

50376  
1996  
38

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

Sophie MOLET

INTERACTIONS DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES  
AVEC LES MEDIATEURS DE L'INFLAMMATION:  
APPLICATION A LA PATHOLOGIE RESPIRATOIRE.

Présentée le 12 Décembre 1996 devant la commission d'examen:

**Président:** Professeur A. DHAINAUT

**Directeur de Thèse:** Professeur A.B. TONNEL

**Rapporteurs:** Professeur J. BOUSQUET  
Professeur B. WALLAERT

**Examineurs:** Professeur M. CAPRON  
Docteur M. PRETOLANI



*"La véritable science enseigne, par dessus tout,  
à douter et à être ignorant"*

*Miguel de Unamuno*

*"Le sens tragique de la vie"*

*A mon président de thèse, Monsieur le Professeur A. Dhainaut,*

*Vous avez accepté de juger ce travail et de présider ce jury. Que ce mémoire soit le témoignage de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.*

*A mes rapporteurs et juges,*

*Monsieur le Professeur J. Bousquet,*

*C'est un très grand honneur que vous me faites d'accepter de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma très sincère reconnaissance.*

*Monsieur le Professeur B. Wallaert,*

*Pour votre soutien constant et pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en acceptant d'en être le rapporteur, soyez assuré de mon profond respect.*

*A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur A.B. Tonnel,*

*Je vous suis particulièrement reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pour y effectuer ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma très profonde gratitude pour la confiance et l'attention que vous m'avez accordées tout au long de ce travail.*

*A Mesdames les membres du jury,*

*Madame le Professeur M. Capron,*

*Lors de nos rencontres, vous m'avez fait bénéficier de vos connaissances scientifiques et vous m'avez apporté le sens critique du travail de recherche. Qu'il me soit permis, en cette occasion, de vous témoigner de ma très sincère reconnaissance.*

*Madame le Docteur M. Pretolani,*

*C'est très spontanément que vous avez accepté de juger ce travail. Votre enthousiasme et votre dynamisme m'ont apporté une aide précieuse. Veuillez trouver, dans ce mémoire, le témoignage de ma sincère reconnaissance et 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:*

*Mr le Docteur Philippe Lassalle,  
pour ses discussions enrichissantes, pour l'intérêt et l'attention qu'il a portés à la lecture de ce manuscrit.*

*Mr le Docteur Philippe Gosset,  
pour m'avoir guidée au cours de cette thèse et m'avoir fait réaliser que la recherche est loin d'être un long fleuve tranquille.*

*Melle Anne Tsicopoulos, Mme Isabelle Tillie-Leblond, Mrs Joël Pestel, Michel Joseph et Dominique Vanhée,  
pour leurs conseils et leur gentillesse.*

*Melles Hikmat Akoum, Agnès Boitelle, Catherine Degros, Catherine Duez, Sophie Galand et Odile Parmentier,  
pour m'avoir supportée pendant ces trois années, mais surtout pour leur amitié et leur soutien indispensable les jours de doute.*

*Mmes Catherine Fourneau, Gwenola Kervoaze, Geneviève Marchandise, Christine Merdy, Sabine Szeremeta, Mrs Han Vornq et Philippe Marquillies,  
pour l'enthousiasme et la bonne humeur qu'ils apportent au laboratoire; pour leur soutien sans réserve et leur aide au quotidien.*

\*

*Merci à Christel, Laurence, Michel, Nicolas pour leur soutien et leur amitié sincère; Fabrice, Jean-Pierre, Joëlle et P'tit Mann pour leurs visites toujours pleines de bonne humeur.*

*Mes plus sincères remerciements s'adressent également à Mesdames les infirmières de la Consultation du Service de Pneumologie et d'Immuno-allergologie du CHRU de Lille, ainsi qu'au personnel du bloc opératoire des Maternités Salengro et Jeanne de Flandres pour leur contribution essentielle dans cette étude.*

*à la mémoire de ma Grand-mère,*

*à mes parents et ma sœur,*

*par votre confiance, vos encouragements et votre affection, vous m'avez aidée à surmonter les périodes difficiles. Acceptez ce modeste travail comme le témoignage de mon immense reconnaissance et de ma plus profonde affection.*

*à toute ma famille,*

*pour les joies et le soutien qu'elle m'apporte en toute circonstance.*

## Bibliographie

### Publications:

- Jeannin, P., Delneste, Y., Gosset, P., **Molet, S.**, Lassalle, P., Hamid, Q., Tsicopoulos, A. and Tonnel, A.B. (1994). Histamine induces IL-8 secretion by endothelial cells. *Blood* **84**: 2229-2233.
  
- Lassalle, P., **Molet, S.**, Janin, A., Van der Heyden, J., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R. and Tonnel, A.B. (1996). ESM-1: a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J. Biol. Chem.* **271** (34): 20458-20464.
  
- Vanhée, D., **Molet, S.**, Gosset, P., Tillie-Leblond, I., Boitelle, A., Wallaert, B., and Tonnel, A.B. (1996). Expression of leukocyte-endothelial adhesion molecule is limited to intercellular adhesion molecule-1 in the lung of pneumoconiotic patients: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Clin. Exp. Immunol.* (sous presse).
  
- Tonnel, A.B., Gosset, P., **Molet, S.**, Tillie-Leblond, I., Jeannin, P. and Joseph, M. (1996). Interactions between endothelial cells and effector cells in allergic inflammation. *Ann. NY Acad. Sc.* (sous presse).
  
- Tonnel, A.B., Jeannin, P., **Molet, S.**, Gosset, P., Delneste, Y., Wallaert, B. and Joseph, M. (1996). Endothelial cells in allergy. *Allergy and allergic diseases* édité par A.B. Kay; Blackwell Scientific Publications. (sous presse).
  
- **Molet, S.**, Gosset, P., Lassalle, P., Czarlewski, W. and Tonnel, A.B. (1996). Inhibitory activity of loratadine and descarboxyethoxyloratadine on histamine-induced activation of human endothelial cells. *Clin. Exp. Allergy* (en cours d'acceptation)
  
- **Molet, S.**, Gosset, P., Vanhée, D., Tillie-Leblond, I., Wallaert, B., Capron, M. and Tonnel, A.B. (1996). Modulation of cell adhesion molecules on human endothelial cells by eosinophil supernatants. *J. Leukoc. Biol.* (en cours de soumission).
  
- **Molet, S.**, Gosset, P., Vanhée, D., Boitelle, A., Tillie-Leblond, I., Wallaert, B., Capron, M. and Tonnel, A.B. (1996). Amplification of cytokine release by human endothelial cells stimulated by eosinophil supernatants. (en préparation).

### *Communications:*

- **Molet, S.**, Gosset, P., Czarlewski, W. and Tonnel, A.B. (1995). Inhibition by loratadine of histamine-induced activation of human endothelial cells. ATS International Conference, 20-24 May 1995, Seattle, Washington. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **151**: A380.

- **Molet, S.**, Gosset, P., Vanhée, D., Tillie-Leblond, I., Wallaert, B., Capron, M. and Tonnel, A.B. (1995). Modulation of cell adhesion molecules expression on human endothelial cells by eosinophil supernatants. ATS International Conference, 20-24 May 1995, Seattle, Washington. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **151**: A216.

- Vanhée, D., **Molet, S.**, Gosset, P., Boitelle, A., Joseph, M., Wallaert, B. and Tonnel, A.B. (1995). Alveolar macrophage-derived TNF $\alpha$  induced adhesion molecule expression in the lung of pneumoconiotic patients. ATS International Conference, 20-24 May 1995, Seattle, Washington. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **151**: A52.

- **Molet, S.**, Gosset, P., Vanhée, D., Tillie-Leblond, I., Wallaert, B. Capron, M. and Tonnel, A.B. (1995). Implication des éosinophiles dans leur propre recrutement tissulaire par le biais de l'amplification de l'expression de molécules d'adhérence et la production de cytokines par l'endothélium. Journée des Jeunes Chercheurs, 20 Octobre 1995, Institut Pasteur de Lille.

- **Molet, S.**, Gosset, P., Tsicopoulos, A., Czarlewski, W. and Tonnel, A.B. Inhibitory activity of loratadine and descarboxyethoxyloratadine on histamine-induced activation of human endothelial cells. AAAAI International Conference, 15-20 March 1996, New Orleans, Louisiana. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **97**: 385.

## PLAN

### *A. Biologie de l'endothélium*

<b>I. Différenciation et diversité de l'endothélium.</b>	<b>p3</b>
<b>II. Identification des cellules endothéliales en culture.</b>	<b>p5</b>
<b>III. Morphologie des cellules endothéliales en culture.</b>	<b>p7</b>
1. Le noyau.	p8
2. Le cytoplasme.	p8
3. Le cytosquelette.	p9
4. La membrane plasmique.	p11
<b>IV. Endothélium et hémostase.</b>	<b>p11</b>
1. L'endothélium: surface naturellement anti-thrombogène.	p11
2. L'endothélium face à une agression.	p13
a. l'agrégation plaquettaire.	
b. les facteurs de coagulation: facteurs thrombogènes.	
c. la fibrinolyse.	
d. la recolonisation vasculaire.	
<b>V. Endothélium et tonus vasculaire.</b>	<b>p18</b>
1. Synthèse de substances vasodilatatrices.	p19
2. Synthèse de substance vasoconstrictrices.	p21
<b>VI. Endothélium et réaction inflammatoire.</b>	<b>p23</b>
1. Le recrutement des leucocytes dans les tissus.	p23
a. Implication de différentes familles de molécules d'adhérence.	p24
<i>α. famille des Sélectines.</i>	
<i>β. famille des Intégrines.</i>	
<i>γ. superfamille des Immunoglobulines.</i>	
b. Participation de molécules chémoattractantes.	p33
c. Facteurs activant les cellules endothéliales ou les leucocytes.	p37
d. La cascade des interactions leucocytes/cellules endothéliales.	p38
<i>α. rolling.</i>	
<i>β. arrêt-activation-adhérence.</i>	
<i>γ. diapédèse.</i>	
<i>δ. migration subendothéliale.</i>	
e. Recrutement leucocytaire sélectif.	p42
2. Les médiateurs endothéliaux participant à la réaction inflammatoire.	<b>p44</b>
a. Les cytokines.	
b. Les chémokines.	
c. Les dérivés de l'acide arachidonique et le PAF.	
3. La cellule endothéliale en tant que cellule présentatrice d'antigène.	<b>p48</b>

<b>VII. Participation de l'endothélium dans la réaction inflammatoire immunoallergique: exemple de l'asthme.</b>	<b>p50</b>
1. les réactions allergiques asthmatiques immédiate et tardive.	p51
a. la réaction immédiate.	
b. la réaction tardive ou retardée.	
2. les médiateurs cellulaires impliqués dans l'asthme.	p54
a. les mastocytes	
b. les macrophages	
c. les lymphocytes T	
d. les éosinophiles	
e. les neutrophiles	
f. les plaquettes	
g. les fibroblastes	

### *B. Travaux personnels*

<b>I. Interactions entre les cellules endothéliales et les mastocytes.</b>	<b>p64</b>
<b>II. Interactions entre les cellules endothéliales et les éosinophiles.</b>	<b>p71</b>
PREMIERE PARTIE: expression de molécules d'adhérence endothéliales.	p74
DEUXIEME PARTIE: sécrétion de différentes cytokines endothéliales.	p85
<b>III. Etude de la régulation d'ESM-1, une nouvelle molécule spécifique des cellules endothéliales humaines.</b>	<b>p91</b>

### *C. Discussion-Conclusion* **p98**

### *D. Perspectives* **p112**

### *E. Annexe* **p117**

### *F. Références bibliographiques* **p136**

## ABBREVIATIONS

**ADP:** adénosine diphosphate  
**ARNm:** acide ribonucléique messenger  
**ATP:** adénosine triphosphate  
**BB:** biopsie bronchique  
**CAM:** cell adhesion molecule  
**CD:** cluster of differentiation  
**CNP:** C-type natriuretic peptide  
**CPA:** cellule présentatrice d'antigène  
**Da:** Dalton  
**DARC:** Duffy antigen/receptor for chemokines  
**ECP:** eosinophil cationic protein  
**EDCF:** endothelium-derived contracting factor  
**EDHF:** endothelium-derived hyperpolarising factor  
**EDN:** eosinophil derived neurotoxin  
**EDRF:** endothelium-derived relaxing factor  
**EGF:** epidermal growth factor  
**EPO:** eosinophil peroxidase  
**ET:** endothéline  
**FGF:** fibroblast growth factor  
**fMLP:** formyl méthionine leucine phénylalanine  
**FvW:** facteur von Willebrand  
**GAG:** glycosaminoglycanes  
**(GM-)CSF:** (granulocyte macrophage-) colony stimulating factor  
**GMPc:** guanosine monophosphate cyclique  
**gp:** glycoprotéine  
**HS:** héparanes sulfates  
**HUVEC:** human umbilical vein endothelial cell  
**ICAM:** intercellular cell adhesion molecule  
**IFN:** interferon  
**Ig:** immunoglobuline  
**IL:** interleukine  
**LBA:** lavage bronchoalvéolaire  
**LFA:** lymphocyte function-associated antigen  
**LPS:** lipopolysaccharide  
**LT:** leucotriène  
**MBP:** major basic protein  
**MCP:** monocyte chemoattractant protein  
**MEC:** matrice extracellulaire  
**MIP:** macrophage inflammatory protein  
**NK:** natural killer  
**NO:** monoxyde d'azote  
**PAF:** platelet activating factor  
**PDGF:** platelet derived growth factor  
**PECAM:** platelet endothelial cell adhesion molecule  
**PG:** prostaglandine  
**PLC:** phospholipase C  
**PMA:** phorbol myristate acetate  
**RANTES:** regulated on activation normal T expressed and secreted  
**(S)Le:** (sialyl) Lewis  
**TGF:** transforming growth factor  
**Th:** T helper  
**TNF:** tumor necrosis factor  
**TX:** thromboxane  
**VCAM:** vascular cell adhesion molecule  
**VLA:** very late antigen

## RESUME

La réaction inflammatoire immunoallergique résulte d'un réseau d'interactions complexes entre les cellules inflammatoires (mastocytes, éosinophiles, macrophages, lymphocytes) et les cellules appartenant, dans le cas des pathologies respiratoires, à la structure pulmonaire elle-même à savoir les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les cellules épithéliales bronchiques. Par sa localisation, l'endothélium vasculaire joue un rôle majeur dans la régulation du développement de la réaction inflammatoire: (i) il contrôle la migration transvasculaire des leucocytes, du sang vers les tissus, par l'intermédiaire de molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales; (ii) il est également capable d'activer les leucocytes et d'amplifier la réaction immunoallergique par la sécrétion de médiateurs proinflammatoires comme les cytokines (IL-1, IL-6, ...), les leucotriènes et par la libération de facteurs chémoattractants comme les chémokines (IL-8, MCP-1...).

Le premier thème de notre recherche a consisté à étudier les interactions entre les cellules endothéliales humaines (issues de veine ombilicale) et l'histamine, un des principaux médiateurs mastocytaires libérés à la suite d'une activation dépendante de l'IgE. Nous avons montré que l'implication du mastocyte, généralement attribuée à la phase immédiate de la réaction allergique, pouvait s'étendre à la phase tardive en incitant la cellule endothéliale à exprimer la P-sélectine, l'IL-6 et l'IL-8. Nous avons également mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de la Loratadine, un anti-histaminique couramment utilisé dans le traitement de l'asthme. Ces résultats laissent entrevoir de nouvelles possibilités d'utilisation de certains anti-histaminiques en thérapeutique, notamment dans des états inflammatoires persistants d'origine immunoallergique.

Le deuxième thème de notre recherche a concerné l'étude des coopérations cellulaires pouvant avoir lieu entre les cellules endothéliales et les éosinophiles lors de la réaction allergique. Nous avons montré que le polynucléaire éosinophile, à côté de son rôle effecteur, est capable de réguler et de favoriser, par l'intermédiaire de l'endothélium vasculaire, le recrutement d'autres éosinophiles. En effet, nous avons mis en évidence que des médiateurs libérés par les éosinophiles (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et les protéines cationiques) induisent l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales et augmentent la sécrétion de cytokines (IL-6) et chémokines (IL-8 et MCP-1) par ces mêmes cellules. L'expression de ces différents facteurs (molécules d'adhérence, cytokines et chémokines) peuvent favoriser l'adhésion et le recrutement cellulaire.

La dernière partie de notre travail a été d'approfondir nos connaissances sur une nouvelle molécule, spécifique des cellules endothéliales pulmonaires humaines, appelée ESM-1. Nous avons démontré que l'expression et la distribution cellulaire de cette molécule étaient influencées par les cytokines habituellement présentes dans la réaction inflammatoire immunoallergique comme le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IFN $\gamma$ .

L'ensemble de ces travaux apporte des éléments nouveaux sur la participation active de la cellule endothéliale dans les mécanismes mis en jeu lors de la réaction inflammatoire immunoallergique, notamment en pathologie respiratoire.



## INTRODUCTION

L'endothélium vasculaire est une monocouche cellulaire qui tapisse la face endoluminale de différents types de vaisseaux sanguins de l'organisme, constituant ainsi une interface critique et stratégique entre le sang et la paroi vasculaire. Il y a encore peu de temps, l'endothélium vasculaire était considéré comme une sorte de gigantesque "tuyau" de dialyse bordant le vaisseau, empêchant les protéines plasmatiques de diffuser dans le compartiment extravasculaire et présentant une surface hémocompatible permettant de prévenir la coagulation sanguine. Des découvertes plus récentes ont mis en évidence la participation des cellules endothéliales à des activités plus larges comme l'induction ou la prévention de la coagulation sanguine, la participation au métabolisme plaquettaire et granulocytaire, la recirculation lymphocytaire, la réponse immunitaire, la prolifération musculaire lisse, la régulation lipidique, la sécrétion des facteurs de croissance hématopoïétiques et le contrôle du tonus vasculaire. Parallèlement, l'implication de l'endothélium dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, angiogenèse tumorale, maladies auto-immunes...) est maintenant bien documentée, surtout en ce qui concerne son rôle dans le développement de la réaction inflammatoire.

L'intérêt porté à la compréhension des processus dynamiques qui autorisent la mise en place de l'inflammation, et qui sont largement dépendants de la fonction de filtre de l'endothélium vasculaire entre le flux sanguin et les tissus environnants, amène les recherches concernant la pathogenèse de l'asthme bronchique à se concentrer sur les cellules endothéliales. Non seulement ces cellules représentent une cible pour les différents types cellulaires impliqués dans l'allergie mais elles peuvent aussi être considérées comme des participants actifs dans le développement de la réaction inflammatoire immunoallergique: par la production de médiateurs proinflammatoires possédant des propriétés activatrices ou inhibitrices (phospholipides, cytokines, chémokines) et à travers l'expression de molécules d'adhérence à sa surface (molécules qui supportent l'adhésion des leucocytes sanguins et leur migration vers les sites inflammatoires). De cette manière, les cellules endothéliales empêchent ou autorisent l'influx de leucocytes sanguins dans les tissus.

L'unité de recherche dirigée par le Professeur TONNEL est particulièrement axée sur la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la réaction inflammatoire en pathologie immunoallergique respiratoire, et dans ce contexte l'asthme représente un des pôles d'intérêt. Ainsi a été entreprise, depuis quelques années, l'étude des coopérations entre les cellules endothéliales et les leucocytes dans l'initiation et la pérennisation de la réaction inflammatoire décrites dans les asthmes allergiques.

Le travail de recherche qui a été mené lors de ma thèse a consisté à étudier, à différents niveaux, la contribution des cellules endothéliales dans l'asthme:

1) nous avons testé, directement au niveau de l'activation endothéliale, l'efficacité d'un anti-histaminique couramment utilisé dans le traitement de l'asthme;

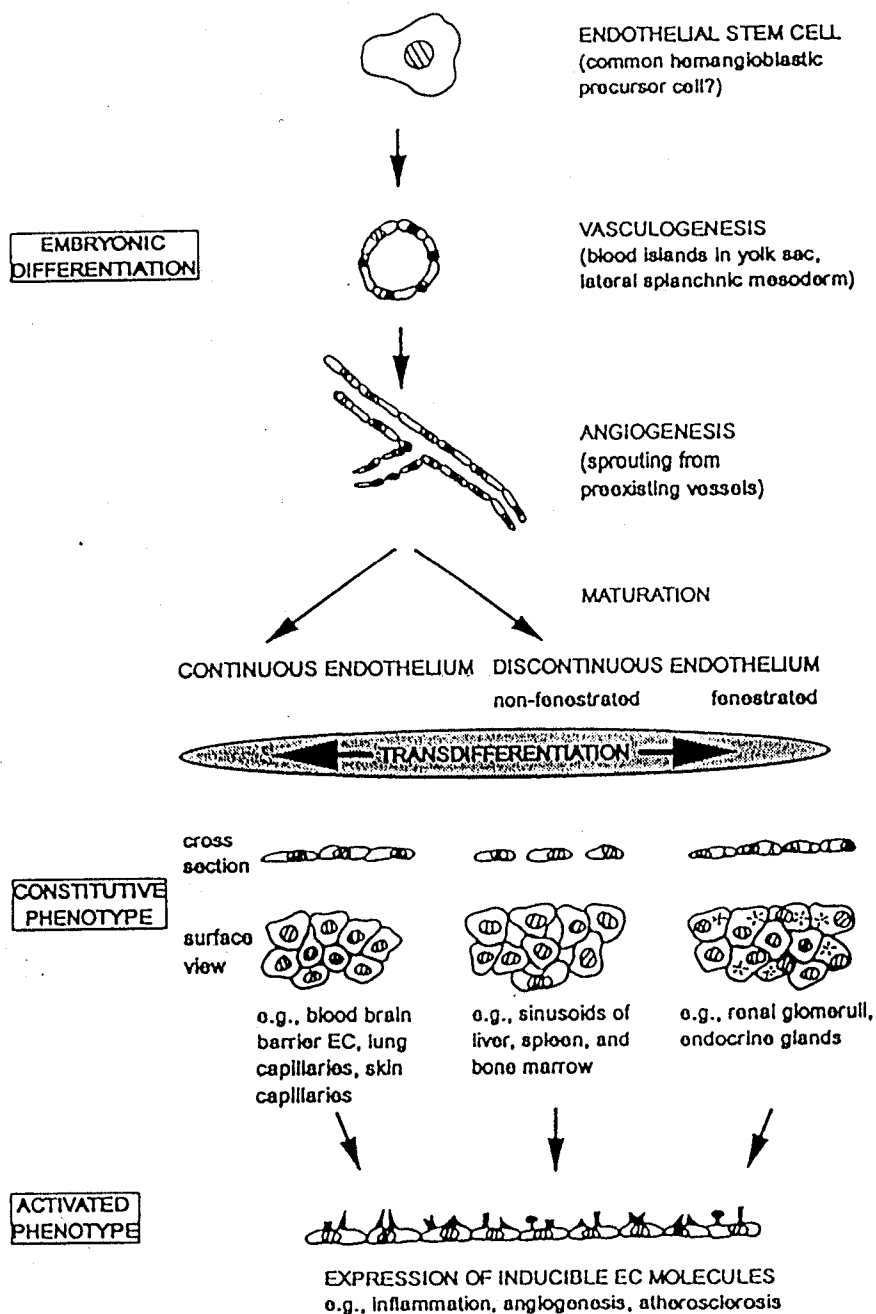
2) l'analyse des mécanismes cellulaires d'activation de la cellule endothéliale lors de la réaction allergique bronchique a été abordée par l'étude des coopérations entre cette cellule et l'éosinophile, cellule clé de la pathologie asthmatique;

3) la mise en évidence récente dans notre laboratoire d'une molécule spécifique des cellules endothéliales nous a amenés à étudier la régulation de son expression par des médiateurs intervenant dans la réaction inflammatoire associée à l'asthme.

*Biologie*

*de*

*l'endothélium*



**Figure 1: Différenciation des cellules endothéliales.** Les cellules souches endothéliales potentielles migrent, prolifèrent et se différencient lors de processus de vasculogénèse et d'angiogénèse, de manière à former les nombreux phénotypes de cellules endothéliales qui sont retrouvés dans les différents lits vasculaires. La stimulation de cellules endothéliales (EC) entraîne une expression spécifique de molécules qui constituent la caractéristique du phénotype "activé" des cellules endothéliales. Le phénotype constitutif des cellules endothéliales est contrôlé spécifiquement par le milieu environnant; et de la même manière, la transdifférenciation des cellules endothéliales caractérise le processus à travers lequel un phénotype constitutif est altéré en réponse à un changement du microenvironnement. (Extrait de "Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes". H.G. Augustin, D.H. Koziar and R.C. Johnson. (1994). *Bioassays* 16: 901-906.)

## A. Biologie de l'endothélium

### I. Différenciation et diversité de l'endothélium.

L'hypothèse selon laquelle les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques dérivent d'un précurseur commun lors de l'embryogenèse a été émise (Risau, 1988) puis confirmée après que l'on ait découvert, à la surface des cellules endothéliales de l'adulte, l'expression de marqueurs de différenciation de cellules hématopoïétiques (Favaloro, 1993). La différenciation *de novo* des cellules endothéliales primaires, processus défini sous le terme de vasculogenèse, est suivie dans les étapes ultérieures du développement embryonnaire par l'angiogenèse, qui correspond au "bourgeoisement" de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux sanguins préexistants (**Figure 1**). Ces deux processus, étroitement contrôlés dans le temps et dans l'espace, subissent l'influence du microenvironnement notamment par l'intermédiaire de facteurs de croissance exogènes (Fibroblast Growth Factor (FGF) acide, FGF basique, Transforming Growth Factor alpha (TGF $\alpha$ ), TGF $\beta$ ) mais aussi d'autres composés tels l'angiogénine, l'héparine et le cuivre (Folkman, 1987).

En effet l'arbre vasculaire peut être divisé en différents systèmes ayant chacun leur spécificité (revu par Caen, 1987):

- le système artériel composé des artères et des artérioles,
- le système capillaire,
- le système veineux constitué par les veinules et les veines.

L'hétérogénéité phénotypique des cellules endothéliales est la conséquence d'une adaptation des territoires vasculaires à leur fonction (Bicknell, 1993):

Ainsi l'endothélium au niveau du système artériel se présente comme une monocouche de cellules endothéliales, de forme polygonale et reposant sur une membrane basale discontinue. La morphologie "monocouche" joue un rôle majeur dans la conception de

l'endothélium en tant que "barrière continue". On estime la surface de cet endothélium à environ 28 m<sup>2</sup> (Wolinsky, 1980).

Au niveau du système capillaire, trois situations sont envisageables: (i) dans la plupart des cas, l'endothélium est formé d'une simple couche de cellules endothéliales extrêmement proches les unes des autres, les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes n'étant séparées que par une fente très étroite constituant la jonction (ex: capillaires des muscles cardiaques et squelettiques, du poumon et de la peau...); (ii) dans certains cas, la couche endothéliale est traversée par de nombreux pores, encore appelés fenestrations, donnant ainsi naissance à un endothélium discontinu fenestré (capillaires fenestrés retrouvés au niveau des glandes endocrines et des glomérules rénaux); (iii) dans la moelle osseuse et les sinusoides du foie ou de la rate, les cellules endothéliales sont alignées avec des cellules de type réticulo-endothélial, formant un endothélium discontinu non-fenestré. L'endothélium capillaire a été estimé comme représentant une surface d'environ 1500 m<sup>2</sup> (Wolinsky, 1980).

L'endothélium situé au niveau du système veineux, évalué à une surface de plus ou moins 90 m<sup>2</sup> (Wolinsky, 1980) est assez semblable à celui retrouvé au niveau du système artériel, les différences concernant davantage les couches plus internes de la paroi vasculaire.

Le phénotype constitutif des cellules endothéliales est assez instable et peut être perdu dès lors que les cellules sortent de leur environnement. Néanmoins cette possibilité de transdifférenciation illustre parfaitement la capacité de ces cellules à s'adapter au mieux aux besoins locaux par la mise en place de fonctions structurales et métaboliques complexes. Les modifications morphologiques des cellules endothéliales peuvent également être associées à une activation cellulaire (phénotype d'activation): l'induction de l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales lors de l'inflammation en est l'un des meilleurs exemples (se reporter au paragraphe VI).

## II. Identification des cellules endothéliales en culture.

L'isolement des cellules endothéliales à partir des différents vaisseaux est une étape délicate qui a nécessité plusieurs années de mise au point afin d'obtenir des cultures d'une assez grande pureté. En effet, de part les techniques d'isolement, des cellules périvasculaires (péricytes, cellules musculaires lisses, fibroblastes) contaminaient fréquemment les cultures de cellules endothéliales. Ceci a conduit les auteurs à rechercher l'existence de marqueurs métaboliques et ultrastructuraux certifiant l'origine endothéliale des cellules en culture (néanmoins ils ne permettent pas d'identifier la provenance (petits ou grands vaisseaux) des cellules). Parmi ces marqueurs, on distingue:

- le facteur VIII/Facteur de Willebrand (von willebrand factor ou vWF): antigène intracellulaire considéré comme étant le marqueur le plus fiable, le facteur de Willebrand se présente sous la forme d'une glycoprotéine multimérique composée de plusieurs sous-unités de 225000 Daltons. Stocké dans les corps de Weibel-Palade, il est libéré par la cellule endothéliale en réponse à divers stimuli (dont la thrombine) constituant le facteur VIIIvWF plasmatique. Il peut également s'associer au facteur VIIIc (coagulant) (facteur anti-hémophilique A) pour former le complexe (FVIII/FvW+FVIIIc). La fonction du VIIIvWF sera présentée ultérieurement (se reporter au paragraphe IV.2.b). Cet antigène a été décrit dans des cultures de cellules endothéliales d'origines diverses: veine ombilicale (Jaffe, 1977), aorte (Booyse, 1975a), artère et veine pulmonaires (Johnson, 1980), capillaires surrénaux (Folkman, 1979), capillaires de la peau (Davison, 1980), du cerveau (Phillips, 1979) et de la rétine (Bruzney, 1979). Le facteur VIII existe également sur les mégacaryocytes et les plaquettes (Jaffe, 1977).

- l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin Converting Enzyme ou ACE): cette enzyme (transformant l'angiotensine I en angiotensine II) est exprimée de façon constitutive au pôle luminal de la cellule endothéliale (Ryan, 1976). Cette localisation lui permet de participer à la régulation du tonus vasculaire (se reporter au paragraphe V.). Elle a été détectée sur des cellules endothéliales d'aorte (Hayes, 1978), de veine ombilicale (Johnson,

1977), d'artère et de veine pulmonaires (Johnson, 1980), de cerveau (Bowman, 1981) et de capillaires surrenaux (Folkman, 1979). Toutefois il semble important de préciser que l'ACE est également exprimée par les macrophages et certains épithélia (Caldwell, 1976) de telle sorte que sa présence sur une cellule ne garantit pas l'origine endothéliale de cette dernière (néanmoins son absence dans une culture supposée d'origine endothéliale doit attirer l'attention).

- les corps de Weibel-Palade: décrits comme des baguettes d'environ 0,1  $\mu\text{m}$  de diamètre et 3  $\mu\text{m}$  de long (Weibel, 1964), ils forment un faisceau de tubules parallèles à l'axe longitudinal de la cellule. Bien que leur fonction reste inconnue, ils constituent un excellent marqueur endothélial. *In vivo*, les corps de Weibel-Palade sont abondants dans les grands vaisseaux et les capillaires en croissance et, à un degré moindre, dans les capillaires matures (Kumar, 1980). Ils ont été mis en évidence dans des cellules endothéliales isolées à partir de veine ombilicale (Haudenschild, 1975) ou de capillaires surrenaux (Folkman, 1979). En plus de leur spécificité endothéliale, ils pourraient refléter une spécificité humaine puisqu'il semble plus difficile de les mettre en évidence sur des cellules endothéliales bovines, murines ou de rat.

- une surface non-thrombogène: par définition, le rôle de l'endothélium est d'assurer le maintien d'une surface à laquelle les plaquettes et autres cellules ne peuvent pas adhérer. Sa position de filtre entre le sang et les vaisseaux rend implicite sa participation dans la régulation de l'activation de la coagulation sanguine et les processus d'infiltrats cellulaires. Il a été démontré que les cellules endothéliales d'aorte (Booyse, 1975b), de veine ombilicale (Curwen, 1980) et de capillaires cervicaux (Bowman, 1981) en culture maintenaient une surface non-thrombogène.

- production de prostacycline (encore appelée Prostaglandine  $I_2$  ou  $PGI_2$ ): ce dérivé de l'acide arachidonique est connu pour sa puissante activité inhibitrice de l'agrégation plaquettaire (Moncada, 1976) ainsi que pour son action vasodilatatrice (Dusting, 1977). Son action dans ces processus sera développée respectivement dans les paragraphes IV.1. et V.1.



La synthèse de prostacycline a été évaluée sur des cellules endothéliales de capillaires (Coughlin, 1980), d'aorte et de veines ombilicales (Weksler, 1977; Coughlin, 1980).

Les cellules endothéliales humaines les plus accessibles sont celles isolées à partir de la veine ombilicale (couramment appelées HUVEC pour Human Umbilical Vein Endothelial Cell). De fait, ces cellules représentent le modèle d'étude de référence de l'endothélium vasculaire humain. Néanmoins le faible index mitotique de ces cellules, décrit *in vivo* pour l'endothélium (Wright, 1972), est également observé *in vitro* et rend impossible la culture à long terme et à grande échelle. Bien qu'il ait été établi que le sérum fournit une multitude d'hormones et de facteurs mitogènes pour la croissance *in vitro* de cellules mammifères, les HUVEC comme les cellules endothéliales isolées à partir d'aorte bovine présentent une densité de saturation qui est indépendante de la concentration de sérum contenu dans le milieu de culture (Haudenschild, 1976): ceci rend la cellule endothéliale humaine unique parmi les cellules impliquées dans la biologie du vaisseau. De plus, une fois la confluence atteinte, les cellules stoppent leur croissance (phénomène décrit sous le terme d'inhibition de contact ou topoinhibition) et ceci même si des facteurs de croissance sont ajoutés au milieu de culture (Haudenschild, 1976). Néanmoins la croissance *in vitro* des HUVEC peut être stimulée par un facteur de croissance (Endothelial Cell Growth Factor ou ECGF), protéine d'environ 75000 Daltons isolée à partir d'hypothalamus bovin (Maciag, 1979).

### **III. Morphologie des cellules endothéliales en culture.**

Les cellules endothéliales *in vivo* s'organisent en monocouche aplatie et uniforme de cellules polygonales et allongées, longues de 25 à 50  $\mu\text{m}$ , larges de 10 à 15  $\mu\text{m}$ , orientées dans le sens du flux sanguin. Le versant supérieur des cellules endothéliales est en contact avec le sang (pôle luminal ou apical) et le versant inférieur est exposé au fluide interstitiel et la matrice extracellulaire du sous-endothélium (pôle subluminal ou basal). Il apparaît évident qu'une fois les cellules isolées de leur vaisseau et mises en culture *in vitro* cette définition ne peut plus être

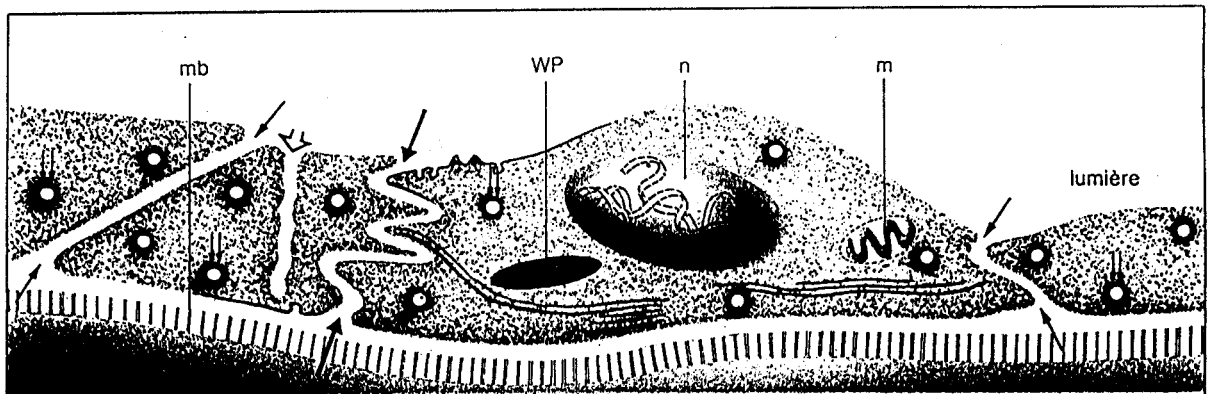


Figure 8  
Représentation schématique et simplifiée d'une cellule endothéliale.

Ce schéma montre les communications possibles entre la lumière du vaisseau et la membrane basale du sous-endothélium par les jonctions interendothéliales (↙) et des canaux trans-endothéliaux (↘). Une vésicule d'endocytose (⊖) et différentes vésicules ↓ cytoplasmiques sont également visibles.  
n = noyau ; m = mitochondrie ; WP = corps de Weibel Palade ; mb = membrane basale.

utilisée comme critère morphologique majeur. Néanmoins cette polarité est également fonctionnelle puisque les composés qui doivent se retrouver dans le sang circulant sont sécrétés, par la cellule endothéliale, par le pôle luminal et que les produits destinés à rejoindre la matrice (constituée de collagène, fibronectine, élastine...) sont sécrétés par le pôle basal. Une représentation schématique d'une cellule endothéliale est proposée sur la **Figure 2**: on y distingue:

### **1. Le noyau.**

La cellule endothéliale présente un noyau rond légèrement elliptique entouré d'un cytoplasme périnucléaire dense et riche en organites cellulaires.

### **2. Le cytoplasme.**

- *les fibrilles*: dans des cultures post-confluentes, on peut observer la mise en place, dans la zone de contact entre le substrat et la membrane basale des cellules, d'un réseau circulaire complexe fait de fibrilles périphériques de 60 Angströms et qui s'oriente de façon parallèle aux fibrilles extracellulaires. Cette orientation préférentielle semble constituer l'évidence morphologique d'une certaine polarité des cellules endothéliales en culture.

- *les corps de Weibel-Palade*: ces organites cellulaires ont déjà été décrits dans le paragraphe II.. Brièvement, ces corps en forme de baguette sont entourés d'une membrane unique. Leur matrice homogène renferme de nombreuses structures tubulaires. Outre le fait d'être le réservoir naturel du facteur de Willebrand, leur fonction reste relativement mal connue.

- *les vésicules*: si l'endothélium constitue une véritable barrière entre le sang et les tissus, il ne doit pas pour autant être un obstacle au passage de nutriments et autres solutés entre ces deux compartiments. Ainsi plusieurs mécanismes d'endocytose peuvent intervenir selon la taille des composés à incorporer. La captation de microgouttelettes extracellulaires peut

se faire par simple invagination de la membrane. L'ingestion de fluides et de solutés est réalisée au niveau de puits de clathrine (encore appelés puits recouverts) par l'intermédiaire de petites vésicules (diamètre inférieur à 150 nm) véritables morceaux de la membrane plasmique des cellules. L'incorporation de ces vésicules dites recouvertes dans le cytoplasme constitue la pinocytose. Leur nombre varie fortement avec les conditions de culture. Les vésicules de pinocytose sont localisées à la base et au sommet des membranes ainsi que le long des membranes en contact avec des cellules adjacentes. Un autre mode plus spécifique d'endocytose permet à la cellule d'incorporer des macromolécules. Ces dernières se fixent à des récepteurs complémentaires exprimés à la surface cellulaire au niveau de puits recouverts. Ces complexes récepteur-macromolécule sont internalisés dans les vésicules d'endocytose.

- les jonctions serrées et jonctions ouvertes: non seulement les cellules endothéliales communiquent avec le milieu environnant (sang, tissu) mais elles assurent également des échanges entre elles par l'intermédiaire de jonctions intercellulaires. Parmi celles-ci on distingue des jonctions serrées ou imperméables (tight junctions) ainsi que des jonctions ouvertes (gap junctions), les deux types ayant été mis en évidence dans des cultures primaires de cellules endothéliales (Larson, 1982). Après plusieurs passages ces jonctions sont moins fréquentes et moins développées que dans les cultures primaires mais ce déficit semble être compensé par un réseau complexe d'invaginations cytoplasmiques. Ces jonctions participent au maintien de la polarité cellulaire, de l'intégrité tissulaire ainsi qu'à la régulation des échanges transvasculaires.

### 3. Le cytosquelette.

Il est composé des trois systèmes fibreux décrits ci-dessous:

- les microfilaments: constitués d'actine, de myosine et de tropomyosine, ces filaments, dont la taille peut atteindre jusqu'à 50  $\mu\text{m}$  (soit toute la longueur de la cellule endothéliale) s'associent pour former des faisceaux de 6 nm de diamètre qui sous-tendent la

membrane plasmique (Goldman, 1979; Giacomelli, 1970). De ce fait, ils sont préférentiellement retrouvés au site d'attachement de la cellule à son substrat (pôle basal *in vivo*) (Gimbrone, 1974). Il a été démontré que l'histamine engendrait la formation des filaments d'actine (Carson, 1992). La thrombine peut se fixer au récepteur de la vitronectine exprimé à la surface des cellules endothéliales et induire la réorganisation du cytosquelette (Bar-Shavit, 1991; Phillips, 1994). Le TGF $\beta$ , décrit pour diminuer la prolifération des cellules endothéliales, modifie également l'agencement des microfilaments d'actine (Coomber, 1991) tout comme le TNF, l'hyperthermie, le 12 (S) HETE (un métabolite de la lipooxygénase) (Lin, 1992; Tang, 1993). La redistribution des filaments d'actine dans les cellules endothéliales est un des événements cellulaires très précoces ayant lieu en réponse aux forces de cisaillement que subissent les cellules endothéliales (Ookawa, 1992).

- les filaments: composés essentiellement de vimentine (Franke, 1978), ces filaments de 10 nm de diamètre (Lazarides, 1980) mais de longueur variable se regroupent en faisceaux ou restent sous forme de simples filaments autour du noyau ou bien encore dispersés au sein du cytoplasme (Blose, 1979; Blose, 1976). Des études *in situ* de cellules endothéliales montrent une association de ces filaments avec des organites intracellulaires tels que les mitochondries (Franke, 1979), les lysosomes (Asmussen, 1975), les corps de Weibel-Palade (Gimbrone, 1974), les phagosomes (Frank, 1977) ou encore le noyau (Blose, 1979). Il a été démontré *in vivo* que ces filaments intervenaient lors de la mitose en assurant le maintien aux vaisseaux des cellules filles issues d'une cellule en division, les empêchant ainsi d'être emportées par le flux sanguin (Blose, 1981).

- les microtubules: d'un diamètre de 24 nm, ils correspondent au regroupement autour d'une cavité, laissée creuse, de treize protofilaments, hétérodimères des tubulines alpha et bêta associées à des protéines dites MAPs (Microtubules Associated Proteins) (Snyder, 1976). Dispersés dans le cytoplasme (Ausprunk, 1978), ils participent aux processus de morphogénèse et de mouvements cellulaires (Gotlieb, 1981). Associés aux filaments de 10 nm,

ils assurent le transport des organites cellulaires et des produits de sécrétion à travers le cytoplasme (Wang, 1978).

#### **4. La membrane plasmique.**

Les cellules endothéliales sont recouvertes d'un manteau péricellulaire, encore appelé glycocalyx, constitué au pôle apical de protéoglycanes (PG) et de glycosaminoglycanes (GAG) (Roth, 1984). Les cellules endothéliales synthétisent et sécrètent ces composés parmi lesquels on distingue des héparanes sulfates (HS) essentiellement localisés à la surface de la cellule, alors que des chondroïtines sulfates (CS) et des dermatanes sulfates (DS) occupent une position plus extracellulaire (Simionescu, 1981).

### **IV. Endothélium et hémostasie.**

L'hémostasie se définit comme l'ensemble des mécanismes assurant à la fois le maintien et la fluidité du sang dans les espaces vasculaires.

#### **1. L'endothélium: surface naturellement anti-thrombogène.**

A l'état physiologique, la cellule endothéliale produit des substances qui maintiennent la fluidité sanguine. Parmi ces différents facteurs, on peut citer:

- les prostaglandines (PG): Les cellules endothéliales ainsi que les cellules musculaires lisses ont la particularité de sécréter des prostaglandines en quantité élevée (Wolinsky, 1980; Pelikan, 1979). Ces molécules (PGD<sub>3</sub>, PGE<sub>2</sub> et PGI<sub>2</sub>) sont issues du catabolisme de l'acide arachidonique (Marcus, 1978). La PGI<sub>2</sub> ou prostacycline a été décrite comme étant un puissant agent vasodilatateur et anti-agrégant plaquettaire jouant un rôle capital dans la prévention de la thrombose. La sécrétion la plus importante de PGI<sub>2</sub> a été mise en

évidence dans les cellules endothéliales de veine ombilicale et d'aorte bovine et porcine, la source de cellules endothéliales semblant être un déterminant majeur pour la capacité de ces cellules à produire la PGI<sub>2</sub> (Moncada, 1977). Plusieurs groupes d'agents sont capables de stimuler les cellules endothéliales et d'induire leur production de PGI<sub>2</sub>: on peut citer la thrombine, l'angiotensine, l'acide arachidonique, le calcium ionophore, la trypsine, la bradykinine, les nucléotides de l'adénosine et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet Derived Growth Factor ou PDGF) (Weksler, 1977; Weksler, 1978; Coughlin, 1980; Moncada, 1977; Czervionke, 1979).

