acether and capsaicin. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135 : A401.
- Persson, C.G.A. 1988. Plasma exudation and asthma. *Lung.* 166 : 1.
- Persson, M.G., Gustaffson, L.E., Wiklund, N.P., Moncada, S., and Hedqvist, P. 1990. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo. *Acta Physiol. Scand.* 140 : 449.
- Peters, S.P., MacGlashan, D.W., Schulman, E.S., Schleimer, R.P., Hayes, E.C., Roback, J., Adkinson, N.F., and Lichtenstein, L.M. 1984. Arachidonic acid metabolism in purified human lung mast cells. *J. Immunol.* 132 : 1972.
- Picker, L.J., Kishimoto, T.K., Smith, C.W., Warnock, R.A., and Butcher, E.C. 1991. ELAM-1 is an adhesion molecule for skin-homing T cells. *Nature.* 349 : 796.
- Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R.P., and Paul, W.E. 1989. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of FcεRI or to calcium ionophores. *Nature* 339 : 64.
- Pober, J.S., and Gimbrone, M.A. Jr. 1982. Expression of Ia-like antigens by human vascular endothelial cells is inducible in vitro: demonstration by monoclonal antibody binding and immunoprecipitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 6641.
- Polley, M.J., Phillips, M.L., and Wayner, E. 1991. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 6224.
- Popovich, K.J., Sheldon, G., Mack, M., Munoz, N.M., Denberg, P., Blake, J., White, S.R., and Leff, A.R. 1988. Role of platelets in contraction of canine tracheal muscle elicited by PAF in vitro. *J. Appl. Physiol.* 65 : 914.
- Postigo, A.A., Garcia-Vicuna, R., Diaz-Gonzales, F., Arroyo, A.G., De Landazuri, M.O., Chi-Rosso, G., Lobb, R.R., and Sanchez-Madrid, F. 1992. Increased binding of synovial T lymphocytes from rheumatoid arthritis to endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Clin. Invest.* 89 : 1445.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and McIntyre, T.M. 1984. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81 : 3534.

- Radmark, O., Malmsten, C., Samuelsson, B., Goto, G., Marfat, A., and Corey, E.J. 1980. Leukotriene A: isolation from human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 255 : 11828.
- Rafferty, P., and Holgate, S.T. 1989. Histamine and its antagonists in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 84 : 144.
- Ranby, M. 1982. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta* 704 : 761.
- Rand, J.H., Sussman, I.I., Gordon, R.E., Chu, S.V., and Solomon, V. 1982. Electron microscopic localization of factor-VIII-related antigen in human vascular subendothelium. *Blood.* 55 : 752.
- Rees, D.D., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 3375.
- Reid, L., and Meyrick, B. 1982. Microcirculation: Definition and organization at tissue level. In *Mechanisms of Lung Microvascular Injury*. Edited by A.B. Malik and N.C. Staub. New York, Annals of the new York Academy of Science, pp. 3-20.
- Reid, L. 1987. The presence or absence of bronchial mucus in fatal asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80 : 415.
- Reidy, M.A., and Schwartz, S.M. Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab. Invest.* 44 : 301.
- Renkin, E.M. 1977. Multiple pathways of capillary permeability. *Circ. Res.* 41 : 735.
- Rippe, B., and Haraldsen, B. 1987. How are macromolecules transported across the capillary wall. *News Physiol. Sci.* 2 : 135.
- Robinson, D.R., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., and Kay, A.B. 1992. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *New. Eng. J. Med.* 326 : 298.
- Rosenbaum, J., Pottinger, B.E., Woo, P., Black, C.M., Loizou, S., Byron, M., and Pearson, J.D. 1988. Measurement and characterization of circulating anti-endothelial cell IgG in connective tissue diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 72 : 450.
- Rosenberg, R.D. 1987. Heparin-antithrombin system. In *Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice*. Edited apr R.W. Colman *et al.* Lippincott, Philadelphia.
- Rosenthal, R.R., Norman, P.S., Summer, W.R., and Permutt, S. 1977. Role of the parasympathetic ssystem in antigen-induced bronchospasm. *J. Appl. Physiol.* 42 : 600.
- Rot, A. 1992. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 13 : 291.
- Roth, J., Lucocq, J.M., and Charest, P.M. 1984. Light and electron microscopic demonstration of sialic acid residues with the lectin from *Limax flavus*. *J. Histochem. Cytochem.* 32 : 1167.