- le système protéine C - protéine S - thrombomoduline: Les cellules endothéliales synthétisent et expriment à leur surface une protéine de 74 kDa: la thrombomoduline. Cette protéine se comporte comme un récepteur pour la thrombine. Ce complexe thrombine-thrombomoduline active la protéine C (inhibiteur physiologique de la coagulation), la thrombomoduline jouant le rôle d'un cofacteur accélérant considérablement la réaction (Levin, 1979). La protéine C passe donc d'une forme inactive à une forme active (protéine Ca) et le complexe thrombine-thrombomoduline est internalisé et dégradé à l'intérieur des cellules endothéliales. La protéine Ca a pour but d'inactiver les facteurs Va et VIIIa, réaction également potentialisée par un cofacteur: la protéine S (Esmon, 1983).

- les "heparin like molecules": mises en évidence à la surface des cellules endothéliales de capillaires en culture (Marcum, 1984), ces molécules correspondent essentiellement à des héparanes sulfates (HS) dont le rôle (semblable à celui de l'héparine mais à un degré moindre (Teien, 1976)) consiste à fixer de l'anti-thrombine III (ATIII) et probablement de la thrombine. Une fois fixée aux HS, l'ATIII accélère l'inhibition de la thrombine et des facteurs IXa et Xa (Hatton, 1978). Des produits de sécrétion plaquettaire tels l'héparinase et le polypeptide platelet factor 4 (PF4) peuvent influencer ces réactions et initier l'hémostase: en dégradant l'héparine et les HS pour l'héparinase (Wasteson, 1976) ou en entrant en compétition avec l'ATIII (en raison de sa très forte affinité pour l'héparine) pour la fixation aux HS membranaires dans le cas du PF4 (Busch, 1980). Il existe donc à la surface de

l'endothélium au moins deux systèmes d'inhibition de la thrombine: le système protéine C-protéine S-thrombomoduline et le complexe ATIII-HS.

• les GAG (glycosaminoglycanes): L'importance des GAG et surtout des héparanes sulfates se traduit à plusieurs niveaux: (i) de part leur encombrement stérique et leurs propriétés polyanioniques, les GAG sont en partie responsables de la sélectivité du transport transcellulaire des macromolécules et des ions. Ils participent au contrôle de la perméabilité endothéliale (Shirahama, 1972); (ii) les interactions des GAG avec les cellules sanguines ou leurs dérivés occupent une place capitale lors des différentes étapes de l'hémostase. En effet ils influencent l'adhésion puis l'agrégation plaquettaire (Busch, 1973) ainsi que le système de coagulation (Kirk, 1959). En effet l'ajout *in vitro* d'héparanes sulfates, de chondroïtines sulfates ou de dermatanes sulfates entraîne l'inhibition de ces deux phénomènes (Busch, 1973). De plus, en s'associant avec d'autres produits de la cellule endothéliale comme la prostacycline, les GAG seraient capables de créer une véritable barrière repoussant les plaquettes et inhibant toute adhésion (Hoak, 1981). Les GAG participent ainsi à la limitation et la focalisation de l'agrégation plaquettaire au foyer lésionnel.

## **2. L'endothélium face à une agression.**

Dans une situation d'agression (traumatique, inflammatoire, toxique...), la surface anti-thrombogène peut être rompue. Se déclenche alors toute une série de phénomènes qui a pour objectif la réparation de la lésion et la restauration de l'intégrité de la surface anti-thrombogène. Ces phénomènes sont divisés en plusieurs étapes successives très liées (revu par Crutchley, 1987):

- *l'hémostase primaire (2 à 5 min)* correspondant à l'adhésion, l'activation puis l'agrégation des plaquettes sanguines,
- *la coagulation (5 à 10 min)* qui aboutit à la formation d'un caillot. La coagulation met en jeu un grand nombre facteurs,



**Tableau 1: Les facteurs de la coagulation**

<b>Numéro</b>	<b>Nom</b>	<b>Rôle</b>
<b>I</b>	Fibrinogène	Substrat
<b>II</b>	Prothrombine	Enzyme
<b>III</b>	Thromboplastine tissulaire	"Cofacteur"
<b>IV</b>	Calcium	Cofacteur
<b>V</b>	Proaccéréline	Cofacteur
<b>VII</b>	Proconvertine	Enzyme
<b>VIII</b>	Anti-hémophilique A	Cofacteur
<b>IX</b>	Anti-hémophilique B	Enzyme
<b>X</b>	Facteur Stuart	Enzyme
<b>XI</b>	Facteur Rosenthal	Enzyme
<b>XII</b>	Facteur Hageman	Enzyme
<b>XIII</b>	Facteur stabilisant la fibrine	Enzyme
<b>aucun</b>	Prékallicroïne (Facteur Fletcher)	Enzyme
<b>aucun</b>	Kininogène (de haut PM) (Facteur Fitzgerald)	"Cofacteur"

Le facteur VI n'existe pas.

- la fibrinolyse (>24 h), processus de réparation, aboutit à la dissolution du caillot,
- la recolonisation vasculaire.

### **a. L'agrégation plaquettaire.**

En cas de lésion, la surface vasculaire anti-thrombogène est rompue. La lésion est alors exposée aux plaquettes circulantes. Les plaquettes sanguines adhèrent de façon très rapide soit au collagène (par un phénomène encore mal connu) soit à la membrane basale et aux microfibrilles. Cette *adhésion* nécessite la présence d'ions calcium et fait interagir la glycoprotéine plaquettaire Ib (gpIb) avec le FvW endothélial. Cette étape déclenche l'*activation* des plaquettes qui se manifeste par un changement de forme (émission de pseudopodes) et la libération de produits métaboliques issus de réactions enzymatiques (dégradation de l'acide arachidonique en thromboxane A<sub>2</sub> ou TXA<sub>2</sub> qui est également un puissant vasoconstricteur; ADP; thrombine). L'étalement des plaquettes rend accessible la glycoprotéine gpIIb/IIIa au fibrinogène qui, en présence d'ions Ca<sup>2+</sup>, permet la formation de pontages entre les plaquettes: il y a *agregation* plaquettaire. Le thrombus augmente par apposition de couches successives de plaquettes. L'agrégat plaquettaire est renforcé par l'action de la thrombine qui transforme le fibrinogène en un réseau de fibres de fibrine insoluble, initiant ainsi la réaction de coagulation.

### **b. Les facteurs de coagulation: facteurs thrombogènes.**

La coagulation a pour objectif de renforcer la solidité du caillot sanguin. Elle fait intervenir de nombreux facteurs qui sont présentés dans le **Tableau 1**. A côté des facteurs anti-thrombogènes, la cellule endothéliale produit également différents facteurs thrombogènes. De cette façon l'endothélium vasculaire limite de manière très active l'extension de la thrombose (**Figure 3**):

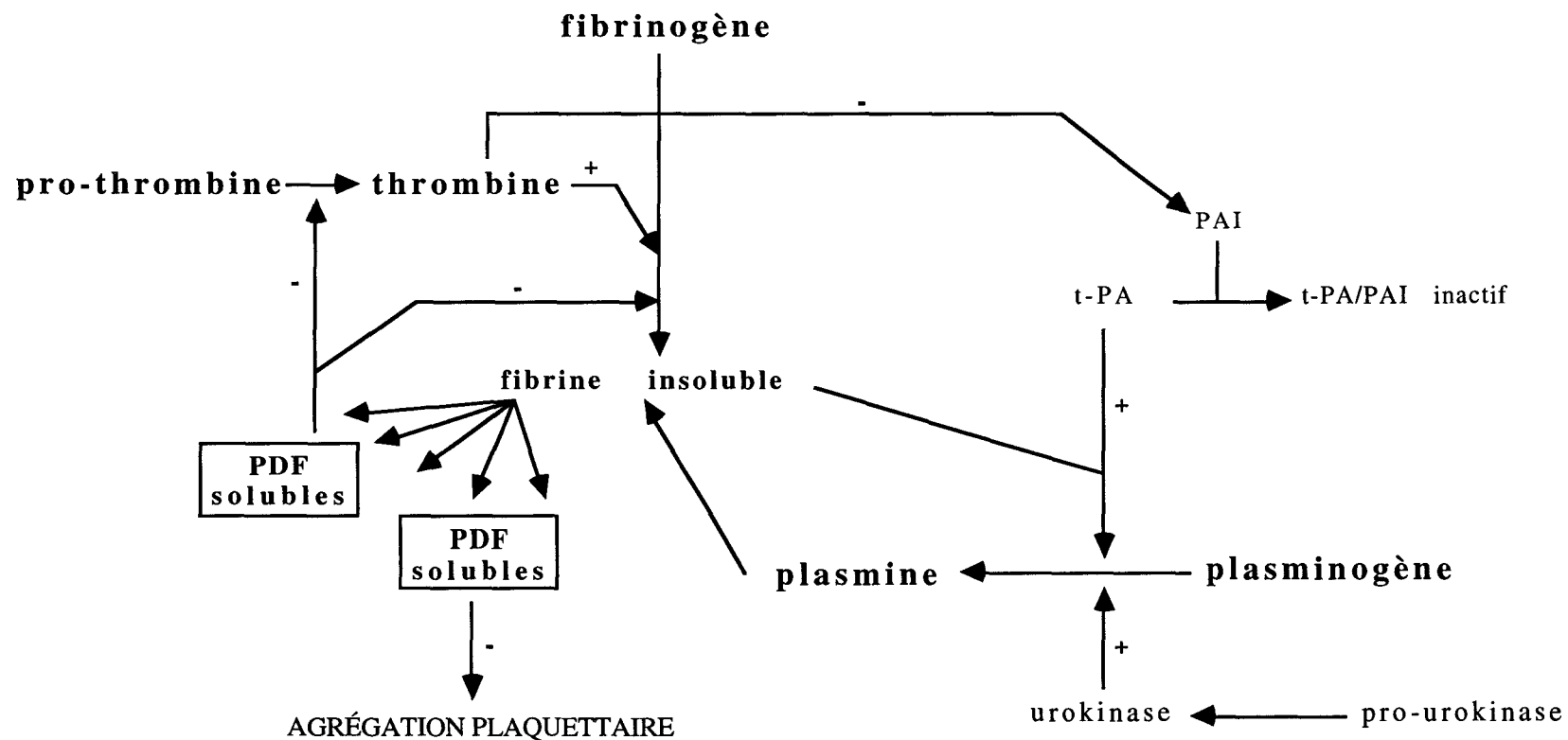


• le facteur de Willebrand (FvW): il ne possède pas d'activité thrombogène intrinsèque mais, lorsqu'il est sécrété, il s'associe au facteur VIII de la coagulation et le complexe ainsi formé a un rôle à jouer dans la formation initiale du thrombus. Brièvement, le facteur VIII/FvW réalise un pontage entre la gpIb des plaquettes et les microfibrilles du sous-endothélium (Barzu, 1986) permettant ainsi l'adhésion des plaquettes. Le facteur vW est libéré par la cellule endothéliale en réponse à de nombreux stimuli dont l'un des plus puissants est la thrombine.

• l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI): cette protéine de 50 kDa a été isolée à partir de surnageants de culture de cellules endothéliales d'aorte bovine et de veine ombilicale (Hoyer, 1981). Cet inhibiteur est sécrété en excès par rapport à l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) connu pour son action fibrinolytique et auquel il s'associe formant ainsi des complexes t-PA/PAI inactifs dans les surnageants de culture (Van Mourik, 1984). La thrombine inhibe la sécrétion du PAI ainsi que la protéine C qui interagit avec les complexes t-PA/PAI (Levin, 1983).

• 2 types d'activité procoagulante: formation de la thrombine

◇ la thromboplastine tissulaire est une lipoprotéine constituée de phospholipides et de l'apoprotéine 3. N'existant pas à l'état basal, elle n'apparaît dans les cellules endothéliales qu'après stimulation par la thrombine, l'endotoxine bactérienne, l'interleukine-1 (IL-1), le phorbol-myristate-acétate (PMA) ou à la suite d'une coopération cellulaire (lymphoblastes, plaquettes) (Lyberg, 1983; Galdal, 1984). La thromboplastine tissulaire active, par la voie extrinsèque de la coagulation, le facteur VII en VIIa qui, à son tour, induit l'activation du facteur X, permettant ainsi au complexe prothrombinasique actif de transformer la prothrombine en thrombine.



**Figure 4: Schéma récapitulatif des principaux facteurs mis en jeu lors de la fibrinolyse.**

t-PA: activateur tissulaire du plasminogène; PAI: inhibiteur de l'activateur du plasminogène; PDF: produits de dégradation de la fibrine.

◇ le système prothrombinasique met en jeu plusieurs facteurs de la coagulation (V, IXa et Xa): soit ils sont synthétisés et exprimés à la surface des cellules endothéliales (V) (Nawroth, 1985), soit ils viennent s'y fixer de manière spécifique (IXa et Xa) (Rodgers, 1983). Le facteur X est activé par le facteur V membranaire et le facteur IXa en présence de facteur VIII (Stern, 1983). Le facteur IX est activé soit par le système de contact soit par le facteur VIIa de la voie extrinsèque (Stern, 1984a). Le complexe prothrombinasique ainsi constitué va donc permettre de transformer la prothrombine en thrombine. Il est intéressant de noter qu'une boucle de régulation des activités procoagulantes peut avoir lieu lors des états inflammatoires par le biais de l'IL-1 sécrétée par les monocytes/macrophages (Stern, 1984b).

L'hémorragie ayant été jugulée par la formation d'un caillot, ce dernier doit être dissous afin que la circulation sanguine, transitoirement interrompue dans le vaisseau lésé, reprenne. Consécutivement à la phase de coagulation débute alors la phase de réparation qui peut se subdiviser en deux étapes: la fibrinolyse et la recolonisation vasculaire.

### c. La fibrinolyse.

Le caillot est formé de fibrine (composé insoluble) qui sera découpée en de nombreux fragments solubles par l'intermédiaire de la plasmine (**Figure 4**). Comme la thrombine, la plasmine est issue d'un précurseur glycoprotéique appelé plasminogène, dont l'activation nécessite l'intervention de cofacteurs enzymatiques. Parmi ces-derniers on trouve:

- l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA): synthétisée et stockée dans les cellules endothéliales, cette glycoprotéine de 66 kDa n'est libérée en quantité importante que sous l'influence de divers stimuli dont la thrombine (Rijken, 1984) mais aussi dans certaines conditions physiopathologiques telles le stress, l'acidose et l'anoxie. Considéré comme le principal activateur de la fibrinolyse physiologique, le t-PA possède une affinité très élevée pour la fibrine et, de ce fait, forme avec celle-ci et le plasminogène un complexe ternaire permettant la transformation du plasminogène en plasmine (Bachmann, 1984). Dans les cultures

de cellules endothéliales de veine ombilicale, la majeure partie du t-PA est couplée au PAI, son inhibiteur (Bachmann, 1984).

• *l'urokinase*: a été initialement isolée à partir d'urine. Plus tard il a été démontré que les surnageants de culture de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine contenaient une protéine semblable présentant des propriétés identiques à celles de l'urokinase urinaire (Peunica, 1983). Contrairement au t-PA, l'urokinase est sécrétée sous la forme d'un précurseur (la pro-urokinase) et ne forme pas de complexe avec la fibrine mais agit directement sur le plasminogène (Gurevitch, 1984).

Une fois le plasminogène dégradé en plasmine, cette protéine à activité enzymatique va digérer la fibrine (pour laquelle elle présente une forte affinité) en petits fragments qui seront ensuite éliminés dans la circulation. Ces produits de dégradation possèdent des activités anti-thrombinique, anti-polymérisation de la fibrine et anti-agrégation plaquettaire. Un équilibre physiologique existe entre les inhibiteurs et les activateurs de la fibrinolyse. C'est la lésion vasculaire qui, en modifiant cet équilibre, déclenche le processus fibrinolytique.

#### **d. La recolonisation vasculaire.**

Afin qu'il n'y ait jamais perte de la continuité cellulaire, les cellules endothéliales migrent et se divisent de manière à recouvrir la zone dénudée (Reidy, 1981). La croissance des cellules endothéliales peut être favorisée par différents facteurs tels que:

- les facteurs de croissance fibroblastique (FGF ou fibroblast growth factor) acide (FGFa) ou basique (FGFb) (Jaye, 1986; Vlodavski, 1987);
- des facteurs de croissance liés à l'héparine (HBGF ou heparin-binding growth factor) (Shing, 1984);
- l'angiogénine (Shapiro, 1986);

- le facteur de croissance de l'épiderme (EGF ou epidermal growth factor) dont l'action est potentialisée par la thrombine, l'insuline et des molécules dites "insulin-like" (Gospadorowicz, 1978);
- le facteur de croissance pour l'épithélium (ECGF ou epithelial cell growth factor);
- le facteur dérivé des plaquettes (PDGF ou platelet derived growth factor) qui peut agir de manière autocrine sur les cellules endothéliales (King, 1984).

Le taux de renouvellement des cellules endothéliales (estimé à 0,01 à 0,1 % par 24 heures) est relativement faible en raison d'un processus d'inhibition de contact qui inhibe le cycle prolifératif d'une cellule lorsque celle-ci entre en contact avec une cellule voisine (Haudenschild, 1976). Cependant les cellules endothéliales peuvent constamment se repositionner les unes par rapport aux autres. Si la surface dénudée est trop importante, un pseudo-endothélium non fonctionnel, constitué de cellules musculaires lisses modifiées, se met en place. Dans ce cas, l'inhibition de contact a lieu entre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales.

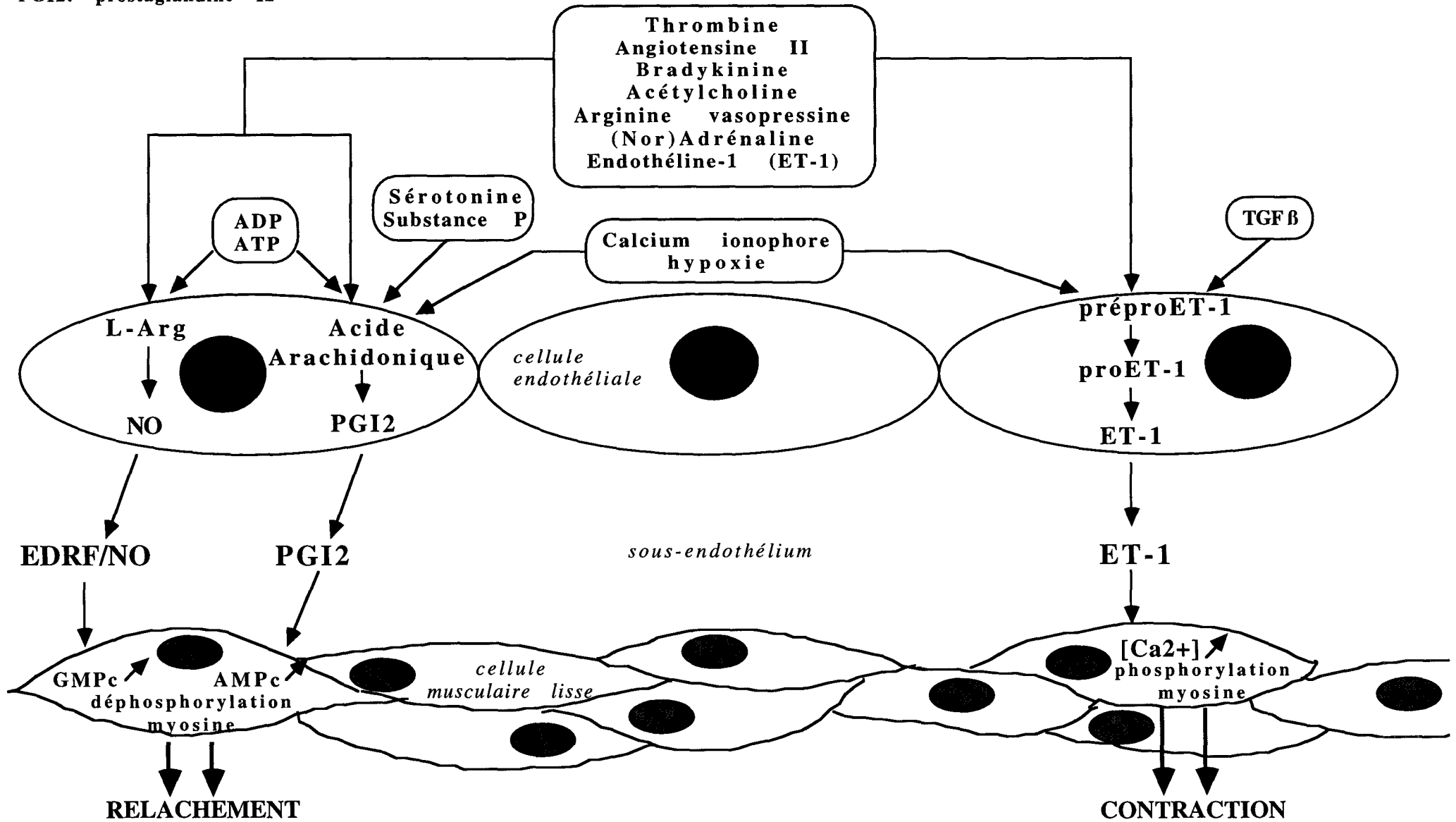
## **V. Endothélium et tonus vasculaire.**

L'endothélium est également une source de puissants agents modulateurs du tonus vasculaire ainsi que de la croissance des cellules musculaires lisses. Ceci inclut les produits relaxants tels que le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (Endothelium-derived relaxing factor ou EDRF) identifié maintenant comme étant le monoxyde d'azote (NO), le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarising factor ou EDHF), un composé apparenté au NO, mais aussi la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et un peptide natriurétique de type C (C-type natriuretic peptide ou CNP). A l'opposé, on distingue des facteurs entraînant une contraction vasculaire comme l'endothéline-1 (ET-1) mais probablement d'autres endothélines ainsi que le facteur contractant dérivé de l'endothélium (endothelium-



**Figure 5: Contrôle du tonus vasculaire par les médiateurs endothéliaux**

- EDRF/NO: monoxyde d'azote dérivé de l'endothélium
- PGI2: prostaglandine I2



derived contracting factor ou EDCF) (**Figure 5**). Il est intéressant de noter que ces facteurs ont également des actions antagonistes pour la croissance cellulaire: la plupart des agents vasoconstricteurs sont de puissants mitogènes alors que les substances vasodilatatrices sont plutôt des inhibiteurs.

### 1. Synthèse de substances vasodilatatrices.

• *PGI<sub>2</sub>*: à côté de son action anti-agrégante plaquettaire décrite ci-dessus, la prostacycline participe aussi au contrôle du tonus vasculaire. Les propriétés de la PGI<sub>2</sub> semblent être médiées par l'induction de l'activité adénylate cyclase plaquettaire et musculaire lisse aboutissant à la génération d'AMP cyclique (AMPc) (Tateson, 1977; Hopkins, 1981), ce dernier stimulant les systèmes protéiques intracellulaires de séquestration du calcium dans les compartiments membranaires non métaboliques. Le manque de calcium dans le cytosol ne permet plus d'initier les phosphorylations nécessaires à l'interaction actine-myosine et par conséquent la contraction musculaire est inhibée. La biosynthèse de la PGI<sub>2</sub> par la cellule endothéliale vasculaire est initiée soit par un transfert transmembranaire d'endopéroxydes-prostaglandines d'origine plaquettaire, soit par la génération intracellulaire d'acide arachidonique libéré à partir des phospholipides endothéliaux par l'action d'une phospholipase activée (phospholipase C ou PLC) (Moncada, 1979). Les substances responsables du relargage de la prostacycline sont également capables d'entraîner la libération d'autres facteurs vasodilatateurs par les cellules endothéliales.

• *facteurs de relâchement dérivés de l'endothélium*: en 1980, deux auteurs mettent en évidence que l'acétylcholine n'entraîne le relâchement du muscle lisse artériel que si, et seulement si, l'endothélium est présent (Furchgott et Zawadski, 1980): on parle alors de facteur relaxant dérivé de l'endothélium ou EDRF (endothelium derived relaxing factor). Cet agent a été identifié plus tard comme étant le NO (Palmer, 1987). Plus récemment, d'autres facteurs sont venus s'ajouter à la liste comme l'EDHF (endothelium-derived hyperpolarising factor) ou le CNP (C-type natriuretic peptide).

◇ l'EDRF=NO: ce vasodilatateur très labile a une demi-vie très brève (6 à 50 sec). Ce n'est pas un produit spécifique à la cellule endothéliale puisque les macrophages, les plaquettes, les cellules musculaires lisses du cerveau ou du foie sont également capables de le synthétiser. Ce composé nitrique est issu de la transformation de la L-arginine par une enzyme: la NO synthase (Palmer, 1988). Les NO-synthases des cellules endothéliales (Marsden, 1992) ou du cerveau (Bredt, 1991) sont constitutives et calcium-calmoduline-dépendante alors que l'enzyme des macrophages est inductible par l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) et le LPS (Xie, 1992) et ne nécessite pas l'implication du système calcium-calmoduline (Lyons, 1992). Les forces de cisaillement, l'acétylcholine, la bradykinine, la sérotonine (récepteurs S1), l'angiotensine II, l'histamine (récepteurs H1), l'arginine (récepteurs VP1), la noradrénaline et adrénaline (récepteurs  $\alpha$ 2), l'ADP et l'ATP (récepteurs purinergiques P2), la substance P et la thrombine sont tous des agents potentiellement inducteurs de la production de NO. Le NO libéré de la cellule endothéliale se dirige vers les cellules musculaires lisses sous-jacentes où il stimule la guanylate cyclase cytosolique (Förstermann, 1986). Cette activation génère la libération d'un second messenger, la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), qui sera responsable du relâchement musculaire lisse à plusieurs niveaux: (i) sur les canaux membranaires en diminuant l'influx calcique; (ii) sur la libération de calcium intracellulaire; (iii) sur l'activité ATPase dépendante du calcium; (iv) sur la sensibilité des myofilaments au calcium (Lincoln, 1991). Tous ces événements ayant pour conséquence l'impossibilité pour l'actine d'interagir avec la myosine et donc l'inhibition de la contraction des cellules musculaires lisses.

◇ l'EDHF (endothelium-derived hyperpolarising factor): a été mis en évidence par Vanhoutte en 1989. La structure comme la pertinence physiopathologique de cet agent demeurent encore mal connues. Cependant il pourrait agir par l'intermédiaire soit de canaux potassiques sensibles à l'ATP (Standen, 1989) soit de canaux potassiques activables par le calcium (Adeagbo, 1993).

◇ le CNP (C-type natriuretic peptide): découvert plus récemment comme étant un autre agent vasodilatateur produit par l'endothélium vasculaire (Suga, 1992). Il appartient à la famille des peptides natriurétiques, produits par les cellules endothéliales, qui comprend déjà l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide ou peptide natriurétique atrial) et le BNP (Brain Natriuretic Peptide ou peptide natriurétique du cerveau). La production endothéliale de CNP est augmentée par l'ANP, le BNP (Nazario, 1995), le TGF- $\beta$  (Suga, 1992) et les forces de cisaillement qui sont capables d'induire l'expression du gène codant pour le CNP dans les cellules endothéliales humaines (Okahara, 1995). Le CNP agit, de façon paracrine et probablement endocrine, en tant que veinodilatateur et vasodépresseur chez le chien (Wei, 1993) et inhibe la prolifération *in vitro* des cellules musculaires lisses associées aux vaisseaux (Porter, 1992).

## **2. Synthèse de substances vasoconstrictrices.**

◇ endothélines: L'endothéline-1 (ET-1) fut la première de ces substances à être découverte dans des cultures de cellules endothéliales bovines en 1988 et décrite comme étant le plus puissant agent vasoconstricteur (Yanagisawa, 1988). En réalité, l'endothéline exerce tout d'abord un effet vasodilatateur bref qui est immédiatement suivi d'un effet vasoconstricteur et hypertenseur très puissant (Masaki, 1993). Les endothélines existent sous trois isoformes: ET-1, ET-2 et ET-3 (peptides de 21 acides aminés ayant des métabolismes similaires) mais seule l'ET-1 est synthétisée par les cellules endothéliales (Inoue, 1989) en réponse à différents stimuli tels l'hypoxie, l'angiotensine II, la vasopressine, l'adrénaline, la bradykinine, la thrombine, le calcium ionophore, l'endotoxine, les esters de phorbol, certains facteurs de croissance (PDGF, EGF) et le TGF- $\beta$ 1. La sécrétion des endothélines est également contrôlée par des agents dilatateurs (EDRF, ANP). Comme beaucoup d'autres facteurs, l'endothéline-1 est synthétisée sous la forme d'un précurseur (la préproendothéline) qui est ensuite transformé en proendothéline (ou big endothéline) pour donner naissance, sous l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (endothelin converting enzyme ou ECE), à la forme

active à savoir l'endothéline-1 (Okada, 1990). Cette enzyme est située dans la membrane plasmique des cellules endothéliales (Ohnaka, 1990) suggérant que la maturation de l'endothéline se fait juste avant son relargage hors de la cellule endothéliale. La sécrétion de l'endothéline semble être polarisée puisqu'elle se localise préférentiellement au pôle basal. Dans la mesure où l'endothéline va agir sur les cellules musculaires lisses vasculaires, on peut avancer l'hypothèse que cette localisation préférentielle traduit un mode d'action paracrine entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires sous-jacentes. On décrit deux types de récepteurs pour l'endothéline: l'ET<sub>A</sub> et l'ET<sub>B</sub> (Lüscher, 1993a; Lüscher, 1993b). L'ET<sub>A</sub> est situé sur les cellules musculaires lisses alors que l'ET<sub>B</sub> est exprimé par les cellules endothéliales et entraîne, après interaction avec l'endothéline, la libération d'EDRF responsable du relâchement des vaisseaux sanguins. Il est intéressant de noter que dans ces conditions l'interaction ET-1/récepteur ET<sub>B</sub> induit également la sécrétion de NO qui s'ajoute à la production basale de cet agent participant au maintien d'un tonus vasculaire, ainsi que la libération de la prostacycline (De Nucci, 1988). L'ET-1 est donc un médiateur à effet paracrine et partiellement autocrine.

◇ EDCF: probablement issu du métabolisme de l'acide arachidonique, ce facteur est sécrété par l'endothélium de rats souffrant d'hypertension (Vanhoutte, 1989) ou de diabète (Tesfamariam, 1990) mais n'a pas été mis en évidence au niveau des vaisseaux sanguins humains.

La compréhension des mécanismes de contrôle du tonus vasculaire passe par l'intégration des différents types possibles de réponse de l'endothélium à des agonistes souvent proches sur le plan fonctionnel. Cependant deux types de seconds messagers semblent prépondérants: les médiateurs labiles entraînant une durée de réponse brève (quelques secondes) comme les EDRF, et les médiateurs exerçant un effet durable (de l'ordre de l'heure) et ayant un temps de réponse long tels l'endothéline. L'endothélium par les EDRF modulerait le diamètre des vaisseaux en fonction des variations du flux sanguin (Rubanyi, 1986) alors qu'en sécrétant

l'endothéline il contrôlerait la réponse des cellules musculaires lisses induisant une réponse vasoconstrictrice locale qui limite le flux et permet l'autorégulation.

En plus de leur action vasoconstrictrice, les endothélines pourraient exercer un effet mitogène (Hirata, 1989; Chua, 1992). L'endothéline agit en augmentant la mobilisation du calcium intracytosolique soit en libérant le calcium de ses sites de stockage (voie des inositols triphosphates IP3) soit en activant des canaux calciques membranaires (Van Renterghem, 1988). En présence de calcium et de calmoduline, la protéine kinase C peut entraîner la phosphorylation des chaînes légères de myosine qui interagit alors avec l'actine provoquant la contraction des cellules musculaires lisses (Resink, 1988).

## **VI. Endothélium et réaction inflammatoire.**

### **1. Le recrutement des leucocytes dans les tissus.**

Les interactions des leucocytes avec l'endothélium et la matrice extracellulaire (MEC) au cours des réactions immunes et inflammatoires ne sont pas des phénomènes aléatoires mais, bien au contraire, correspondent à des processus complexes et finement régulés. Les maîtres d'œuvre sont représentés par des chémokines, des molécules d'adhérence, des intégrines et des mucines. Les molécules d'adhérence sont celles qui ont été le plus étudiées. Elles ont été regroupées en familles et, parmi celles qui participent au recrutement des leucocytes à l'intérieur des tissus, on peut citer: les sélectines, les intégrines et certains membres de la superfamille des immunoglobulines. Les sélectines jouent un rôle important dans la phase initiale de contact entre les leucocytes et l'endothélium alors que les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines sont impliqués dans les phases suivantes à savoir la migration transendothéliale et les interactions avec la MEC.

**a. Implication de différentes familles de molécules d'adhérence.**

*α. famille des Sélectines:* elle se compose des trois protéines suivantes: la E-sélectine (E=Endothélial), la P-sélectine (P=Platelet ou Plaquette) et la L-sélectine (L=Leukocyte ou leucocyte). Ces trois glycoprotéines transmembranaires ont une structure commune à savoir:

- une extrémité N-terminale apparentée à celle des lectines de type C (dépendante du  $Ca^{2+}$ );
- un domaine homologue à celui du facteur de croissance pour l'épiderme ou EGF (epidermal growth factor);
- de petites séquences consensus répétées (CRP ou complement regulatory proteins) comme celles des protéines régulatrices du complément;
- un domaine transmembranaire;
- une extrémité cytoplasmique (revu par McEver, 1994).

Les gènes codant pour ces molécules sont localisés sur le chromosome 1 (q21-24) (Watson, 1990).

• **la E-sélectine** (CD62E, ELAM-1 ou endothelial leucocyte adhesion molecule-1): cette molécule, dont le poids moléculaire peut varier de 64 à 115 kDa selon le degré de glycosylation, comporte 6 CRP. Elle requiert une synthèse *de novo* d'ARN messager et de protéine. Elle est induite à la surface de cellules endothéliales stimulées par l'interleukine-1 (IL-1), le facteur nécrosant pour les tumeurs (TNF ou tumor necrosis factor) et le lipopolysaccharide (LPS) (Bevilacqua, 1987). L'induction par le  $TNF\alpha$  pourrait être inhibée par l'action du  $TGF-\beta$  (Gamble, 1993). *In vitro* son expression à la surface de la cellule endothéliale est détectable environ 1 heure après la stimulation, maximale entre la quatrième et la huitième heure, le niveau basal étant retrouvé à la vingt-quatrième heure. L'extrémité N-terminale du domaine lectinique ainsi qu'un épitope de la région homologue à l'EGF jouent un rôle important dans la liaison de la E-sélectine à son ligand (Erbe, 1992). Les neutrophiles, les



éosinophiles, les cellules NK (natural killer), une sous-population de cellules T mémoires, les monocytes et certaines cellules tumorales se lient à l'endothélium par l'intermédiaire de cette sélectine (Walsh, 1990; Carlos, 1991; Leeuwenberg, 1992; Bevilacqua, 1993). En absence de ligand, la E-selectine est rapidement internalisée et dégradée dans des lysosomes (Smeets, 1993). Néanmoins une forme soluble de la E-sélectine a été mise en évidence dans le plasma (Lobb, 1991a).

Les sélectines reconnaissent des déterminants carbohydratés. En ce qui concerne la E-sélectine, son ligand a été identifié comme étant un tétrasaccharide fucosylé: le sialyl Lewis X (SLe<sup>x</sup> ou CD15s) ainsi que des structures très apparentées comme l'antigène lymphocytaire cutané ou CLA (cutaneous lymphocyte antigen) (Phillips, 1990; Tiemeyer, 1991, Berg, 1992). Ces ligands sont exprimés par les neutrophiles et les monocytes (Munro, 1992), les cellules NK (Pinola, 1994), les lymphocytes T et B activés *ex vivo* (Ohmori, 1993). L'interaction des cellules tumorales avec la E-sélectine se fait plutôt par l'intermédiaire d'un ligand retrouvé de façon moins fréquente sur les leucocytes (donc peut-être moins impliqué dans le recrutement leucocytaire): le sialyl Lewis A (SLe<sup>a</sup>) (Bevilacqua, 1993). La P-sélectine est également capable de se fixer à une autre sélectine: la L-sélectine (Picker, 1991). A côté de ces sucres, certaines protéines comme le CD66 (Kuijpers, 1992), les intégrines  $\beta_2$  (Kotovuori, 1993) ou une glycoprotéine de 150 kDa (Lenter, 1994) peuvent participer à la reconnaissance des sélectines par l'intermédiaire d'un résidu sucré, donnant lieu à des interactions de plus forte affinité entre les sélectines et leur ligand (Lasky, 1992).

- **la P-sélectine (CD62P):** cette protéine comporte 9 CRP et possède un poids moléculaire compris entre 86 et 122 kDa suivant son degré de glycosylation. Initialement observée dans les plaquettes sous le terme de PADGEM (platelet activation-dependent granule-external membrane protein) (Hsu-Lin, 1984) ou GMP-140 (granule membrane protein) (McEver, 1984), la P-sélectine a également été décrite dans les cellules endothéliales (McEver, 1989; Bonfanti, 1989). Dans les deux cas, cette protéine est synthétisée et stockée à l'intérieur des cellules dans les granules  $\alpha$  des plaquettes (Stenberg, 1985) ou les



corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales (McEver, 1989; Bonfanti, 1989). La P-sélectine est mobilisée très rapidement (dans les minutes suivant la stimulation) et de façon transitoire (quelques minutes) à la surface membranaire après activation des cellules endothéliales par l'histamine, la thrombine (Lorant, 1991) ou le C5a (Foreman, 1994). L'IL-3 et le TNF $\alpha$  peuvent également entraîner son expression mais de manière plus durable (Khew-Goodall, 1996). La P-sélectine entre en jeu dans les interactions avec les neutrophiles, les monocytes et certains lymphocytes (Larsen, 1989a; Zimmerman, 1992; Lorant, 1993). Une forme soluble a été mise en évidence dans le plasma d'individus normaux mais son origine (plaquettaire ou endothéliale) reste incertaine. Par contre cette molécule peut venir se fixer sur les neutrophiles, inhibant ainsi l'interaction des neutrophiles avec les molécules de P-sélectine exprimées à la surface de l'endothélium (Dunlop, 1992).

Les SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup> et la L-sélectine font également partie des ligands potentiels de la P-sélectine (Handa, 1991; Picker, 1991) ainsi que le trisaccharide Lewis X (Le<sup>x</sup> ou CD15) mais ce dernier avec une moindre affinité (Larsen, 1990). La P-sélectine se lie aussi à des glycolipides sulfatés (Handa, 1991) et certains polysaccharides sulfatés comme l'héparine (Skinner, 1989). Concernant les ligands protéiques de la P-sélectine, il a été récemment démontré l'existence d'une glycoprotéine de 220 kDa dénommée PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand) dont la liaison est dépendante du calcium (Moore, 1992). Certains auteurs la classent également dans la nouvelle famille des molécules dites "mucine-like".

• **la L-sélectine (CD62L)**: encore appelée LAM-1, LECAM-1, Leu-8, TQ1, gp<sup>90</sup> MEL ou Mel-14 chez la souris, cette molécule possède 2 CRP et un poids moléculaire différent selon le type cellulaire sur lequel elle est exprimée: 75 kDa pour les lymphocytes, 95 à 105 kDa pour les neutrophiles et 110 kDa pour les monocytes. La L-sélectine est exprimée constitutivement et à l'état fonctionnel sur la plupart des leucocytes et, de ce fait, est impliquée dans le trafic leucocytaire (McEver, 1994). Un clivage protéolytique faisant immédiatement suite à l'activation des leucocytes, la L-sélectine est rapidement libérée dans le plasma (Jung, 1990) constituant ainsi la forme soluble de la protéine, cette dernière

ayant la capacité d'inhiber l'adhésion des leucocytes à l'endothélium au cours de l'inflammation (Gearing, 1993; Schleiffenbaum, 1992). En effet la L-sélectine, en plus de ces fonctions de "homing receptor" (récepteur de domiciliation) dans la recirculation lymphocytaire, est impliquée dans l'émigration des neutrophiles vers les sites inflammatoires.

La L-sélectine reconnaît les SLe<sup>x</sup>, SLe<sup>a</sup> (Berg, 1992), les polysaccharides sulfatés et l'héparine (Handa, 1991; Green, 1992). Deux glycoprotéines sulfatées (appartenant aux sialomucines) ont été décrites comme étant des ligands spécifiques de la L-sélectine (Lasky, 1992): une glycoprotéine majeure de 50 kDa appelée GlyCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), la seconde de 90 kDa ayant été identifiée comme étant le CD34 molécule également exprimée par les précurseurs hématopoïétiques et les cellules endothéliales (Baumhueter, 1993).

*β. famille des Intégrines:* cette famille est constituée d'hétérodimères ( $\alpha\beta$ ) glycoprotéiques transmembranaires, les deux sous-unités étant liées de manière non covalente (Springer, 1990). Les intégrines sont classées en sous-familles portant le nom de la sous-unité  $\beta$  (intégrines  $\beta_1, \beta_2 \dots \beta_8$ ), chaque sous-unité  $\beta$  pouvant s'associer avec différentes sous-unités  $\alpha$  (1 à 8 possibilités parmi les 15 sous-unités existantes). Les deux sous-unités sont impliquées dans la fixation du ligand et ont une structure similaire :

- un grand domaine extracellulaire;
- une région transmembranaire hydrophobe;
- une petite région intracytoplasmique nécessaire aux changement d'avidité de la molécule.

La sous-unité  $\alpha$  comprend une répétition de 7 domaines homologues (I à VII) d'environ 60 acides aminés, les 3 ou 4 derniers constituant la zone de liaison aux cations. En effet les cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ ) sont nécessaires à la fonctionnalité de la molécule et à l'association  $\alpha/\beta$  de certaines intégrines. Quant à la sous-unité  $\beta$ , son domaine intracytoplasmique est impliqué dans la liaison aux protéines du cytosquelette telles la fibuline, la taline, la vinculine,

l'actine...(Burridge, 1988). Trois sous-familles d'intégrines sont principalement impliquées dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium: il s'agit des intégrines  $\beta_2$  (Arnaout, 1990),  $\beta_1$  (Elices, 1990), et  $\beta_7$  (Berlin, 1993).

• **intégrines  $\beta_2$** : à cette chaîne commune  $\beta_2$  ou CD18, on peut y trouver associées trois sous-unité  $\alpha$  donnant ainsi naissance aux intégrines suivantes: CD11a/CD18 ( $\alpha_L\beta_2$ , LFA-1 ou lymphocyte function-associated antigen-1), CD11b/CD18 ( $\alpha_M\beta_2$ , Mac-1, Mo-1, CR3) et le CD11c/CD18 ( $\alpha_X\beta_2$ , p150, 95). L'expression de ces intégrines  $\beta_2$  est restreinte aux leucocytes néanmoins elle diffère selon la nature de ces leucocytes. Si les neutrophiles, les monocytes, les cellules NK expriment les trois intégrines  $\beta_2$ , il n'en est pas de même pour les lymphocytes qui expriment principalement le CD11a/CD18 (Arnaout, 1990). Les molécules CD11b/CD18 et CD11c/CD18 sont stockées à l'intérieur des monocytes, des neutrophiles, et leur expression à la surface cellulaire peut être induite très rapidement par différents agonistes tels le calcium ionophore, les esters de phorbol, le fMLP, le  $TNF\alpha$ , le GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor), le C5a ou le leucotriène B4 (LTB4) (Carlos, 1990a). A l'opposé le CD11a/CD18 n'est pas stocké et le nombre de molécules CD11a/CD18 en surface n'apparaît pas modulable. Il a été démontré que la grande affinité que possédaient ces intégrines pour leurs ligands respectifs était associée à un changement conformationnel de la molécule sous la dépendance d'une liaison avec des cations divalents (Dransfield, 1989). Ainsi les intégrines  $\beta_2$ , présentes à la surface des leucocytes, possèdent une affinité qui peut être modulable. En ce qui concerne le LFA-1, spontanément, l'affinité pour son ligand est faible mais, en présence de  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ou lorsque le LFA-1 est engagé avec son ligand ou bien encore en présence de cytohésine-1 fixée à la partie cytoplasmique de la chaîne  $\beta_2$  (notion de signalisation "inside-out"), l'affinité de l'intégrine augmente sensiblement (Kolanus, 1996).