- Rubanyi, G.M. 1989. Maintenance of "basal" vascular tone may represent a physiological role for endothelin. *J. Vasc. Med. Biol.* 1 : 315.

- Ruggeri, Z.M., and Ware, J. 1993. von Willebrand factor. *FASEB J.* 7 : 308.
- Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M.D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238 : 491.
- Ruoslahti, E. 1991. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87 : 1.
- Ryan, U.S., Ryan, J.W., Whitaker, C., and Chiu, A. 1976. Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue cell* 8 : 125
- Ryan, U.S., Schultz, D.R., and Ryan, J.W. 1981. Fc and C3b receptors on pulmonary endothelial cells: induction by injury. *Science.* 214 : 557
- Ryan, U.S. 1985. Processing of angiotensin I and other related peptides by the lung. Dans *Handbook of Physiology. The respiratory system* 1. Edité par A.P. Fishman et A.B.Fisher. 10 : 351.
- Ryley, H.C., and Brogan, T.D. 1968. Variation in the composition of sputum in chronic chest diseases. *Br. J. Exp. Pathol.* 49 : 625.
- Saida, K., Mitsui, Y., and Ishida, N. 1989. A novel peptide, vasoactive intestinal contractor, of a new (Endothelin) peptide family. *J. Biol. Chem.* 264 : 14163.
- Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A., and Sixma, J.J. 1979. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 279 : 636.
- Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takawa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K., and Masaki, T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 348 : 732.
- Samuelsson, B. 1983. Leukotriens: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science.* 220 : 568.
- Samuelsson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Morrison, C.A., and Serhan, C.N. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis of leukotrienes B₄. *Science.* 237 : 1171.
- Scheenberger, E.E., and Karnovski, M.J. 1968. The ultrastructural basis of aveolar-capillary membrane permeability to peroxidase used as a tracer. *J. Cell. Biol.* 37 : 781.
- Scheenberger, E.E. 1979. Barrier function of intercellular junctions in adult and fetal lungs. In *Pulmonary Edema*, Clinical Physiology Series. Edited by A. P. Fishman and E.M. Renkin. Bethesda, Maryland, American Physiological Society, pp. 21.
- Scheenberger, E.E., 1981. Segmental differentiation of endothelial intercellular junctions in intra-acinar arteries and veins of the rat lung. *Circ. Res.* 49 : 1102.
- Schechter, N.M., Frakl, J.E., Geesin, J.C., and Lazarus, G.S. 1983. Human skin chymotryptic proteins: isolation and relation to cathepsin G and rat mast cell proteinase. *J. Biol. Chem.* 258 : 2973.
- Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., Bickel, C.A., Klunk, D.A., Tomioka, K., Newman, W., Lusinkas, F.W., Gimbrone Jr, M.A., McIntyre, B.W., and Bochner, B. 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.* 148 : 1086.

- Schmid-Schonbein, G.S.W., Usami, S., Skalak, R. and Chein, S. 1980. Interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and post-capillary vessels. *Microvasc. Res.* 19 : 45.
- Schuman, E.M., and Madison, D.V. 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long term potentiation. *Science.* 254 : 1503.
- Scott, T., and Kaliner, M. 1993. Mast cells in asthma. Dans *The mast cell in health and disease*. Edité par M.A. Kaliner et D.D. Metcalfe, Marcel Dekker, New York, pp 575-608.
- Scow, R.O., Blanchette-Mackie, E.J., and Smith, I.C. 1976. Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons: a model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes. *Circ. Res.* 39 : 149.
- Seifert, S.C., and Gelherter, T.D. 1978. Mechanism of dexamethasone inhibition of plasminogen activator in rat hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75 : 6130.
- Shapiro, R., Riordan, J.F., and Vallee, B.L. 1986. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry.* 25 : 3527.
- Shaw, J.O. 1980. Leukocytes in chemotactic fragment-induced lung inflammation. Vascular emigration and alveolar surface emigration. *Am. J. Pathol.* 2 : 100.
- Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigne, K.S., McManus, L.M., and Hanahan, D.J. 1981. Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine, the active moiety of platelet activating factor. *J. Immunol.* 127 : 1250.
- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., and Klagsbrun, M. 1984. Heparin-affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science.* 223 : 1296.
- Sief, C.A., Niemeyer, C.M., Mentzer, S.J., and faller, D.V. 1988. Interleukin 1, tumor necrosis factor, and the production of colony-stimulating factors by cultured mesenchymal cells. *Blood.* 72 : 1316.