Les ligands des intégrines  $\beta_2$  correspondent à des molécules appartenant à la superfamille des Immunoglobulines comme l'ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1 ou CD54) qui se lie aux CD11a/CD18 et CD11b/CD18; l'ICAM-2 et l'ICAM-3 qui interagissent

avec le CD11a/CD18 (de Fougerolles, 1992). Parmi les protéines solubles qui reconnaissent les intégrines  $\beta_2$ , on distingue le fibrinogène, le facteur X pour le CD11b/CD18, et les fragments du complément pour les CD11b/CD18 et CD11c/CD18 (Arnaout, 1990).

• **intégrines  $\beta_1$** : la chaîne commune de cette sous-famille d'intégrines est le CD29 (Hemler, 1990). Les intégrines  $\beta_1$  représentent des récepteurs cellulaires pour un grand nombre de protéines de la MEC dont la fibronectine, le collagène, la laminine et la vitronectine. La principale intégrine  $\beta_1$  impliquée dans les phénomènes d'adhésion des leucocytes à l'endothélium correspond au CD49d/CD29 ( $\alpha_4\beta_1$ , VLA-4 ou very late antigen-4). Elle est exprimée à la surface des lymphocytes (Elices, 1990), des monocytes (Carlos, 1991), des éosinophiles (Dobrina, 1991), des basophiles (Bochner, 1991; Schleimer, 1992), des cellules NK (Allavena, 1991) mais pas des neutrophiles (Hemler, 1990), son rôle éventuel dans la sélectivité des infiltrats cellulaires sera évoqué ultérieurement. L'expression de cette intégrine atteint des niveaux plus élevés sur les cellules hématopoïétiques.

Parmi les ligands de l' $\alpha_4\beta_1$ , on trouve un autre membre de la superfamille des Immunoglobulines à savoir le VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) qui est le ligand principal (Elices, 1990) mais aussi une protéine de la MEC comme la fibronectine (Wayner, 1989), la thrombospondine (Yabkowitz, 1993) ainsi que l'invasine, une protéine de la membrane externe de la paroi bactérienne (Ennis, 1993).

• **intégrines  $\beta_7$** : cette sous-unité peut se lier à la sous-unité  $\alpha_4$  et former ainsi un récepteur de domiciliation pour l'adressine vasculaire muqueuse MAdCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) (Berlin, 1993). Cette intégrine  $\alpha_4\beta_7$  peut également interagir avec la fibronectine et le VCAM-1 (cette interaction nécessitant une activation préalable) (Chan, 1992), par contre l' $\alpha_4\beta_1$  ne se lie pas au MAdCAM-1 (Berlin, 1993).

*γ. superfamille des Immunoglobulines:* cette dernière famille est représentée par des protéines localisées à la surface des cellules qui ont la particularité d'exprimer une extrémité extracellulaire organisée en domaines ayant des homologies avec les immunoglobulines (Ig). Ces molécules d'adhérence sont spécialisées dans la reconnaissance de l'antigène, la liaison aux molécules du complément ou encore l'adhésion cellulaire. C'est surtout sur cette dernière fonction que nous porterons notre intérêt. Ainsi cinq membres de cette famille sont exprimés sur les cellules endothéliales et sont impliqués dans l'adhésion des leucocytes: l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1, CD54), l'ICAM-2 (CD102), le VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1, CD106), le PECAM-1 (platelet endothelial adhesion molecule-1, CD31, EndoCAM) et le MAdCAM-1.

• **ICAM:** trois ICAM différentes sont à dénombrer.

L'ICAM-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I. Elle comporte un core protéique de 55 kDa organisé en cinq domaines de type Ig (Staunton, 1988). Son poids moléculaire varie de 76 à 114 kDa selon le type de glycosylation et selon le type cellulaire sur lequel elle est exprimée à savoir les cellules endothéliales mais aussi les leucocytes, les fibroblastes et les cellules épithéliales (Dustin, 1988a). L'ICAM-1 se lie spécifiquement aux CD11a/CD18 et CD11b/CD18 et se trouve par conséquent impliquée dans les interactions cellulaires et le recrutement leucocytaire au site de l'inflammation.

Comme l'ICAM-1, l'ICAM-2 est également exprimée à la surface de l'endothélium et impliquée dans l'adhésion des leucocytes par la reconnaissance du CD11a/CD18 (Staunton, 1989) néanmoins l'ICAM-2 semble jouer un rôle plus important dans le trafic des leucocytes dans les zones non-inflammatoires ainsi que dans la recirculation lymphocytaire. L'ICAM-2 est une protéine de 46 kDa comportant deux domaines extracellulaires de type Ig (Staunton, 1989). L'ICAM-1 et l'ICAM-2 sont exprimées de manière constitutive à la surface des cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro* mais leur expression peut être augmentée par le TNF $\alpha$  ainsi que par le LPS, l'IL-1 et l'IFN $\gamma$  pour l'ICAM-1 (Dustin, 1986).

En ce qui concerne l'ICAM-3 (CD50), cette molécule d'adhérence de 124 kDa est exprimée exclusivement sur les leucocytes (monocytes, lymphocytes T) et de manière constitutive. Il est intéressant de noter que ces trois molécules participent aux interactions spécifiques des cellules T avec l'antigène en tant que facteur de costimulation pour la prolifération (Vazeux, 1992; de Fougerolles, 1994).

- **VCAM-1:** cette molécule d'adhérence a un poids moléculaire d'environ 102 à 110 kDa selon qu'elle possède six ou sept domaines extracellulaires de type Ig, conséquences d'un épissage alternatif (Hession, 1991), l'isoforme de plus haut poids moléculaire étant celle qui est exprimée préférentiellement à la surface de l'endothélium activé (Carlos, 1990b). L'expression du VCAM-1 est induite par le TNF $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-4 et le LPS à la surface des cellules endothéliales (Wellicome, 1990; Thornhill, 1991). Comme d'autres molécules d'adhérence, le VCAM-1 peut subir un clivage protéolytique et donner naissance à une molécule soluble dans le plasma (Lobb, 1991b).

Le VCAM-1 a pour ligands les intégrines  $\alpha_4\beta_1$  et à un degré moindre  $\alpha_4\beta_7$  (Chan, 1992) ce qui l'implique dans les processus d'adhésion avec les monocytes, les lymphocytes T, les basophiles et les éosinophiles (Hemler, 1990; Schleimer, 1992).

- **PECAM-1:** cette molécule d'adhérence suscite un intérêt grandissant ces dernières années puisqu'elle semble jouer un rôle important dans la migration des leucocytes à travers l'endothélium. Le PECAM-1 est une glycoprotéine d'environ 130 kDa (six domaines extracellulaires de type Ig) (Stockinger, 1990) exprimée de façon constitutive à la surface des cellules endothéliales mais également sur d'autres cellules telles les plaquettes et certains leucocytes (monocytes, neutrophiles et certaines sous-classes de lymphocytes T), (Simmons, 1990; Albelda, 1991; Stockinger, 1990). La localisation préférentielle du PECAM-1 aux jonctions intercellulaires (Simmons, 1990) suggère que cette molécule joue un rôle clé dans les liaisons homotypiques entre les cellules endothéliales adjacentes (Albelda, 1991). Par ailleurs le PECAM-1 contribue à assurer la fonction de "barrière" de l'endothélium puisque des anticorps dirigés contre cette molécule entraînent une fuite vasculaire (Ferrero, 1995).

Initialement considérée comme une molécule non modulable (Simmons, 1990), il a été démontré très récemment, pour des cellules endothéliales d'origine bovine, que le TNF $\alpha$  et/ou l'IFN $\gamma$  entraînaient une déstabilisation des ARN messagers codant pour le PECAM-1, ce qui a pour conséquence la diminution du taux de protéines stockées puis exprimées en surface (Stewart, 1996). Néanmoins d'autres auteurs avaient démontré antérieurement, sur des cellules endothéliales humaines, que la transcription du PECAM-1 n'était pas altérée par le TNF $\alpha$  et/ou l'IFN $\gamma$  mais que ces deux cytokines étaient plutôt responsables d'une redistribution du PECAM-1 sur toute la surface des cellules endothéliales (Romer, 1995). L'origine des cellules endothéliales (bovine ou humaine) ainsi que les différences de culture qui en découlent semblent être les principales causes de ces résultats contradictoires. Dans le domaine de l'adhésion cellulaire, la migration des neutrophiles et des monocytes entre des cellules endothéliales adjacentes peut être inhibée par la forme soluble du PECAM (Muller, 1993). De plus il a été démontré récemment que l'engagement du PECAM-1 des monocytes, des neutrophiles (Berman, 1995) et des cellules NK (Berman, 1996) augmentait le nombre des intégrines  $\beta_2$  à la surface de ces cellules ainsi que leur capacité à adhérer aux cellules endothéliales.

• **MAdCAM-1**: correspond à une adressine de la muqueuse, impliquée dans la recirculation des lymphocytes, décrite initialement sur les veinules endothéliales des plaques de Peyer mais également exprimée sur d'autres veinules (Streeter, 1988). La structure particulière du MAdCAM-1 nous amène à considérer cette molécule d'adhérence de 66 kDa, membre de la superfamille des Ig (présence de trois domaines extracellulaires de type Ig), comme un ligand pour les intégrines mais aussi comme un ligand pour les sélectines. En effet il existe un domaine de type mucine entre deux domaines de type Ig (Briskin, 1993). Il est intéressant de noter que cette structure mixte incite certains auteurs à la classer dans la nouvelle famille des molécules dites "mucines-like". Néanmoins MAdCAM-1 est unique dans la mesure où cette molécule est capable de se lier à l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  et à la L-sélectine et de participer à la fois aux étapes de rolling et d'adhésion (Berlin, 1993, Berg, 1992).

## **b. Participation de molécules chémoattractantes.**

L'importance que jouent les molécules chémoattractantes dans l'induction du pouvoir d'adhésion des intégrines ou dans la direction de migration des leucocytes a été mise en évidence ces dernières années. Ces molécules polypeptidiques correspondent à des cytokines dotées d'un pouvoir chémoattractant et ayant des spécificités vis-à-vis de sous-classes de leucocytes (Oppenheim, 1991). Comme d'autres cytokines, leur poids moléculaire est compris entre 6 et 15 kDa. Leur classification est basée sur une homologie de séquence, à savoir la conservation de quatre résidus Cystéine (C) formant des ponts disulfures à l'intérieur de la molécule, et la position relative de deux de ces résidus. En effet, si les deux Cystéines sont séparées par un autre acide aminé, la chémokine appartient au groupe des C-X-C chémokines (encore appelées  $\alpha$  chémokines) alors que si les deux Cystéines sont l'une à côté de l'autre, la chémokine fait partie de la famille des C-C chémokines (encore appelées  $\beta$  chémokines). La différence qui oppose ces deux familles est aussi fonctionnelle puisqu'il semble que les membres de la famille des chémokines  $\alpha$  agissent préférentiellement sur les neutrophiles et les cellules non-hématopoïétiques impliquées dans les phénomènes de réparation, alors que l'action des chémokines  $\beta$  est plutôt portée sur les monocytes et dans certains cas sur les éosinophiles et quelques sous-populations lymphocytaires. De nombreuses études *in vitro* suggèrent que les chémokines participent au moins à trois étapes du recrutement leucocytaire:

- en activant les intégrines exprimées à la surface des leucocytes circulants, elles favorisent ces derniers à adhérer plus fermement à l'endothélium;
- grâce à leurs propriétés chémoattractantes, les chémokines guident les leucocytes jusqu'au site inflammatoire à travers les jonctions endothéliales et le tissu sous-jacent;
- enfin, les chémokines activent les fonctions effectrices des leucocytes comme la production de métabolites dérivés de l'oxygène ou l'exocytose d'enzymes de dégradation.

Exception faite des quelques chémokines contenues dans les granules  $\alpha$  des plaquettes, les chémokines ne sont généralement pas stockées à l'intérieur des cellules mais libérées après néosynthèse induite par divers stimuli tels le LPS ou les cytokines proinflammatoires (IL-1 $\alpha$  et



$\beta$ , TNF $\alpha$ ). Les chémokines peuvent être sécrétées par une grande variété de types cellulaires mais ce sont les monocytes/macrophages qui produisent la majeure partie des chémokines  $\alpha$  et  $\beta$  bien que l'endothélium vasculaire participe amplement à la synthèse de la plupart d'entre-elles.

Les chémokines peuvent modifier l'expression et l'affinité des intégrines à la surface des leucocytes circulants (revu par Carlos et Harlan, 1994). En effet, les intégrines présentent une affinité extrêmement faible pour leurs ligands respectifs: un changement conformationnel est nécessaire pour augmenter leur affinité et rendre les intégrines opérationnelles (Smyth, 1993). L'implication des chémokines à ce niveau a été démontrée (Butcher, 1991). Ainsi il a été rapporté que plusieurs chémoattractants (fMLP, C5a, LTB4) et certaines chémokines  $\alpha$  (IL-8, NAP-2, GRO $\alpha$ ) entraînent une augmentation du nombre de molécules CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles (Detmers, 1991; Huber, 1991). De la même manière, certaines chémokines  $\beta$  (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES) sont capables d'augmenter l'expression des intégrines  $\beta_2$  CD11b/CD18 et CD11c/CD18 à la surface des monocytes et de les engager dans une liaison avec l'endothélium (Vaddi, 1994a; Shyy, 1993). Le MIP-1 $\alpha$ , le MIP-1 $\beta$  (Taub, 1993a) et l'IP-10 (Taub, 1993b) augmentent également l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales. Néanmoins la démonstration *in vitro* du pouvoir stimulateur des chémoattractants sur les intégrines amène à se demander comment cela est réalisable *in vivo* dans la mesure où les chémokines risquent d'être emportées par le flux sanguin. Ainsi il a été suggéré *in vitro* que des chémokines (IL-8, MIP-1 $\beta$ , RANTES, protéines GRO) peuvent se fixer à l'héparine et donc aux protéoglycanes héparanes sulfates exprimés à la surface des cellules endothéliales pour former un système de présentation stable (Huber, 1991; Tanaka, 1993a; Gilat, 1994; Schwartz, 1994). Néanmoins cette activation des intégrines leucocytaires entraînant une adhésion plus stricte avec l'endothélium ne doit être que transitoire afin de permettre aux leucocytes leur migration à travers l'endothélium et le tissu sous-jacent. Cette notion correspond à ce que l'on observe puisque l'activation du CD11b/CD18 après stimulation par les chémokines  $\alpha$  est maximale à 30 minutes pour décroître ensuite (Detmers, 1991). De manière plus générale, les chémokines  $\alpha$  ainsi que d'autres chémoattractants

Chémokines	Origine	Cellules cibles					
		LcT	Mo	Ne	Eo	Ba	Autres
<b>Classiques</b>							
f-MLP	bactérienne		+	+	+	+	
C5a	voie du Complément		+	+	+	+	
LTB4	métabolisme de l'acide arachidonique		+	+	+		
PAF	métabolisme de la phosphatidylcholine		+	+	+		
IL-5	LcT, Eo				+		
<b>C-X-C (ou <math>\alpha</math>)</b>							
IL-8/NAP-1	LcT, Mo, CE, Fibro, CMéso, Kératino, Chondro	+		+	+	+	
NAP-2	Plaquettes			+		+	Fibro
gro/MGSA	Mo, CE, Fibro, mélanomes			+		+	Fibro, mélanomes
ENA-78	Epithélium			+			
PF4	Plaquettes			+			Fibro
IP10	LcT activés, Mo, CE, Kératino	ss-pop	+				
<b>C-C (ou <math>\beta</math>)</b>							
MCP-1	LcT, Mo, CE, Fibro, CML	ss-pop	+			+	NK, Masto
MCP-2	Mo	ss-pop	+		+	+	
MCP-3	Mo	ss-pop	+		+	+	
MIP-1	LcT, Mo, Ba	ss-pop	+	+	+	+	NK (MIP-1 $\alpha$ )
RANTES	LcT, Plaquettes	ss-pop	+		+	+	NK
Eotaxine	CE				+		

**Tableau 2:** Tableau récapitulatif des différentes molécules à activité chémoattractante. (Oppenheim, 1991; Devreotes, 1988; Springer, 1994; Taub, 1993b). **f-MLP:** formyl-Met-Leu-Phe; **LTB4:** leucotriène B4; **PAF:** platelet activation factor; **NAP-:** neutrophil-activating peptide-; **MGSA:** melanoma growth stimulatory activity; **ENA:** epithelial-derived neutrophil attractant; **PF:** platelet factor; **IP:** IFN $\gamma$ -inducible protein; **MCP-:** monocyte chemoattractant protein; **MIP:** macrophage inflammatory protein; **LcT:** lymphocytes T; **Mo:** monocytes; **Ne:** neutrophiles; **Eo:** éosinophiles; **Ba:** basophiles; **CE:** cellules endothéliales; **Fibro:** fibroblastes; **CMéso:** cellules mésothéliales; **Kératino:** kératinocytes; **Chondro:** chondrocytes; **CML:** cellules musculaires lisses; **NK:** cellules natural killer; **Masto:** mastocytes. +: molécule chémoattractante pour; +\*: molécule chémoattractante si les éosinophiles sont préalablement activés par l'IL-3, l'IL-5 ou le GM-CSF (Warringa, 1991; Desreumaux, 1992); **ss-pop:** molécule chémoattractante pour une sous-population cellulaire.

pourraient induire le clivage de la L-sélectine exprimée à la surface des neutrophiles (Huber, 1991).

Consécutivement à l'adhésion, les leucocytes vont devoir traverser l'endothélium, pénétrer le sous-endothélium pour rejoindre le site inflammatoire. Cette migration ne se fait pas au hasard mais est imposée par les chémokines qui s'organisent en gradient. Deux processus de chémoattraction peuvent intervenir: (i) la chémotaxie proprement dite qui correspond à la migration des cellules vers des concentrations croissantes d'un chémoattractant, généralement une molécule soluble qui diffuse à partir de son site de production où se trouve la concentration la plus élevée (Devreotes, 1988); (ii) l'haptotaxie où les cellules se déplacent à la surface d'autres cellules ou dans la MEC et migrent vers la région de plus forte adhésivité, autrement dit, les cellules tendent à s'accumuler dans la zone où le ligand est présent à sa plus forte densité (Tanaka, 1993b). Cette dernière notion est à rapprocher du fait que les chémokines fixées à la surface des cellules endothéliales par le biais des héparanes sulfates pourraient constituer un gradient haptotactique pour les leucocytes (Tanaka, 1993b). En ce qui concerne la spécificité d'attraction, la distinction entre les deux familles de chémokines paraît moins évidente excepté pour une chémokine murine, l'éotaxine, qui semble agir spécifiquement sur les éosinophiles (Griffiths-Johnson, 1993; Jose, 1994). Son homologue humain vient d'être cloné (Ponath, 1996) ainsi que son récepteur (Daugherty, 1996). Comme dans le modèle murin, l'éotaxine humaine est un chémoattractant spécifique des éosinophiles (Garcia, 1996). Un tableau récapitulatif (**Tableau 2**) est proposé et résume la complexité et la redondance fonctionnelle de toutes ces chémokines.

A côté de leur fonction d'attraction, les chémokines possèdent d'autres propriétés biologiques: (i) elles participent à la défense de l'hôte; (ii) elles peuvent aussi contribuer au développement des processus inflammatoires (Strieter, 1994; Baggiolini, 1994). En effet, les chémokines  $\alpha$  (l'IL-8 étant la plus efficace dans ce contexte) stimulent les neutrophiles à libérer par exocytose des enzymes de dégradation ainsi que des dérivés métaboliques de l'oxygène toxiques pour le tissu environnant (Walz, 1991 Geiser, 1993).

Stimulés par le MCP-1, les monocytes libèrent des enzymes lysosomiales et des dérivés métaboliques de l'oxygène, le relargage de ces derniers étant également induit par le MIP-1 $\alpha$  et le RANTES (Vaddi, 1994b). Ces observations ont aussi été rapportées pour les éosinophiles activés par le RANTES ou le MIP-1 $\alpha$  (Rot, 1992). De plus, les chémokines peuvent amplifier les processus inflammatoires en incitant leurs cellules cibles à produire et sécréter davantage de médiateurs pro-inflammatoires qui ont pour but l'entretien de l'inflammation. Ainsi le MCP-1 est capable d'induire la production d'IL-1 et d'IL-6 par les monocytes humains (Jiang, 1992); et le MCP-3, l'exocytose de molécules d'histamine par les basophiles (Dahinden, 1994). Chez la souris, les macrophages péritonéaux co-stimulés par les MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$  produisent du TNF $\alpha$ , de l'IL-1 $\alpha$  et de l'IL-6 (Fahey, 1992).

Pour rétablir un équilibre, plusieurs mécanismes limitant l'expression et/ou l'activité des chémokines peuvent être mis en jeu: (i) la synthèse de certaines chémokines (IL-8, MIP-1 $\alpha$ ) peut être inhibée par l'IL-4 (Standiford, 1990; Standiford, 1993) et l'IL-10 (Cassatella, 1993a). L'IFN $\gamma$  serait également capable dans certains cas de réduire la production de chémokines (IL-8, MCP-1) (Cassatella, 1993b; Ohmori, 1994); (ii) la présence dans le sérum humain normal d'autoanticorps polyclonaux dirigés contre l'IL-8 ou le MCP-1 suggère que ces chémokines pourraient former des complexes avec ces auto-anticorps et ainsi voir leur activité neutralisée (Sylvester, 1993). Cette hypothèse a été démontrée dans le cas d'un choc septique où l'IL-8 et le MCP-1, qui s'étaient accumulés dans le sérum des patients, en disparaissaient de façon concomitante à l'augmentation de production des auto-anticorps anti-chémokines (Sylvester, 1993). A l'heure actuelle, ce processus n'a pas encore été décrit pour d'autres chémokines; (iii) il existe, à la surface des érythrocytes, un récepteur (scavenger receptor ou récepteur "éboueur") qui éliminerait du sang les chémokines circulantes, limitant de cette manière leur activité. Ce récepteur est identique à l'antigène Duffy qui reconnaît le parasite malarial *Plasmodium vivax* (Horuk, 1993) et de ce fait a été dénommé DARC (pour Duffy antigen/receptor for chemokines). C'est le premier récepteur ayant été décrit pour ces capacités à fixer les chémokines des deux familles  $\alpha$  et  $\beta$  (IL-8, NAP-2, GRO $\alpha$ , RANTES, MCP-1, PF4) (Horuk, 1993; Neote, 1993). Récemment l'expression constitutive du DARC a été décrite sur

	<b>Expression constitutive</b>	<b>IL-1</b>	<b>TNF</b>	<b>LPS</b>	<b>Thrombine</b>	<b>Esters de phorbol</b>	<b>Inducteurs plus spécifiques</b>	<b>Inhibiteurs</b>
<b>ICAM-1(a)</b>	+	+	+	+	+	+	IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ , GM-CSF, hypoxie	
<b>ICAM-2(a)</b>	+	aucune modulation par le TNF, l'IL-1, l'IFN $\gamma$ ou le LPS sur les cellules endothéliales vasculaires.						
<b>PECAM-1(b)</b>	+	aucune modulation connue à l'heure actuelle.						TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ entraînent une redistribution du PECAM-1 sur toute la surface cellulaire
<b>VCAM-1(c)</b>	-	+	+	+	+	+	IL-4, TNF $\beta$ , hypoxie	
<b>E-sélectine(d)</b>	-	+	+	+	+	+	IFN $\gamma$ si stimulation préalable par le TNF $\alpha$ ou le LPS; IL-3	IL-4, TGF $\beta$ si stimulation préalable par le TNF $\alpha$ ou le LPS
<b>P-sélectine(e)</b>	synthèse constitutive	-	+	+	+	+	histamine, C5a, IL-3, Calcium ionophore, thrombine	

**Tableau 3 :** Tableau récapitulatif des différents médiateurs capables de moduler l'expression des principales molécules d'adhérence endothéliales impliquées dans le recrutement leucocytaire ((a): Dustin, 1986; (b): Simons, 1990; Stewart, 1996; Romer, 1995; (c): Wellicome, 1990; Thornhill, 1991; (d): Bevilacqua, 1987; Gamble, 1993; (e): Lorant, 1991; Foreman, 1994; Khew-Goodall, 1996).

l'endothélium de veinules post-capillaires sans que l'on sache s'il fonctionne de la même manière que son homologue érythrocytaire (Hadley, 1994). Le rôle inhibiteur de ce récepteur DARC demande encore à être approfondi dans la mesure où 1) il ne lie pas toutes les chémokines (ex: MIP-1 $\alpha$  et  $\beta$ ), 2) il existe des individus immunologiquement normaux qui n'expriment pas l'antigène Duffy érythrocytaire mais pour qui l'expression du récepteur DARC endothélial est normale (Peiper, 1995) suggérant un rôle clé du DARC dans l'inflammation et le trafic leucocytaire. Ceci est corroboré par le fait qu'à la différence d'une injection intradermique, l'injection intravasculaire d'IL-8 inhibe l'émigration des neutrophiles (Hechtman, 1991); (iv) enfin, en fonction de leur localisation par rapport à l'endothélium, les chémokines peuvent initier ou inhiber elles-mêmes leurs différentes actions. Ainsi si elles sont présentes en quantités plus importantes au pôle basal des cellules endothéliales les chémokines auront tendance à initier la diapédèse des leucocytes cibles, alors que la migration sera plutôt diminuée si elles s'accumulent préférentiellement au pôle luminal.

### **c. Facteurs activant les cellules endothéliales ou les leucocytes pour l'expression de molécules d'adhérence.**

*$\alpha$ : les cellules endothéliales:* les cellules endothéliales sont particulièrement sensibles à l'action de cytokines et autres médiateurs. Certains de ces facteurs induisent de manière plus ou moins spécifique une molécule d'adhérence particulière alors que d'autres ont une action plus pleïotrope en induisant plusieurs molécules d'adhérence mais avec des niveaux d'expression variables. Ce paragraphe a été résumé sous la forme d'un tableau (Tableau 3), en ne présentant que les principales molécules d'adhérence intervenant dans le recrutement leucocytaire.

*$\beta$ : les leucocytes:* la situation concernant ces cellules diffère légèrement. En effet, la plupart des intégrines  $\beta_2$  est exprimée spontanément à la surface des leucocytes. Ces molécules d'adhérence sont également présentes au sein des vésicules

monocytaires et granulocytaires et, de ce fait, de nombreux stimuli (PMA ou phorbol myristate acétate, LTB<sub>4</sub>, PAF, C5a et chémokines) sont capables d'entraîner rapidement leur mobilisation et leur translocation à la surface cellulaire. Ainsi le PAF, synthétisé et exprimé à la surface des cellules endothéliales, augmente l'adhésion des neutrophiles à ces cellules non seulement en augmentant le nombre d'intégrines CD11/CD18 mais aussi en augmentant leur affinité (Lorant, 1991). L'interaction des P- et E-sélectines endothéliales avec leur ligand neutrophilique a les mêmes conséquences (Forsyth, 1989). De manière similaire, la liaison des lymphocytes T au PECAM-1 endothélial accroît les fonctions adhésives des intégrines  $\beta 1$  (Tanaka, 1992) comme l' $\alpha_4\beta_1$  dont le changement de conformation est également initié par le MIP-1 $\beta$  lié aux protéoglycanes de la surface endothéliale (Tanaka, 1993a). Il est intéressant de noter que la plupart des stimuli qui entraîne une augmentation du CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles est également responsable de la diminution rapide et concomitante de la L-sélectine (Kishimoto, 1989a).

De l'ensemble de ces travaux, il apparaît que l'implication des intégrines leucocytaires soit plutôt liée à un changement d'affinité inductible et réversible. Cette modification d'affinité semble dépendre des chémokines mais aussi de manière plus indirecte de l'engagement d'autres récepteurs de surface. Ainsi l'interaction de molécules telles que le CD2, CD3, CD43 ou CD44 avec leur ligand induit le changement de conformation du CD11a/CD18 (Shimizu, 1992). De ces résultats est née la notion de signalisation "inside out" qui traduit le contrôle intracellulaire de la fonctionnalité des molécules de surface destinées à la messagerie extracellulaire.

#### **d. La cascade des interactions leucocytes/cellules endothéliales.**

La transmigration endothéliale est représentée par cette cascade composée de trois étapes séquentielles (qui se chevauchent dans certaines phases du recrutement

leucocytaire) avant d'aboutir à la migration subendothéliale mettant en jeu des interactions leucocytes/protéines de la matrice extracellulaire. Ces trois étapes correspondent au rolling, à l'arrêt puis l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium et enfin la diapédèse.

*α. le rolling* a une définition expérimentale issue d'études de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales dans des conditions de flux dynamique contrôlé. Il a pour effet de ralentir les leucocytes marginés afin de favoriser les étapes d'adhésion ultérieures. Cette étape initiale implique la présence locale de médiateurs et l'activation préliminaire de l'endothélium à proximité du site inflammatoire. Elle est médiée par les molécules d'adhérence appartenant à la famille des sélectines, leurs ligands respectifs; toutes ces molécules étant exprimées par les cellules endothéliales et les leucocytes.

Ainsi il a été démontré, *in vitro* et *in vivo*, que si la fonction adhésive de la L-sélectine était bloquée (par des polysaccharides ou des anticorps neutralisants), alors le rolling des leucocytes était inhibé et le recrutement des leucocytes à l'intérieur des tissus fortement diminué (Tangelder, 1991; von Adrian, 1991). De plus, un clivage précoce de la L-sélectine ou la déglycosylation de cette molécule a pour conséquence l'inhibition du rolling (von Adrian, 1993). De la même manière, d'autres études ont mis en évidence, à l'aide d'anticorps bloquants ou de souris déficientes pour la P-sélectine, l'implication de cette molécule dans le processus de rolling (Bienvenu, 1993; Mayadas, 1993). Concernant la E-sélectine, on peut supposer que cette molécule intervient à la fin de l'étape de rolling puisque son expression, nécessite une néosynthèse d'ARN messagers puis de protéines. Elle n'est maximale que dans les 4 à 6 heures suivant la stimulation de l'endothélium mais détectable dès la deuxième heure d'activation ce qui est suffisant pour médier le rolling. Néanmoins le rolling faisant intervenir la E-sélectine semble plus efficace que celui mettant en jeu la P-sélectine (Lawrence, 1993). Les P- et E-sélectines influencent le rolling dans la mesure où toutes deux reconnaissent le SLe<sup>x</sup> exprimé par la L-sélectine; cependant il a été démontré que la P-sélectine possède d'autres ligands de plus forte affinité (PSGL-1) (Moore, 1992). Ceci suggère que ces deux sélectines reconnaissent des ligands différents à la surface des cellules en contact.



*β. l'arrêt-l'activation-l'adhérence:* cette étape peut se décomposer en trois phases: (i) immédiate au rolling, la première phase correspond à l'arrêt des leucocytes à la surface de l'endothélium;

(ii) fixées à leur récepteur endothélial DARC, les chémokines sont présentées aux leucocytes et vont s'engager dans une interaction avec leurs récepteurs respectifs exprimés à la surface des leucocytes. Cette étape de présentation initie une autre cascade (encore mal connue) qui est celle des seconds messagers intracellulaires (signal "inside out") générés par l'activation de protéines G couplées à la partie cytoplasmique des récepteurs pour les chémokines (Wu, 1993). Cette cascade est responsable, au final, de l'expression d'intégrines à la surface des leucocytes.

(iii) la dernière phase correspond aux interactions entre les molécules d'adhérence endothéliales et leurs intégrines respectives. L'activation des leucocytes par des médiateurs de type chémokine entraîne un changement conformationnel des intégrines, les rendant plus avides vis-à-vis de leurs ligands respectifs.

Cette étape d'adhésion peut être inhibée par différents facteurs comme l'IL-8 (décrit alors comme le LAI ou leukocyte adhesion inhibitor et entraînant une désactivation) (Gimbrone, 1989), le monoxyde d'azote (Kubes, 1991) ou le TGF- $\beta$  (Gamble, 1988; Gamble, 1991). Une déficience ou une absence des intégrines CD11/CD18 (décrit comme le syndrome LAD (Leukocyte Adhesion Deficiency) de type I) a pour conséquence l'absence de migration de neutrophiles et de monocytes à travers l'endothélium alors que ces cellules participent au rolling (Anderson, 1985). Cependant la migration de lymphocytes, d'éosinophiles et le maintien d'une immunité cellulaire (Anderson, 1985) indiquent qu'un autre mécanisme d'adhésion vient compenser le premier (détaillé dans le prochain paragraphe). Un autre syndrome LAD a été décrit et dénommé de type II (Etzioni, 1992). Dans ce cas, une anomalie du métabolisme du fucose ne permet pas de former des sélectines normales et engendre un rolling défectueux. L'adhésion ferme et l'émigration des leucocytes pourront quand même être réalisées lors de circonstances particulières, à savoir la réduction du flux

sanguin ou le rétrécissement des vaisseaux, qui favorisent ainsi un contact plus intime entre les leucocytes et la barrière endothéliale. Ces deux types de syndrome LAD illustrent la complexité des interactions lors de la migration transendothéliale. Ils montrent l'existence d'une relative redondance fonctionnelle entre les différentes molécules d'adhérence; cette redondance pouvant avoir une signification importante.

*γ. la diapédèse*, dernière étape de la cascade. La plupart des leucocytes ayant adhéré à l'endothélium est stimulée par un gradient chimotactique et migre à travers la monocouche de cellules endothéliales.

L'expression transitoire des intégrines leucocytaires et de leurs ligands endothéliaux respectifs permet leur désactivation et rend possible la migration entre deux cellules endothéliales adjacentes. Les chémokines, déjà impliquées dans l'activation des intégrines, jouent ici encore un rôle important puisqu'elles imposent aux leucocytes la direction à suivre. Elles peuvent également sélectionner les sous-populations leucocytaires qui migreront. Des études *in vitro* ont montré que les monocytes (Muller, 1992), les lymphocytes (Oppenheimer-Marks, 1991) et les cellules NK (Bianchi, 1993) étaient capables spontanément de migrer à travers une monocouche de cellules endothéliales non activées alors que les neutrophiles (Huber, 1991) et les éosinophiles (Morland, 1992) ont besoin d'une stimulation chimotactique. Dans tous les cas, le nombre de leucocytes en migration augmente lorsque les cellules endothéliales sont stimulées par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1.

Compte tenu de la redondance fonctionnelle, il est difficile d'attribuer à une molécule d'adhérence donnée un rôle exclusif dans telle ou telle étape de la transmigration endothéliale. En effet, les trois étapes que nous venons de décrire étant très liées, l'éventuelle perturbation de l'une d'entre-elles n'est pas sans conséquence sur les suivantes. Toutefois une exception peut être envisagée pour la molécule d'adhérence PECAM-1 décrite pour son implication directe dans la diapédèse (Muller, 1993). Les anticorps monoclonaux dirigés contre le PECAM-1 (endothélial ou leucocytaire) inhibent la transmigration des leucocytes. Ils confinent également ces derniers à la surface des cellules endothéliales,

démontrant ainsi l'implication du PECAM-1 dans le passage entre les cellules endothéliales adjacentes. Il est important de signaler que certains lymphocytes n'expriment pas cette molécule d'adhérence et que, par conséquent, un autre système doit exister afin de permettre la diapédèse de ces cellules.

*δ. la migration subendothéliale:* la diapédèse achevée, les gradients chimotactiques dirigent les leucocytes jusqu'au site de l'inflammation. Pour cela ils sont amenés à interagir avec des composants de la MEC, probablement par le biais des intégrines  $\beta_1$  (Hemler, 1990) ou du CD11b/CD18 qui reconnaît le fibrinogène (Wright, 1988). Ces interactions avec les protéines de la MEC pourraient également préactiver les leucocytes de telle sorte qu'ils arrivent sur le site de l'inflammation dans un état de "compétence".

#### **e. Recrutement leucocytaire sélectif.**

La mise en place de modèles expérimentaux d'inflammation chez les animaux ont permis de mettre en évidence, au site de l'inflammation, l'existence d'un recrutement sélectif visant certaines sous-populations leucocytaires. Ainsi l'injection intradermique de molécules chémoattractantes ou de LPS a pour conséquence une émigration massive de neutrophiles à partir du sang; cette infiltration est déjà pratiquement maximale 4 heures après l'injection et perdure jusque 24 heures (Issekutz, 1980). Par contre, à la douzième heure, ce sont les monocytes qui sont présents en plus grand nombre. Leur recrutement est maintenu pendant au moins 24 heures. L'infiltrat cellulaire, 48 heures après l'injection, est composé entièrement de leucocytes mononucléés (Issekutz, 1980). Ajoutée à ces différences quantitatives et temporelles de recrutement, une sélection qualitative peut également intervenir. En effet, dans certaines pathologies comme les rhinites allergiques ou l'asthme, on observe une accumulation marquée d'éosinophiles respectivement dans les muqueuses nasale et bronchique alors que cette sous-population de leucocytes n'est que très faiblement représentée par rapport aux leucocytes circulants.

La transmigration dépend principalement de trois événements: l'expression précoce de molécules d'adhérence (les sélectines), la participation de facteurs d'activation (chémokines, cytokines, chémoattractants) et les interactions entre molécules d'adhérence dépendantes d'une activation (intégrines/Ig). Les molécules d'adhérence existant en nombre relativement limité, la spécificité et la diversité des infiltrats cellulaires reposent sur les molécules potentiellement activatrices et surtout sur la pléiotropie de leurs effets aux différentes étapes de la transmigration endothéliale et sur les différents types cellulaires qui y sont impliqués.

Ainsi des cytokines peuvent moduler différemment l'induction des molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales selon qu'elles sont seules ou en combinaison. Il existe des inducteurs communs pour l'induction de plusieurs molécules adhésives (IL-1, TNF $\alpha$ , LPS) alors que d'autres sont plus spécifiques d'une molécule (IFN $\gamma$  pour l'ICAM-1, IL-3 pour la E-selectine ou IL-4 pour le VCAM-1). La combinaison de certaines cytokines (IL-4 + TNF $\alpha$ ) peut avoir des effets additifs ou synergiques pour une molécule d'adhérence (VCAM-1) et antagonistes pour une autre (E-sélectine). Ceci suggère qu'une modulation plus fine peut être exercée par une combinaison de cytokines. A ces actions différentielles doivent être ajoutées des différences de cinétique d'expression de ces molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Ainsi la E-sélectine a une expression maximale 4 heures après une stimulation par le TNF $\alpha$  et retrouve son niveau de base à 24 heures alors que dans les mêmes conditions d'activation le VCAM-1 et l'ICAM-1 ont un maximum d'expression respectivement 6 et 24 heures après la stimulation (Pober, 1986).

L'expression d'une combinaison particulière de molécules d'adhérence à la surface des leucocytes ou des cellules endothéliales pourraient également participer à la sélectivité de ce recrutement cellulaire. Les neutrophiles et les monocytes utilisent principalement leurs intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 pour adhérer à l'endothélium (le CD11c/CD18 ne jouant qu'un rôle mineur) (Arnaout, 1988), alors que l'intégrine CD11a/CD18

est la plus impliquée dans l'adhésion des lymphocytes (Dustin, 1988b). A la différence de tous les autres leucocytes et des cellules NK, les neutrophiles ne peuvent pas traverser l'endothélium en utilisant la voie dépendante du VCAM-1 dans la mesure où ils n'expriment pas son récepteur: l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  (Hemler, 1990). De la même manière, le PECAM-1 n'étant exprimé que sur une sous-population de lymphocyte T, l'implication d'autres molécules dans la diapédèse est suggérée.

La participation des chémoattractants, des médiateurs lipidiques, des cytokines et des chémokines n'est pas à négliger puisqu'ils sont capables d'activer et d'attirer de manière préférentielle certains types de leucocytes: l'IL-8 agit plutôt sur les neutrophiles et les lymphocytes, le RANTES sur les monocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T mémoires; le MCP-1 sur les monocytes; l'IL-5 et l'éotaxine sur les éosinophiles.

Nous pouvons donc dire, en conclusion, que le recrutement préférentiel d'un type cellulaire donné est la somme de plusieurs événements distincts plutôt que l'effet unique d'un chémoattractant spécifique d'une cellule ou d'une voie d'adhésion pour un type cellulaire particulier.

## **2. Les médiateurs endothéliaux participant à la réaction inflammatoire.**

Les chapitres précédents ont largement contribué à nous faire comprendre que les cellules endothéliales étaient la cible de nombreux médiateurs; or l'endothélium en constitue également une source importante. Les cellules endothéliales sont capables de synthétiser et de relarguer des cytokines, des chémokines et des dérivés lipidiques qui régulent le recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires mais aussi d'autres processus comme la différenciation des lymphocytes B et T, l'hématopoïèse ou la coagulation.

### a. Les cytokines.

• **IL-1:** cette cytokine existe sous deux formes: l'une, majoritaire, est membranaire (IL-1 $\alpha$ ), l'autre est sécrétée (IL-1 $\beta$ ). L'IL-1 a des effets pléiotropiques agissant sur le métabolisme de l'acide arachidonique, les processus de coagulation, le recrutement leucocytaire ou encore la prolifération des cellules endothéliales. Produite par de nombreux types cellulaires et notamment par les monocytes/macrophages (Oppenheim, 1986), l'IL-1 est également synthétisée par les cellules endothéliales en réponse à une stimulation par le TNF $\alpha$ , le LPS ou l'IL-1 elle-même (Libby, 1986; Locksley, 1987).

• **IL-6:** cette cytokine présente de nombreuses similitudes fonctionnelles avec l'IL-1. Comme elle, l'IL-6 est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle important dans l'activation lymphocytaire, la synthèse des protéines de la phase aigüe de la réaction inflammatoire et l'hématopoïèse (Kishimoto, 1989b). Les cellules endothéliales produisent spontanément l'IL-6, néanmoins cette production peut être augmentée par le TNF $\alpha$ , le LPS, l'IL-1, l'IFN $\gamma$  et l'histamine (Jirik, 1989; Leeuwenberg, 1990; Delneste, 1994). L'IL-4 seule active plus faiblement la synthèse d'IL-6 mais amplifie l'action des stimuli classiques (Howell, 1991; Colotta, 1992).

• **TGF- $\beta$ :** des trois isoformes connues pour le TGF, c'est la première, soit le TGF- $\beta$ 1, que les cellules endothéliales sécrètent sous l'effet de divers stimuli (Kojima, 1995; Ribeiro, 1995). Cette cytokine exerce de multiples activités aussi bien stimulatrices qu'inhibitrices sur de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales (Chen, 1996). Cette action autocrine sur les cellules de l'endothélium peut se traduire par l'induction de l'angiogenèse *in vivo* ou par l'inhibition de la prolifération et de la migration de cellules endothéliales en culture (Frank, 1996). Ce rôle autocrine prend également de l'importance dans le recrutement cellulaire puisque le TGF- $\beta$ 1 inhibe l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales vasculaires (Rhodes, 1995).

• **CSFs (colony stimulating factors):** les CSFs représentent des facteurs de croissance importants pour l'accomplissement et la régulation de l'hématopoïèse. Les cellules endothéliales libèrent des facteurs spécifiques de la prolifération des granulocytes (G-CSF ou granulocyte-CSF), des monocytes (M-CSF ou monocyte-CSF) ou communs à ces deux types cellulaires (GM-CSF) et ceci sous l'effet des cytokines classiques ( $\text{TNF}\alpha$ , LPS, IL-1) (Pober, 1990). Toutefois il a été envisagé que les cellules endothéliales, possédant les récepteurs pour les G- et GM-CSFs, puissent produire ces facteurs de croissance de manière autocrine ou paracrine. Le GM-CSF est également une cytokine clé pour la pré-activation et le recrutement des éosinophiles au sein des tissus.

#### **b. Les chémokines.**

• **IL-8:** cette chémokine  $\alpha$  est synthétisée par les cellules endothéliales stimulées par le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-1, le LPS ou l'histamine (Strieter, 1989; Jeannin, 1994).  $\text{Gro}\alpha$ , une chémokine de la même famille, est également synthétisée par les cellules endothéliales en réponse au  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 et LPS (Strieter, 1989). Outre ses activités de stimulation des intégrines leucocytaires et de chémotactisme, l'IL-8 est également capable de stimuler la libération de médiateurs basophiliques (White, 1989). Bien qu'une forme associée à la membrane cytoplasmique ait été mise en évidence à la surface des cellules endothéliales, aucune preuve d'activation autocrine de l'IL-8 n'a pu être relatée (Smith, 1993). Or si l'on suppose que l'IL-8 détectée à la surface des cellules endothéliales correspond à l'interaction de la chémokine au récepteur DARC, l'absence d'activation ne doit pas surprendre puisqu'il a été démontré, pour son homologue érythrocytaire (l'antigène Duffy) que la liaison des chémokines au récepteur n'entraînait pas d'activations cellulaires (Neote, 1993).