- Siflinger-Birnboim, A., DelVocchio, P.J., Cooper, A.L., and Malik, A. 1986. Transendothelial albumin flux: evidence against active transport of albumin. *Fed. Proc.* 45 : 755.
- Simionescu, N., Simionescu, M., and Palade, G.E. 1972. Permeability of intestinal capillaries. Pathway followed by dextran and glycogens. *J. Cell Biol.* 53 : 365.
- Simionescu, M., Simionescu, N., Silbert, J.E., and Palade, G.E. 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium. II. Partial characterisation of their anionic sites. *J. Cell. Biol.* 90 : 614.
- Simionescu, D., and Simionescu, M. 1983. Differential distribution of the cell surface charge on the alveolar capillary unit. Characteristic paucity of anionic sites on the air-blood barrier. *Microvasc. Res.* 25 : 85.
- Simionescu, M., Ghitescu, L. Fixman, A., and Simionescu, N. 1987. How plasma macromolecules cross the endothelium. *News Physiol. Sci.* 2 : 97.
- Smith, U., and Ryan, J.W. 1971. Pinocytic vesicles of the pulmonary endothelial cells. *Chest.* 59 : 12s.

- Smith, M.J.H., Ford-Hutchinson, A., and Bray, M.A. 1980. Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.* 32 : 517.
- Smith, T.J., Hougland, M.W., and Johnson, D.A. 1984. Human lung tryptase: purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 259 : 11046.
- Smith, S.S., Joneckis, C.C., and Parise, L.V. 1993. Regulation of vascular integrins. *Blood.* 81 : 2827.
- Smith, W.B., Gamble, J.R., Clark-Lewis, I., and Vadas, M.A. 1993. Chemotactic desensitization of neutrophils demonstrates interleukin-8 (IL-8)-dependent and IL-8-independent mechanisms of transmigration through cytokine-activated endothelium. *Immunology* 78 : 491.
- Snyder, S.H., and Bredt, D.S. 1991. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends. Pharmacol. Sci.* 12 : 125.
- Sobonoya, R.E. 1984. Concise clinical study: quantitative structural alterations in long standing allergic asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130 : 289.
- Soderberg, M., Lundgren, R., Bjermer, L., Stjernberg, N., and Rosenhall, L. 1989. Inflammatory response in bronchoalveolar lavage fluid after inhaling histamine. *Allergy* 44 : 98.
- Spiegelberg, H.L. 1984. Structure and function of Fc receptors for IgE on lymphocytes, monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* 35 : 61.
- Sporn, M.B., Roberts, A., Sjull, J.H., Smith, J.M., Ward, J.M., and Sodbk, J. 1983. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science.* 219 : 1329.
- Sporn, L.A., Marder, V.J., and Wagner, D.D. 1986. Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell.* 46 : 185.
- Sprengers, E.D., Verheijen, J.H., van Hinsbergh, V.W.M., and Emeis, J.J. 1984. Evidence for the presence of two different fibrinolytic inhibitors in human endothelial cell conditioned medium. *Biochem. Biophys. Acta.* 801 : 163.
- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., and Marlin, S. 1987. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 223.
- Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors in the immune system. *Nature.* 346 : 425.
- Springer, T.A., and Laski, L.A. 1991. Sticky sugars for selectins. *Nature.* 349 : 196.
- Stacker, S.A., and Springer, T.A. 1991. Leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) function as an adhesion molecule binding to a counter receptor on stimulated endothelium. *J. Immunol.* 146 : 648.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L., and Springer, T.A. 1989. Functionnal cloning of ICAM-2, a cell adhesion molecule ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature.* 339 : 61.
- Stern, D., Bank, I., Nawroth, P.P., Cassimans, J., Kisiel, W., Fenton, J.W., Dinarello, C., Jaffe, E.A., and Chess, L. 1985. Self-regulation of procoagulant events on the endothelial surface. *J. Exp. Med.* 162 : 1223.

- Stern, D., Nawroth, P., Handley, D., and Kiesel, W. 1985. An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 2523.
- Stern, D.M., Nawroth, P.P., Harris, K., and Esmon, C.T. 1986. Cultured bovine aortic endothelial cells promote activated protein C- protein S-mediated inactivation of factor Va. *J. Biol. Chem.* 261 : 713.