• **MCP-1:** cette cytokine chémoattractante pour les monocytes fait partie de la famille des chémokines  $\beta$ . Sa synthèse par les cellules endothéliales est initiée par le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-1, le LPS, l'IFN $\gamma$  et, à un degré moindre, l'IL-4 (Rollins, 1990; Sica, 1990; Rollins, 1991; Colotta, 1992). Le MCP-1 est aussi capable d'entraîner le changement de conformation des intégrines ainsi que l'activation de certaines sous-populations leucocytaires.

• **RANTES:** le RANTES est une chémokine  $\beta$  spécifique des cellules T mémoires, des monocytes et des éosinophiles (Schall, 1990; Alam, 1993). Les cellules endothéliales ne produisent pas de façon spontanée le RANTES dont la synthèse nécessite l'action conjointe de l'IFN $\gamma$  et du  $\text{TNF}\alpha$ , l'IFN $\gamma$  sensibilisant les cellules endothéliales à la stimulation par le  $\text{TNF}\alpha$  (Marfaing-Koka, 1995). L'IFN $\gamma$  seul n'a aucun effet sur la production de RANTES par les cellules endothéliales, l'IL-1 ou le  $\text{TNF}\alpha$  n'induisant qu'une très faible augmentation. L'effet synergique puissant de l'IFN $\gamma$  et du  $\text{TNF}\alpha$  s'observe au niveau de l'ARNm et de la synthèse protéique, et peut être inhibé partiellement par l'IL-4 ou l'IL-13 (Marfaing-Koka, 1995). Ces observations ont été faites dans le cadre d'une réaction retardée associée à une granulomatose où le  $\text{TNF}\alpha$  et l'IFN $\gamma$  sont produits de façon concomitante et en quantités importantes; ce qui pourrait expliquer que dans un contexte où ces deux cytokines ne sont pas présentes en même temps, la production de RANTES par les cellules endothéliales n'ait pu être mise en évidence.

### **c. Les dérivés de l'acide arachidonique et le PAF.**

Parmi les médiateurs immunologiques libérés par la cellule endothéliale, on trouve également les eicosanoïdes, produits du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique. La dégradation de ce produit peut se faire de deux manières:

- par la voie des lipooxygénases donnant naissance aux leucotriènes (LT) B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> ainsi qu'à l'acide hydroperoxyeicosatétraoïque (5 HETE). Les cellules endothéliales ne possédant pas la 5 lipooxygénase (l'enzyme convertissant le LTA<sub>4</sub> en LTB<sub>4</sub> puis LTC<sub>4</sub>) elles



synthétisent ces LT à partir du LTA<sub>4</sub> d'autres cellules comme les neutrophiles (Feinmark, 1986). Le LTB<sub>4</sub> est considéré comme agent chémoattractant pour les granulocytes et les monocytes alors que le LTC<sub>4</sub>, en plus de ses puissants effets broncho- et vaso- constricteurs, agit sur la contraction des cellules musculaires lisses et sur la perméabilité microvasculaire (Samuelson, 1983).

- par la voie de la cyclooxygénase aboutissant à la formation d'endopéroxydes, précurseurs des prostaglandines (PG) et du thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Les cellules endothéliales synthétisent des taux élevés de PG dont la PGD<sub>3</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, et PGI<sub>2</sub> (prostacycline).

A partir du même précurseur phospholipidique dont sont issus tous ces médiateurs, les cellules endothéliales synthétisent et relarguent un autre facteur: le PAF (Prescott, 1984). Outre sa fonction activatrice des plaquettes, le PAF est connu pour être un agent chémoattractant pour les granulocytes et les monocytes (**Tableau 2**). Co-exprimé avec la P-sélectine à la surface endothéliale, il favoriserait l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium (Lorant, 1991).

### **3. La cellule endothéliale en tant que cellule présentatrice d'antigène.**

Pour qu'une cellule soit considérée comme cellule présentatrice d'antigène (CPA), elle doit au minimum être capable de réaliser les trois processus suivants:

- capter l'antigène par pinocytose ou phagocytose;
- dégrader l'antigène de façon partielle grâce à des enzymes contenues dans les compartiments lysosomiaux;
- exprimer, à sa surface, des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II auxquelles sont associés les fragments de l'antigène dégradé.

Les cellules endothéliales interagissent avec les leucocytes circulants dans des conditions normales (homing ou recirculation lymphocytaires) ou pathophysiologiques (émigration des leucocytes jusqu'au site inflammatoire). L'intérêt porté à la cellule endothéliale comme éventuelle CPA provient de l'observation que bon nombre des désordres immunologiques implique les vaisseaux sanguins (Nossel, 1982) et par conséquent suggère que les cellules endothéliales puissent servir de CPA aux lymphocytes T helper (Th).

Dans un premiers temps, il a été démontré que les cellules endothéliales possédaient effectivement les deux premières qualités requises à savoir les capacités à phagocyter l'antigène et à le dégrader (Langner, 1995). D'autre part des études antérieures avaient montré l'induction de molécules du CMH de classe II (essentiellement HLA-DR et à un degré moindre HLA-DP et -DQ) sous l'effet de l'IFN $\gamma$  (Pober, 1983). A la suite de ce traitement, les cellules endothéliales sont capables d'initier la prolifération de cellules T allogéniques CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Brooks, 1993), prouvant ainsi qu'en plus de présenter l'antigène elles expriment également un facteur costimulateur nécessaire à la prolifération lymphocytaire (probablement une interaction LFA-3/CD2 entre cellules endothéliales et cellules T) (Savage, 1995).

Plus récemment, des arguments supplémentaires sont venus renforcer ces démonstrations. En effet, les nombreuses CPA (cellules B, monocytes, cellules dendritiques, fibroblastes, basophiles et cellules épithéliales) ont toutes en commun le fait d'exprimer à leur surface le CD40 (Clark, 1986; Alderson, 1993; Freudenthal, 1990; Yellin, 1995a; Valent, 1990; Galy, 1992). L'interaction de cette molécule avec son ligand (gp39) entraîne l'activation, la différenciation ou la prolifération de ces cellules. Il a été mis en évidence que les cellules endothéliales normales d'origine tissulaire diverse exprimaient faiblement le CD40 à leur surface, cette expression pouvant être augmentée par différentes cytokines telles le TNF, l'IL-1, les IFN $\gamma$  et  $\beta$ , le LPS (Karmann, 1995). L'interaction du CD40 endothélial avec son ligand induit l'expression de la E-sélectine, de l'ICAM-1 (Karmann, 1995, Hollenbaugh, 1995) et du VCAM-1 (Yellin, 1995b) à la surface des cellules endothéliales: les cinétiques d'expression de

ces trois molécules d'adhérence étant similaires à celles établies pour le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 (Yellin, 1995b). Ces résultats suggèrent que le CD40 pourrait participer au développement de la réponse inflammatoire. Cette idée est d'ailleurs renforcée par l'observation d'une augmentation de l'expression du CD40 à la surface des cellules endothéliales dans certaines maladies dermiques inflammatoires comme le psoriasis ou la dermatite allergique (Hollenbaugh, 1995) indiquant ainsi l'éventuelle implication du CD40 endothélial *in vivo* dans l'inflammation. Des expériences *in vitro* ont apporté plus de renseignements quant à la fonctionnalité du CD40 endothélial: en effet, l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales est augmentée après que celles-ci aient été activées par le gp39 soluble (Hollenbaugh, 1995).

Toutes ces observations suggèrent fortement qu'il puisse exister un mécanisme de présentation d'antigène par les cellules endothéliales aux lymphocytes T activés, ces derniers amplifiant les réponses inflammatoires *in vivo* par le biais d'une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence.

## **VII. Participation de l'endothélium dans la réaction inflammatoire immunoallergique: exemple de l'asthme.**

L'asthme est une maladie fréquente caractérisée par l'obstruction réversible des voies aériennes et des bronches ainsi qu'une intense infiltration des muqueuses bronchiques par des cellules inflammatoires. Le syndrome asthmatique est déclenché par des facteurs multiples: les allergènes, les infections, la pollution atmosphérique, les irritants chimiques, l'exercice physique, les allergies alimentaires ou bien encore les médicaments. Les lésions anatomopathologiques sont constituées d':

- un épaissement de la membrane basale par dépôt de collagène;
- une destruction et une desquamation de l'épithélium;
- une formation d'un œdème et une hypersécrétion de mucus;

- une hyperplasie des cellules glandulaires productrices de mucus;
- une hypertrophie et une constriction des fibres musculaires lisses;
- un infiltrat inflammatoire constitué essentiellement de lymphocytes de type Th<sub>2</sub>, d'éosinophiles, de mastocytes et peut-être de plaquettes.

(Laitinen, 1985; Barnes, 1988; Brewster, 1990; Kay, 1991a).

Ces troubles sont généralement réversibles. Néanmoins dans certains cas ils peuvent persister, donnant lieu à une hypertrophie musculaire lisse et glandulaire associée à une infiltration cellulaire inflammatoire (dominance de polynucléaires) qui se pérennise dans le temps

L'épithélium bronchique joue un rôle important dans l'asthme dans la mesure où il peut réguler l'accès des facteurs déclenchants à leur cible (accès des allergènes aux cellules porteuse d'IgE de la muqueuse et de la sous-muqueuse). Les principaux agents allergéniques inhalés sont:

- les poussières de maison, les acariens dont *Dermatophagoides pteronyssinus* et *farinae*;
- les pollens;
- les phanères, squames et autres composés animaux;
- les moisissures atmosphériques agissant sous forme de spores (*Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*).

L'inhalation d'un allergène par un sujet sensibilisé peut provoquer deux types de réactions bronchiques dénommées "réaction immédiate" et "réaction tardive ou retardée".

## **1. les réactions allergiques asthmatiques immédiate et tardive.**

### **a. la réaction immédiate.**

Elle apparait très rapidement (dans les minutes qui suivent le contact allergénique) et se manifeste par une diminution des débits respiratoires et l'apparition des symptômes d'asthme (dyspnée, oppression thoracique, bronchospasme). Ces observations

cliniques sont la conséquence d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et donc d'un œdème de la muqueuse, d'une sécrétion de mucus et d'une contraction des muscles lisses bronchiques, le tout étant engendré majoritairement par les médiateurs mastocytaires (Scott, 1993). L'obstruction des voies aériennes s'estompe généralement dans l'heure de manière naturelle ou par l'intermédiaire de  $\beta_2$  mimétiques bronchodilatateurs (Booij-Noord, 1972).

L'implication de l'endothélium dans la réaction précoce est de tout premier ordre. En effet, la formation de l'œdème dans la muqueuse est due à une augmentation de la perméabilité capillaire, accompagnée d'une fuite des protéines sériques dans les espaces interstitiels et la muqueuse bronchique. Cette perturbation de l'endothélium vasculaire s'effectue en réponse à divers médiateurs mastocytaires tels l'histamine, le PAF, les prostaglandines E, les leucotriènes C, D et E. Sous l'action de ces médiateurs, les cellules nerveuses peuvent libérer la substance P, un neuropeptide également responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (Kowalski, 1988).

#### **b. la réaction tardive ou retardée.**

Cette réaction n'est pas une constante puisqu'elle n'apparaît que chez certains certains sujets 3 à 4 heures après l'exposition à l'allergène, l'obstruction des voies aériennes étant maximale entre 4 et 8 heures (O'Byrne, 1987). Les symptômes d'obstruction peuvent perdurer jusque 24 heures voire au-delà. On observe alors une inflammation de la muqueuse qui se traduit par:

- la présence de médiateurs d'origines diverses;
- un dysfonctionnement vasculaire amenant à une augmentation du flux sanguin et à l'aggravation de l'œdème;
- une destruction de la barrière épithéliale et de son environnement proche;
- mais surtout un infiltrat cellulaire composé majoritairement d'éosinophiles et de lymphocytes T.

(Persson, 1986; Laitinen, 1985; Frew, 1990).

Chez les sujets présentant les deux types de réactions après une simple exposition à l'allergène, l'intensité et la durée de l'obstruction des voies aériennes en phase tardive est plus sévère que lors de la réaction immédiate.

La sécrétion de mucus est réalisée principalement par des glandes situées sous la muqueuse et par les cellules de Goblet, dont l'hyperplasie représente en fait une des caractéristiques de l'asthme. Les décès inhérents à une crise d'asthme révèlent des sécrétions diffuses de mucus qui ont probablement causé l'obstruction des voies aériennes (Messer, 1960). On dénombre plusieurs sécrétagogues potentiels (i) mastocytaires: LTD<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, HETE, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGA<sub>2</sub>, histamine (Shelhamer, 1981); (ii) issus du système nerveux autonome avec entre autres la substance P (Shelhamer, 1980); (iii) éosinophiliques avec les protéines dérivées des granules; (iv) macrophagiques comme le MMS (macrophage-derived mucus secretagogue ou sécrétagogue muqueux dérivé du macrophage) (Marom, 1985).

Le passage des fluides constitutifs de l'œdème vers la lumière des voies aériennes vient perturber l'édifice épithélial et contribue fortement à la desquamation de l'épithélium. Ce phénomène est amplifié en particulier par l'action de radicaux libres oxygénés formés après la dégranulation mastocytaire (Henderson, 1978). Les cellules de Goblet prennent peu à peu la place des cellules épithéliales détachées, initiant ainsi le processus d'hyperplasie.

Nous nous intéresserons davantage à l'infiltrat cellulaire et plus particulièrement aux cellules qui le composent. La mise en évidence de ces éléments cellulaires a été réalisée dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires (LBA) ou sur des biopsies bronchiques (BB). Ainsi il a été démontré, dans les LBA et les BB d'asthmatiques, une augmentation du nombre d'éosinophiles et de lymphocytes T (Djukanovic, 1990; Bousquet, 1990; Corrigan, 1992). Ces cellules contribuent à l'hyperréactivité bronchique et à la destruction épithéliale (Boushey, 1980). De plus, un infiltrat constitué d'éosinophiles, de neutrophiles, de macrophages, de monocytes et de plasmocytes a pu être mis en évidence dans les muqueuses de patients décédés d'un asthme (Kaliner, 1989). Il est important de signaler que

les cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme sont toutes capables de relarguer des facteurs capables de perpétuer la dégranulation mastocytaire et ainsi d'engendrer une boucle responsable de l'aggravation de l'état général du sujet asthmatique.

L'implication de l'endothélium dans cette phase tardive est double: (i) les leucocytes, retrouvés au niveau des tissus, sont recrutés à partir du sang. Ils doivent, par conséquent, effectuer une transmigration endothéliale nécessitant la mise en place des molécules d'adhérence, la libération de cytokines et chémokines....; (ii) par la sécrétion de différents médiateurs (LT, PG, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES...), les cellules endothéliales peuvent contribuer à l'amplification des processus inflammatoires.

## **2. les médiateurs cellulaires impliqués dans l'asthme.**

L'examen des voies aériennes de sujets décédés d'un asthme révèle une importante infiltration de cellules inflammatoires. Même si les éosinophiles semblent être le type cellulaire prédominant, on peut noter la présence d'un nombre variable d'autres cellules telles les neutrophiles, les lymphocytes T et les plasmocytes (Dunnill, 1969). Toutefois en absence de toute autre maladie pouvant être associée à une éosinophilie, la présence massive d'éosinophiles dans les voies aériennes constituera un critère diagnostique pour l'asthme (Dunnill, 1969), la sévérité de l'asthme étant corrélée au nombre d'éosinophiles présents dans les voies aériennes (Bousquet, 1990).

**a. les mastocytes:** ce sont les premières cellules à avoir été associées à la pathologie immunoallergique grâce à leur capacité d'activation par un mécanisme dépendant de l'IgE. Les mastocytes sont abondants dans la peau, les tractus respiratoires supérieur et inférieur, les muqueuses gastro-intestinale et reproductive. Ils représentent 2% du pool cellulaire pulmonaire se situant sous la membrane basale des muqueuses bronchiques et

bronchiolaires (Fox, 1981), néanmoins leur nombre peut être 3 à 5 fois supérieur chez les sujets asthmatiques (Tomioka, 1984). Leur localisation, au sein du tissu pulmonaire, fait des mastocytes l'une des cellules les plus accessibles à l'allergène, facteur déclenchant la dégranulation mastocytaire. Les médiateurs ainsi relargués sont tenus pour responsables des manifestations cliniques observées lors de la réaction immédiate (Lai, 1988).

Les mécanismes de dégranulation du mastocyte dépendants de l'IgE sont liés à la présence, à la surface de ces cellules, d'un récepteur de forte affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines E (IgE) (Conrad, 1975). Ultérieurement ce récepteur a été identifié à la surface d'autres types cellulaires comme les basophiles/mastocytes (Kinet, 1987; Kinet, 1988), les éosinophiles (Soussi-Gouni, 1994), les monocytes/macrophages (Maurer, 1994; Taborda, 1995) et les plaquettes (Soussi-Gouni, 1995). A côté de ce FcεRI, les mastocytes comme d'autres cellules (éosinophiles, lymphocytes, monocytes/macrophages, neutrophiles, plaquettes) expriment à leur surface des récepteurs de plus faible affinité pour les IgE ou FcεRII (Capron, 1981; Joseph, 1983; Spiegelberg, 1984). L'allergène exerce un pontage entre les molécules d'IgE, plus nombreuses chez les sujets allergiques; ces dernières entraînant la dégranulation des mastocytes en se fixant à leurs récepteurs membranaires (Ishizaka, 1972). L'activation mastocytaire a pour conséquence la libération de deux types de composés: (i) les médiateurs préformés (histamine, ECF-A, NCF-A) contenus dans les granules sécrétoires et immédiatement disponibles; (ii) les médiateurs secondaires ou néoformés nécessitant une synthèse à partir de composés de la membrane cellulaire comme les radicaux libres (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, PG, HETE, TX, PAF) ou encore des médiateurs stockés comme les cytokines.

Par le biais de récepteurs de type H<sub>1</sub>, l'histamine stimule la contraction du muscle lisse bronchique (Rosenthal, 1977) et augmente la perméabilité vasculaire et la formation de l'œdème (Wasserman, 1980). Elle participe également à la sécrétion de mucus en interagissant avec ses récepteurs de type H<sub>2</sub> (White, 1987). L'interaction histamine/récepteur de



type H3 permet d'exercer un rétrocontrôle négatif de la production d'histamine (Ichinose, 1989). Parmi les autres médiateurs libérés, citons:

- le PAF, bronchoconstricteur puissant, qui intervient dans toutes les phases de la réaction asthmatique (bronchoconstriction, formation de l'œdème, sécrétion du mucus et infiltration cellulaire);

- les  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGD}_2$  et  $\text{TXA}_2$  qui participent au bronchospasme alors que les  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGI}_2$  ont, au contraire, une activité bronchodilatatrice. Les PG en général potentialisent la sécrétion de mucus, et la  $\text{PGE}_2$  agit plus spécifiquement dans la formation de l'œdème.

- à l'image du PAF, les LT interviennent à de multiples niveaux.

Des études récentes tendent à montrer, que non seulement les mastocytes jouent un rôle prépondérant dans la réaction immédiate par la libération de facteurs broncho- et vasoactifs, mais qu'ils pourraient également intervenir dans la phase retardée par le relargage de facteurs chimotactiques (ECF-A ou eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis, NCF-A ou neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis,  $\text{LTB}_4$ ) et de cytokines (GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6); influençant la mobilisation, l'attraction et l'activation des éosinophiles, monocytes et neutrophiles (Plaut, 1989).

**b. les macrophages:** l'examen des cellules récupérées dans les LBA et les lavages bronchiques montre que les macrophages représentent la majorité des cellules à la fois aux étages alvéolaires, bronchiques et bronchiolaires (Eschenbacher, 1987). La présence d'un récepteur pour l'IgE à la surface des macrophages suggère sa participation dans la réaction inflammatoire immunoallergique. En effet, il a été démontré *in vitro* que les macrophages alvéolaires humains, en présence d'allergène et d'IgE spécifiques, sont capables d'être activés et de sécréter des métabolites proinflammatoires, notamment des enzymes lysosomiaux, des anions superoxydes mais aussi des cytokines (TNF, IL-1, IL-6...) (Joseph, 1980).

Dans le cadre des manifestations allergiques, il a été mis en évidence que des macrophages de sujets asthmatiques étaient capables, *in vitro* et à la suite d'une activation

par l'IgE, de relarguer différents médiateurs tels la glucuronidase  $\beta$ , le LTB<sub>4</sub>, la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , le TXB<sub>2</sub> et le PAF (Fuller, 1986; Nathan, 1987). Ces composés apparaissent dans les 15 minutes suivant la stimulation, ce qui est compatible avec leur implication dans la phase précoce de la réaction asthmatique. De plus, le LTB<sub>4</sub> et le PAF étant des agents chémoattractants puissants, la participation des macrophages s'étend également jusqu'à la réaction retardée où ils favorisent le recrutement cellulaire (Gosset, 1984). Cette notion est renforcée par le fait que ces cellules sécrètent des médiateurs et des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF, le PDGF, le TNF $\alpha$ , et des facteurs de libération de l'histamine (Kelley, 1990). Ceci a également été observé au niveau des macrophages alvéolaires de patients présentant une réaction tardive (Gosset, 1991). L'addition de tels surnageants de macrophages alvéolaires sur des cultures de cellules endothéliales a pour conséquence une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et E-sélectine. Cet effet est complètement aboli par l'ajout d'anticorps anti-TNF $\alpha$ , les anticorps dirigés contre l'IL-6 étant sans effet sur l'expression d'ICAM-1 et de la E-sélectine (Lassalle, 1993). Ces résultats suggèrent la participation active des macrophages alvéolaires dans l'induction de la réaction inflammatoire locale au niveau des bronches de sujets asthmatiques et plus précisément par leur capacité à induire l'expression de molécules d'adhérence à la surface de l'endothélium situé dans leur environnement proche.

Les interactions privilégiées entre les cellules endothéliales et les macrophages alvéolaires ne sont pas limitées à la pathologie immunoallergique. En effet, les macrophages alvéolaires issus de patients porteurs d'une pathologie pulmonaire interstitielle, comme par exemple la pneumoconiose du mineur de charbon (CWP ou Coal Workers Pneumoconiosis), sont capables d'induire et d'augmenter de manière significative l'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Cet effet est dépendant du TNF $\alpha$ , cytokine libérée en quantité beaucoup plus importante par les macrophages alvéolaires de sujets avec CWP par rapport aux sujets sains (Vanhée, 1996 (sous-presse)).

Tous ces médiateurs relargués par les macrophages agiraient en synergie avec les produits mastocytaires afin d'amplifier la réaction asthmatique. Toutefois il apparaît

important de noter que les macrophages pourraient également moduler de façon négative cette réaction en libérant des facteurs inhibiteurs (Gosset, 1988). Des cytokines lymphocytaires (ex: IFN $\gamma$ ) peuvent potentialiser la libération de certaines de ces cytokines, démontrant ainsi la possibilité d'interactions entre les macrophages et des lymphocytes T présents dans les voies aériennes.

**c. les lymphocytes T:** leur rôle dans la réaction asthmatique est plutôt attribué à la phase tardive dans la mesure où cette dernière s'accompagne de leur mobilisation. Les lymphocytes T sont divisés en deux sous-types principaux: les lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1 ou T helper 1) et les Th2. On les distingue par la spécificité des cytokines qu'ils relarguent. Ainsi les Th1 sont responsables de la sécrétion de l'IL-2 et de l'IFN $\gamma$  alors que les Th2 libèrent l'IL3, l'IL-4, l'IL-5 et le GM-CSF (Plaut, 1989; Gerblich, 1984; Robinson, 1992).

Il a été mis en évidence, chez des sujets atteints d'asthme sévère, un recrutement pulmonaire sélectif de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>; ces cellules présentant une augmentation d'expression des molécules HLA-DR,  $\alpha_1\beta_1$  lymphocytaires et des récepteurs pour l'IL-2 (IL-2R) qui correspondent à des marqueurs d'activation (Gerblich, 1984). De plus, par la diversité des médiateurs qu'ils relarguent, les lymphocytes T peuvent intervenir dans le développement de la réaction asthmatique tardive. Ainsi, ils participent à:

- la différenciation des mastocytes et des basophiles par la sécrétion d'IL-3, d'IL-4 et d'IL-5 (Ihle, 1983; Hamaguchi, 1987);
- la régulation de la production d'IgE par les lymphocytes B par le biais de l'IFN $\gamma$  (inhibiteur) ou de l'IL-4 (stimulateur) (Leung, 1987);
- la maturation, l'activation, le recrutement et la survie des éosinophiles grâce à l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF (Sanderson, 1985; Metcalf, 1986; Campbell, 1987; Kay, 1991b).

Par leurs nombreux champs d'action, les lymphocytes T peuvent constituer un lien nécessaire entre l'initiation de la réaction asthmatique et sa propagation

ultérieure. Ainsi il a été démontré que des surnageants de lymphocytes T périphériques (issus de sujets asthmatiques sensibles aux acariens et ayant été exposés à des cellules présentatrices d'antigène fixées), ajoutés à des cultures de cellules endothéliales, induisaient une augmentation de l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1, l'expression de la E-sélectine n'étant pas modulée (Delneste, 1995). La sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales stimulées par ces surnageants de lymphocytes T est également augmentée. Les lymphokines impliquées dans ces effets sont au nombre de deux: l'IFN $\gamma$  qui est responsable de l'induction de l'expression de l'ICAM-1 ainsi que de la sécrétion d'IL-6, et l'IL-4 qui induit spécifiquement l'expression du VCAM-1.

**d. les éosinophiles:** toutes les connaissances concernant les capacités cytotoxiques des éosinophiles dérivent de l'étude de ces cellules dans le cadre des défenses anti-parasitaires. La présence d'éosinophiles dans le sang périphérique est souvent associée aux désordres immunologiques. Initialement, il avait été attribué un rôle protecteur aux éosinophiles dans les manifestations allergiques, ces cellules ayant la capacité de dégrader et d'inhiber la libération de l'histamine, d'inactiver les leucotriènes et le PAF (Bass, 1979). Des études ultérieures ont montré que, à l'image des mastocytes, les éosinophiles activés pouvaient libérer des médiateurs préformés et néoformés: dans ce cadre, ces cellules possèdent d'importants pouvoirs pro-inflammatoires (Frigas, 1981; Fukuda, 1985). La présence, à leur surface, des récepteurs de haute et de faible affinité pour l'IgE font des éosinophiles des cellules de l'allergie à part entière (Capron, 1986; Soussi-Gouni, 1994).

Six heures après un challenge allergénique, on observe à partir de numération sanguine une éosinopénie transitoire qui peut être suivie, chez les sujets présentant une réaction tardive, d'une éosinophilie progressive jusque 24 heures après le challenge (Durham, 1985). Chez ces sujets, l'analyse des LBA démontre la présence d'éosinophiles activés ainsi que des produits de sécrétion éosinophiliques (Kay, 1991c). En effet les éosinophiles ont la capacité de libérer de nombreux médiateurs responsables des destructions

cellulaires et tissulaires observées dans l'asthme. Les granules de l'éosinophile contiennent 4 protéines riches en arginine et possédant des propriétés cytotoxiques pour l'épithélium respiratoire:

- la protéine basique majeure (MBP ou major basic protein): localisée spécifiquement dans le core cristalloïde des granules des éosinophiles, elle possède un poids moléculaire d'environ 10 kDa. Elle a été retrouvée en quantité abondante dans la sous-muqueuse, le mucus et l'épithélium de sujets décédés à la suite d'un asthme (Filley, 1982). Elle possède d'autres propriétés: sécrétagogue pour les basophiles humains (Heutlin, 1985), elle entraîne aussi la libération d'IL-8 par les éosinophiles humains ainsi que sa propre libération (Kita, 1995);

- la protéine cationique éosinophile (ECP ou eosinophil cationic protein): c'est une protéine basique, d'un poids moléculaire de 21 kDa, localisée dans la matrice des granules. Elle partage avec la MBP une action cytotoxique et de l'ECP sécrétée a été détectée à proximité d'éosinophiles activés dans la peau, le tractus gastrointestinal, le cœur, la rate (McLaren, 1981). Parmi ses autres fonctions, on note la capacité à inhiber la prolifération lymphocytaire (Peterson, 1986);

- la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN ou eosinophil-derived neurotoxin): c'est une protéine d'environ 17 kDa qui présente une certaine homologie avec l'ECP (70%). Néanmoins elle ne semble pas être fortement impliquée dans la destruction de l'épithélium bronchique lors de la réaction asthmatique;

- la peroxydase éosinophile (EPO ou eosinophil peroxidase): cette enzyme est fortement basique et possède un poids moléculaire allant de 71 à 77 kDa (Carlson, 1985). En présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'iode, de chlore ou de brome, l'EPO est capable d'éliminer diverses cibles telles que des virus, des bactéries, des parasites, des champignons et des cellules tumorales. Toujours en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, elle agit comme sécrétagogue pour les

mastocytes et les basophiles humains et participe à la destruction du tissu pulmonaire (Davis, 1984).

Chez l'homme, la participation des éosinophiles dans la destruction des tissus est uniquement suggérée de manière indirecte par la présence de protéines cationiques aux sites de l'agression. Des concentrations élevées de ces protéines peuvent être détectées dans les expectorations et les LBA de patients asthmatiques (Gleich, 1986). De plus, des infiltrats riches en éosinophiles et des niveaux importants d'ECP et d'EDN ont été détectés dans les liquides de lavages nasaux ou dans les sécrétions lacrimales de patients allergiques après challenge allergénique.

A côté de ces protéines cytotoxiques, les éosinophiles sont capables de synthétiser et de relarguer d'autres composés parmi lesquels on distingue des médiateurs lipidiques (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, PAF), et des cytokines qui peuvent être réparties en 3 groupes selon leur activité:

- **les facteurs de croissance** comme l'IL-3, le GM-CSF (Kita, 1991), l'IL-5 (Desreumaux, 1992) et **les chémokines** comme le MIP-1 $\alpha$  (Costa, 1993), le RANTES, l'IL-16 (Lim, 1996), l'IL-8 (Braun, 1996; Yousefi, 1995) et l'éotaxine (Garcia-Zepeda, 1996);
- les cytokines impliquées dans l'**inflammation** et le **développement de la fibrose** comme l'IL-1 (Weller, 1993), l'IL-6 (Hamid, 1992), l'IL-8 (Braun, 1996; Yousefi, 1995), le TNF $\alpha$  (Beil, 1993), les TGF- $\alpha$  (Elovic, 1994) et - $\beta$ 1 (Wong, 1991);
- les cytokines impliquées dans la **régulation de la réponse immune** comme l'IL-2 (Levi-Schaffer, 1996), l'IL-4 (Nonaka, 1995), l'IFN $\gamma$  et l'IL-10 (Lamkhioued, 1995).

Ainsi, à la possibilité qu'ont les éosinophiles de participer à la destruction de leur environnement tissulaire, s'ajoute leur capacité à produire des facteurs bronchoconstricteurs,

vasoactifs et chémoattractifs impliqués dans les processus de la réaction inflammatoire immunoallergique.

**e. les neutrophiles:** l'implication des neutrophiles dans la pathologie asthmatique est beaucoup plus controversée. Bien que ces cellules soient capables de synthétiser différents médiateurs dont le rôle dans l'asthme est clairement établi (PG, TX, LTB<sub>4</sub>, PAF), la mise en évidence de leur participation n'est pas claire. Toutefois, par la mise en place de nombreux modèles animaux présentant une réaction asthmatique retardée après inhalation d'un allergène, il a pu être mis en évidence l'existence d'un infiltrat cellulaire dans les voies aériennes avec les neutrophiles comme population leucocytaire prédominante (Marsh, 1985; Murphy, 1986). Des expériences réalisées chez des primates ont montré que l'influx de neutrophiles était dépendant de l'expression de la E-sélectine (Gundel, 1991) alors que la molécule d'adhérence ICAM-1 était impliquée principalement dans l'infiltrat des éosinophiles et l'hyperréactivité bronchique (Gundel, 1992). Néanmoins les neutrophiles ont été mis en cause dans certains cas de réaction asthmatique allergénique, dans certains types d'asthme professionnel, après effort (O'Byrne, 1995) ou encore en présence de polluant atmosphérique comme l'ozone (Seltzer, 1986). De plus la présence de neutrophiles dans les biopsies bronchiques d'asthmatiques laisse supposer qu'ils puissent contribuer aux réactions asthmatiques.

**f. les plaquettes:** la fonction des plaquettes semble s'étendre au-delà de leur rôle dans l'hémostase. En effet, dans la mesure où ces cellules présentent à leur surface les récepteurs FcεRI et FcεRII et que la stimulation par les IgE engendre la libération de facteurs (PF<sub>4</sub>, PAF, HRF ou histamine-releasing factors) largement impliqués dans l'asthme (Knauer, 1981; Benveniste, 1982; Knauer, 1984), la participation des plaquettes dans l'allergie peut être suggérée (Joseph, 1988), d'autant plus que ces cellules sont retrouvées dans les LBA après challenge allergénique au bout d'une période correspondant à la phase retardée. La contribution relative des plaquettes par rapport aux autres cellules de l'allergie reste difficile car les médiateurs précédemment cités (PAF, HRF) sont également sécrétés par d'autres types cellulaires (macrophages, éosinophiles, neutrophiles).

**g. les fibroblastes** interviennent dans le remodelage de la structure bronchique chez l'asthmatique. En effet, suite au processus inflammatoire, diverses modifications morphologiques de la paroi bronchique ont été constatées. Suite à la collagénisation de la paroi et l'hypertrophie du muscle lisse, une hyperréactivité bronchique peut se mettre en place de façon irréversible. On observe une fibrose sous-épithéliale qui a principalement pour origine le dépôt de collagènes de type I, III, V et de fibronectine synthétisés et sécrétés par les myofibroblastes résidant dans la paroi bronchique (Roche, 1989; Roche, 1991). Ces modifications bronchiques peuvent être à l'origine des modifications du tonus bronchomoteur, de la réponse bronchique aux stimuli et de la réaction des voies aériennes.



*Travaux*

*Personnels*

## *B. Travaux personnels*

### I. Interactions entre les cellules endothéliales et les mastocytes.

#### **Données actuelles:**

L'un des événements majeurs de la réaction inflammatoire immunoallergique est représenté par une infiltration leucocytaire dans les tissus. Ces phénomènes impliquent à la fois la libération de chémoattractants ainsi que l'intervention des molécules d'adhérence à la surface de ces cellules (cellules endothéliales et leucocytes). Le mastocyte constitue une des cellules clés des manifestations allergiques par les médiateurs qu'il libère après engagement de ses récepteurs à l'IgE. Le principal médiateur mastocytaire relargué correspond à l'histamine, qui est aussi un puissant activateur de la cellule endothéliale. L'action de l'histamine sur la cellule endothéliale est largement reconnue dans la phase précoce de la réaction allergique où on la sait responsable

de:

- la vasodilatation;
- l'augmentation de la perméabilité vasculaire à l'origine de la formation de l'œdème;
- l'expression transitoire de la P-sélectine.

Par contre, son action dans la phase tardive de la réaction allergique est mal connue. Dans ce but, une étude a été menée, au sein de notre laboratoire, sur l'implication éventuelle de l'histamine dans cette phase tardive.

La participation des cellules endothéliales dans la phase tardive a été envisagée par le biais de leur sécrétion de cytokines et en particulier l'IL-6 et l'IL-8. Il a été démontré que:

1) l'histamine induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales de manière dépendante de la dose, les concentrations d'histamine utilisées allant de  $10^{-7}$  à  $10^{-3}$ M et la dose optimale étant la plus efficace;

2) l'augmentation de la sécrétion des cytokines est également dépendante de la durée de la stimulation par l'histamine: significativement augmentée après 4 heures d'activation (pour

l'IL-8) ou 6 heures (pour l'IL-6), la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 devient maximale après 24 heures;

3) l'histamine est capable d'induire une augmentation d'expression des ARN messagers codant respectivement pour l'IL-6 et l'IL-8 (analyse par Northern blot);

4) le  $\text{TNF}\alpha$ , un autre médiateur mastocytaire préformé, peut agir en synergie avec l'histamine au niveau de la sécrétion des cytokines étudiées;

5) les effets observés sont la conséquence de l'interaction de l'histamine avec les récepteurs de type H1 et H2 exprimés à la surface des cellules endothéliales, les récepteurs de type H3 ne semblant pas intervenir dans ces processus;

6) l'absence d'induction d'expression par l'histamine des molécules d'adhérence telles l'ICAM-1, la E-sélectine ou le VCAM-1 est en accord avec la littérature.

Ces travaux ont fait l'objet de deux publications (Delneste, 1994 et Jeannin, 1994).

### **But de l'étude:**

Ces résultats font des cellules endothéliales un modèle intéressant dans l'étude de la régulation de la réaction immunoallergique compte tenu du fait qu'elles participent aux phases précoce et tardive de cette réaction. Ainsi pour contrecarrer les manifestations allergiques, l'emploi d'anti-histaminiques est couramment préconisé. Forts de ses informations, nous avons évalué, sur l'activation des cellules endothéliales, l'effet d'un antagoniste des récepteurs de type H1 pour l'histamine, la Loratadine (commercialisée sous le nom de Clarityne®) ainsi que l'un de ses métabolites actifs, la déséthoxycarboxyloratadine (DCL). La DCL est considérée comme étant 4 fois plus puissante que la Loratadine elle-même dans sa liaison au récepteur H1 de l'histamine (Barenholtz, 1989).

La Loratadine, active après administration orale, est couramment utilisée dans le traitement de désordres allergiques. Il a été démontré *in vitro* que la Loratadine avait des propriétés anti-allergiques. En effet, elle est capable d'inhiber la libération mastocytaire de leucotriènes et d'histamine (Temple, 1988; Kreutner, 1987) ainsi que la libération d'histamine

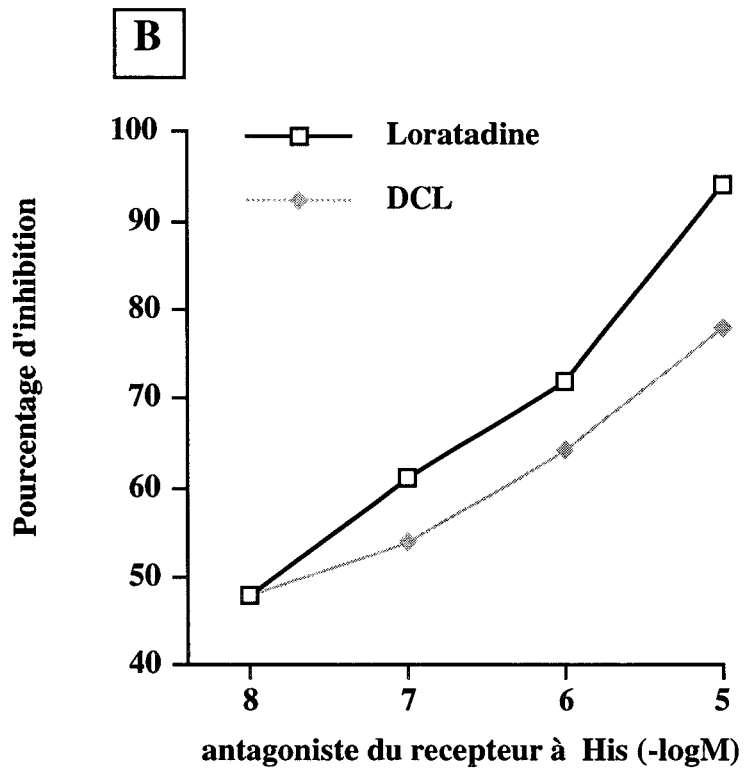
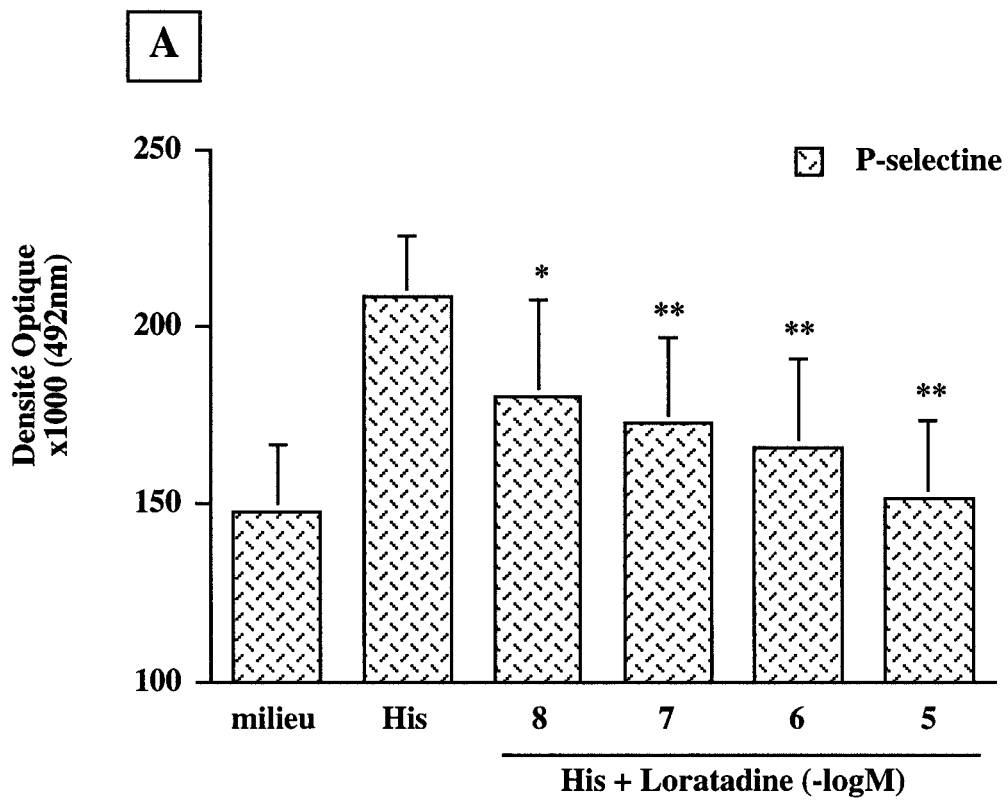
par le basophile (Miadonna, 1994). La Loratadine affecte également les fonctions éosinophiliques en inhibant à la surface la chémotaxie induite par le PAF, la libération de dérivés oxygénés (Eda, 1993) ainsi que l'expression de certains marqueurs membranaires tels ICAM-1, CD11a, CD11b, CD11c, CD18, Mac2, CD23 (Dugas, 1994). Cette action anti-anaphylactique a été mise en évidence dans des modèles animaux (cobayes, rats) où la Loratadine bloquait l'anaphylaxie bronchique (Kreutner, 1987), l'accumulation d'éosinophiles et la vasoperméabilité (Cuss, 1990). Dans le cadre de rhinites allergiques, des études *in vivo* ont confirmé le rôle bénéfique de la Loratadine dans la mesure où cette substance, administrée une semaine avant l'exposition à l'allergène, diminue le relargage d'histamine et de PGD<sub>2</sub> dans les sécrétions nasales (Bousquet, 1988; Anderson, 1991). L'activation des cellules épithéliales nasales par l'histamine, et en particulier l'expression des marqueurs membranaires ICAM-1 et HLA-DR, est inhibée par la Loratadine (Vignola, 1995).

Par conséquent, le but de notre étude a été d'évaluer et de comparer, dans notre modèle d'activation des cellules endothéliales par l'histamine, la capacité relative de ces deux antagonistes H1 à modifier l'activation endothéliale. Les critères d'activation ont été fondés sur la mesure de l'expression de la P-sélectine, de l'IL-6 et de l'IL-8.

**Matériel et méthodes:** se reporter à l'annexe (page 116).

L'expression de la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales a été réalisée par ELISA (n=5). La sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 a été quantifiée, dans les surnageants de cellules endothéliales récupérés après 24 heures de culture (n=6), au moyen d'ELISA commerciaux. L'expression de l'ARN messager codant pour l'IL-8 a été abordée par une technique de RT-PCR semi-quantitative.

**Figure 6**



## Résultats:

### *1) expression de la P-sélectine à la surface de la cellule endothéliale:*

- l'expression de la P-sélectine a été évaluée 10 minutes après la stimulation des cellules endothéliales par de l'histamine (His) à  $10^{-5}$ M et  $10^{-4}$ M, la concentration la plus forte étant la plus efficace.

- Antérieurement à la stimulation par l'histamine, des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été préincubées 1 heure avec des concentrations croissantes de Loratadine ( $10^{-8}$  à  $10^{-5}$ M), cette période de préincubation ayant été déterminée préalablement et étant désormais considérée comme optimale pour les expériences d'évaluation de l'expression de la P-sélectine. Ainsi nous avons mis en évidence que la Loratadine inhibait, significativement et de manière dépendante de la dose, l'expression de la P-sélectine à la surface des HUVEC (Figure 6A:  $p < 0,01$  pour les concentrations de  $10^{-5}$  à  $10^{-7}$ M et  $p < 0,05$  pour la concentration de  $10^{-8}$ M).

- des résultats similaires sont obtenus avec la DCL, utilisée aux mêmes doses. Toutefois la DCL semble être moins efficace que la Loratadine à inhiber l'expression de la P-sélectine induite par l'histamine ( $p < 0,05$  uniquement pour les concentrations de  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ M) (résultats non présentés).

- les doses d'antagonistes responsables d'une inhibition de 50% de l'expression de la P-sélectine induite à la surface des HUVEC, à la suite d'une stimulation par de l'histamine à  $10^{-4}$ M sont (Figure 6B):

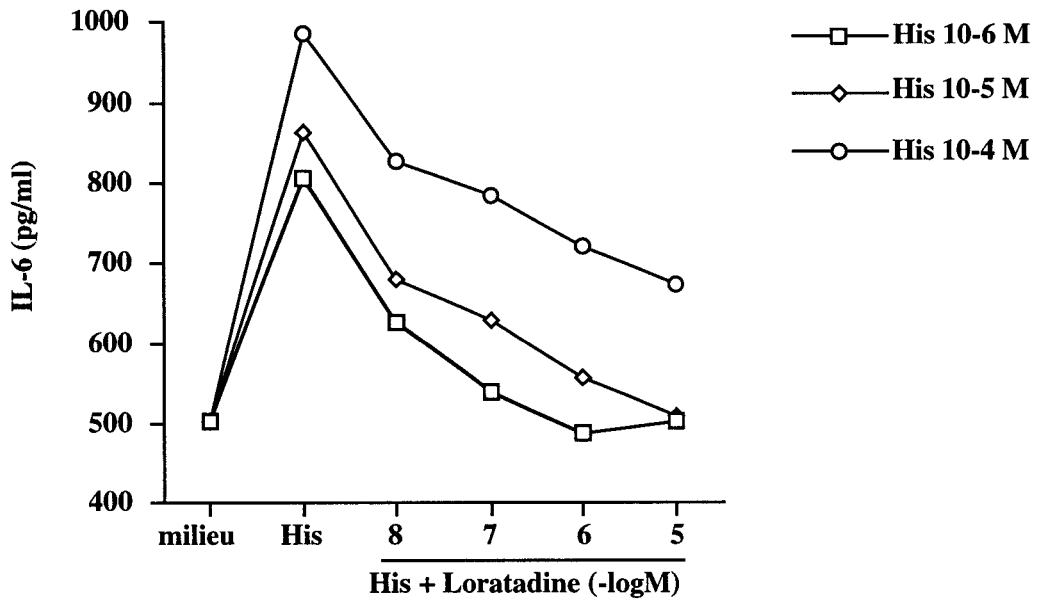
- 13nM pour la Loratadine;

- 23nM pour la DCL;

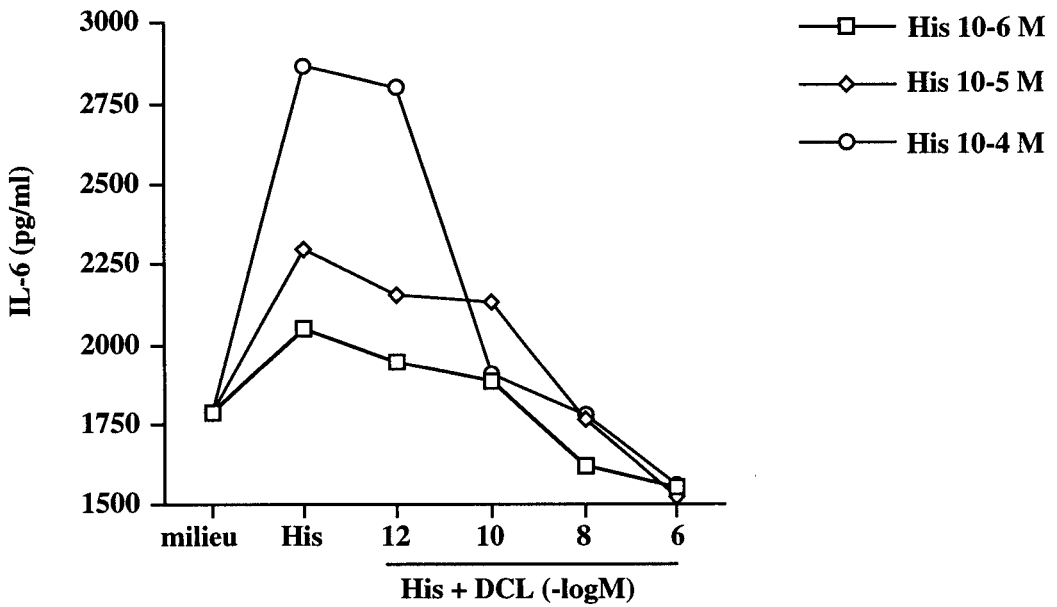
ce qui confirme l'apparente efficacité de la Loratadine versus la DCL sur le paramètre d'activation qu'est l'induction de l'expression de la P-sélectine.

**Figure 7**

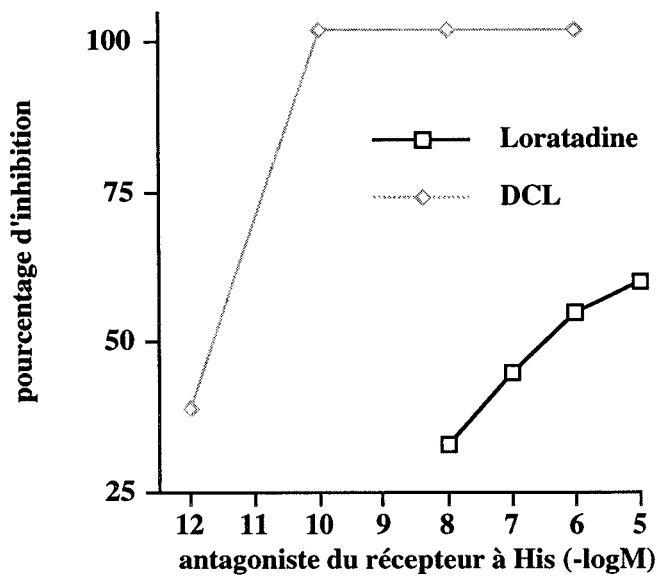
**A**



**B**



**C**



## 2) production d'IL-6 par les cellules endothéliales:

- 3 doses d'histamine ( $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$ M) ont été utilisées et nous ont permis de confirmer l'effet dépendant de la dose d'histamine sur la sécrétion d'IL-6 par les HUVEC. Cette sécrétion a été dosée dans des surnageants d'HUVEC après 24 heures de culture. Pour l'évaluation des cytokines, la période optimale de préincubation des HUVEC avec les anti-histaminiques a été fixée à 3 heures.

- quelle que soit la concentration d'histamine employée, la Loratadine ainsi que son métabolite actif inhibent significativement la sécrétion d'IL-6 induite par l'histamine d'une façon dépendante de la dose (respectivement les Figures 7A et 7B). La concentration la plus forte de Loratadine utilisée ( $10^{-5}$ M) est également la plus efficace ( $p < 0,01$  avec de l'histamine à  $10^{-6}$ M et  $10^{-5}$ M;  $p < 0,05$  avec de l'histamine à  $10^{-4}$ M). Néanmoins une diminution significative est observée pour d'autres conditions d'activation (Figure 7A):

- Loratadine/histamine  $10^{-6}$ M:  $p < 0,01$  sauf pour la Loratadine à  $10^{-8}$ M (NS);
- Loratadine/histamine  $10^{-5}$ M:  $p < 0,01$ ;
- Loratadine/histamine  $10^{-4}$ M:  $p < 0,05$  sauf pour la Loratadine à  $10^{-8}$ M (NS).

- les premières évaluations de l'effet de la DCL sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales activées par de l'histamine ont été effectuées avec des doses similaires à celles de la Loratadine. Or il est apparu que ces doses étaient trop fortes (résultats non présentés) et qu'il était nécessaire de réajuster les concentrations de DCL à employer à savoir  $10^{-6}$  à  $10^{-12}$ M.

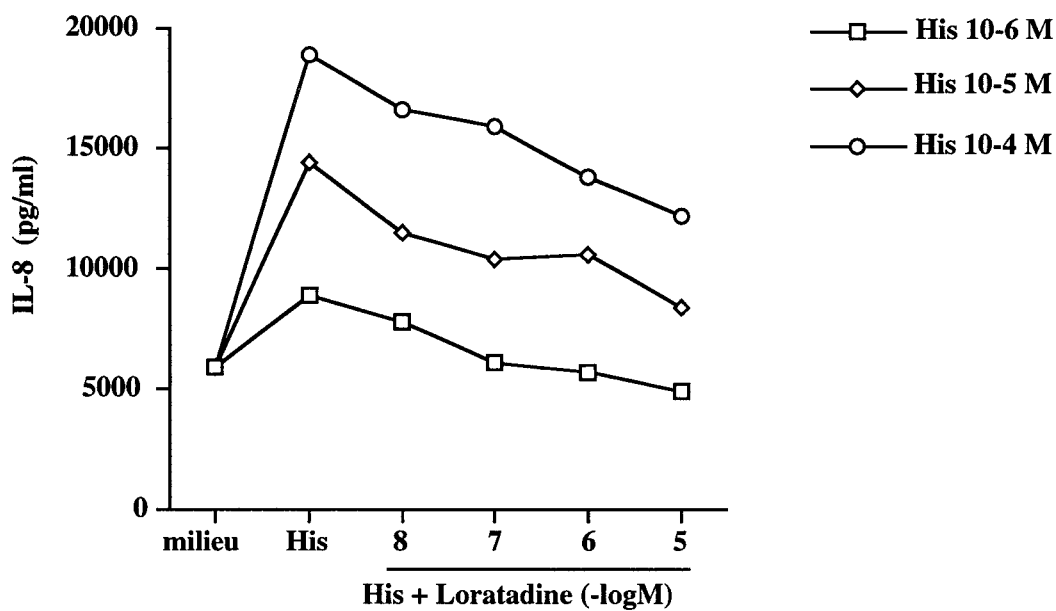
- utilisée à des concentrations inférieures, la DCL semble être plus efficace que la Loratadine à inhiber la sécrétion d'IL-6 induite par l'histamine (Figure 7C). Cette inhibition est significative pour la plupart des conditions (Figure 7B):

- DCL/histamine  $10^{-6}$ M: NS sauf pour une concentration de DCL égale à  $10^{-10}$ M ( $p < 0,05$ );
- DCL/histamine  $10^{-5}$ M:  $p < 0,05$ ;
- DCL/histamine  $10^{-4}$ M:  $p < 0,05$ .

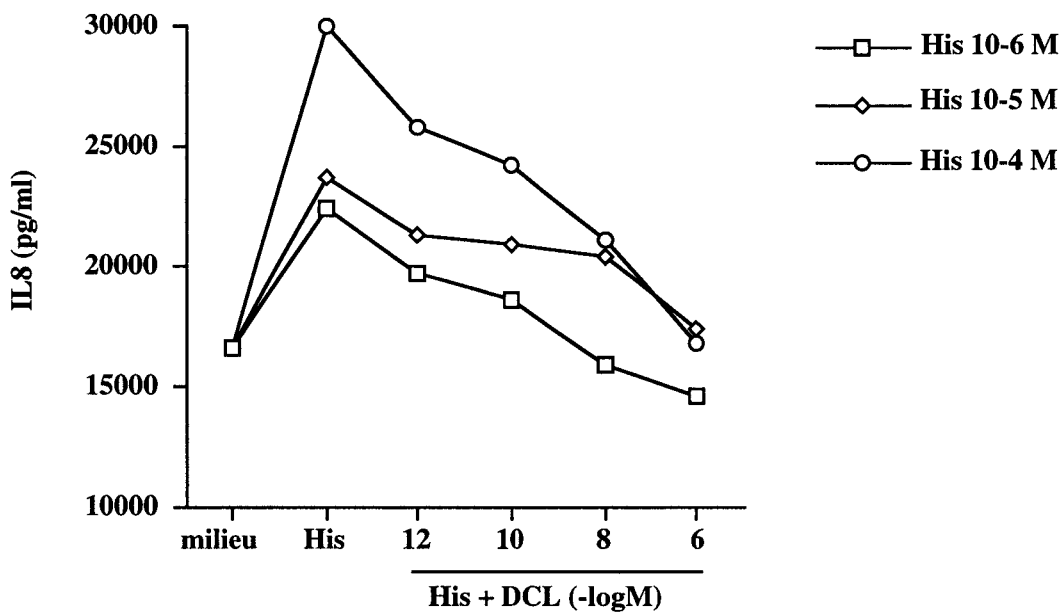


**Figure 8**

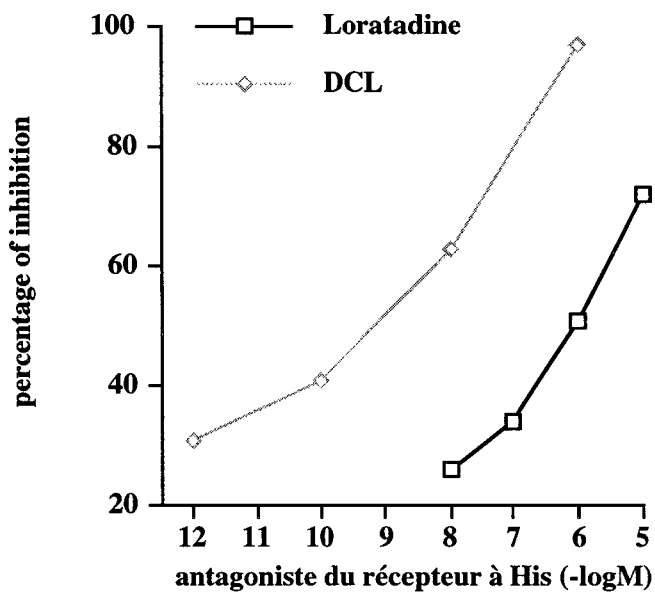
**A**



**B**



**C**



- les doses de Loratadine et de DCL entraînant 50% d'inhibition de la production d'IL-6 à la suite de l'activation des HUVEC par de l'histamine à  $10^{-4}\text{M}$  sont (Figure 7C):

- $0,3 \cdot 10^{-6}\text{M}$  pour la Loratadine;

- $2,6 \cdot 10^{-12}\text{M}$  pour la DCL.

### **3) production d'IL-8 par les cellules endothéliales:**

- nous avons étendu l'étude de l'action de la Loratadine sur la sécrétion d'IL-8 sur la cellule endothéliale. Nous avons montré que l'histamine avait un effet dépendant de la dose sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules endothéliales. Les doses d'histamine et d'anti-histaminiques utilisées sont similaires à celles décrites pour l'évaluation de la sécrétion de l'IL-6.

- la Loratadine et la DCL inhibent significativement la sécrétion d'IL-8 par les HUVEC stimulées par l'histamine, l'effet étant dépendant de la dose (Figure 8A: quelle que soit la dose d'histamine:  $p < 0,01$  avec la Loratadine à  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}\text{M}$  et  $p < 0,05$  pour la Loratadine à  $10^{-7}$  ou  $10^{-8}\text{M}$ ). Concernant la DCL, les résultats sont les suivants (Figure 8B):

- DCL/histamine  $10^{-6}\text{M}$ :  $p < 0,05$  sauf pour la concentration de DCL égale à  $10^{-12}\text{M}$  (NS);

- DCL/histamine  $10^{-5}\text{M}$ :  $p < 0,05$  excepté pour la concentration de DCL égale à  $10^{-6}\text{M}$   $10^{-12}\text{M}$  (NS);

- DCL/histamine  $10^{-4}\text{M}$ :  $p < 0,01$ .

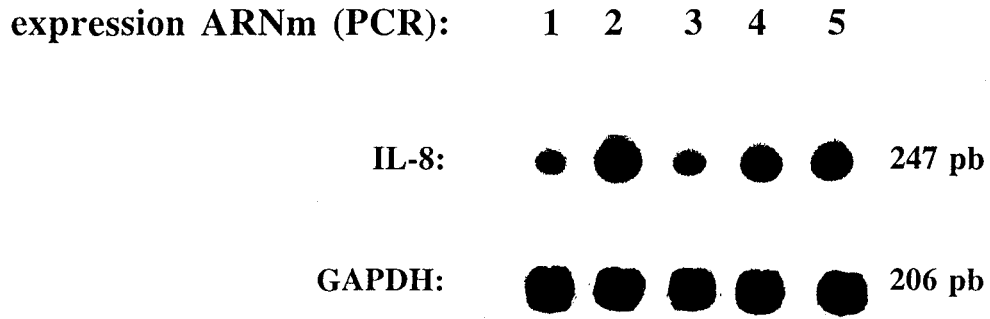
- la DCL semble également agir de façon plus efficace que la Loratadine pour inhiber la sécrétion d'IL-8 par les HUVEC activées par l'histamine. Ceci est confirmé par l'évaluation de la dose respective d'anti-histaminique entraînant 50% d'inhibition à savoir, pour une stimulation d'histamine de  $10^{-4}\text{M}$ , (Figure 8C):

- $0,2 \cdot 10^{-6}\text{M}$  pour la Loratadine

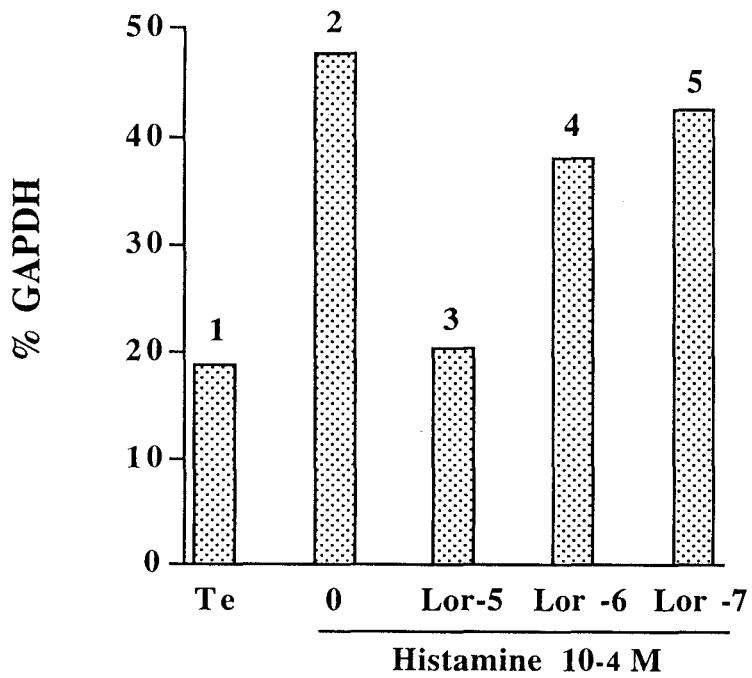
- $10^{-9}\text{M}$  pour la DCL.

Figure 9

A



B



#### **4) expression de l'ARN messenger codant pour l'IL-8:**

L'évaluation de cette expression a été appréciée par une technique de RT-PCR semi-quantitative. L'analyse de la Figure 9A nous montre que l'ARN messenger codant pour l'IL-8 est détectable en base (piste 1) et qu'une stimulation des cellules endothéliales par de l'histamine à  $10^{-4}\text{M}$  en augmente fortement la quantité (piste 2). Le prétraitement des cellules avec les différentes doses de Loratadine ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-7}\text{M}$  pour les pistes 3, 4 et 5 respectivement) confirme, au niveau transcriptionnel, l'effet inhibiteur de l'anti-histaminique. Cette inhibition transcriptionnelle apparaît aussi dépendante de la dose de Loratadine utilisée. La densité optique de chaque spot a été lue et les résultats relatant les niveaux d'expression de l'ARNm codant pour l'IL-8 ont été exprimés en pourcentage de la densité optique obtenue pour la GAPDH (Figure 9B). Des résultats similaires ont été obtenus avec la DCL (résultats non présentés).

#### **Conclusions:**

- nos résultats concordent avec les travaux antérieurs démontrant que la stimulation des cellules endothéliales par l'histamine entraîne:

- une expression transitoire de la P-sélectine (Lorant, 1991);

- la synthèse d'ARN messagers codant pour l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que la sécrétion de ces deux cytokines (Delneste, 1994; Jeannin, 1994).

- l'expression de la P-sélectine induite par l'histamine à la surface des cellules endothéliales ainsi que la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par ces mêmes cellules sont inhibées efficacement par la Loratadine, un anti-histaminique de type H1, et par l'un de ses métabolites actifs, la DCL.

- la Loratadine inhibe de façon plus efficace l'expression de la P-sélectine alors que l'action inhibitrice de la DCL s'exerce préférentiellement sur la sécrétion des cytokines. L'activité de ces deux composés est dépendante de la dose employée.

- la Loratadine et la DCL inhibent également le taux d'ARN messager codant respectivement pour l'IL-6 et l'IL-8.

Ce travail (Article I) a été soumis pour publication dans la revue *Clinical Experimental Allergy* (Inhibitory activity of Loratadine and Descarboxyethoxyloratadine on histamine-induced activation of human endothelial cells. Molet et al).

## **II. Interactions entre les cellules endothéliales et les éosinophiles.**

Les travaux menés au sein de notre laboratoire s'intéressent aux interactions entre les cellules endothéliales et les leucocyte impliqués dans la réaction inflammatoire immunoallergique. Il a notamment été mis en évidence des interactions privilégiées entre les cellules endothéliales et les macrophages alvéolaires (Gosset, 1991; Lassalle, 1993; Vanhée, 1996 (sous-presse)) ou les lymphocytes T issus de patients allergiques (Delneste, 1995). Plus récemment, nous nous sommes intéressés aux relations éventuelles entre éosinophiles et cellules endothéliales.

### **Données actuelles:**

De nombreuses maladies comme les allergies, les infections parasitaires à helminthes ou encore le syndrome hyperéosinophilique (HES) sont caractérisées par une éosinophilie à la fois sanguine et tissulaire. La particularité de l'infiltrat observé dans certaines de ces pathologies, comme l'asthme ou la pneumonie chronique à éosinophiles, consiste en la présence majoritaire d'éosinophiles mais surtout en l'absence de neutrophiles. Il est clairement établi que les éosinophiles sont fortement impliqués dans la réaction inflammatoire par la libération de différents médiateurs tels les protéines cationiques contenues dans les granules (ECP, EDN, EPO, MBP) qui démontrent toutes des propriétés cytotoxiques importantes (Gleich, 1986; Wardlaw, 1988; Corrigan, 1992). De plus les éosinophiles possèdent la capacité à synthétiser et à relarguer diverses cytokines contribuant à la réaction inflammatoire comme le

GM-CSF, l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-3, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8, le TNF $\alpha$ , le MIP-1 $\alpha$ , les TGF- $\alpha$  et - $\beta$  (Moqbel, 1994), l'IL-4 (Nonaka, 1995) et le RANTES (Ying, 1996).

Les mécanismes responsables de cet infiltrat sélectif d'éosinophiles sont encore mal connus. La transmigration endothéliale des éosinophiles, comme les autres leucocytes, met en jeu de nombreux mécanismes, ce qui rend très difficile la détermination de l'étape ou des étapes responsable(s) de cette sélectivité d'infiltration. Cependant, la participation active de l'endothélium dans le recrutement des éosinophiles a été évoquée.

L'interaction des éosinophiles avec les cellules endothéliales est initiée *in vitro* par le PAF, le GM-CSF, le TNF, l'IL-1 ou l'IL-4 (Lopez, 1986; Kimani, 1988; Lamas, 1988; Ebisawa, 1992; Moser, 1992). Les mécanismes qui concourent à l'infiltrat sélectif des éosinophiles s'appuient sur trois notions:

1) un mécanisme de chémoattraction sélectif. La transmigration endothéliale fait intervenir d'autres molécules possédant des propriétés chimotactiques et qui attirent les leucocytes vers le site inflammatoire. L'infiltration des éosinophiles à l'intérieur des tissus est favorisée par l'exposition de ces leucocytes aux chémoattractants suivants: PAF (Wardlaw, 1986; Casale, 1993), C5a, LTB<sub>4</sub> (Hakansson, 1987), MIP-1 $\alpha$ , RANTES (Rot, 1992), IL-8 (Warringa, 1993) et éotaxine (Griffiths-Johnson, 1993);

2) un mécanisme d'adhésion sélectif des éosinophiles aux cellules endothéliales (Moser, 1992). En effet, en présence d'IL-4, la cellule endothéliale peut exprimer à sa surface le VCAM-1 dont le ligand (l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$ ) existe sur les éosinophiles mais pas les neutrophiles (Schleimer, 1992). Mais à côté de ces mécanismes sélectifs, d'autres voies non sélectives participent également au recrutement. Les éosinophiles comme les neutrophiles expriment à leur surface les intégrines  $\beta_2$  LFA-1 (CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18) ainsi que le récepteur pour la E-sélectine; toutefois seule l'adhésion des éosinophiles à des cellules endothéliales non stimulées peut être augmentée par l'IL-3 et l'IL-5 (Walsh, 1990), ce qui distingue encore une

fois les éosinophiles des neutrophiles. Les éosinophiles peuvent se lier à l'endothélium par l'intermédiaire d'une interaction LFA-1/ICAM-1, cette dernière molécule d'adhérence étant exprimée de façon constitutive (Marlin, 1987). Une autre voie d'adhésion indépendante du CD18 peut être empruntée par les éosinophiles et les neutrophiles: elle nécessite l'expression de la E-sélectine, molécule d'adhérence exprimée à la surface des cellules endothéliales uniquement sous l'effet d'une stimulation (Bevilacqua, 1987; Weller, 1991, Dobrina, 1991);

3) une survie tissulaire des éosinophiles prolongée dans le temps et dépendante de la présence de cytokines comme l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF et dont certaines peuvent être exprimées par la cellule endothéliale (Hart, 1992). De plus l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF, trois cytokines sécrétées par une sous-population de lymphocytes T (CD4<sup>+</sup>), sont capables d'induire la maturation, l'activation et une augmentation de la survie des éosinophiles suggérant ainsi la participation des lymphocytes T dans l'infiltration de ces leucocytes (Robinson, 1993).

#### **But de l'étude:**

Dans les conditions normales, les éosinophiles représentent environ 2 à 3% de la population leucocytaire sanguine. Dans certaines pathologies, l'augmentation de cette éosinophilie sanguine précède l'apparition des symptômes cliniques et l'infiltration des éosinophiles dans les tissus. Les mécanismes qui gouvernent l'infiltration tissulaire des éosinophiles demeurent encore obscurs. Nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait être le résultat d'une boucle d'auto-amplification, réalisée par les éosinophiles eux-mêmes, et ayant pour cible l'endothélium: les éosinophiles favoriseraient leur propre recrutement. Dans ce but nous avons évalué les effets des surnageants d'éosinophiles d'une part sur l'expression de molécules d'adhérence endothéliales et d'autre part sur la sécrétion de différentes cytokines par ces cellules endothéliales.

**PREMIERE PARTIE: expression de molécules d'adhérence endothéliales.**

**🍏 Intervention des médiateurs spontanément relargués par les éosinophiles sur l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales:**

**Matériel et méthodes:** se reporter à l'annexe (page 122).

Les éosinophiles ont été purifiés à partir du sang périphérique de patients présentant une éosinophilie sanguine supérieure à 5% en association avec un asthme (n=4), une pneumonie chronique à éosinophiles (n=6), une angéite de Churg et Strauss (n=1) ou un syndrome hyperéosinophile (HES) (n=10). La purification a été effectuée par un système immunomagnétique (système MACS). Les éosinophiles purifiés sont maintenus en culture à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 1 heure et 18 heures.

L'expression des molécules d'adhérence (ICAM-1, E-sélectine, VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales a été évaluée par ELISA.

La quantification des médiateurs libérés par les éosinophiles a été réalisée par dosage biologique (IL-6), ELISA (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) ou RIA (ECP).

**Résultats:**

**1) modulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales activées par les surnageants d'éosinophiles:**

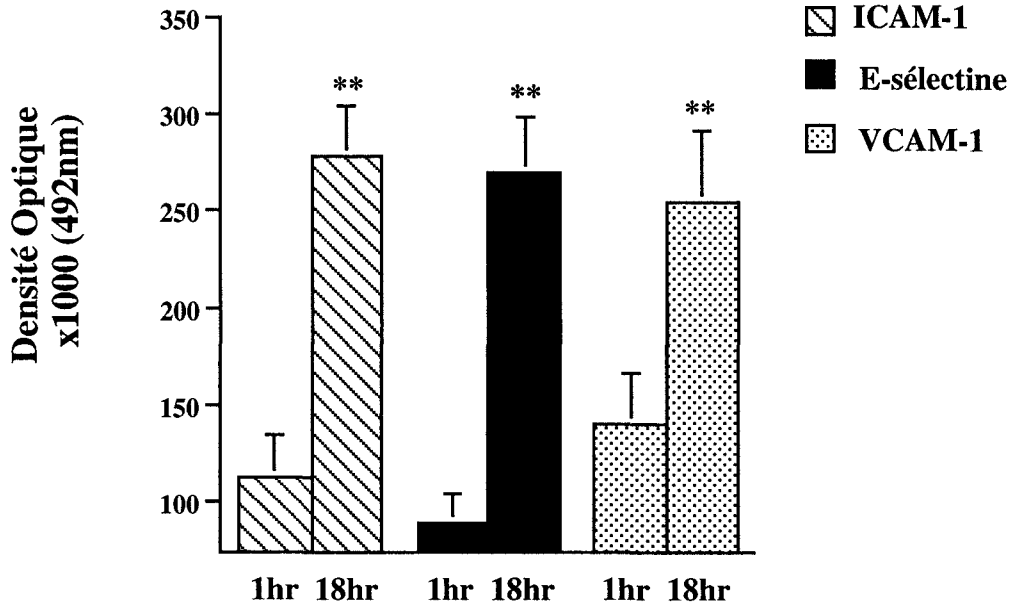
- les surnageants d'éosinophiles (dilués au 1/2) ont été mis en contact avec les cellules endothéliales pendant 6 heures (pour l'évaluation de l'expression de la E-sélectine et du VCAM-1) ou durant 24 heures (pour l'évaluation de l'expression de l'ICAM-1). Ces temps correspondent aux conditions optimales d'expression de ces molécules et sont en accord avec les nombreuses données de la littérature.

- Dans tous les cas (n=21), l'expression des trois molécules d'adhérence étudiées est augmentée lorsque les surnageants d'éosinophiles sont ajoutés aux cultures de cellules endothéliales par rapport à l'expression mesurée sur les cellules endothéliales non stimulées;

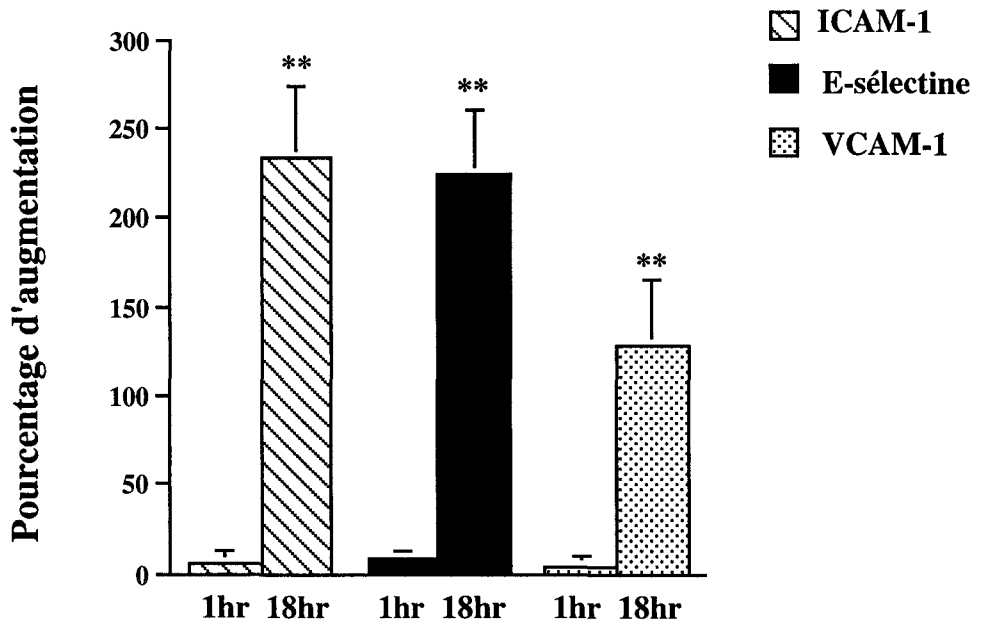


FIGURE 10

**A**



**B**



toutefois selon la durée pendant laquelle les éosinophiles ont été maintenus en culture (1 heure ou 18 heures) cette augmentation est plus ou moins importante (Figure 10A)

- Les surnageants d'éosinophiles collectés après 1 heure de culture induisent une augmentation faible et non-significative de l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1. A l'inverse, les surnageants collectés après 18 heures augmentent fortement l'expression de ces trois molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Les valeurs observées et exprimées en pourcentage d'augmentation sont très supérieures à celles obtenues avec les surnageants d'une heure, les différences étant très significatives (Figure 10B):

surnageants d'éosinophiles collectés après		
	1h	18h
ICAM-1	5,5±7,8%	233,5±40,1% *
E-sélectine	7,9±6,2%	223,9±35,8% *
VCAM-1	4,8±6,2%	128,3±37,2% *

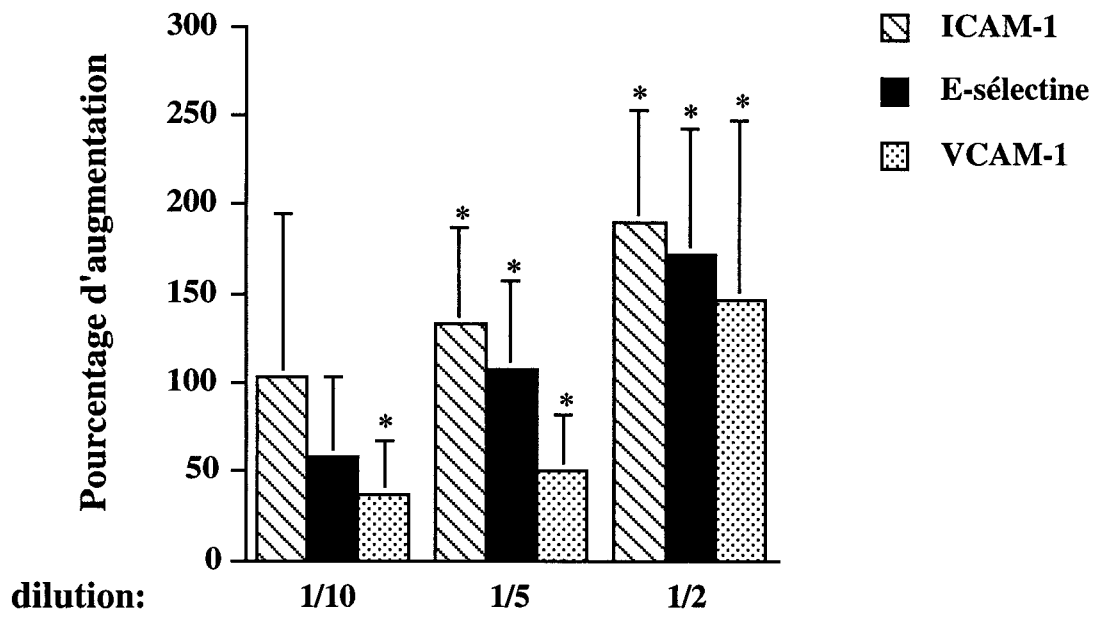
(n=21, Moyenne±SEM. \*: p<0,0001 en comparaison avec les cellules endothéliales mises en présence des surnageants d'éosinophiles collectés après 1 heure ou mise en présence du milieu de culture seul).

- nous avons pu également montrer que, dans les conditions optimales d'activation (c'est-à-dire avec les surnageants collectés à 18 heures), l'augmentation d'expression des trois molécules d'adhérence était dépendante de la dilution des surnageants d'éosinophiles (Figure 11).

## ***2) modulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales activées par les surnageants de neutrophiles:***

- les neutrophiles ont été récupérés et maintenus 1 heure et 18 heures à l'étuve dans les mêmes conditions que les éosinophiles (n=5). Le but était de voir si l'effet engendré par les surnageants d'éosinophiles sur l'expression des molécules d'adhérence endothéliales

**FIGURE 11**



était spécifique de ces cellules ou si, au contraire, les polynucléaires neutrophiles libéraient eux aussi des médiateurs capables d'activer les cellules endothéliales.

- les surnageants de neutrophiles collectés après 1 heure n'induisent aucune augmentation d'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine ou du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales, lorsqu'ils sont testés à la dilution minimale (1/2) (résultats non présentés).

- les surnageants, récupérés au bout des 18 heures de maintien en culture, n'affectent que très légèrement et de manière non significative l'expression de la E-sélectine et du VCAM-1 ( $21,2 \pm 25,0\%$  et  $8,0 \pm 7,0\%$  d'augmentation respectivement) (résultats non présentés).

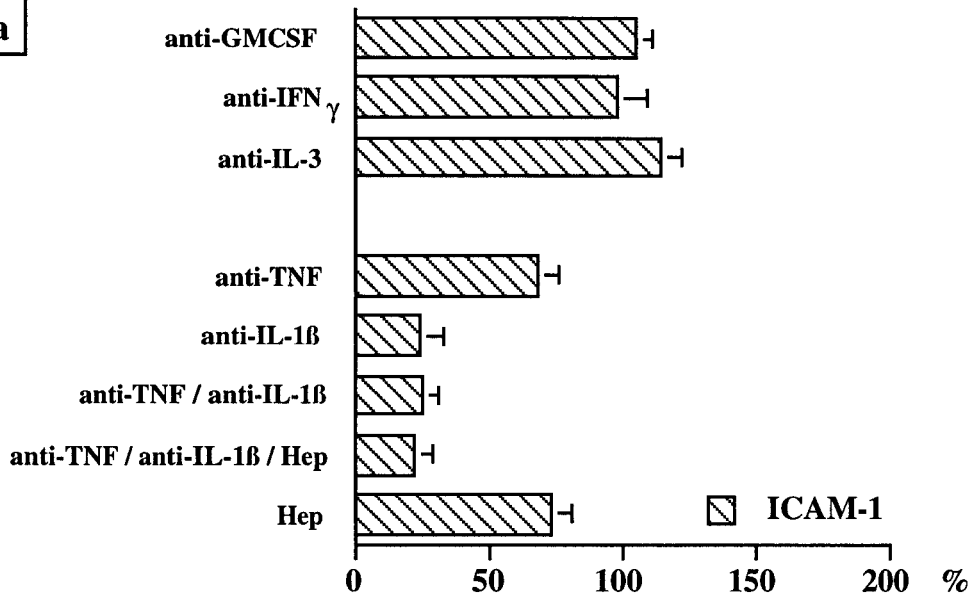
### ***3) caractérisation des médiateurs éosinophiliques impliqués dans l'activation des cellules endothéliales:***

- il est maintenant établi que les éosinophiles synthétisent et libèrent des composés lipidiques de petit poids moléculaire (produits de dégradation de l'acide arachidonique), des cytokines et des protéines cationiques. La poursuite de notre travail a donc consisté à déterminer lesquels de ces médiateurs pouvaient être responsables de l'augmentation de l'expression des trois molécules d'adhérence étudiées.

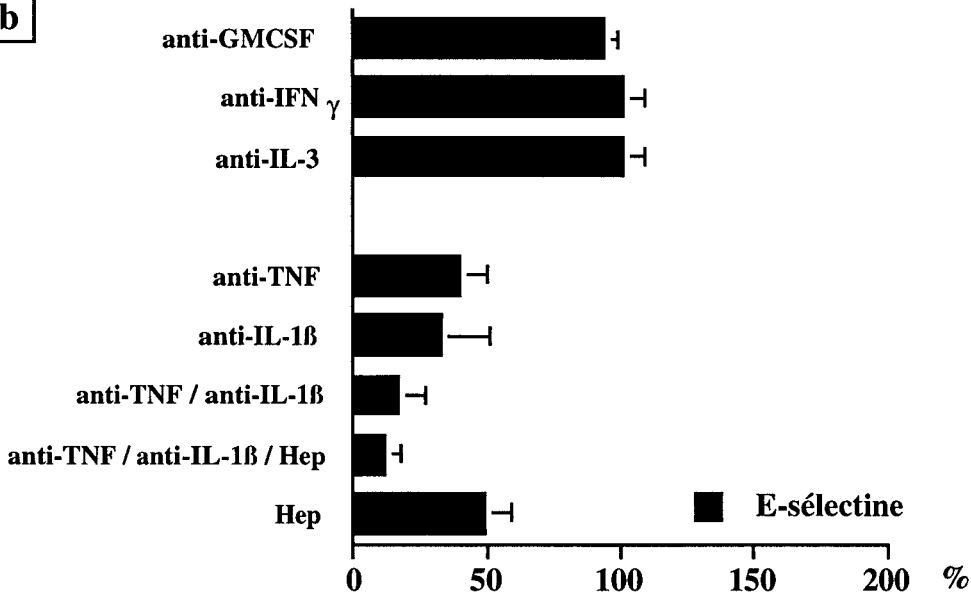
- dans un premier temps, nous avons fractionné les surnageants d'éosinophiles par filtration sur des membranes à limite d'exclusion prédéterminée. Nous avons choisi une colonne dont la limite d'exclusion correspondait à 10 kDa. Des surnageants d'éosinophiles collectés après 18 heures ont été déposés sur ces colonnes, centrifugés et fractionnés en deux parties:

- l'échantillon concentré (se situant dans le compartiment supérieur de la colonne) est repris dans un volume identique à celui initialement déposé et renferme les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 10 kDa;

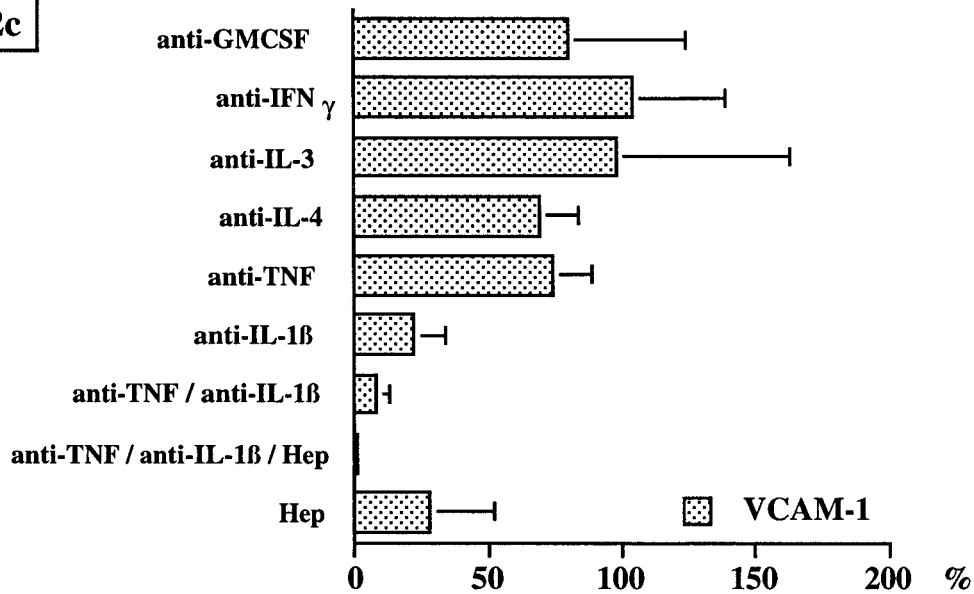
12a



12b



12c



- le filtrat (se trouvant dans la partie inférieure de la colonne) contient les molécules possédant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa.

Ces deux fractions (diluées au demi) sont incubées avec les cellules endothéliales pendant 6 et 24 heures dans le but d'évaluer l'expression de la E-sélectine, du VCAM-1 et de l'ICAM-1. Dans ces conditions, seule la fraction renfermant les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 kDa est capable de reproduire l'effet engendré par les surnageants d'éosinophiles non-fractionnés (résultats non présentés). Ainsi on peut écarter les facteurs solubles dont le poids moléculaire est inférieur à 10 kDa, cependant l'intervention des molécules de petit poids moléculaire n'est pas à exclure totalement compte tenu du fait qu'elles peuvent toujours se fixer à des protéines de haut poids moléculaire.

- dans un deuxième temps, nous avons passé les surnageants d'éosinophiles sur des colonnes d'affinité réalisées avec de la protéine G sépharose complexée à différents anticorps capables de neutraliser spécifiquement l'action de cytokines comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-3, l'IL-4, l'IFN $\gamma$ , le GM-CSF, ou le TNF $\alpha$ . Afin de neutraliser l'action des protéines éosinophiliques, nous avons utilisé le fait qu'elles présentent une forte charge positive, propriété qui les rend adhésives à l'héparine. Ainsi les surnageants d'éosinophiles ont pu être déplétés en protéines cationiques après passage sur gel d'héparine.