- Streck, H., Günther, C., Beuscher, H.U., and Röllinghoff, M. 1988. Studies on the release of cell-associated interleukin 1 by paraformaldehyde-treated murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 18 : 1609.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Showell, H.J., Remick, D.G., Phan, S.H., Ward, P.A., and Marks, R.M. 1989. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β . *Science.* 243 : 1467.
- Swerlick, R.A., and Lawley, T.J. 1993. Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 100 : S111.
- Sy, M.S., Scheeburger, E., McCluskey, R., Greene, M.I., and Rosenberg, R.D. 1983. Inhibition of delayed type hypersensitivity by heparin depleted of anticoagulant activity. *Cell Immunol.* 82 : 23.
- Takagi, Y., Fuksae, M., Takata, S., Yoshimi, H., Tokunaga, O., and Fujita, T. 1990. Autocrine effect of endothelin on DNA synthesis in human vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168 : 537.
- Takeichi, M. 1988. The cadherins : cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development.* 102 : 639.
- Takigawa, M., Shira, E., Enomoto, M., Hiraki, Y., Fukuya, M., Suzuki, F., Shiio, T., and Tugari, Y. 1985. Cartilage-derived anti-tumor factor (CATF) inhibits the proliferation of endothelial cells in culture. *Cell Biol. Int. Rep.* 9 : 619.
- Takizawa, T., and Thurlbeck, W.M. 1971. Muscle, and mucous gland size in the major bronchi of patients with chronic bronchitis, asthma and asthmatic bronchitis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 104 : 331.
- Tate, R.M., and Repine, J.E. 1983. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128 : 552.
- Tenschler, E., and Weidler, V. 1985. Adenosine nucleotides, adenosine and adenine as angiogenic factors. *Biomed. Biochim. Acta.* 44 : 493.
- Theoharides, T.C. 1989. Histamine₂-receptor antagonists in the treatment of urticaria. *Drugs.* 37 : 345.
- Thiemermann, C., and Vane, J. 1990. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 182 : 591.
- Thompson, A.R., Forrey, A.W., Gentry, P.A., Smith, K.J., and Harker, L.A. 1980. Human factor IX in animals; kinetics from isolated, radiolabelled protein and platelet destruction following crude concentrate infusions. *Br. J. Haematol.* 45 : 239.
- Thornhill, M.H., Kyan-Aung, U., and Haskard, D.O. 1990. IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. *J. Immunol.* 144 : 3060.

- Thornhill, M.H., Wellicome, S.M., Mahiouz, D.L., Lanchbury, J.S.S., Kyan-Aung, U., and Haskard, D.O. 1991. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN- γ to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and independent binding mechanisms. *J. Immunol.* 146 : 592.
- Thorsen, S., Glas-Greenwalt, P., and Astrup, T. 1972. Differences in the binding to fibrin of urokinase and tissue plasminogen activator. *Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 28 : 65.
- Tosato, G., Sehgal, K.B., May, L.T., Washington, O.C., Jones, K.D., and Pike, S.E. 1988a. Monocyte-derived human B cell growth factor identified as interferon-B2 (BSF-2, IL-6). *Science.* 239 : 502.
- Tosato, G., Gerrard, T.L., Goldman, N.G., and Pike, S.E. 1988b. Stimulation of EBV-activated human B cells by monocytes and monocytes products. Role of IFN β /B cell stimulatory factor 2/IL-6. *J. Immunol.* 140 : 4329.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. 1976. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 4350.
- Turley, E.A. 1991 Hyaluronan-binding proteins and receptors. *Adv. Drug Delivery Rev.* 41 : 239.
- Ugurbil, K., and Holmsen, H. 1981. Nucleotide compartmentalization: radio-isotopic and nuclear magnetic resonance studies. Dans *Platelets in biology and pathology*. Edité par J.L. Gordon. Elsevier, Amsterdam. pp 146-177.
- VanCalker, A., Muller, D., and Hamprecht, B. 1979. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J. Neurochem.* 33 : 999.
- Vanhoutte, P.M., Verbeuren, T.J., and Webb, R.C. 1981. Local modulation of adrenergic neuroeffector interactions in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.* 61 : 151.
- Vanhoutte, P.M., Rubyani, G.M. Miller, V.M., and Houston, D.S. 1986. Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Annu. Rev. Physiol.* 48 : 307.
- Van Snick, J., Cayphas, S., Vinck, A., Uyttenhove, C., Coulie, P.G., Rubira, M., and Simpson, R.J. 1986. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of a T cell derived lymphokine with growth activity for B cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83 : 9679.