- la déplétion des surnageants d'éosinophiles en GM-CSF, IFN $\gamma$  ou IL-3 n'entraîne aucune diminution significative de l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales, en comparaison avec les surnageants non-déplétés (Figure 12a). Le traitement des surnageants d'éosinophiles par un anticorps anti-TNF $\alpha$  n'a qu'un effet inhibiteur modeste sur l'expression de l'ICAM-1 ( $35,0 \pm 7,8\%$  d'inhibition), le passage sur gel d'héparine ayant un effet similaire ( $24,2 \pm 5,9\%$  d'inhibition). L'inhibition maximale ( $72,3 \pm 9,6\%$ ) de l'expression de l'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales est observée dans le cas où les surnageants ont été déplétés en IL-1 $\beta$ . Des déplétions supplémentaires (en TNF $\alpha$  ou TNF $\alpha$ +protéines cationiques) n'ont pas permis d'améliorer ce niveau d'inhibition ( $72,5 \pm 5,5\%$  et  $76 \pm 8\%$  d'inhibition respectivement).

- concernant l'inhibition d'expression de la E-sélectine, les résultats sont relativement proches de ceux obtenus pour l'ICAM-1 (Figure 12b):

- la déplétion des surnageants d'éosinophiles en GM-CSF, IL-3 ou IFN $\gamma$  n'influence pas l'expression de la molécule d'adhérence;
- les anticorps anti-IL1 $\beta$  sont responsables d'une forte inhibition de l'expression de la E-sélectine à la surface des cellules endothéliales (90,8 $\pm$ 11,1% d'inhibition).

Par contre, l'inhibition de l'expression de la E-sélectine apparaît ici efficace lorsque les anticorps anti-TNF $\alpha$  ou le gel d'héparine sont utilisés comme absorbants (59,8 $\pm$ 9,3% et 51,2 $\pm$ 9,9% d'inhibition respectivement). De plus, le niveau d'inhibition engendré par les anticorps anti-IL-1 $\beta$  peut encore être amélioré par des déplétions supplémentaires en TNF $\alpha$  et protéines cationiques, générant ainsi une inhibition maximale de 95,4 $\pm$ 10,1%.

- comme pour les deux molécules d'adhérence précédentes, aucune inhibition de l'expression du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales n'est observée après passage des surnageants d'éosinophiles sur les anticorps anti-GM-CSF, anti-IL-3 et anti-IL-5 (Figure 12c). La déplétion des surnageants en TNF $\alpha$  ou en IL-4 inhibe de façon modérée l'expression du VCAM-1 (26,0 $\pm$ 14,4% et 31,3 $\pm$ 14,9% d'inhibition respectivement). Nous avons pu obtenir des niveaux d'inhibition à peu près équivalents lorsque les surnageants d'éosinophiles ont été soit traités par des anticorps anti-IL-1 $\beta$  (77,7 $\pm$ 11,3%) soit passés sur gel d'héparine (71,7 $\pm$ 23,5%). La déplétion concomitante en TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  permet d'augmenter cet effet inhibiteur (92,0 $\pm$ 4,6%), l'inhibition maximale de l'expression du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales étant atteinte avec des surnageants d'éosinophiles déplétés en TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et protéines cationiques.

#### ***4) quantification de certains médiateurs collectés dans les surnageants d'éosinophiles après 1 heure et 18 heures de culture:***

- en vertu des résultats obtenus précédemment, nous avons recherché et dosé les taux de TNF $\alpha$  et d'IL-1 $\beta$  dans les surnageants d'éosinophiles. Concernant les protéines

	1hr	18hr
<b>ECP (ng/ml)</b>	28.30 ± 11.60	119.4 ± 53.4 <sup>*</sup>
<b>IL-6 (IU/ml)</b>	3.10 ± 0.90	90.4 ± 23.4 <sup>**</sup>
<b>IL-8 (ng/ml)</b>	0.05 ± 0.01	2.7 ± 0.4 <sup>**</sup>
<b>TNF<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	16.40 ± 2.60	155.0 ± 47.7 <sup>*</sup>
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	2.50 ± 1.40	267.8 ± 68.0 <sup>**</sup>

**Tableau 4:** Concentrations d'ECP (n=11), IL-6, IL-8 (n=21), TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (n=16) détectées dans les surnageants d'éosinophiles collectés après 1 heure et 18 heures de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \*: p < 0.01 et \*\*: p < 0.001 en comparaison avec les niveaux obtenus dans les surnageants d'une heure.



cationiques, seule l'ECP a été dosée afin d'estimer la dégranulation des éosinophiles, évaluation renforcée par le dosage de l'IL-6, cytokine démontrée comme étant synthétisée et stockée dans les granules cristalloïdes des éosinophiles. Une autre cytokine, l'IL-8, a été quantifiée dans les surnageants d'éosinophiles; ce choix ayant été guidé pour le rôle de cette molécule dans la réaction inflammatoire.

- de manière générale, les taux de médiateurs relargués spontanément par les éosinophiles augmentent de manière significative dans les surnageants collectés après 18 heures par rapport aux niveaux obtenus dans les surnageants d'une heure (Tableau 4).

### **Conclusions:**

- nos résultats montrent que les médiateurs éosinophiliques impliqués dans l'activation des cellules endothéliales étaient principalement l'IL-1 $\beta$  et, à un degré moindre, le TNF $\alpha$ . Ces travaux suggèrent également que les protéines cationiques puissent participer à cette amplification de l'expression des molécules d'adhérence. De plus, il semblerait que l'action des protéines cationiques s'exerce préférentiellement sur l'expression de la E-sélectine et du VCAM-1, ce qui correspondrait, pour les cellules endothéliales, à un nouveau mécanisme.

- ces médiateurs éosinophiliques sont détectés en faibles quantités dans les surnageants collectés après 1 heure de maintien en culture, ce qui tend à expliquer la très faible induction de l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales mises en contact avec ces surnageants. L'importante augmentation d'expression de ces trois molécules d'adhérence, par les surnageants d'éosinophiles collectés après 18 heures, coïncide avec la présence en quantités également plus élevées de médiateurs éosinophiliques au sein de ces surnageants.

- les observations rapportées dans cette étude suggèrent que ce processus d'amplification de l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales semble être spécifique des éosinophiles dans la mesure où, dans des

conditions expérimentales identiques, les neutrophiles ne sont pas capables de moduler l'expression de ces trois molécules d'adhérence.

Ce travail (Article II) a été soumis pour publication dans *Journal of Leukocyte Biology* (Modulation of cell adhesion molecules on human endothelial cells by eosinophil supernatants. Molet et al).

### 🍎 Effets de l'activation des éosinophiles sur l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales:

Initialement, nous avons mis en évidence l'existence d'interactions entre les cellules endothéliales et les éosinophiles médiées par des facteurs libérés spontanément par l'éosinophile (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et protéines cationiques). Le second point de notre étude a été d'analyser la participation de médiateurs libérés seulement après stimulation pertinente de l'éosinophile.

Les éosinophiles expriment à leur surface deux types de récepteurs spécifiques pour la partie Fc des immunoglobulines de type E (IgE): le Fc $\epsilon$ RI ou récepteur de haute affinité (Soussi-Gouni, 1994) et le Fc $\epsilon$ RII/CD23 ou récepteur de faible affinité (Capron, 1986); ainsi qu'un récepteur spécifique pour la partie Fc des IgG: le Fc $\gamma$ RII/CD32 (Hartnell, 1990). L'engagement de ces récepteurs avec des complexes immuns a pour conséquence l'activation des éosinophiles et la libération de différents médiateurs. Le déclenchement de cette activité sécrétoire des éosinophiles a surtout été démontré dans les phénomènes de cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps (ADCC ou antibody dependent cell mediated cytotoxicity) contre les parasites. Néanmoins la libération de médiateurs éosinophiliques consécutive à une stimulation médiée par des immunoglobulines intervient également dans la physiopathologie de la réaction inflammatoire immunoallergique (Tomassini, 1991). Dans ce contexte, les mécanismes impliquant les IgE apparaissent jouer un rôle majeur dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire. C'est pourquoi nous avons tenté de déterminer si une dégranulation éosinophilique médiée par les IgG ou les IgE pouvait augmenter l'expression de molécules

d'adhérence (ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1) à la surface des cellules endothéliales et, de ce fait, favoriser l'adhérence et l'infiltration des éosinophiles.

Ainsi deux types de complexes activateurs ont été utilisés pour stimuler nos préparations d'éosinophiles: le premier, un système d'activation dépendant de l'IgG, correspondait à des globules rouges humains associés à un anticorps IgG anti-rhésus D (CRTS, Lille) (Chou, 1985). Le second, un système d'activation dépendant de l'IgE, était réalisé avec des sérums humains riches en IgE associés à un anticorps anti-IgE (Cappel). Après une incubation d'une heure à 37°C nécessaire à la formation des complexes, ces derniers étaient ajoutés individuellement aux éosinophiles purifiés à la concentration finale de 0,25% pour les complexes immuns à IgG ou au 1/100<sup>ème</sup> pour complexes immuns à IgE (les temps de culture restant identiques à ceux décrits dans l'étude précédente à savoir 1 heure et 18 heures). Pour certains patients, les éosinophiles ont été incubés, pendant les mêmes périodes, avec un anticorps monoclonal dirigé contre le FcεRII (aimablement fourni par le Dr G. Delespesse, Montréal) à la concentration finale de 10 µg/ml. A la fin de chaque période d'incubation, les surnageants de culture d'éosinophiles ont été récupérés après centrifugation et conservés à -80°C avant d'être testés sur les cellules endothéliales.

### **Résultats:**

#### ***1) modulation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales activées par les surnageants d'éosinophiles:***

- l'induction et l'évaluation de l'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales ont été effectuées comme cela a précédemment été décrit.

- nous avons testé, au préalable, que les complexes immuns IgE et IgG n'avaient aucune activité stimulante sur la cellule endothéliale.

• concernant les cultures d'une heure, seuls les surnageants d'éosinophiles ayant été activés par les complexes immuns IgE sont capables d'augmenter significativement l'expression de l'ICAM-1 et de la E-sélectine ( $p < 0,01$ ). Une augmentation de l'expression du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales est également observée. Cependant cette augmentation n'est pas apparue statistiquement significative compte tenu d'une grande variations dans les résultats.

### Stimulation des Eos

	aucune	IgG	IgE
ICAM-1	5,5±7,8%	3,0±9,2%	44,1±17,4% *
E-sélectine	7,9±6,2%	0,8±8,2%	49,0±15,5% *
VCAM-1	4,8±6,2%	6,6±8,8%	35,0±19,3%

(résultats présentés en pourcentage d'augmentation par rapport aux cellules endothéliales mises en présence de milieu de culture seul. Moyenne ± SEM de 21 expériences \*:  $p < 0,01$  en comparaison avec les cellules endothéliales mises en présence des surnageants d'éosinophiles non-stimulés et collectés après une heure de culture).

• pour les cultures de 18 heures, quelles que soient les conditions de stimulation qu'ont subies les éosinophiles, les surnageants induisent tous une forte augmentation de l'expression des trois molécules d'adhérence étudiées, et ceci par rapport aux résultats recueillis avec les surnageants collectés après une heure de culture:

### Stimulation des Eos

	aucune	IgG	IgE
ICAM-1	233,5±40,1%	209,0±34,7%	235,7±34,2%
E-sélectine	223,9±35,8%	181,5±35,4%	205,3±31,1%
VCAM-1	128,3±37,2%	81,7±22,4%	101,7±25,3%

(résultats présentés en pourcentage d'augmentation par rapport aux cellules endothéliales mises en présence de milieu de culture seul. Moyenne ± SEM de 21 expériences et pour toutes les valeurs présentées  $p < 0,001$ ).

	1h			18h		
	aucune	IgG	IgE	aucune	IgG	IgE
<b>ECP (ng/ml)</b>	28.3 ± 11.6	28.7 ± 7.4	88.5 ± 31.9*	119.4 ± 53.4	67.3 ± 14	330.0 ± 147.6*
<b>IL-6 (UI/ml)</b>	3.1 ± 0.9	4.0 ± 1.5	11.3 ± 6.7	90.4 ± 23.4	121.2 ± 28.9	198.1 ± 82.5
<b>IL-8 (ng/ml)</b>	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.4 ± 0.1*	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.9 ± 0.4
<b>TNF-α (pg/ml)</b>	19.3 ± 2.4	20.3 ± 2.2	21.4 ± 2.8	168.7 ± 57.6	210.5 ± 68.5	174.6 ± 57.8
<b>IL-1β (pg/ml)</b>	< 2	< 2	4.8 ± 2.9	280.0 ± 78.6	223.9 ± 56.7	196.3 ± 65.3

**Tableau 5:** Quantification d'ECP (n=11), IL-6 et IL-8 (n=21), TNF-α et IL-1β (n=16) dans des surnageants d'éosinophiles non-stimulés ou stimulés par des complexes immuns de type IgG ou IgE après 1 heure et 18 heures de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. \*: p < 0.05 en comparaison avec les niveaux obtenus pour les cellules non-stimulées.

- nous avons également montré que la surexpression de ces 3 molécules d'adhérence endothéliales dépendait de la dilution de ces surnageants (résultats non présentés).

*2) effet de la stimulation des éosinophiles sur la libération de certains médiateurs collectés dans les surnageants après 1 heure et 18 heures de culture:*

- afin de prouver que nos complexes immuns sont bien fonctionnels pour l'activation des éosinophiles, nous avons quantifié, dans les surnageants de culture, différents médiateurs (Tableau 5).

- les taux d'ECP, de TNF $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et d'IL-8 libérés de façon spontanée par les éosinophiles sont fortement augmentés dans les surnageants collectés après 18 heures de culture par rapport à ceux récupérés après une heure.

- l'activation des éosinophiles par les complexes immuns de type IgE, pendant une heure, induit une augmentation faible mais significative de la production d'ECP et d'IL-8 ( $p < 0,05$  par rapport aux éosinophiles non stimulés). Pour les cultures de 18 heures, l'activation par les complexes immuns de type IgE augmente significativement la sécrétion d'ECP (que l'on compare avec les éosinophiles après 1 heure de culture ou non-stimulés après 18 heures de culture) alors que la production d'IL-8 évaluée après 18 heures de culture, même si elle reste très supérieure à celle observée après 1 heure de culture, n'est pas modulée par l'action des complexes immuns. La sécrétion d'IL-6 est également augmentée par les complexes immuns de type IgE, que ce soit après 1 heure ou 18 heures de culture, néanmoins la différence avec les quantités produites par les éosinophiles non-stimulés n'est pas significative.

- l'activation des éosinophiles par les complexes immuns de type IgG, pendant 1 ou 18 heures de culture, ne modifient pas la sécrétion d'ECP, d'IL-6 ou d'IL-8 par rapport aux éosinophiles non-stimulés.

- l'activation des éosinophiles par l'anticorps dirigé contre le FcεRII a donné des résultats similaires à ceux obtenus avec les complexes immuns de type IgE (résultats non-présentés).

- les concentrations en TNFα et IL-1β ont également été déterminées dans les surnageants d'éosinophiles. La production de TNFα n'est pas modulée de façon significative quel que soit le mode d'activation des éosinophiles. On observe des résultats similaires pour la sécrétion d'IL-1β.

### **Conclusion:**

- pour les éosinophiles mis en culture pendant une heure, nos résultats montrent que seule une activation dépendante de l'IgE entraîne une augmentation de la sécrétion des différents médiateurs étudiés (ECP, IL-1β, IL-6, IL-8) excepté pour le TNFα.

- de plus, parmi les surnageants d'éosinophiles collectés après une heure de culture, seuls ceux issus de l'activation des éosinophiles par l'IgE induisent l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1. Parmi les cytokines quantifiées dans les surnageants, l'IL-1β semble être le meilleur candidat pour exercer cet effet, d'autant plus que son profil de sécrétion par les éosinophiles après une heure de culture conforte cette hypothèse.

- au terme des 18 heures de culture, les éosinophiles libèrent spontanément des quantités importantes d'ECP, IL-1β, IL-6, IL-8 et TNFα, ce qui pourrait expliquer l'absence de toute modulation par les complexes immuns de type IgG ou IgE.

- cette observation coïncide avec le fait que tous les surnageants d'éosinophiles (stimulés ou non) collectés après 18 heures de culture activent les cellules endothéliales de manière similaire et induisent l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à des niveaux très proches.

	1hr	18hr
<b>IL-6 (UI/ml)</b>	3.1 ± 0.9	90.4 ± 23.4 <sup>**</sup>
<b>IL-8 (ng/ml)</b>	0.05 ± 0.01	2.70 ± 0.40 <sup>**</sup>
<b>MCP-1(pg/ml)</b>	25.0 ± 5.0	85.0 ± 31.0 <sup>*</sup>

**Tableau 6:** Concentrations d'IL-6, IL-8 (n=21) et MCP-1 (n=14) détectées dans les surnageants d'éosinophiles collectés après 1hr et 18hr de culture. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. \*: p < 0.05 et \*\*: p < 0.001 en comparaison avec les niveaux obtenus dans les surnageants d'une heure.



## ***DEUXIEME PARTIE: sécrétion de différentes cytokines endothéliales.***

### **• Intervention des médiateurs spontanément relargués par les éosinophiles sur la sécrétion d'IL-6, IL-8 et MCP-1 par les cellules endothéliales:**

Initialement, nous avons montré que des médiateurs libérés spontanément par les éosinophiles étaient capable d'induire l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Nous avons trouvé intéressant d'évaluer dans quelle mesure les éosinophiles étaient capables, dans le même contexte, de stimuler les cellules endothéliales à produire différentes cytokines telles l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1.

#### **Résultats:**

##### ***1) évaluation des taux d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 dans les surnageants d'éosinophiles:***

- l'IL-6, l'IL-8 (n=21) et le MCP-1 (n=14) ont été dosés dans les surnageants d'éosinophiles (Tableau 6) afin d'apprécier les niveaux de sécrétion de ces cytokines par les éosinophiles.

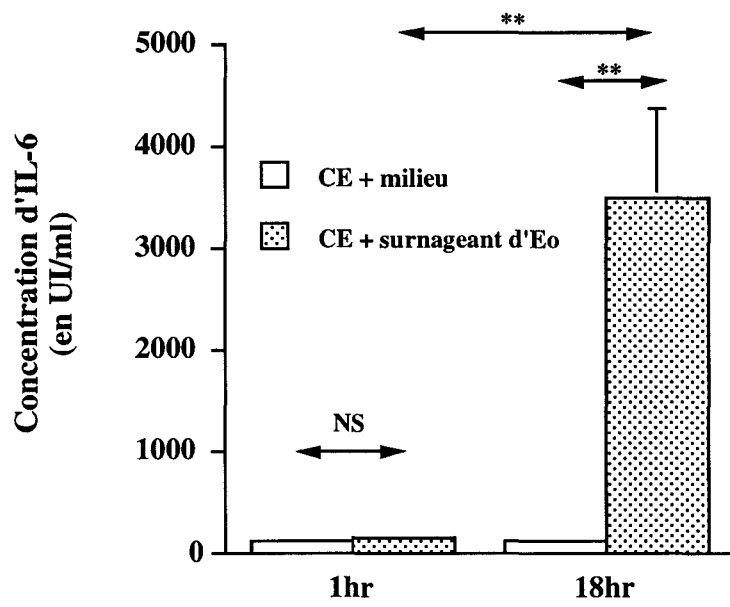
- ces trois cytokines sont déjà détectables dans les surnageants d'éosinophiles maintenus 1 heure en culture, toutefois dans de très faibles proportions. Les quantités de ces médiateurs, libérés spontanément par les éosinophiles, sont augmentées de manière significative dans les surnageants de 18 heures par rapport aux niveaux obtenus à une heure.

##### ***2) modulation de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales stimulées par les surnageants d'éosinophiles:***

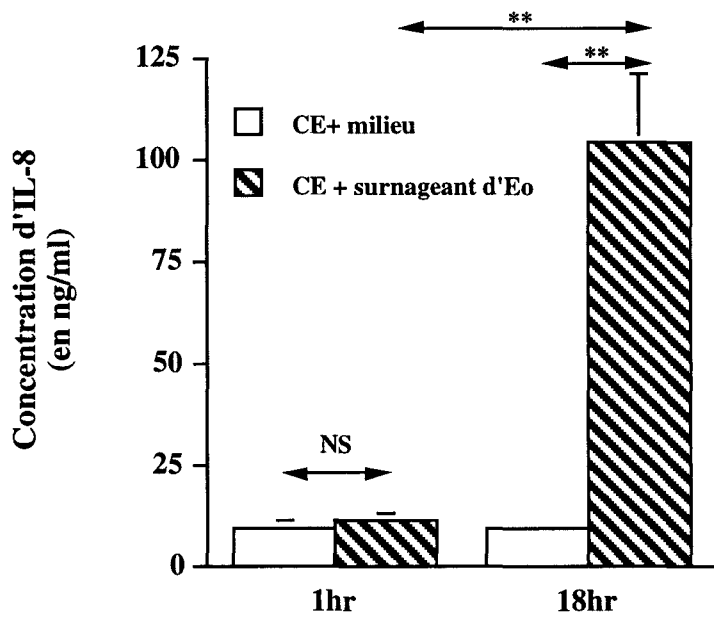
- la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 a été évaluée dans des surnageants de cellules endothéliales stimulées, pendant 24 heures, par différents surnageants d'éosinophiles (Figure 13).

FIGURE 13

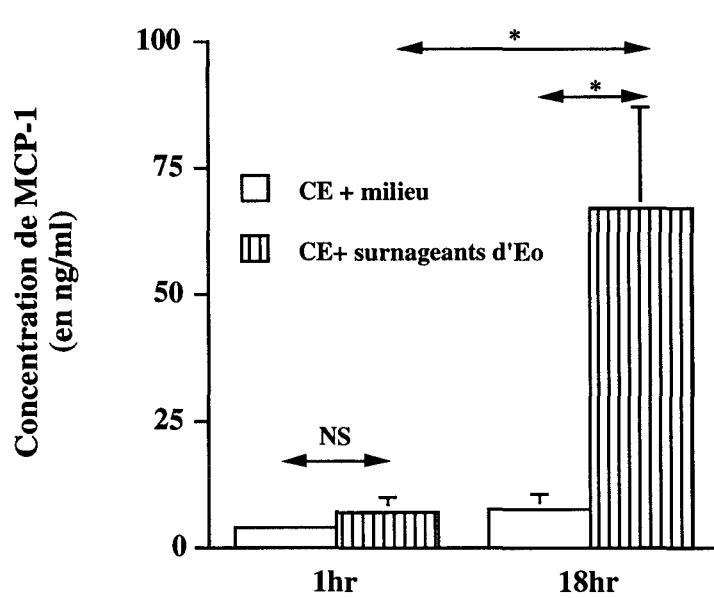
A



B



C



- nos résultats montrent que les cellules endothéliales non stimulées produisent spontanément de l'IL-6, IL-8 et du MCP-1 à des taux faibles (Figure 13). Les surnageants d'éosinophiles d'1 heure ne modifient pas significativement ces niveaux de base. Les surnageants d'éosinophiles de 18 heures augmentent considérablement la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et du MCP-1 (Figure 13).

- la comparaison des concentrations d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 dans les surnageants d'éosinophiles de 18 heures (Eos) versus les concentrations obtenues dans les surnageants de cellules endothéliales (CE) stimulées par ces surnageants d'éosinophiles met en évidence des différences considérables:

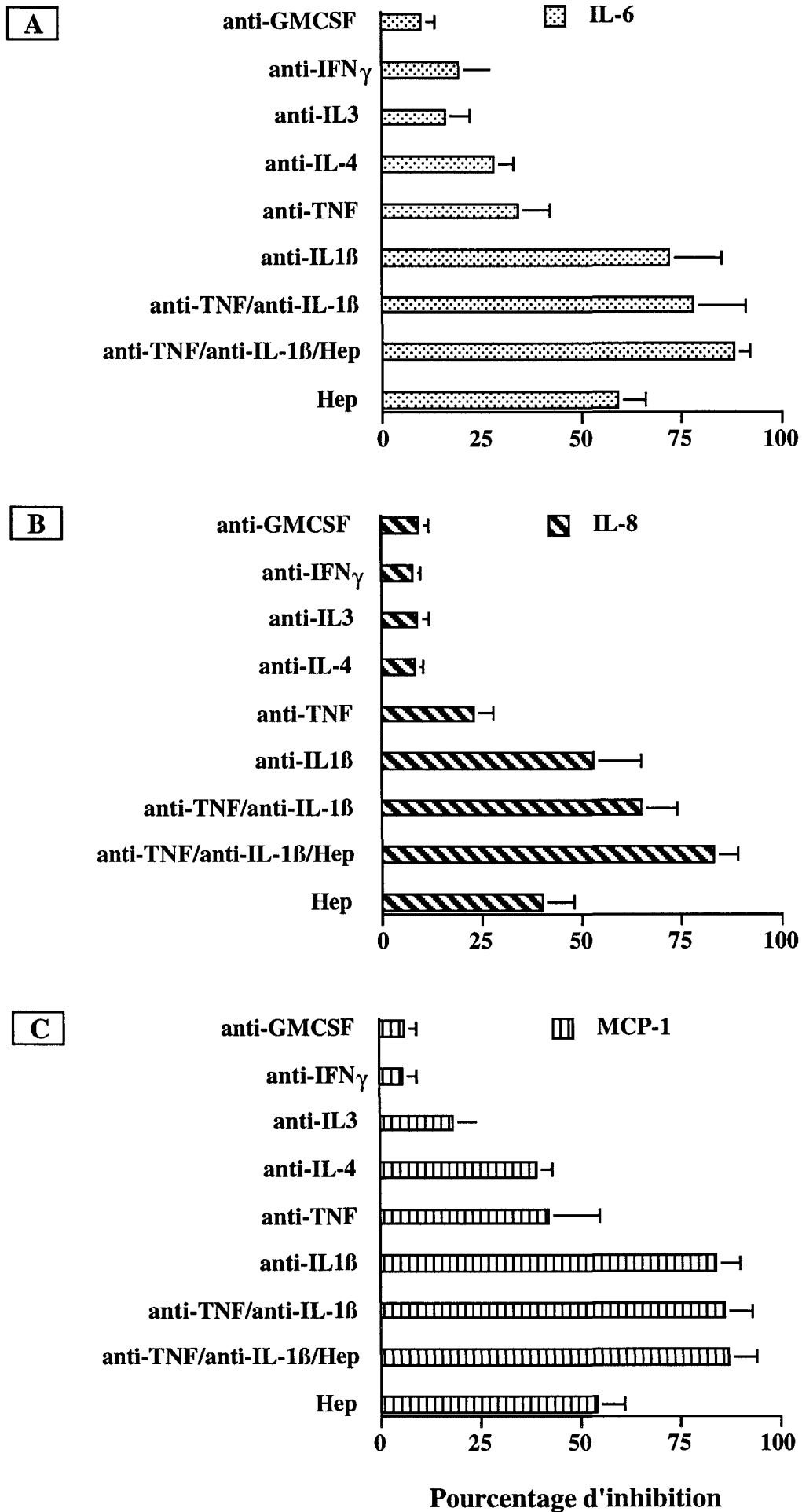
	<b>surnageants Eos 18h</b>	<b>CE stimulées par les surnageants Eos 18h</b>
<b>IL-6 (UI/ml)</b>	90,4±23,4	3503,4±883,2*
<b>IL-8 (ng/ml)</b>	2,70±0,40	104,1±16,6*
<b>MCP-1 (ng/ml)</b>	0,09±0,03	66,9±20,1*

(Moyenne ± SEM de 21 expériences. \*: p<0,001 en comparaison avec les surnageants d'éosinophiles collectés après 18 heures).

### *3) caractérisation des médiateurs éosinophiliques impliqués dans l'activation des cellules endothéliales:*

- comme pour l'induction des molécules d'adhérence, aucun médiateur éosinophilique présentant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa n'a pu être mis en évidence dans l'induction de la sécrétion des cytokines endothéliales. Nous avons également procédé à la réalisation de colonnes d'affinité grâce à de la protéine G sépharose complexée à différents anticorps neutralisants afin d'inhiber spécifiquement l'action de cytokines comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-3, l'IL-4, l'IFN $\gamma$ , le GM-CSF ou le TNF $\alpha$ . La déplétion des surnageants d'éosinophiles en protéines cationiques a été réalisée par l'intermédiaire de gel d'héparine.

FIGURE 14



- en ce qui concerne l'IL-6, les immunoadsorptions des surnageants d'éosinophiles sur des colonnes complexées à des anticorps anti-GM-CSF, anti-IFN $\gamma$  ou anti-IL-3 ne diminuent pas significativement la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales (Figure 14A). L'inhibition induite après le traitement des surnageants d'éosinophiles avec des anticorps anti-IL-4 ou anti-TNF $\alpha$  est modérée ( $27,5\pm 4,5$  et  $34,3\pm 7,9\%$  d'inhibition respectivement). Le passage des surnageants d'éosinophiles à travers les colonnes de gel d'héparine est responsable d'une inhibition de  $58,8\pm 7,1\%$  de la sécrétion endothéliale d'IL-6. L'immunoadsorption des surnageants d'éosinophiles avec des anticorps anti-IL-1 $\beta$  diminue de façon significative la sécrétion d'IL-6 ( $71,6\pm 13,0\%$  d'inhibition). La combinaison des anticorps anti-IL-1 $\beta$  et anti-TNF $\alpha$  augmente très faiblement l'effet inhibiteur ( $77,7\pm 7,0\%$  d'inhibition); l'inhibition maximale ( $88,4\pm 4,3\%$ ) étant obtenue lorsque les surnageants d'éosinophiles ont été déplétés à la fois en IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et protéines cationiques.

- L'inhibition de la sécrétion d'IL-8 par les cellules endothéliales est représentée sur la figure 14B. Les immunoadsorptions des surnageants d'éosinophiles avec des anticorps anti-GM-CSF, anti-IFN $\gamma$ , anti-IL-3 ou anti-IL-4 n'entraînent pas de diminution significative de la sécrétion d'IL-8 par rapport aux surnageants non traités. L'inhibition induite par des anticorps anti-TNF $\alpha$  ou le passage des surnageants d'éosinophiles à travers les colonnes de gel d'héparine est plus faible ( $22,9\pm 5,4$  et  $40,4\pm 7,9\%$  respectivement) que celle observée pour la sécrétion d'IL-6. Les surnageants d'éosinophiles déplétés en IL-1 $\beta$  induisent  $53,4\pm 11,7\%$  d'inhibition. La déplétion combinée en IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  induit  $65,0\pm 8,8\%$  d'inhibition. L'inhibition maximale a été obtenue lorsque les surnageants d'éosinophiles ont été déplétés en IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et protéines cationiques ( $83,3\pm 6,9\%$  d'inhibition).

- Aucune inhibition de la sécrétion endothéliale de MCP-1 n'est observée si les surnageants d'éosinophiles sont déplétés en GM-CSF, IFN $\gamma$  ou IL-3 (Figure 14C). Les déplétions de ces surnageants par des anticorps anti-IL-4, anti-TNF $\alpha$  ou anti-IL-1 $\beta$  induisent une diminution significative de la sécrétion de MCP-1 par les cellules endothéliales ( $38,3\pm 3,8$ ;  $41,6\pm 12,6$  et  $83,9\pm 5,9\%$  d'inhibition respectivement). Le niveau d'inhibition résultant de la

déplétion des surnageants en protéines cationiques est de  $54,1 \pm 6,5\%$ . L'inhibition de sécrétion du MCP-1 engendrée par la combinaison des anticorps anti-IL-1 $\beta$  et anti-TNF $\alpha$  associée ou non au passage à travers les colonnes de gel d'héparine donne des résultats fort semblables ( $85,6 \pm 6,8$  et  $87,4 \pm 6,8\%$  d'inhibition respectivement).

### **Conclusions:**

- nos résultats montrent que, parallèlement à ce qui a été observé pour l'induction de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales, les surnageants d'éosinophiles collectés après 18 heures de culture amplifient considérablement la libération d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales; alors que les éosinophiles, maintenus une heure en culture, ne libèrent pas de médiateurs en quantités suffisamment importantes pour stimuler les cellules endothéliales à produire ces cytokines.

- la déplétion des surnageants d'éosinophiles en IL-3, IFN $\gamma$  ou GM-CSF n'affecte pas l'activation des cellules endothéliales pour la sécrétion d'IL-6, IL-8 et de MCP-1.

- parmi les médiateurs relargués par les éosinophiles, l'IL-1 $\beta$  semble affecter nettement la libération des trois cytokines étudiées (MCP-1 ( $83,9\%$ ) > IL-6 ( $71,6\%$ ) > IL-8 ( $51,4\%$ ), les valeurs entre parenthèses correspondant aux pourcentages d'inhibition présentés dans les résultats) alors que, en comparaison, l'action du TNF $\alpha$  reste beaucoup plus modeste (MCP-1 ( $41,6\%$ ) > IL-6 ( $34,3\%$ ) > IL-8 ( $22,9\%$ )). La participation de l'IL-4 apparaît intervenir uniquement sur la libération de MCP-1 par les cellules endothéliales.

- nos résultats indiquent que les protéines cationiques participent également à l'induction de l'activation endothéliale dans le cadre d'une libération de cytokines (MCP-1 ( $54,1\%$ ) = IL-6 ( $58,8\%$ ) > IL-8 ( $40,4\%$ )).

- l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$  et les protéines cationiques apparaissent jouer un rôle additif dans l'induction de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par la cellule endothéliale.

## ☛ Effets de l'activation des éosinophiles sur la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales:

Les éosinophiles peuvent libérer spontanément des médiateurs capables d'activer les cellules endothéliales. Dans un second temps, nous avons voulu savoir si la stimulation des éosinophiles pouvait moduler le relargage de ces médiateurs.

Nous avons montré que:

1) la sécrétion des médiateurs éosinophiliques impliqués dans l'activation endothéliale est significativement augmentée lorsque les éosinophiles sont activés 1 heure par des complexes immuns de type IgE (mais pas de type IgG); ce qui se traduit, au niveau de la cellule endothéliale, par l'induction de l'expression des molécules d'adhérence telles l'ICAM-1, la E-sélectine et le VCAM-1;

2) l'activation prolongée (18 heures) des éosinophiles par les complexes immuns de type IgG ou IgE n'est plus capable d'amplifier la libération spontanée (observée à 18 heures) des différents médiateurs éosinophiliques étudiés (excepté pour l'ECP); ce qui se traduit, au niveau de la cellule endothéliale, par des niveaux similaires de l'expression de l'ICAM-1, la E-sélectine et du VCAM-1 que les éosinophiles soient non stimulées ou stimulés par l'IgE ou l'IgG.

Dans ce contexte, il nous semblait intéressant d'évaluer *la modulation de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales incubées avec des surnageants d'éosinophiles stimulés.*

### **Résultats:**

• l'induction et l'évaluation de la sécrétion des cytokines dans les surnageants de cellules endothéliales (après 24 heures de culture) ont été évaluées comme cela a précédemment été décrit.

- nous avons testé, au préalable, que les complexes immuns à IgE et à IgG n'augmentaient pas la libération de cytokines par les cellules endothéliales.

- la sécrétion de cytokines par la cellule endothéliale, induite par les surnageants d'éosinophiles maintenus en culture une heure, diffère selon les conditions d'activation qu'ont subies les éosinophiles, et selon la cytokine endothéliale qui est évaluée.

- pour les cultures d'une heure, seuls les surnageants d'éosinophiles activés par les complexes immuns de type IgE sont capables d'augmenter significativement la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales. Une augmentation de la sécrétion de MCP-1 par les cellules endothéliales est induite par tous les surnageants d'éosinophiles. Cependant, cette augmentation n'est pas apparue statistiquement significative compte tenu d'une grande variation dans les résultats. Les valeurs brutes de sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales (CE) activées ou non par les surnageants d'éosinophiles d'une heure de culture (1h) sont présentées dans le tableau ci-dessous:

	CE		Stimulation des Eos (1h)	
	non stimulées	aucune	IgG	IgE
<b>IL-6 (UI/ml)</b>	136,7±43,6	159,2±52,0	100,2±29,3	184,2±60,6*
<b>IL-8 (ng/ml)</b>	8,9±2,0	10,8±2,0	8,8±1,8	14,3±2,9**
<b>MCP-1 (ng/ml)</b>	3,8±1,2	7,1±3,0	6,4±2,8	7,9±4,1

(Moyenne ± SEM de 21 expériences. résultats présentés en valeurs brutes \*: p<0,05 et \*\*: p<0,01 en comparaison avec les niveaux obtenus pour la sécrétion spontanée des cellules endothéliales).

- pour les cultures de 18 heures, quelles que soient les conditions de stimulation qu'ont subies les éosinophiles, les surnageants d'éosinophiles induisent tous une forte augmentation de la sécrétion, par les cellules endothéliales, des trois cytokines étudiées (par rapport à la sécrétion spontanée par les cellules endothéliales).



	Stimulation des Eos (18h)			
	CE non stimulées	aucune	IgG	IgE
IL-6 (UI/ml)	132,3±46,7	3503,4±883,2**	2400,2±667,6**	3793,1±961,1**
IL-8 (ng/ml)	8,8±1,8	104,1±16,6**	97,0±13,9**	103,0±17,3**
MCP-1 (ng/ml)	7,6±2,8	66,9±20,1*	61,6±20,0*	75,9±22,9*

(Moyenne ± SEM de 21 expériences. résultats présentés en valeurs brutes \*: p<0,05 et \*\*: p<0,01 en comparaison avec les niveaux obtenus pour la sécrétion spontanée des cellules endothéliales).

### Conclusion:

- parmi les surnageants d'éosinophiles collectés après une heure, seuls ceux issus de l'activation des éosinophiles par l'IgE induisent une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8.

- tous les surnageants d'éosinophiles (activés ou non) collectés après 18 heures de culture activent les cellules endothéliales de manière similaire et induisent la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 à des niveaux très proches.

### III. Etude de la régulation d'ESM-1, une nouvelle molécule spécifique des cellules endothéliales humaines.

Récemment, nous avons identifié une nouvelle molécule endothéliale appelée ESM-1 (Endothelial cell-Specific Molecule-1) (Lassalle, 1996). Cette molécule est apparue intéressante pour plusieurs raisons, notamment une expression spontanée restreinte à l'endothélium vasculaire pulmonaire humain. Nous avons donc appréhendé l'effet des cytokines sur l'expression d'ESM-1 par les HUVEC.

### **Données actuelles:**

La découverte de cette molécule s'est faite, de manière fortuite, par criblage d'une banque d'ADN complémentaire (ADNc) d'HUVEC dans le but d'isoler l'ADNc codant pour un auto-antigène de 55 kDa potentiellement impliqué dans une forme sévère de l'asthme (Lassalle, 1993). Un sérum immun dirigé contre cet antigène a été obtenu chez le lapin et utilisé dans le criblage d'une banque d'ADNc d'HUVEC. Ainsi un ADNc de 1,2 kb a été isolé, correspondant à un ARNm de séquence inconnue et dont l'expression est apparue restreinte aux cellules endothéliales. Cette molécule (clairement différente de l'auto-antigène de 55 kDa initial) a été dénommée ESM-1 pour Endothelial cell-Specific Molecule-1. L'ADNc entier d'ESM-1 a été reclone, donnant naissance à un fragment de 2 kb. Cette séquence définit:

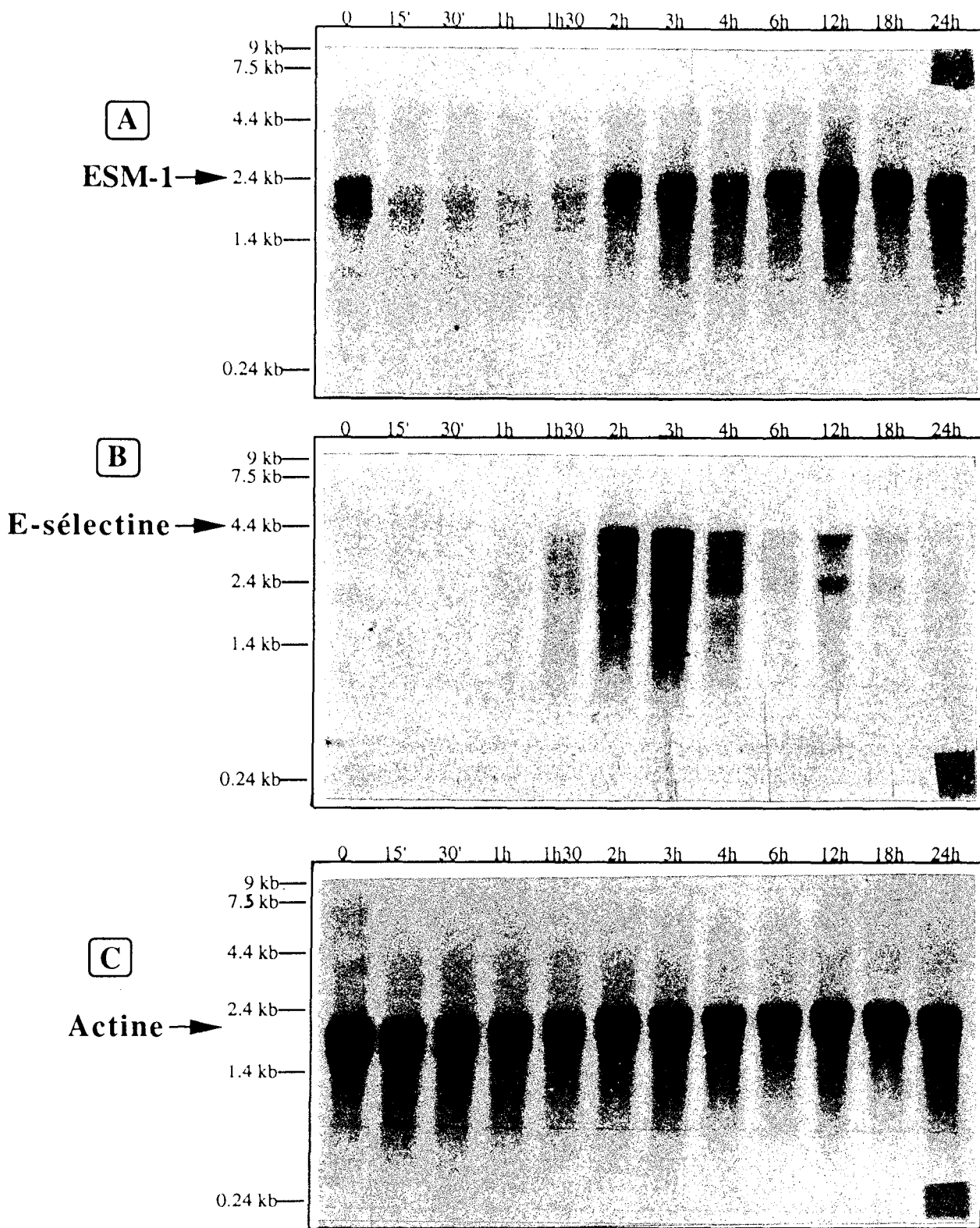
- un cadre de lecture fermé de 552 nucléotides;
- une région 3' non traduite de 1398 nucléotides renfermant plusieurs domaines impliqués dans l'instabilité de l'ARNm, ainsi que 5 sites de polyadénylation;
- la séquence nucléotidique complète d'ESM-1 est apparue unique. Les meilleures homologues sont obtenues pour des protéines ayant un rôle dans l'adhésion cellulaire.

A partir de cet ADNc, il a été déduit que la protéine devait être constituée de 184 acides aminés (AA) : 19 AA formant un peptide signal qui a été testé comme étant fonctionnel et une protéine mature de 165 AA ne possédant pas de site de N-glycosylation mais contenant 18 résidus Cystéine. ESM-1 se présente comme une protéine monomérique ayant un poids moléculaire théorique de 20 kDa. Par des expériences de RT-PCR, Northern Blot et hybridation *in situ*, il a pu être démontré que ESM-1 était exprimée spécifiquement dans les cellules endothéliales humaines avec, au niveau tissulaire, une expression préférentielle dans le poumon et le rein.

### **But de l'étude:**

La mise en évidence de cette nouvelle molécule, exprimée spécifiquement dans les cellules endothéliales humaines et localisée préférentiellement dans le poumon, nous amène tout naturellement à évaluer l'action de différentes cytokines impliquées dans la réaction inflammatoire sur l'expression d'ESM-1:

cinétique de stimulation par le TNF $\alpha$



**Figure 15:** Expression des gènes d'ESM-1 et de la E-sélectine dans les cellules endothéliales stimulées par le TNF $\alpha$ .

- au niveau transcriptionnel (Northern Blot);
- au niveau des produits de traduction (immunocytochimie ou ICC, dosage dans les surnageants et les lysats cellulaires).

**Matériel et méthodes:** se reporter à l'annexe (page 130).

Les HUVEC ont été activées par le TNF $\alpha$  pendant différentes périodes (de 15 minutes à 24 heures). Les ARN totaux sont ensuite purifiés et analysés par hybridation (Northern Blot) à l'aide de sondes spécifiques pour l'ESM-1, la E-sélectine et l'actine  $\beta$ . Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-4 et IFN $\gamma$  sur l'expression des ARNm codant pour l'ESM-1, l'ICAM-1 et l'actine  $\beta$  par des HUVEC activées pendant 1, 6, 12, 18 ou 24 heures.

Concernant l'ICC, les HUVEC ont été traitées par le TNF $\alpha$  et/ou l'IFN $\gamma$  pendant 4 et 24 heures. Une fois les cellules fixées, la localisation d'ESM-1 et de l'ICAM-1 a pu être réalisée grâce à un premier anticorps spécifique de chaque molécule puis un deuxième anticorps marqué à la peroxydase nécessaire à la réaction de coloration.

Le dosage d'ESM-1 dans les surnageants et les lysats cellulaires a été réalisé par ELISA (grâce à l'utilisation de deux anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes différents de la molécule: technique sandwich).

## **Résultats:**

### ***1) cinétique d'expression des ARNm codant pour ESM-1 par des HUVEC activées par le TNF $\alpha$ :***

- les ARN totaux sont issus d'HUVEC non stimulées ou stimulées par le TNF $\alpha$  (200 U/ml) pendant 15 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 18h et 24h.
- l'expression de l'ARNm codant pour ESM-1 augmente d'une manière qui est dépendante du temps d'activation par le TNF $\alpha$ . Le niveau d'expression maximale est obtenu

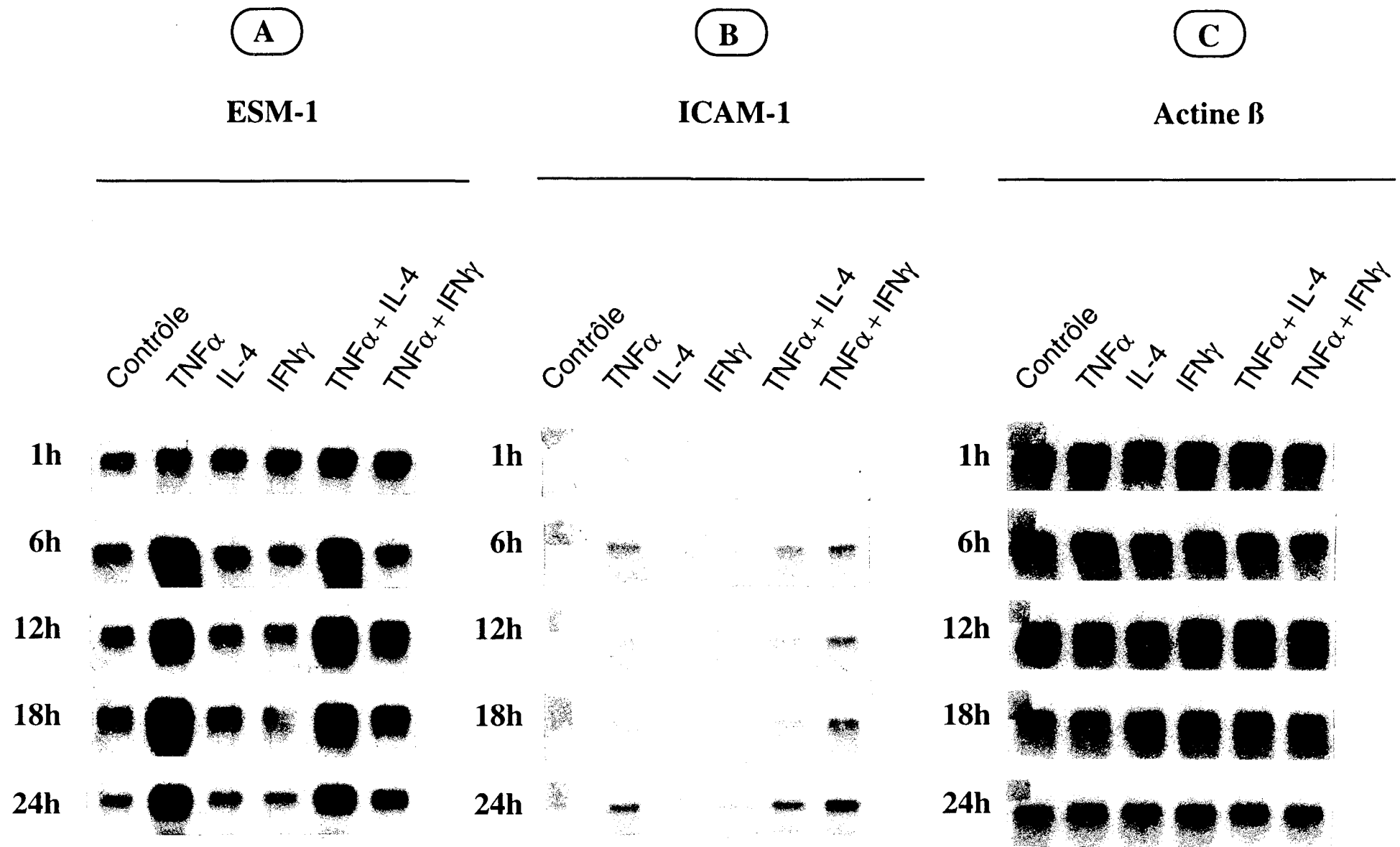


Figure 16: Régulation des gènes d'ESM-1, d'ICAM-1 et de l'Actine β par les cytokines.

après 18 heures d'activation et correspond à une expression 3 à 4 fois supérieure à la production basale (Figure 15A).

- pour trois des cinq expériences réalisées, une diminution précoce et transitoire de l'expression d'ARNm pour l'ESM-1 a été observée, débutant 15 min et perdurant jusqu'à 1h30 après l'addition de TNF $\alpha$ .

- les mêmes blots ont été utilisés pour évaluer la cinétique d'expression des ARNm codant pour la E-sélectine, afin de confirmer l'efficacité de l'activation des HUVEC par le TNF $\alpha$ . Ainsi nous avons mis en évidence une augmentation rapide et transitoire du taux d'ARNm codant pour la E-sélectine, le niveau maximum étant atteint 3 heures après l'addition du TNF $\alpha$  dans les cultures d'HUVEC. Le signal s'éteint après la 12<sup>ème</sup> heure (Figure 15B).

- l'analyse de l'expression des ARNm codant pour l'actine  $\beta$  confirme que dans chacune des pistes du Northern blot ont été déposés des taux équivalents d'ARN totaux (Figure 15C).

## ***2) régulation de la transcription d'ESM-1 par différentes cytokines:***

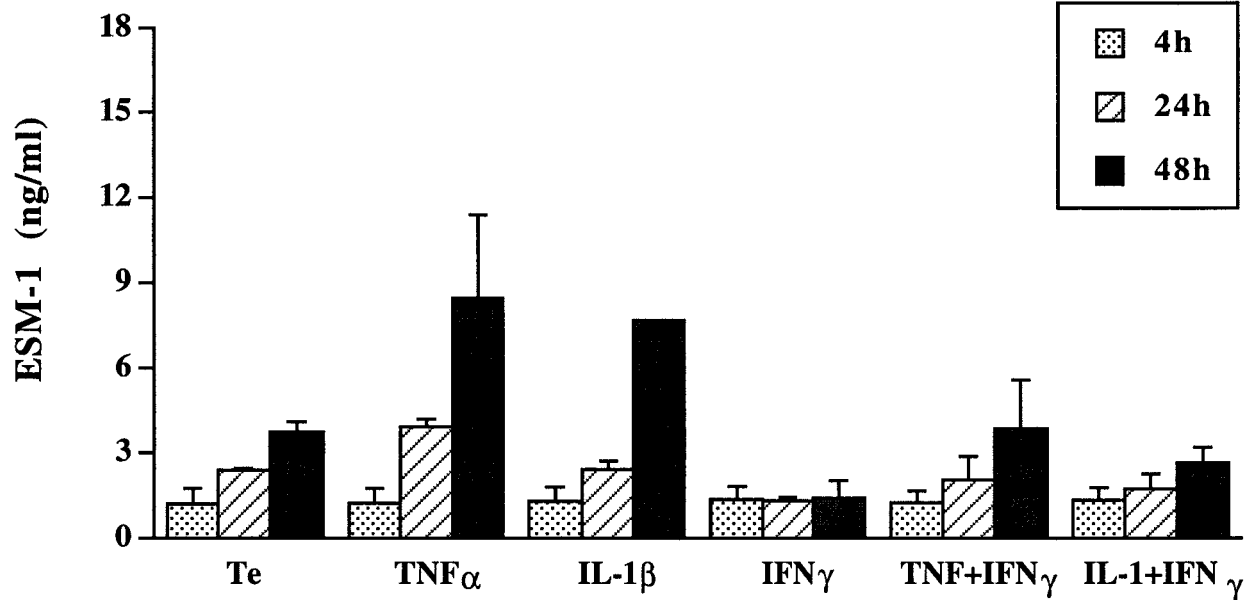
- les HUVEC ont été activées par l'IL-1 $\beta$  (10 U/ml), l'IL-4 (1000 U/ml) et l'IFN $\gamma$  (1000 U/ml) pendant 1h, 6h, 12h, 18h et 24h. Les combinaisons de cytokines TNF $\alpha$ +IL-4 et TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  ont également été étudiées.

- l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'expression, au cours du temps, des ARNm codant pour ESM-1 présente un profil similaire à ce qui a été observé avec le TNF $\alpha$  (résultats non présentés).

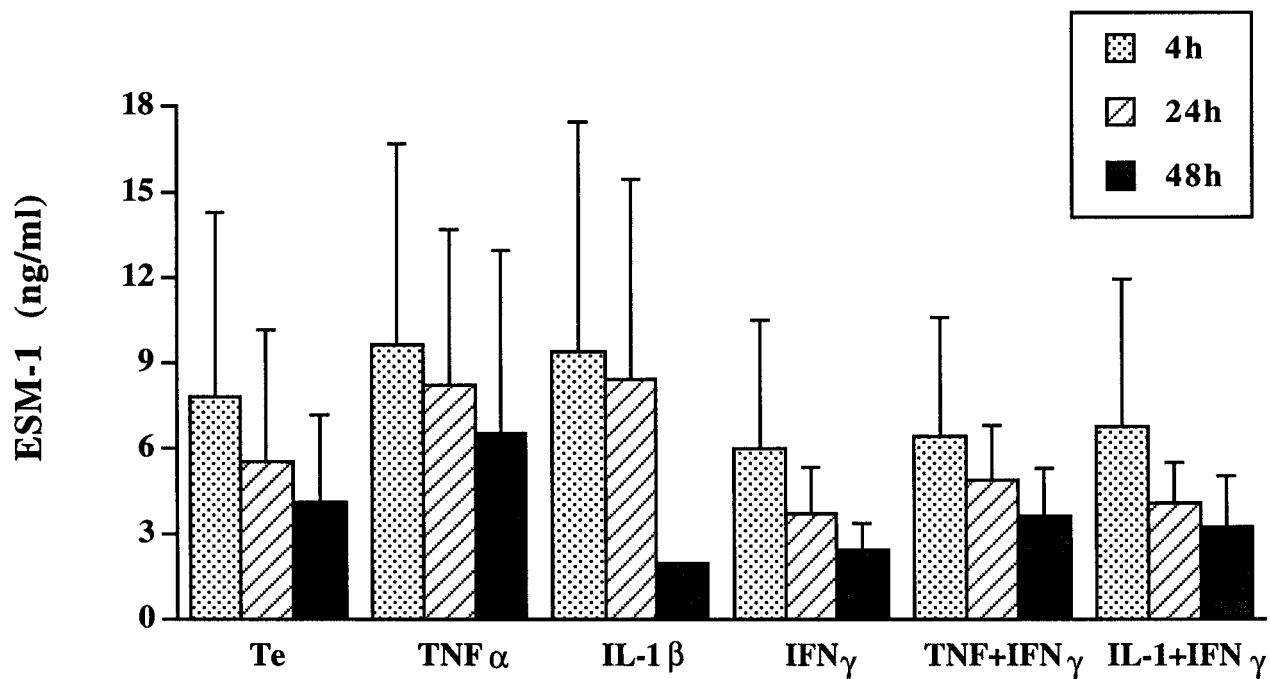
- l'IL-4 et l'IFN $\gamma$  n'exercent aucune modulation de l'expression de l'ARNm d'ESM-1 dans les HUVEC (Figure 16A). Néanmoins, ces deux cytokines augmentent l'expression des ARNm codant pour le VCAM-1 (IL-4) (non présentés) et l'ICAM-1 (IFN $\gamma$ ) (Figure 16B) montrant ainsi leur efficacité à activer les HUVEC dans nos conditions de travail.

Figure 17

A



B



- de manière surprenante, l'IFN $\gamma$  exerce un effet inhibiteur sur l'expression, induite par le TNF $\alpha$ , des ARNm codant pour ESM-1 (Figure 16A). A l'inverse, cette même combinaison potentialise l'expression des ARNm codant pour l'ICAM-1 (Figure 16B). Par ailleurs l'IL-4 n'a aucune incidence sur la modulation d'ESM-1 induite par le TNF $\alpha$  (Figure 16A).

### **3) dosage d'ESM-1 dans les surnageants et les lysats cellulaires d'HUVEC:**

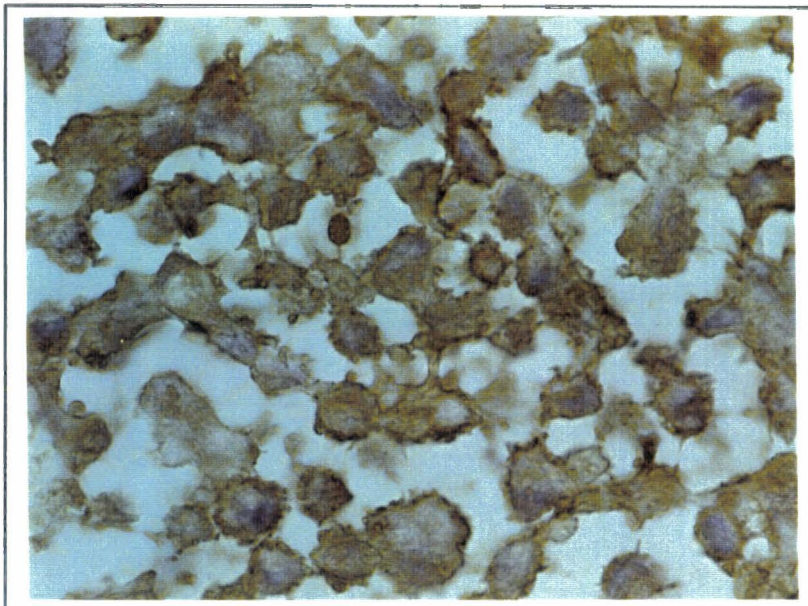
- la quantification d'ESM-1 a été réalisée dans les surnageants et les lysats de cellules endothéliales confluentes (n=3), maintenues en culture sans aucune activation ou activées par différentes cytokines, pendant 4, 24 et 48 heures (résultats présentés en moyenne  $\pm$  SD). Le début de l'expérience correspond au changement de milieu de culture.

- la sécrétion spontanée d'ESM-1, spontanément très faible, est déjà détectable dans les surnageants cellulaires au bout de quatre heures de culture (1,2 ng/ml) et augmente progressivement au cours du temps (2,4 et 3,7 ng/ml dans les surnageants de 24 et 48 heures de culture respectivement) (Figure 17A). L'activation des HUVEC par le TNF $\alpha$  (200 U/ml) ou l'IL-1 $\beta$  (10 U/ml) est responsable de l'augmentation de la libération d'ESM-1 uniquement dans les surnageants cellulaires collectés après 24 et 48 heures de culture, les taux les plus importants correspondant aux temps de culture les plus longs (9,4 et 7,7 ng/ml pour le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  respectivement). En ce qui concerne l'IFN $\gamma$  (1000 U/ml), cette cytokine n'a aucun effet sur la libération d'ESM-1 par les HUVEC maintenues 4 heures en culture sans activation ou stimulées par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Figure 17A). En revanche, l'IFN $\gamma$  inhibe la libération d'ESM-1 induite par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  dans les cultures de 24 et 48 heures. En effet, les quantités d'ESM-1 dosées dans ces surnageants sont similaires voire inférieures aux quantités libérées spontanément par les HUVEC pour des périodes de culture identiques (Figure 17A).

- en parallèle, ESM-1 a été quantifiée dans les lysats cellulaires (Figure 17B). La quantité d'ESM-1 retenue dans les HUVEC non stimulées, après 4 heures de culture, est environ 7 fois supérieure à la quantité sécrétée dans le même temps (7,8 ng/ml). Cette fraction

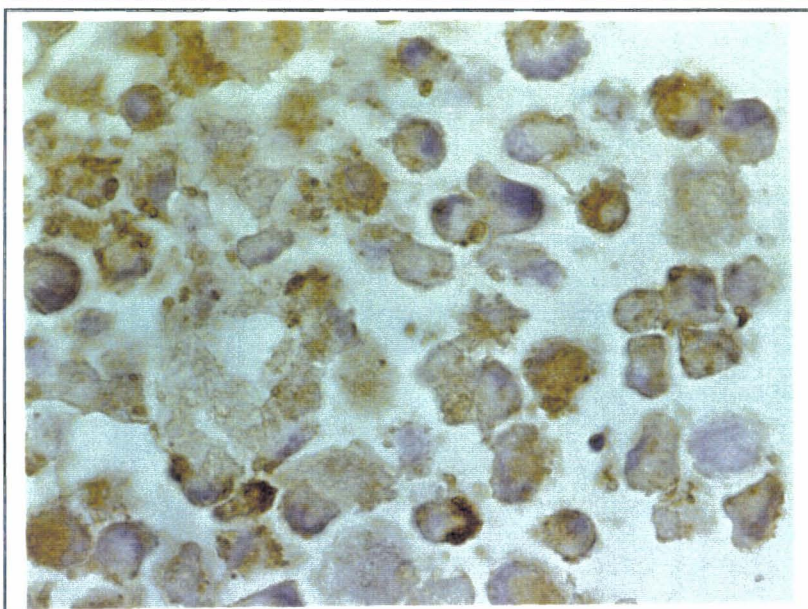


A



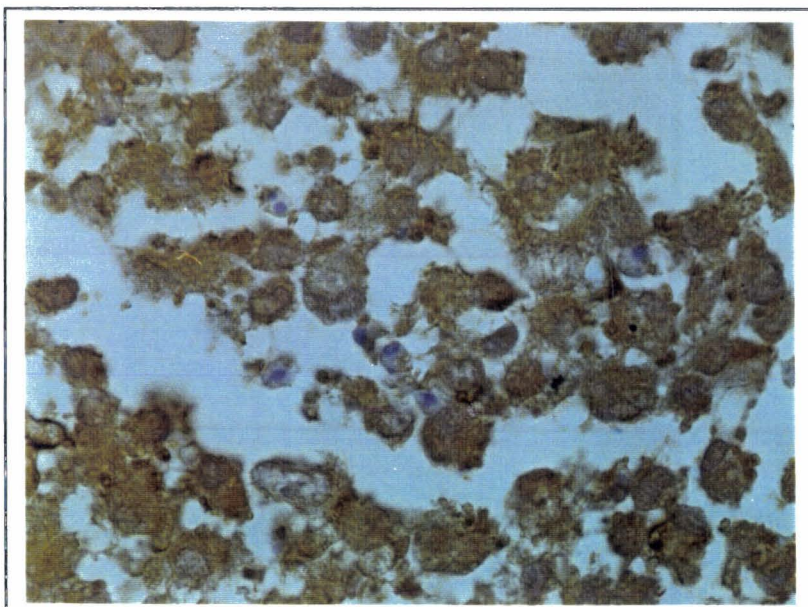
Contrôle

B



TNF $\alpha$  4h

C



TNF $\alpha$  24h

**Figure 18:** Distribution cellulaire de la protéine ESM-1 à la surface de cellules endothéliales activées par le TNF $\alpha$  pendant 4h, 24h ou non activées (contrôle).

intracellulaire d'ESM-1 diminue peu à peu au cours du temps (5,5 et 4,1 ng/ml dans les lysats de 24 et 48 heures de culture respectivement). Les quantités d'ESM-1 augmentent légèrement dans les lysats cellulaires d'HUVEC ayant été stimulées 4 heures par du TNF $\alpha$  ou de l'IL-1 $\beta$  (Figure 17B). La diminution du taux d'ESM-1 dans les lysats cellulaires d'HUVEC stimulées pendant 24 et 48 heures par du TNF $\alpha$  ou de l'IL-1 $\beta$  coïncide avec l'augmentation de la libération d'ESM-1 dans les surnageants (Figures 17B et 17A). L'action inhibitrice de l'IFN $\gamma$  est confirmée à la fois au niveau de la synthèse constitutive d'ESM-1 par les HUVEC et au niveau de la synthèse induite par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , ceci quelle que soit la durée de la culture (Figure 17B).

#### ***4) distribution cellulaire de la protéine ESM-1 à la surface d'HUVEC activées par différents cytokines:***

- la localisation d'ESM-1 dans les cellules endothéliales humaines a été réalisée grâce à un immunosérum de lapin anti-ESM-1.

- en absence de toute stimulation, ESM-1 est retrouvée associée à la membrane plasmique des HUVEC (Figure 18A).

- la stimulation des HUVEC par le TNF $\alpha$  a pour conséquence une redistribution cellulaire d'ESM-1: - après 4 heures d'activation, ESM-1 est disséminée dans le cytoplasme

(Figure 18B);

- après 24 heures d'activation, la localisation cytoplasmique d'ESM-1 persiste et s'accompagne d'un marquage périnucléaire intense (Figure 18C).

- l'effet de l'IFN $\gamma$  (seul ou associé au TNF $\alpha$ ) sur la distribution cellulaire d'ESM-1 a également été envisagé. Cependant aucune modification notable de la répartition d'ESM-1 n'a pu être mise en évidence par cette technique d'immunocytochimie (résultats non présentés).

### **Conclusions:**

- nos résultats montrent que la transcription d'ESM-1 est régulable par les cytokines. Le  $\text{TNF}\alpha$  et l' $\text{IL-1}\beta$  ont une activité stimulatrice alors que, de manière surprenante, l' $\text{IFN}\gamma$  (souvent décrit pour agir en synergie avec le  $\text{TNF}\alpha$ ) inhibe ici l'action du  $\text{TNF}\alpha$ . Cette activité inhabituelle de l' $\text{IFN}\gamma$  laisse supposer des fonctions uniques d'ESM-1 dans le cadre de la réaction inflammatoire dépendante des cytokines.

- les résultats sont confirmés par les dosages d'ESM-1 dans les surnageants et les lysats cellulaires d'HUVEC, qui nous indiquent que la protéine est libérée spontanément par les cellules endothéliales et que sa sécrétion est régulable par les cytokines (potentialisation par le  $\text{TNF}\alpha$  ou l' $\text{IL-1}\beta$ , inhibition par l' $\text{IFN}\gamma$ ).

- l'étude d'ESM-1 en immunocytochimie indique que cette molécule est spontanément présente dans les HUVEC, associée à la membrane cytoplasmique. La stimulation par le  $\text{TNF}\alpha$  est capable d'entraîner primitivement la redistribution cellulaire d'ESM-1 de la membrane cytoplasmique vers le cytosol, et secondairement d'induire une néosynthèse, comme semble le suggérer la localisation périnucléaire observée après 24 heures d'activation.

*Discussion*

*Conclusion*

## *C. Discussion-Conclusion*

### I. Interactions entre les cellules endothéliales et les mastocytes.

Le mastocyte joue un rôle majeur dans le déclenchement des manifestations immunoallergiques. Parmi les médiateurs libérés par le mastocyte, l'histamine intervient non seulement dans la réaction allergique immédiate mais est aussi impliquée dans la réaction plus tardive où la composante inflammatoire prédomine.

L'une des cibles privilégiées de l'histamine est la cellule endothéliale. Nous avons montré que l'histamine induit au niveau des cellules endothéliales l'expression de la P-sélectine et l'augmentation de la libération d'IL-6 et d'IL-8. Cette induction est apparue avec des doses d'histamine physiologiquement pertinentes ( $10^{-6}$  à  $10^{-4}$  M), retrouvées dans les tissus après dégranulation mastocytaire (Bourne, 1971; Vannier, 1991; Vannier, 1993). Notre travail a consisté à évaluer l'action anti-inflammatoire de la Loratadine, un anti-histaminique puissant utilisé en thérapeutique (Clarityne®).

Nous avons montré que l'activation des cellules endothéliales induite par l'histamine pouvait être inhibée par la Loratadine (concentrations allant de  $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  M) ou bien son métabolite actif, la DCL, (concentrations allant de  $10^{-12}$  à  $10^{-5}$  M), ces deux anti-histaminiques ayant été utilisés à des doses compatibles avec les conditions physiologiques.

La comparaison des effets engendrés par la Loratadine et la DCL nous montre que la Loratadine possède une action plus marquée sur l'expression de la P-sélectine que sur la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8, même si dans tous les cas l'effet inhibiteur est dépendant de la dose. A l'inverse, l'action inhibitrice de la DCL semble s'exercer préférentiellement sur la libération des cytokines.



Le rôle de la P-sélectine dans la réaction inflammatoire a déjà été largement évoqué. Cette molécule d'adhérence, stockée au sein des cellules endothéliales dans les corps de Weibel-Palade (McEver, 1989), peut être rapidement exprimée à la surface des cellules endothéliales sous l'effet de divers stimuli comme l'histamine, la thrombine, le C5a ou encore l'IL-3 (Khew-Goodall, 1996). Lors la réaction inflammatoire, la P-sélectine est impliquée dans le rolling des neutrophiles (Geng, 1990) et des éosinophiles (Symon, 1994), étape initiale de l'adhésion et du recrutement leucocytaire. Nous avons montré que la Loratadine inhibe efficacement l'expression de la P-sélectine, ce qui suggère que la Loratadine peut moduler la réaction inflammatoire en diminuant l'infiltrat leucocytaire dès la première étape de l'adhésion.

En ce qui concerne les cytokines, l'IL-6 est décrite comme l'une des principales cytokines pro-inflammatoires possédant des effets pleïotropes et produites dans les réactions allergiques à la suite d'un challenge allergénique (Lee, 1992; Gosset, 1993; Choi, 1994). L'importance de son action a été mise en évidence par l'intermédiaire de modèles animaux et en particulier avec des souris qui, déficientes pour l'IL-6, sont incapables de développer une réaction inflammatoire (Kopf, 1994). Quant à l'IL-8, cette cytokine a surtout été décrite *in vitro* pour ses activités chémoattractrices vis à vis des neutrophiles, des lymphocytes, des basophiles (Larsen, 1989b; Leonard, 1990) et des éosinophiles préactivés (Warringa, 1991). Toutefois l'IL-8 possède également des activités régulatrices de la libération d'histamine par les basophiles. En effet, si à faible concentration ( $10^{-9}$  M) l'IL-8 inhibe la sécrétion d'histamine induite par l'IL-3 ou les facteurs de libération d'histamine (HRF), à forte dose ( $10^{-6}$  M) elle est capable d'engendrer cette libération (White, 1989, Kuna, 1991). Le puissant effet inhibiteur exercé par la DCL (et à un degré moindre par la Loratadine) sur la sécrétion par les cellules endothéliales d'IL-6 et d'IL-8 s'exerce aussi par une inhibition transcriptionnelle des ARN messagers codant respectivement pour ces deux cytokines. Ceci suggère un rôle de la DCL dans le contrôle de la réaction tardive de la réaction immunoallergique retardée en agissant, en particulier, sur la phase de recrutement cellulaire.



En résumé, l'ensemble de nos travaux indique que l'histamine peut être impliquée dans le processus de recrutement leucocytaire de la réaction inflammatoire immunoallergique. Cette intervention se traduit notamment par l'induction de l'expression de la P-sélectine et la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par l'endothélium vasculaire.

Nous avons démontré ici que la Loratadine et la DCL inhibent l'action de l'histamine au niveau des cellules endothéliales. Ceci suggère que la Loratadine et son métabolite actif principal, la DCL, peuvent avoir une activité anti-inflammatoire dans le processus immunoallergique. La Loratadine et la DCL pourraient limiter le recrutement leucocytaire associé aux réactions inflammatoires. Nos résultats suggèrent que l'action de la Loratadine sur les cellules endothéliales puisse être biphasique: dans un premier temps, la Loratadine agirait dans la phase précoce en inhibant l'expression de la P-sélectine puis la DCL, issue du processus de dégradation de la Loratadine, poursuivrait son action dans la phase tardive en inhibant la sécrétion de certaines cytokines impliquées dans le développement et l'amplification de la réaction inflammatoire.

## **II. Interactions entre les cellules endothéliales et les éosinophiles.**

Les données relatives à la pathogenèse de l'asthme mettent très souvent en avant le rôle des cellules inflammatoires telles que les mastocytes, les éosinophiles, les cellules mononucléées et les lymphocytes T activés. Ces cellules sont recrutées vers le site inflammatoire et sont responsables des lésions tissulaires de l'arbre bronchique. Parmi ces populations cellulaires, le polynucléaire éosinophile joue un rôle majeur; il est étroitement associé au degré de sévérité de la maladie (Beasley, 1989; Bousquet, 1990; Corrigan, 1992). Les cellules endothéliales vasculaires participent activement dans la migration cellulaire locale. En effet, elles assurent un rôle de barrière qui régule de manière sélective le transfert de cellules et de fluides entre le sang circulant et les structures tissulaires environnantes. De plus des études ultrastructurales ont mis en évidence, dans la muqueuse bronchique de patients asthmatiques, la

présence d'éosinophiles et de monocytes en contact très étroit avec l'endothélium. Toutes ces données suggèrent que les cellules endothéliales vasculaires pourraient participer activement au développement de la réaction inflammatoire liée à l'asthme. C'est pourquoi nous avons évalué les interactions ayant lieu entre les cellules endothéliales et les éosinophiles.

***PREMIERE PARTIE: expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales.***

Nous avons montré, dans cette étude, que des surnageants d'éosinophiles maintenus en culture étaient capables d'activer les cellules endothéliales et d'induire à leur surface l'expression des molécules d'adhérence telles ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1. Nous avons démontré que les médiateurs éosinophiliques impliqués dans cette activation étaient principalement l'IL-1 $\beta$  et à un degré moindre le TNF $\alpha$ . Nos résultats suggèrent qu'à côté de ces cytokines les protéines cationiques pourraient participer à l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Cette dernière donnée est tout à fait nouvelle et sera discutée dans un des paragraphes suivants.

Le dosage des différents médiateurs (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , ECP) dans les surnageants d'éosinophiles montre qu'il existe de grandes différences de niveaux de sécrétion entre ceux qui ont été collectés après 1 heure et ceux récupérés après 18 heures de culture. Les médiateurs dosés dans les surnageants d'une heure proviennent de la dégranulation des éosinophiles et correspondent donc à des produits préformés et stockés au sein des éosinophiles; en effet une synthèse protéique *de novo* apparaît peu probable pour un temps si court (1 heure). Concernant l'importance des concentrations de ces médiateurs éosinophiliques dans les surnageants de 18 heures, plusieurs mécanismes peuvent être évoqués:

- une synthèse protéique;
- la poursuite du processus de dégranulation des éosinophiles. En effet, les concentrations d'ECP sont fortement accrues par rapport aux surnageants d'une heure;



- une pré-activation *in vivo* des éosinophiles en relation avec le statut pathologique des patients à partir desquels les éosinophiles ont été purifiés. Tous ces sujets présentent des concentrations sériques très importantes d'ECP ( $127,8 \pm 14,8 \mu\text{g/L}$ ; les valeurs normales étant comprises entre 2,3 et 16  $\mu\text{g/L}$ ) et de récepteur soluble pour l'IL-2 ou sIL-2-R ( $3269,1 \pm 601,4 \text{ pg/ml}$ ; les valeurs normales étant comprises entre 500 et 2250  $\text{pg/ml}$ ): ces deux facteurs sont généralement utilisés comme critères d'évaluation pour l'activation des éosinophiles *in vivo* et pour l'existence d'une éosinophilie (Venge, 1988; Prin, 1991).

Nos résultats sont en accord avec des études précédentes ayant démontré la synthèse et la libération de  $\text{TNF}\alpha$ , d'IL-6 et d'IL-8 par les éosinophiles (revu par Moqbel, 1994). Bien que la synthèse d'IL-1 $\alpha$  ait été démontrée, il n'existe pas de données dans la littérature concernant la sécrétion d'IL-1 $\beta$  par les éosinophiles humains. Pourtant nos expériences d'inhibition montrent que l'IL-1 $\beta$  est réellement impliquée dans l'activation des cellules endothéliales (l'utilisation d'anti-IL-1 $\alpha$  ne donnant pas de résultats probants). Le dosage d'IL-1 $\beta$  dans les surnageants d'éosinophiles confirme ce résultat, le taux de cette cytokine étant presque 100 fois supérieur dans les surnageants de 18 heures que dans ceux d'une heure.

L'IL-1 $\beta$  joue un rôle fondamental dans l'initiation de la réaction inflammatoire et dans son "auto-entretien". Cette cytokine est non seulement présente dans l'environnement immédiat du site inflammatoire mais aussi dans la circulation générale. L'IL-1 $\beta$ , comme le  $\text{TNF}\alpha$ , induit la synthèse, par les cellules endothéliales et les macrophages, d'IL-6, de chémokines  $\alpha$  et  $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  permet également l'induction de l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Par conséquent, sa synthèse par les éosinophiles constitue une composante intéressante pour le développement de la réaction inflammatoire.

Le  $\text{TNF}\alpha$ , possède de nombreux points communs avec l'IL-1 $\beta$ , et se présente comme un puissant facteur pro-inflammatoire qui permet d'augmenter la production de PAF par les cellules endothéliales et les monocytes ainsi que la libération de leucotriènes par les granulocytes. Par l'induction de l'expression de diverses molécules d'adhérence et de la synthèse de chémokines, le TNF contribue à la formation d'un infiltrat leucocytaire. Il participe

également à l'épaississement de la sous-muqueuse bronchique observé chez les patients allergiques ainsi qu'à la destruction épithéliale.

L'**IL-6** joue aussi un rôle important dans la régulation de la réponse immune en modulant les fonctions des lymphocytes B et T, et en activant les granulocytes. Elle est également produite par de nombreuses autres cellules comme les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales, les fibroblastes (Kishimoto, 1989a). L'IL-6 induit la vasoperméabilité, la synthèse des protéines de la phase aiguë par les hépatocytes, l'augmentation de l'expression du CD23 à la surface des cellules inflammatoires ainsi que l'apoptose des neutrophiles. L'IL-6 n'apparaît pas être impliquée dans la modulation de l'expression de molécules d'adhérence, ni dans le processus d'infiltration leucocytaire. Toutefois le rôle de l'IL-6 dans la réaction asthmatique semble important dans la mesure où cette cytokine permet d'amplifier le processus de desquamation de l'épithélium (Dunnill, 1982).

L'**IL-8** est produite par de nombreux types cellulaires, généralement ceux qui produisent l'IL-6. Cette cytokine, initialement décrite pour ses propriétés chémoattractantes (Baggiolini, 1989), voit son champ d'action s'élargir, en particulier grâce à ses effets activateurs pour les intégrines leucocytaires.

Le fait que les éosinophiles libèrent ces trois cytokines confirme le rôle de ces cellules dans la réaction inflammatoire, et les taux élevés dosés dans les surnageants de 18 heures suggèrent même qu'ils puissent participer à l'amplification de la réaction. De plus, puisque l'IL-8 est chémoattractante pour les éosinophiles pré-activés (Warringa, 1993), la libération de cette chémokine par des éosinophiles tissulaires pourrait engendrer la formation d'un gradient chimotactique et attirer de nouveaux éosinophiles sur le site inflammatoire. Ceci serait en accord avec notre hypothèse d'autoamplification du recrutement des éosinophiles au sein des tissus. Ce mécanisme "paracrine" pourrait intervenir de façon considérable dans la pathogenèse de certaines maladies comme l'asthme où la participation des éosinophiles est clairement établie.

Nos résultats sont à rapprocher des différentes études menées sur l'adhésion des éosinophiles aux cellules endothéliales. Dobrina et col ont démontré que les éosinophiles adhéraient à des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) stimulées par le

LPS, le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\alpha$  par un mécanisme mettant en jeu l'interaction VLA-4/VCAM-1, l'interaction dépendante de la E-sélectine n'étant pas impliquée. Une autre étude (Ebisawa, 1992), concernant la migration transendothéliale, mettait en évidence que:

- l'activation des HUVEC par de l'IL-1 $\beta$  avait pour conséquence l'induction de l'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1;

- l'interaction du CD11/CD18 des éosinophiles avec l'ICAM-1 endothélial représentait un mécanisme majeur dans le processus de transmigration;

Selon Moser et col, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-4 et le TNF ont toutes en commun la capacité à induire une adhérence pour les éosinophiles qui est dépendante de l'endothélium, alors que seule l'IL-4 serait responsable de la sélectivité d'infiltration des éosinophiles au sein des tissus (Moser, 1992).

En ce qui concerne nos résultats, nous avons voulu vérifier que les quantités de cytokines (TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) évaluées par dosage dans les surnageants d'éosinophiles étaient capables d'induire l'expression des trois molécules d'adhérence étudiées et comparer l'augmentation d'expression induite par les surnageants d'éosinophiles avec les niveaux obtenus par des cytokines recombinantes. La gamme de concentration, pour chacune des deux cytokines, a été réalisée en prenant pour valeur minimale la concentration observée dans les surnageants d'éosinophiles collectés après 1 heure et pour dose maximale la concentration évaluée dans les surnageants collectés après 18 heures. Les capacités d'activation des cellules endothéliales par les surnageants d'éosinophiles ont été comparées à l'action des cytokines recombinantes pertinentes (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ). Les résultats montrent que l'augmentation d'expression induite par les cytokines recombinantes humaines (hr) est moins importante que celle engendrée par les surnageants (par exemple, le hrTNF (Genzyme) à la concentration de 160pg/ml et le hrIL-1 $\beta$  (Genzyme) à la concentration de 200pg/ml induisent respectivement 97% et 141% d'augmentation d'expression pour l'ICAM-1 contre 233% pour les surnageants. L'association des deux cytokines ne permet pas non plus d'atteindre ce niveau; ce qui suggère l'intervention de médiateurs autres que l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  dans l'activation endothéliale par les surnageants d'éosinophiles.

Nos résultats laissent supposer que les protéines cationiques libérées par les éosinophiles puissent être en partie responsables de l'induction de l'expression de certaines molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. Cet effet inducteur semble être restreint à la E-sélectine et au VCAM-1 dont la surexpression sur les cellules endothéliales a été mise en cause dans l'infiltration sélective des éosinophiles. Ceci conforte notre hypothèse impliquant une éventuelle boucle de recrutement spécifique de type cellulaire (en particulier les éosinophiles) par l'intermédiaire d'une amplification de l'activation endothéliale. La littérature ne fournit aucune donnée concernant l'effet des protéines cationiques d'éosinophiles sur l'activation des cellules endothéliales. Par contre diverses études rapportent que la MBP et l'EPO sont capables d'activer certaines cellules associées à l'inflammation comme les éosinophiles (Kita, 1995), les basophiles, les plaquettes et les neutrophiles (O'Donnell, 1983; Rohrbach, 1990; Moy, 1990). Dans une étude réalisée par Altman en 1993, il a été montré que l'ECP et la MBP purifiées ne modulaient pas l'expression de l'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales mais l'expression de la E-sélectine et du VCAM-1 n'avait pas été envisagée. Il apparaît dans notre étude que ce sont ces deux molécules qui seraient préférentiellement induites par les protéines cationiques plutôt que l'ICAM-1. La preuve directe d'une éventuelle participation des protéines cationiques des éosinophiles dans l'activation endothéliale aurait été l'utilisation de protéines recombinantes ou purifiées, malheureusement, ces produits n'étant pas commercialisés, il nous a été impossible d'argumenter davantage nos résultats.

La relative non spécificité du gel d'héparine indique la retenue possible d'autres médiateurs chargés positivement, comme par exemple les chémokines, qui pourraient également participer à l'activation endothéliale. En effet ces molécules chémoattractantes activent les intégrines leucocytaires en augmentant leur affinité dans les processus d'adhésion. Nous avons donc testé l'effet de trois chémokines recombinantes humaines, à différentes concentrations, sur l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales:

- IL-8 (R&D systems) de 2 à 500 ng/ml;
- RANTES (R&D systems) de 25 à 500 ng/ml;
- MCP-1 (R&D systems) de 10 à 100 ng/ml.`

Nos résultats montrent clairement que ces chémokines n'ont aucune activité sur la cellule endothéliale, en particulier sur la capacité d'induction de l'expression des molécules d'adhérence endothéliales précédemment citées (résultats non présentés).

L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation de protéines natives (récupérées dans les surnageants cellulaires) au lieu de protéines recombinantes comme cela est réalisé dans les nombreuses études analysant les processus d'adhésion des éosinophiles aux cellules endothéliales. Les résultats obtenus avec les surnageants d'éosinophiles montrent que les expériences d'inhibition avec les anticorps neutralisant anti-cytokines ne permettent pas d'inhiber à 100% l'action de ces surnageants. De plus, la modélisation de l'effet des surnageants avec les cytokines recombinantes aux doses correspondantes ne permet pas non plus de reproduire exactement les résultats obtenus avec les surnageants d'éosinophiles. Ceci suggère l'intervention d'autres médiateurs. Nous avons, en particulier, mis en évidence la participation des protéines cationiques qui semblent agir de manière additive avec le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . En effet:

- les concentrations de ces médiateurs évaluées dans les surnageants d'éosinophiles sont inférieures à celles fréquemment utilisées dans les expériences d'activation de cellules endothéliales dans le cadre d'un système de transmigration endothéliale;

- l'inhibition de l'induction de l'expression d'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 a clairement été démontrée par la déplétion des surnageants éosinophiles en IL-1 $\beta$  (pour les trois molécules d'adhérence étudiées), en TNF $\alpha$  (uniquement pour la E-sélectine) et en protéines cationiques (pour la E-sélectine et le VCAM-1 préférentiellement). Bien que l'adhésion des éosinophiles aux cellules endothéliales n'ait pas été abordée dans notre système, nos résultats supportent fortement l'hypothèse selon laquelle les éosinophiles libèrent des médiateurs qui pourraient faciliter leur adhésion et/ou leur transmigration à travers l'endothélium dans la mesure où ils amplifient considérablement l'expression de l'ICAM-1, la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales. De plus ce processus semble être spécifiquement attribué aux polynucléaires éosinophiles puisque, dans les mêmes conditions

expérimentales, les neutrophiles n'ont engendré aucune modulation d'expression des trois molécules d'adhérence endothéliales étudiées.

Nos résultats concernant la stimulation des éosinophiles semblent être en contradiction apparente avec les données de la littérature. En effet, Baskar et col montrent que les éosinophiles stimulés par l'IgG ou l'IgE fixées sur des billes de sépharose sont capables de libérer de manière similaire des enzymes comme la glucuronidase  $\beta$  et l'arylsulfatase (Baskar, 1990). D'autres auteurs montrent, dans un modèle très proche, que seuls les IgG immobilisés sur un support solide induisent la sécrétion d'EDN par les éosinophiles (Abu-Ghazaleh, 1989; Kaneko, 1995a). Ces données semblent converger avec celles obtenues par Kaneko et col qui démontrent que la dégranulation des éosinophiles par l'IgG n'est efficace que si et seulement si l'IgG de surface se complexe avec un anticorps anti-IgG non soluble (Kaneko, 1995b). Par ailleurs il a été aussi démontré que l'ECP était libérée par l'éosinophile stimulé par l'IgG (Tomassini, 1991). En ce qui concerne la stimulation des éosinophiles par des complexes à IgE, les données publiées indiquent une sécrétion d'EPO induite par l'IgE mais pas de sécrétion d'ECP (Khalife, 1986; Tomassini, 1991).

Nos résultats indiquent au contraire que, sous l'action de l'IgE, l'éosinophile libère des quantités augmentées d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, d'IL-8 et d'ECP. Il est peu probable, dans ce système, que l'IgG soit, impliquée et ce pour plusieurs raisons:

- 1) les éosinophiles issus de patients allergiques expriment de l'IgE à leur surface (Capron, 1985). En présence d'anti-IgE, les éosinophiles sont stimulés;
- 2) le même niveau d'activation est obtenu lorsque les éosinophiles sont incubés avec un anti-Fc $\epsilon$ R2;
- 3) l'anti-IgE utilisé est, en théorie, incapable de réaction croisée avec l'IgG (selon les recommandations du fournisseur).

Ces arguments expérimentaux supportent l'hypothèse d'un engagement réel de la voie d'activation dépendante de l'IgE dans notre modèle.