- Vehaskari, V.M., Chang, C.J.C., Stevens, J.K., and Robson, A.M. The effects of polycations on vascular permeability in the rat. A proposed role for charge negatives. *J. Clin. Invest.* 73 : 1053.
- Venables, K.M., Burge, P.S., Davison, A.G., and Newman Taylor, A.J. 1984. Peak flow rate records in surveys: reproducibility of observer's reports. *Thorax.* 39 : 828.
- Vlodavski, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J., and Klagsbrun, M. 1987. Endothelial dcell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition in subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 2292.

- Wagner, D.D., Olmsted, J.B., and marder, V.J. 1982. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 95 : 335.
- Walker, C., Kaegi, M.K., Braun, P. and Blaser, K. 1991. Activated T-cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 88 : 935.
- Walsh, G.M., Mermod, J.J., Hartnell, A., Kay, A.B., and Wardlaw, A.J. 1991. Human eosinophil, but not neutrophil, adherence to IL-1-stimulated human umbilical vascular endothelial cells is $\alpha 4\beta 1$ (verylate antigen-4) dependent. *J. Immunol.* 146 : 3419.
- Wanner, A. 1977. Clinical aspects of mucociliary transport. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116 : 73.
- Wardlaw, A.J., Moqbel, R., Cromwell, O., and Kay, A.B. 1986. PAF-acether: a potent chemotactic and chimokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* 78 : 1701.
- Wardlaw, A.J., Dunnette, S., Gleich, G.J., Collins, J.V., and Kay, A.B. 1988. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 137 : 62.
- Wasserman S.I. 1980. The lung mast cell: its physiology and potential relevance to defense of the lung. *Environ. Health Perspect.* 35 : 133.
- Wedmore, C.V., and Williams, T.J. 1981. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature.* 289 : 646.
- Weg, V.B., Williams, T.J., Lobb, R.R., and Nourshargh, S. 1993. A monoclonal antibody recognizing very late antigen-4 inhibits eosinophil accumulation in vivo. *J. Exp. Med.* 177 : 561.
- Wegner, C.D., Gundel, R.H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L.G., and Rothlein, R. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science.* 247 : 456.
- Weksler, B.B., Ley, C.W., and Jaffe, C.A. 1978. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A 23187. *J. Clin. Invest.* 67 : 923.
- Weller, P.F. 1992. Cytokine regulation of eosinophil function. *Immunol. Immunopathol.* 62 : S55.
- Wellicome, S.M., Thornhill, M.H., Thomas, D.S., et al. 1990. A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by TNF, IL-1 or LPS. *J. Immunol.* 144 : 2258.
- White, M.V., Kowalski, M., and Kaliner, M.A. 1989a. Mast cell segretagogues. Dans *Biochemistry of the acute allergic reaction*, Fifth international symposium. Edité par B. Wintroub, F. Tauber, et A.S. Simon, Alan R. Liss, New York.
- White, M.V., Yoshumira, T., Hook, W., Kaliner, M.A., and Leonard E.J. 1989b. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunology letters* 22 :151.
- White M. V. (1990) The role of histamine in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 86 : 599.

- Whorton, A.R., Kent, R.S., Young, S.L., and Shand, D.G. 1981. Arachidonic acid metabolism by porcine aortic endothelial cells. *Fed. Proc.* 40 : 689.
- Wight, T.N., Curwen, K.D., and Minick, C.R. 1983. The effect of endothelium on glycosaminoglycan accumulation in the rabbit aorta.
- Wiman, B., and Collen, D. 1978. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature.* 272 : 549.
- Woolcock, A.J. 1988. Asthma-what are the important experiments? *Am. Rev. Resir. Dis.* 138 : 71.
- Xie, Q-W, Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding A., Troso, T., and Nathan, C. 1992. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 256 : 225.
- Yanasigawa, M., Kurihara, H., Kumura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Goto, K., and Masaki, T. 1988.. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 332 : 411.
- Yoshida, C., and Takeichi, M. 1982. Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell.* 28 : 217.
- Yoshizumi, M., Morita, T., Kurihara, H., Oh-hashii, Y., Yanagisawa, M., Inoue, A., Masaki, T., and Yazaki, Y. 1992. Regulatory effects of macrophage-derived cytokines and polymorphonuclear leukocytes on endothelin production and its metabolism. *J. Vasc. Med. Biol.* 2 : 177.
- Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Mehra, M., and Prescott, S.M. 1990. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signalling intercellular adhesion. *J. Cell Biol.* 110 : 529.