L'hypothèse de sous-populations d'éosinophiles exprimant de manière différente le FcεR a été avancée pour expliquer les résultats a priori discordants (Capron, 1981; Abu-Ghazaleh, 1989). Dans ce sens, il a été montré que les éosinophiles, purifiés à partir du sang de patients présentant un syndrome hyperéosinophilique, sont hétérogènes en terme de densité et présentent une augmentation de l'expression de certains marqueurs de surface. Chez ce type de patients, la proportion d'éosinophiles exprimant le FcεRII est significativement plus élevée alors que la proportion d'éosinophiles exprimant le FcγR n'est pas modifiée (Capron, 1981). Cependant, dans notre travail, les sous-populations d'éosinophiles n'ont pas été étudiées.

Les patients qui ont été sélectionnés pour notre étude présentaient une éosinophilie circulante moyenne de 25,1%. La majorité de ces patients était atteinte d'un syndrome hyperéosinophile. Ce qui suggère l'existence d'un FcεR fonctionnel à la surface des éosinophiles étudiés et, par voie de conséquence, une aptitude à être stimulés par l'IgE, ce que nous avons constaté dans notre travail.

Finalement, nos résultats apparaissent être convergents avec les données de la littérature. Les différences de réactivité vis-à-vis de l'IgE ou de l'IgG qui ont été constatées apparaissent plutôt liées au type même de patients recrutés (syndrome hyperéosinophile, maladie parasitaire, asthme allergique, pneumonie chronique à éosinophile, angéite de Churg-Strauss...).

### ***DEUXIEME PARTIE: sécrétion de cytokines par les cellules endothéliales.***

Nous avons montré, dans notre étude, que des surnageants d'éosinophiles maintenus en culture étaient capables d'activer les cellules endothéliales et d'augmenter considérablement la sécrétion spontanée de cytokines telles l'IL-6, l'IL-8 et le MCP-1. Nous avons mis en évidence l'implication de différents médiateurs éosinophiliques (IL-1β, TNFα, protéines cationiques) dans cette libération endothéliale de cytokines. Le dosage d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 dans les surnageants d'éosinophiles montrent que ces cytokines peuvent également être relarguées par



les éosinophiles. Cependant les quantités libérées par ces cellules apparaissent être minimales par rapport à la sécrétion endothéliale. L'exemple le plus frappant concerne le MCP-1, dont les concentrations sont de l'ordre du pg/ml dans les surnageants d'éosinophiles et de l'ordre du ng/ml dans les surnageants de cellules endothéliales soit 1000 fois plus.

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature concernant la synthèse et la libération d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales.

L'**IL-6** est l'une des principales cytokines proinflammatoires. Son importance dans la réaction asthmatique est imputée à l'amplification du processus de desquamation de l'épithélium bronchique qu'elle génère. De plus, l'IL-6 est capable de médier la croissance, la différenciation et l'activation des lymphocytes T, cellules participant amplement à la réaction inflammatoire immunoallergique.

Les deux chémokines que nous avons dosées dans les surnageants de cellules endothéliales non stimulées ou stimulées par les surnageants d'éosinophiles appartiennent à des familles différentes: l'IL-8 à la famille des chémokines  $\alpha$  et le MCP-1 à la famille des chémokines  $\beta$ . Il a été démontré que l'**IL-8** était plutôt chimotactique pour les neutrophiles et les lymphocytes, cependant des expériences montrent qu'*in vitro* elle est également capable d'attirer les basophiles et les éosinophiles préalablement activés. De plus, l'IL-8 possède d'autres fonctions comme celles d'activer les intégrines leucocytaires permettant aux leucocytes d'adhérer à l'endothélium. L'IL-8 influence également la libération de certains médiateurs par différents types cellulaires: sous l'action de l'IL-8, les basophiles régulent la sécrétion de l'histamine alors que les neutrophiles libèrent des enzymes de dégradation et des dérivés métaboliques de l'oxygène toxiques pour le tissu environnant. On peut noter que l'IL-8 est une chémokine qui apparaît relativement tard lors de la réponse inflammatoire (à partir de 3h jusque 24h) en comparaison avec d'autres molécules chémoattractantes comme le LTB<sub>4</sub> (quelques minutes à 3h). Comme l'IL-8, le **MCP-1** possède la capacité à activer les intégrines leucocytaires et en particulier le CD11b/CD18 et CD11c/CD18 à la surface des monocytes. Ces mêmes cellules peuvent être amenées à libérer, sous l'action du MCP-1, (i) des enzymes lysosomiales; (ii) des dérivés métaboliques de l'oxygène; (iii) des cytokines pro-



inflammatoires telles l'IL-1 et l'IL-6, qui ont pour conséquence l'amplification du processus inflammatoire. Le MCP-1 constitue également le plus puissant facteur de libération d'histamine pour les basophiles.

Les cellules endothéliales jouent un rôle actif et majeur dans l'initiation et la régulation des réponses inflammatoires et immunes. A travers la production de cytokines et de chémokines, elles attirent les leucocytes et activent leurs récepteurs. Alors que les monocytes, les lymphocytes et les cellules NK présentent une migration spontanée à travers les cellules endothéliales non stimulées, les neutrophiles et les éosinophiles requièrent des stimuli chimotactiques et/ou une activation des cellules endothéliales. Ceci a pour conséquence l'ancrage des leucocytes aux molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales, adhésion généralement suivie par la migration des leucocytes. La régulation de l'infiltration leucocytaire dans les tissus inflammatoires par les cellules endothéliales s'exerce notamment par la libération de cytokines. Ces molécules sont des protéines sécrétées qui participent au développement de la réponse inflammatoire. Elles sont impliquées dans chaque facette de la réaction inflammatoire immunoallergique (présentation de l'antigène, différenciation des cellules de la moelle osseuse, recrutement cellulaire, expression et activation des molécules d'adhérence). Les cytokines particulières qui sont produites en réponse à une agression détermineront la nature de la réponse immune. Cependant la littérature met clairement en évidence la redondance qui existe dans les variétés des sources cellulaires et le champ d'action des activités biologiques pour chaque cytokine. Ceci s'avère être particulièrement exacte pour les chémokines, qui sont classées selon des homologies structurales. Au niveau de leur activité biologique, on décrit des tendances à attirer un type cellulaire plutôt qu'un autre. Toutefois, l'éotaxine humaine, chémokine spécifique des éosinophiles ayant été découverte très récemment chez l'homme, semble être pour le moment l'exception.

Par conséquent l'augmentation considérable de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1 par les cellules endothéliales activées par des surnageants d'éosinophiles laisse supposer que les

éosinophiles incitent leur cellules cibles (ici les cellules endothéliales) à produire et sécréter davantage de médiateurs proinflammatoires qui ont pour but l'entretien, l'amplification et la pérennisation de l'inflammation. Cette libération accrue de chémokines par les cellules endothéliales pourrait refléter le système DARC. L'action pro-inflammatoire des chémokines par fixation de celles-ci sur DARC s'accompagne d'un phénomène d'inhibition par déactivation de ces mêmes cytokines en phase soluble.

### **III. Etude de la régulation d'ESM-1, une nouvelle molécule spécifique des cellules endothéliales humaines.**

Nos résultats indiquent que l'expression d'ESM-1, une nouvelle molécule spécifique des cellules endothéliales humaines, est régulable *in vitro* aux niveaux transcriptionnel et traductionnel par des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$ ) impliquées dans la réaction inflammatoire immunoallergique. La particularité de la régulation d'ESM-1 par les cytokines réside dans l'action inhibitrice de l'IFN $\gamma$  sur la production spontanée et la production induite par le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ . Ceci pourrait conférer à cette nouvelle molécule, dont on ignore encore la fonction, un rôle majeur dans l'inflammation locale. ESM-1 pourrait être impliquée dans la phase tardive de la réaction inflammatoire comme le suggère les quantités accrues d'ESM-1 dosées dans les surnageants de culture de 24 et 48 heures. Cependant sa participation dans les temps précoces de la réaction inflammatoire n'est pas à exclure, à en juger par la redistribution cellulaire d'ESM-1 observée dès la 4<sup>ème</sup> heure de culture en présence de TNF $\alpha$ .

# *Perspectives*

## D. Perspectives

La réaction inflammatoire immunoallergique met en jeu des mécanismes d'une extrême complexité encore non élucidés. Les travaux menés au cours de cette thèse ont pour but d'explorer de nouveaux mécanismes d'interactions cellulaires ayant lieu lors de la réaction inflammatoire immunoallergique et mettant en jeu la cellule endothéliale. Il est clairement établi que l'endothélium vasculaire joue un rôle majeur lors de la réaction inflammatoire en fonctionnant comme une véritable interface régulatrice entre le sang et les tissus environnants. Certaines populations cellulaires comme les mastocytes et les éosinophiles ont également une place privilégiée dans l'initiation et le développement de la réaction inflammatoire immunoallergique. La coordination des activations et mouvements cellulaires est sous l'influence de nombreux facteurs (molécules d'adhérence, cytokines, chémokines, leucotriènes...).

La première partie de nos recherches a consisté à approfondir et élargir nos connaissances dans l'étude des interactions entre les cellules endothéliales et l'un des principaux médiateurs mastocytaires relargués: l'histamine. Nous avons démontré que l'implication du mastocyte, généralement attribuée à la phase immédiate de la réaction allergique, pouvait s'étendre à la phase tardive en incitant la cellule endothéliale à exprimer la P-sélectine, l'IL-6 et l'IL-8. La démonstration que l'anti-histaminique testé (la Loratadine) ainsi qu'un de ses métabolites actifs (la DCL) soient efficaces dans l'inhibition de l'activation endothéliale dépendante de l'histamine laisse peut-être entrevoir de nouvelles possibilités d'utilisation de cet anti-histaminique en thérapeutique. La Loratadine, par son effet anti-histaminique, inhibe l'action proinflammatoire de l'histamine sur la cellule endothéliale. De fait, la Loratadine possède une activité anti-inflammatoire dans le traitement des maladies allergiques. De plus, il est important d'avoir à l'esprit que la Loratadine agit dans un premier temps sous sa forme primaire et que dans un second temps, un des métabolites issu de sa dégradation (DCL) pourra également exercer une action anti-histaminique (action qui s'avère être *in vitro* plus efficace que celle de la molécule mère). Cette dualité d'action de l'anti-histaminique peut avoir de

l'importance dans le traitement des patients allergiques, et en particulier dans un éventuel allègement de la médication anti-histaminique.

En conclusion, nos résultats suggèrent, pour certains anti-histaminiques, de nouvelles activités anti-inflammatoires, intéressantes pour le traitement au long cours des maladies allergiques.

La deuxième partie intéressante issue de nos travaux suggère que, à côté du rôle effecteur du polynucléaire éosinophile, celui-ci peut jouer un rôle régulateur en favorisant, par l'intermédiaire de l'endothélium vasculaire, le recrutement d'autres éosinophiles. Cette boucle de "pararecrutement" sélectif de type cellulaire serait médiée non seulement par les cytokines mais aussi par les protéines cationiques libérées au contact ou à distance de l'endothélium vasculaire. Les médiateurs induisent à la surface des cellules endothéliales l'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 qui, à leur tour, vont favoriser l'adhésion et le recrutement cellulaire.

Les résultats obtenus lors de notre étude sur les interactions entre les cellules endothéliales et les éosinophiles nous invitent à poursuivre nos investigations. En effet il semble très intéressant de confirmer mais surtout de préciser le rôle éventuel de chaque protéine cationique éosinophile (ECP, EDN, EPO et MBP) sur (i) l'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales; et sur (ii) la sécrétion de cytokines et chémokines par les cellules endothéliales. Ceci implique l'isolement et la purification de chacune de ces protéines cationiques afin de les tester, vis-à-vis des cellules endothéliales, seules ou associées (entre elles ou avec des cytokines connues pour activer les cellules endothéliales comme le TNF, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-4 ou encore IL-13). Parmi les quatre protéines cationiques à étudier, l'ECP et la MBP semblent être potentiellement les plus intéressantes si l'on se réfère à la littérature concernant leur action activatrice sur d'autres types cellulaires. La mise en évidence du rôle activateur de l'une (ou de plusieurs) de ces protéines cationiques sur l'expression de molécules d'adhérence et/ou la sécrétion de cytokines par les cellules endothéliales nous amènera à comparer les cinétiques d'apparition de ces différents facteurs par rapport à celles décrites avec les stimuli classiques de la cellule endothéliale (TNF,

IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-4). Il sera également intéressant de pouvoir apprécier ces phénomènes au niveau moléculaire en évaluant la synthèse des ARN messagers codant pour les différents facteurs étudiés (molécules d'adhérence et cytokines). Par ailleurs il est souhaitable de confirmer l'éventuelle action de telle ou telle protéine cationique par un test d'inhibition spécifique (anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux) ou non spécifique (héparine). Ces différentes investigations pourront aboutir à une étude plus fonctionnelle du rôle éventuel des protéines cationiques dans les processus de migration transendothéliale: ainsi l'adhésion puis la migration de granulocytes éosinophiles et/ou neutrophiles à travers une monocouche de cellules endothéliales stimulées par une protéine cationique pourront être envisagées. L'ensemble de ces résultats devra nous permettre de répondre de manière plus précise à notre hypothèse initiale formulée sur l'idée que les éosinophiles seraient capables de favoriser leur propre recrutement tissulaire en activant l'endothélium vasculaire.

Il a été décrit dans la revue générale de ce manuscrit que la cellule endothéliale exprime le CD40 *in vitro*, sous l'action des stimuli classiques comme le TNF, l'IL-1, l'IFN ou le LPS, et *in vivo*. Lorsqu'il s'associe à son ligand (gp39 ou CD40L), le CD40 est capable d'induire une augmentation de l'expression de l'ICAM-1, de la E-sélectine et du VCAM-1 (Karmann, 1995; Hollenbaugh, 1995; Yellin, 1995). De plus, la stimulation des cellules endothéliales par la gp39 soluble entraîne une augmentation de l'adhésion des polynucléaires neutrophiles à la surface des cellules endothéliales (Hollenbaugh, 1995). Si l'on ajoute à ces informations le fait que les éosinophiles activés expriment également le CD40L (Gauchat, 1995), il semble fort intéressant de rapporter ces données à notre modèle. Il semble intéressant d'étudier les coopérations entre les cellules endothéliales et les éosinophiles. Les éosinophiles n'expriment le CD40L que s'ils ont été préalablement activés. Néanmoins dans le cas d'éosinophiles purifiés à partir du sang de patients présentant un syndrome hyperéosinophile (HES), le CD40L est exprimé constitutivement à la surface des éosinophiles reflétant ainsi une probable activation de ces cellules *in vivo* (Gauchat, 1995). Comme cela a été réalisé dans notre étude pour la sécrétion de cytokines, il conviendrait de comparer les niveaux d'expression du CD40L à la surface d'éosinophiles de différentes origines (HES, asthme, pneumonie chronique à éosinophiles...)

afin de déterminer si il existe une éventuelle corrélation entre la pathologie et l'ampleur de l'expression du CD40L.

Compte tenu des nouvelles informations concernant la molécule d'adhérence endothéliale PECAM-1 ou CD31 (redistribution cellulaire et modifications transcriptionnelles sous l'effet de cytokines, implication dans les processus de transmigration leucocytaire, renforcement du rôle de "barrière" de l'endothélium), il serait souhaitable d'étudier cette molécule au même titre que les molécules d'adhérence endothéliales classiques (ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1).

La mise en évidence de l'homologue humain de l'éotaxine, chémokine qui semblerait agir spécifiquement sur le polynucléaire éosinophile, laisse entrevoir de nouveaux champs d'investigation. En effet, le gène codant pour l'éotaxine humaine vient d'être cloné et il a été établi que la cellule endothéliale représente l'une des principales sources cellulaires. En effet l'accumulation d'ARNm codant pour l'éotaxine a été mise en évidence dans les cellules endothéliales humaines stimulées par différentes cytokines. Toutes ces données nous permettent, dans notre modèle, d'évaluer la transcription du gène codant pour l'éotaxine, par les cellules endothéliales humaines activées par des surnageants d'éosinophiles et, par la suite, l'identification du médiateur éosinophilique principalement responsable de cette activation.

La troisième partie de notre travail concerne la mise en évidence d'une nouvelle molécule appelée ESM-1 qui s'exprime spécifiquement dans les cellules pulmonaires humaines et dont l'expression est régulée par les cytokines. Le rôle de cette molécule dans la réaction inflammatoire immunoallergique peut être évoqué et mérite d'être exploré. De plus l'utilisation d'outils tels que les anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-ESM-1, actuellement à notre disposition, nous amènera à étudier l'expression d'ESM-1 dans les tissus humains normaux et pathologiques par des techniques d'immunohistochimie. Le but de cet investigation réside principalement dans l'observation d'une éventuelle modification de l'expression d'ESM-1 dans

les tissus humains pathologiques. Parmi les modèles pathologiques à explorer, les asthmes et les pathologies caractérisées par des infiltrats cellulaires importants seront privilégiés.

En conclusion, la réalisation de toutes ces perspectives devrait nous permettre de préciser la signification de la participation de la cellule endothéliale dans le développement de la réaction inflammatoire en pathologie immunoallergique.



*Matériel*

*et*

*Méthodes*

## *E. Annexe (Materiel et Methodes)*

### **I Techniques utilisées dans l'étude de la Loratadine sur l'activation, dépendante de l'histamine, de la cellule endothéliale.**

#### **1. Histamine et anti-histaminiques.**

L'histamine est pesée et mise en suspension dans le milieu RPMI 1640 (Gibco). Les solutions d'histamine sont préparées extemporanément.

Les anti-histaminiques nous ont été fournis par les laboratoires Schering-Plough (Levallois-Perret) et correspondent à la Loratadine et à son métabolite actif, la déséthoxycarboxyloratadine (DCL). Ces deux composés sont des antagonistes des récepteurs H1 pour l'histamine. La Loratadine est dissoute dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). La concentration finale de DMSO dans la solution de Loratadine la plus concentrée est de 0,005 % et n'affecte pas l'activation cellulaire. La DCL est dissoute dans le milieu RPMI.

#### **2. Culture de cellules endothéliales.**

##### *• isolation et culture:*

Les cellules endothéliales (CE) sont issues d'un cordon umbilical humain (Jaffe, 1973; Gimbrone, 1974). Après cathétérisation, une solution de collagénase à 0,2 % (type IV, Sigma) en RPMI est injectée et laissée à l'intérieur de la veine pendant 15 minutes, temps nécessaire au détachement des CE de la matrice sous-endothéliale. Les cellules sont récupérées après centrifugation (700 g, 10 minutes), lavées dans le milieu RPMI puis remises en suspension dans le milieu de culture ci-defini:

RPMI.1640 supplémenté en - 20 % de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF)  
(Gibco)  
- 2 mM de L-Glutamine  
- 25 µg/ml de "facteur de croissance" pour cellules  
endothéliales (extraits hypophysaires de bœuf) (Sigma)  
- 100 µg/ml d'héparine  
- 100 U/ml de pénicilline  
- 10 µg/ml de streptomycine

La primo-culture des cellules endothéliales se fait en plaques de culture 6 puits préalablement gélatinés avec une solution de gélatine 0.5 % en eau physiologique (1 ml par puits pendant 1h à 37°C). La culture s'effectue dans une étuve à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. La confluence cellulaire est généralement atteinte au bout d'une semaine. Les cellules sont alors décollées grâce à une solution de versen-trypsine à 0,5 %. Au deuxième ou troisième passage, les cellules sont réparties à la concentration de 10<sup>4</sup> cellules par puits en plaque de 96 puits également gélatinés (100 µl/puits). La confluence est atteinte en 4 à 6 jours. Pour les études d'expression d'ARN messagers, l'expansion des cultures se fait en plaques 6 puits gélatinés. Toutes les expériences sont réalisées avec des CE à confluence dont le milieu vient d'être changé.

• *stimulation:*

A confluence, les CE sont lavées en milieu RPMI puis incubées avec les solutions de Loratadine ou de DCL à différentes concentrations. Par des expériences préalables, nous avons défini les périodes optimales de pré-incubation des CE avec les anti-histaminiques, ainsi elles sont de:

- 1h lorsque l'évaluation de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des CE est envisagée;
- 3h quand la sécrétion d'interleukines est étudiée.

Les CE sont ensuite incubées avec différentes concentrations d'histamine pour une période de 10 minutes (P-sélectine) ou de 24h (sécrétion d'interleukines). Les surnageants de culture sont collectés après 24 heures et conservés à -20°C pour le dosage des interleukines alors que, pour

l'évaluation de l'expression des molécules d'adhérence, les cellules sont lavées deux fois en PBS 0,1 M pH 7,4, fixées (10 min à 4°C en glutaraldéhyde 0,05 % - PBS) puis lavées deux fois en PBS - sérumalbumine bovine (BSA) 0,1 % - EDTA 5 mM.

### **3. Evaluation de l'expression de la P-sélectine par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).**

L'évaluation de la modulation d'expression de la P-sélectine est réalisée sur cellules fixées selon la méthode décrite par Pober en 1986. Une fois fixées, les cellules endothéliales sont saturées par le tampon PBS-BSA-EDTA (précédemment décrit) une nuit à 4°C ou 1h à température ambiante. Ensuite les CE sont incubées pendant 1h à température ambiante en présence d'une solution d'anticorps monoclonal anti-P-sélectine (Becton Dickinson), à la concentration de 1,4 µg/ml en PBS-BSA-EDTA et à raison de 100 µl/puits. Cette période écoulée, la plaque est lavée deux fois par ce même tampon et incubée, dans les mêmes conditions de temps et de température, avec la solution d'anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase (Diagnostics, Pasteur), à la concentration de 0,5 µg/ml en PBS-BSA-EDTA et à raison de 100 µl/puits. Après deux lavages en PBS-BSA-EDTA puis un lavage en PBS seul, 100 µl d'une solution de citrate à 0,1 M pH 5 contenant 0,4 mg/ml d'o-phenylènediamine et 0,03 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (additionnés de façon extemporanée) sont ajoutés dans chaque puits, et ceci de manière à révéler les anticorps fixés aux CE. La réaction de coloration est stoppée par l'ajout de 100 µl d'HCl 4N par puits. La densité optique (DO) est lue à 492 nm. Toutes les analyses ont été faites en triple.

### **4. Dosage des interleukines.**

La production d'IL-6 et d'IL-8 dans les surnageants de CE a été quantifiée par des tests ELISA (CLB, Amsterdam) selon les recommandations du fabricant. Les résultats sont exprimés en pg/ml pour l'IL-6 et en ng/ml pour l'IL-8.

**5. Evaluation de l'expression de l'ARN messenger codant pour l'IL-8:**  
**utilisation d'une technique d'amplification génique par rétrotranscription**  
**(RT-PCR) semi-quantitative.**

- *rétrotranscription des ARN messagers (ARNm) en ADN complémentaires (ADNc):*

Les cellules endothéliales ont été pré-incubées 3h avec la Loratadine ou la DCL avant d'être stimulées 4h par une solution d'histamine  $10^{-4}$  M, ces différentes incubations se déroulant à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont lysées par un tampon d'isothiocyanate de guanidium (tampon GT) et l'ARN cellulaire total ainsi récupéré est purifié sur un coussin de chlorure de césium (ultracentrifugation de 18h à 35000 t/min et 22°C). L'ARN se retrouve sous la forme d'un culot qui est ensuite lavé deux fois par une solution d'éthanol 70 % en eau pour préparation injectable (EPPI). L'ARN ainsi purifié est dissous dans 32 µl d'EPPI contenant 2 µl de RNasin. La rétrotranscription s'effectue sur un volume correspondant à 1 µg d'ARN auquel sont ajoutés les produits suivants:

- amorces oligodT à 1 mg/ml (Boehringer)	2 µl
- RNasin à 4 U/µl (Promega)	2 µl
- EPPI	qsp 18 µl

Cette nouvelle solution est laissée 5 minutes à 72°C puis 5 minutes dans la glace avant que ne

soit ajouté le mélange suivant:	- RNasin à 4 U/µl	2 µl
	- ARNt d' <i>E.coli</i> à 1mg/ml	2 µl
	- tampon 5X (Perkin Elmer)	10 µl
	- dithiothréitol (DTT) à 0,1 M (Gibco BRL)	2 µl
	- MMLV-transcriptase reverse (mouse moloney leukemia virus, Gibco BRL) à 200 U/µl	2 µl
	- dNTP (Pharmacia) à 10 mM	10 µl

L'ensemble est incubé 1h à 42°C puis chauffé 5 min à 95°C. La solution finale correspond à 50 µl d'ADNc qui peuvent être utilisés de suite pour les expériences de PCR ou conservés à -20°C en attendant cette étape.

• *amplification d'ADNc spécifiques:*

Les expériences de PCR ont été réalisées pour deux marqueurs: l'IL-8 humaine et la GAPDH (6 glyceraldéhyde phosphodéhydrogénase). Le gène codant pour la GAPDH est un gène dit domestique (housekeeping gene) dans la mesure où il est exprimé constitutivement dans toute cellule et que son expression n'est pas modulable. Pour ces raisons, la GAPDH est considérée comme témoin interne des expériences de PCR et sert de référence pour ajuster les volumes d'ADNc prélevés pour chaque condition. Les amorces spécifiques utilisées pour amplifier les ADNc de la GAPDH (Eurogentec) et de l'IL-8 (Eurogentec) sont les suivantes:

**GAPDH:** amorce en 5': GTCTTCACCACCATGGAGA  
amorce en 3': CCAAAGTTGTCATGGATGACC

**IL-8:** amorce en 5': TTGGCAGCCTTCCTGATT  
amorce en 3': AACTTCTCCACAACCCTCTG

La réaction d'amplification se fait dans un volume final de 25 µl par tube renfermant:

- tampon 10X (Perkin Elmer)	2,5 µl
- dNTP (dATP 2 mM, dTTP 1,9 mM, dCTP 2 mM, dGTP 2 mM, Pharmacia)	1,25 µl
- digoxigenin-11-dUTP (Boehringer) à 0,1 mM	0,5 µl
- mélange (1:1) des amorces 3' et 5'	1,25 µl
- Taq polymérase (Perkin Elmer) à 1,25 U/µl	0,5 µl
- MgCl <sub>2</sub> (Perkin Elmer) à 25 mM	2,5 µl
- ADNc dilué au 1/10 <sup>ème</sup> en EPPI	16,5 µl

Toutes ces étapes se déroulent dans la glace puis les tubes sont placés dans le thermocycler (cyclone integra biosciences) pour la PCR proprement dite, cette dernière se décomposant en trois parties:

- 1) l'étape de dénaturation: à 94°C pendant 1 min;
- 2) l'étape d'hybridation: à 55°C pendant 1 min afin de permettre aux amorces de s'apparier au premier brin d'ADNc;
- 3) l'étape d'élongation: elle a lieu à 72°C pendant 1 min.

Ces trois étapes constituent un cycle de PCR. La première étape peut être précédée d'une première dénaturation (2 min à 94°C); de même la troisième étape est généralement suivie d'une élongation terminale (7 min à 72°C). La GAPDH et l'IL-8 ont été étudiées conjointement et ont nécessité 19 cycles d'amplification. Le nombre de cycles a été préalablement défini pour chaque marqueur par des expériences de cinétique faisant à la fois varier la concentration d'ADNc à amplifier et le nombre de cycles d'amplification. Après électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % - Bromure d'éthidium, les produits de PCR sont transférés sur une membrane de nylon (Boehringer) par capillarité et sur la nuit. Après transfert, la membrane est séchée puis fixée sous les UV. Les ADNc sont révélés par l'intermédiaire d'un anticorps anti-digoxygénine marqué à la phosphatase alcaline et un système de chimioluminescence (CDP-star, Boehringer). La densité optique de chaque bande est lue sur ordinateur équipé du logiciel Bio-profil (Vilber Lourmat). Les résultats de l'IL-8 sont exprimés comme le pourcentage de la densité optique obtenue pour la bande de GAPDH correspondante.

## **6. Analyse statistique.**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (erreur standard à la moyenne) pour l'expression de la P-sélectine et la production des cytokines. Le pourcentage d'inhibition correspond à la formule suivante:

$$\frac{(A-M) - (H-M)}{(H-M)} \times 100$$

où

**A**= CE stimulées par l'histamine en présence d'anti-histaminique;

**M**= CE en milieu seul (niveau de base);

**H**= CE stimulées par l'histamine seule.

Le test *t* de Student pour données appariées a été utilisé afin d'analyser l'effet des anti-histaminiques (les données obtenues en l'absence et en la présence du produit ont été comparées). Les valeurs de *p* inférieures à 0,05 sont considérées comme étant significatives.

## **II Techniques utilisées dans l'étude des interactions entre les cellules endothéliales et les éosinophiles.**

### **1. Purification des éosinophiles.**

Les éosinophiles humains sont purifiés à partir du sang périphérique de patients présentant une éosinophilie supérieure à 5 % (5 à 60 %) en association avec un asthme (n=4), une pneumonie chronique à éosinophiles (PCE) (n=6), une angéite de Churg - Strauss (n=1) ou un syndrome hyperéosinophile (HES) (n=10). La technique de purification employée est basée sur celle décrite par Hansel en 1991 à laquelle nous avons apporté quelques modifications. Cette méthode consiste à effectuer une séparation cellulaire dans un champ magnétique par l'intermédiaire de billes recouvertes d'un anticorps, spécifique d'une ou de plusieurs populations cellulaires données. Dans notre cas, le marqueur utilisé pour isoler les éosinophiles du reste des granulocytes est l'anti-CD16, anticorps dirigé contre le récepteur de faible affinité pour l'IgG et exprimé principalement sur les neutrophiles, les cellules NK (natural killer) et les macrophages. Notre préparation sera donc déplétée en cellules CD16<sup>+</sup>.



Le sang est collecté par véniponction sur 0,2 M de calciparine (anticoagulant), dilué de moitié dans le milieu RPMI et déposé sur un coussin de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Après une centrifugation de 30 min (à 400 g et à température ambiante), les cellules mononucléées se situant à l'interface entre le Ficoll et le plasma sont éliminées alors que les granulocytes (neutrophiles et éosinophiles) sont collectés au fond du tube avec les hématies. Ce culot "polynucléaires-hématies" est dilué de moitié dans le plasma et cette suspension est mise à sédimenter sur une solution de dextran à 3 % dans de l'eau physiologique (tube incliné à 45°C pendant 30 min et à température ambiante) (méthode de Boyum, 1964). Le surnageant est récupéré par centrifugation et les hématies contaminantes sont éliminées par 1 à 3 chocs hypotoniques (NaCl 0,2 % pendant 30 sec puis addition de NaCl 1,6 %). A partir de cette étape toutes les manipulations doivent se faire au froid et avec des solutions conservées à 4°C.

Les éosinophiles et les neutrophiles sont ensuite lavés (7 min à 700 g) dans le tampon utilisé pour la séparation cellulaire à savoir du PBS contenant 0,5 % de BSA et 5 mM d'EDTA. Les cellules sont aliquotées et incubées 30 min à 4°C en présence des billes magnétiques (Mytenyi Biotec) recouvertes d'anti-CD16 (50 µl de billes pour 50 10<sup>6</sup> de neutrophiles). La suspension cellulaire est ensuite déposée sur la colonne immobilisée à l'intérieur du champ magnétique et l'élution est effectuée avec le tampon PBS-BSA-EDTA précédemment décrit. La fraction non retenue sur la colonne (fraction négative) correspond à une population très pure d'éosinophiles (la pureté est évaluée sur cytopspins par une coloration au May Grünwald-Giemsa et estimée comme étant supérieure à 98,1±0,4 %, les cellules contaminantes étant des lymphocytes (1,6±0,4 %) et des neutrophiles (0,3±0,2 %). Après deux lavages en PBS-BSA-EDTA et milieu RPMI, le culot est resuspendu dans le milieu RPMI supplémenté en SVF (5 %) à une concentration de 2 10<sup>6</sup> cellules/ml. Ces éosinophiles sont maintenus en culture pendant 1h ou 18h dans une étuve à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub>. La vitalité des cellules après 18h d'incubation est estimée entre 80 et 90 %. Les surnageants d'éosinophiles sont récupérés après centrifugation et conservés à -80°C.

## **2. Obtention des neutrophiles.**

Une fois les éosinophiles purifiés, la colonne est sortie du champ magnétique et les cellules initialement retenues (fraction dite positive, correspondant en grande partie aux neutrophiles: degré de pureté supérieur à 95 %) sont collectées et traitées de la même façon que ce qui a été précédemment décrit pour les éosinophiles. Dans la mesure où elles sont biodégradables, les microbilles n'affectent ni la vitalité ni les fonctions des cellules qu'elles retiennent. Aucun détachement n'est nécessaire et ces cellules peuvent être utilisées directement.

## **3. Culture de cellules endothéliales.**

- *isolation et culture*: se reporter au paragraphe I 2.

- *stimulation*:

A confluence, les cellules endothéliales (de 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> passage et cultivées en plaques 96 puits gélatinés) sont lavées avec le milieu RPMI avant d'être incubées avec les surnageants d'éosinophiles. Ces derniers sont dilués dans le milieu de culture pour CE (1/2, 1/5 ou 1/10) et déposés sur les CE à raison de 100 µl par puits. Les plaques sont incubées dans l'étuve pendant 6h (pour l'évaluation de l'expression de la E-sélectine et du VCAM-1 à la surface des CE) ou 24h (si l'expression de l'ICAM-1 et la sécrétion de cytokines par les CE sont évaluées). Les surnageants sont collectés uniquement à la fin des 24h de culture alors que, dans tous les cas, les cellules sont fixées à la glutaraldéhyde pour apprécier la modulation d'expression des molécules d'adhérence.

## **4. Evaluation de l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1) par ELISA.**

Le protocole décrit au paragraphe I.3. reste valable. Seule la première incubation diffère dans la mesure où elle met en jeu 3 anticorps monoclonaux de souris dirigés chacun contre une

molécule d'adhérence précise: un anti-ICAM-1, un anti-E-sélectine et un anti-VCAM-1 (Becton Dickinson). Ces anticorps sont ajoutés aux CE fixées à raison de 100 µl par puits d'une solution à 0,4 µg/ml (anti-ICAM-1, anti-VCAM-1) ou 0,2 µg/ml (anti-E-sélectine). Les étapes suivantes demeurent inchangées.

Toutes les analyses ont été faites en triple. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'augmentation selon la formule suivante:  $( (CE/Eo - CE) / CE ) \times 100$

où **CE/Eo** correspond aux CE stimulées par les surnageants d'éosinophiles;

**CE** correspond aux CE incubées avec le milieu de culture seul.

Les expressions (DO) en base des CE pour ces différentes molécules d'adhérence sont les suivantes: ICAM-1=0,116±0,024; E-sélectine=0,102±0,018; VCAM-1=0,141±0,030.

## **5. Dosages des interleukines.**

### *• dosage de l'IL-6:*

La sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales a été quantifiée par un dosage biologique mettant en jeu une lignée cellulaire (7TD1) dont la prolifération est dépendante de l'IL-6 (Van Snick, 1986). Les cellules 7TD1 sont incubées en plaques 96 puits avec différentes dilutions des échantillons à doser. La prolifération des cellules 7TD1 est appréciée par une méthode colorimétrique. Après 4 jours de culture, une solution de (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ou MTT est ajoutée à la concentration finale de 10 % puis suivie 4h plus tard de l'addition d'un tampon composé de sodium dodecylsulfate (SDS) à 20 % et de diméthylformamide (DMF) à 40 %. La DO est lue à 570 nm et toutes les analyses sont effectuées en double. La concentration d'IL-6 est déterminée par comparaison à une courbe standard réalisée avec de l'IL-6 recombinante humaine (Boehringer). La spécificité de ce dosage a été vérifiée en inhibant la prolifération des cellules 7TD1 par ajout, dans les échantillons à tester, d'un anti-IL-6 neutralisant: cette inhibition est toujours supérieure à 90%.

Les résultats sont exprimés en unité internationale par millilitre (UI/ml), une unité étant définie comme le taux d'IL-6 nécessaire pour induire une prolifération des cellules 7TD1 correspondant à la moitié de la prolifération maximale.

• *dosage de l'IL-8:*

La sécrétion d'IL-8 dans les surnageants de CE a été quantifiée par un test ELISA (CLB, Amsterdam) selon les recommandations du fabricant. Les résultats sont exprimés en ng/ml et la limite de détection est estimée à 1 pg/ml.

• *dosage du MCP-1:*

Le MCP-1 a été détecté dans les surnageants de culture grâce à la technique d'ELISA mise au point dans notre laboratoire. Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le MCP-1 humain (Genzyme) est utilisé à 0,4 µg/ml en tampon carbonate (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH9,6) et 50 µl de cette solution sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration (MicrowellModule NUNC). Après une incubation sur la nuit à 4°C, la plaque est lavée 2 fois par du PBS contenant 0,05 % de Tween 20 (tampon de lavage) puis saturée 30 min à 37°C par du PBS-BSA 3 %, à raison de 50 µl/puits. Les échantillons à doser sont dilués en PBS-BSA 1 % (tampon de dilution) et 50 µl de chaque dilution sont déposés en double. La gamme est réalisée dans le tampon de dilution avec du MCP-1 humain recombinant (PeproTech INC): le point le plus élevé de la gamme correspond à une concentration de 30 ng/ml et le point le plus bas à 30 pg/ml. Après une incubation d'1h30 à 37°C, la plaque est rincée 4 fois par le tampon de lavage et 50 µl d'une solution d'anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre le MCP-1 humain (R&D Systems) sont ajoutés, dans chaque puits, à la concentration de 3 µg/ml en tampon de dilution et ce pour une période d'1h30 à 37°C. Après 4 lavages, un anticorps de lapin dirigé contre la chèvre et marqué à la biotine (Sigma) est dilué au 1/500<sup>ème</sup> dans le tampon de dilution, et distribué à raison de 50 µl par puits. Après une incubation d'1h30 à 37°C, la plaque est rincée 4 fois par le tampon de lavage et 50 µl d'une solution au 1/10000<sup>ème</sup> d'avidine-peroxydase (CLB) est ajoutée dans chaque puits pour 30 min à 37°C. La plaque est finalement lavée 6 fois (4 en tampon de lavage et 2 en PBS seul) avant que ne soient répartis 50 µl par

puits de la solution substrat (solution de citrate à 0,1 M pH 5 contenant 0,4 mg/ml d'o-phenylènediamine et 0,03 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additionnés de façon extemporanée). Pour stopper le développement de la réaction colorimétrique, 50 µl d'HCl 4N sont ajoutés dans chaque puits et la DO est lue sur un spectrophotomètre à 492 nm.

Aucune réaction croisée pour les cytokines suivantes n'a pu être mise en évidence (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFNγ, MIP-1α, RANTES, TNFα). Les résultats sont exprimés en pg/ml et le seuil de détection est fixé à 1 pg/ml.

## **6. Caractérisation du ou des médiateur(s) relargué(s) par les éosinophiles et responsables de l'état d'hyperactivation des cellules endothéliales.**

### *• évaluation du poids moléculaire:*

Des surnageants d'éosinophiles maintenus en culture pendant 18h sont déposés sur des colonnes de filtration (Centricon-10, AMICON) dont la membrane retient, après centrifugation, les macromolécules dont le poids moléculaire est supérieur à 10 kDa. Les molécules de faible poids moléculaire (<10kDa) se retrouvent dans le filtrat alors que l'échantillon concentré est repris dans un volume identique au volume de départ. Ces deux fractions sont diluées (1/3 dans le milieu de culture pour CE) puis incubées avec les cellules endothéliales pendant 6h ou 24h afin d'évaluer la modulation d'expression des molécules d'adhérence ainsi que la sécrétion de cytokines.

Seule la fraction renfermant les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 kDa est capable de reproduire les résultats obtenus avec les surnageants d'éosinophiles non fractionnés. Ceci suggère donc que deux groupes de molécules peuvent être impliqués dans l'hyperactivation des CE: les cytokines potentiellement relarguées par les éosinophiles ainsi que les protéines cationiques présentes dans les granules.

• *réalisation de colonnes d'affinité:*

Afin de dépléter les surnageants d'éosinophiles en cytokine(s), des colonnes de filtration sur gel ont été réalisées par l'intermédiaire de protéine G sépharose (4 Fast Flow, Pharmacia Biotech) complexée avec un (des) anticorps neutralisant(s) dirigé(s) contre une cytokine définie. Après deux lavages en milieu RPMI, la protéine G sépharose est déposée, avec les anticorps neutralisants, dans la partie supérieure d'une colonne (Spin-X 0,22 CA filter, Corning Costar).

Les anticorps utilisés sont les suivants:

- anti-GM-CSF (Genzyme): 1 µg par µl de protéine G sépharose
- anti-IFN $\gamma$  (Genzyme): 0,5 µg par µl de protéine G sépharose
- anti-IL-3 (R&D Systems): 1 µg par µl de protéine G sépharose
- anti-TNF $\alpha$  (Genzyme): 1 µg par µl de protéine G sépharose
- anti-IL-1 $\beta$  (Endogen): 1 µg par µl de protéine G sépharose
- anti-IL-4 (Genzyme): 1 µg par µl de protéine G sépharose

Des IgG de souris (Dako A/S) et de lapin (Endogen) ont été utilisés comme contrôles négatifs. Ces colonnes d'affinité sont incubées une nuit à 4°C.

Pour piéger les protéines cationiques des éosinophiles, le même principe a été utilisé mais cette fois-ci avec un gel d'héparine (HiTrap Heparin, Pharmacia Biotech), ayant été décrit comme capable de retenir les protéines chargées positivement (Coyle et al, 1993). Le gel est également lavé 2 fois en milieu RPMI, déposé sur la colonne Spin-X et laissé une nuit à 4°C.

Dans tous les cas, les surnageants d'éosinophiles (récupérés après 18h de culture) sont déposés sur les colonnes et le tout est laissé 1h à température ambiante sous agitation douce. Après centrifugation (3 min à 1000 g), les surnageants sont collectés dans la partie inférieure de la colonne, dilués (1/3 dans le milieu de culture pour CE) puis incubés avec les cellules endothéliales pendant 6h ou 24h afin d'évaluer la modulation d'expression des molécules d'adhérence ainsi que la sécrétion de cytokines.

Toutes les analyses ont été faites en triple. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante:  $(A - B) / B \times 100$

où **A** correspond aux CE incubées avec les surnageants d'éosinophiles passés sur colonne(s);

**B** correspond aux CE incubées avec les surnageants d'éosinophiles non déplétés; (après déduction des valeurs correspondant aux CE non stimulées)

### **7. Dosage de médiateurs relargués par les éosinophiles.**

- *dosage de l'ECP:*

Les concentrations d'ECP ont été mesurées dans les surnageants d'éosinophiles grâce à un dosage RIA (RadioImmunoAssay) (Pharmacia diagnostics). Les résultats sont exprimés en ng/ml et la limite de détection est inférieure à 2 ng/ml (réaction croisée avec l'EPX < 0,06%).

- *dosage de l'IL-6:*

La sécrétion d'IL-6 par les éosinophiles a été évaluée par le dosage biologique précédemment décrit pour les cellules endothéliales (se reporter au paragraphe II 5.).

- *dosage de l'IL-8:*

La quantification de l'IL-8 (ng/ml) dans les surnageants d'éosinophiles a été réalisée grâce à un dosage ELISA (CLB, Amsterdam). La limite de détection est estimée à 1 pg/ml.

- *dosages de l'IL-1 $\beta$  et du TNF $\alpha$ :*

Ils ont été effectués par l'intermédiaire de tests ELISA (Medgenix Diagnostics). Les résultats sont exprimés en pg/ml. Les concentrations minimales détectables sont évaluées à 2 pg/ml et 3 pg/ml pour l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  respectivement.

## **8. Analyse statistique.**

Tous les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test *t* de Student pour données appariées. Les valeurs de *p* inférieures à 0,05 sont considérées comme étant significatives.

### **III Techniques utilisées dans l'étude de la régulation d'ESM-1.**

#### **1. culture de cellules endothéliales.**

- *isolation et culture*: se reporter au paragraphe I.2.

#### **2. cinétique d'expression des ARNm codant pour ESM-1 par des HUVEC activées par le TNF $\alpha$ :**

- *stimulation des HUVEC*:

A subconfluence, les cellules endothéliales (de 3<sup>ème</sup> passage et cultivées en plaques 6 puits gélatinés) sont lavées deux fois avec le milieu RPMI supplémenté uniquement en SVF (20 %) et en L-Glutamine (2 mM). Les cellules sont laissées toute la nuit dans ce milieu à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Un lavage identique est effectué juste avant l'activation des cellules endothéliales par le TNF $\alpha$  (200 U/ml, Genzyme) en milieu RPMI supplémenté en SVF (5 %) et en L-Glutamine (2 mM). La stimulation des HUVEC a été réalisée pour différents temps (0, 15 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 18h et 24h). Chaque période d'incubation s'achève par la récupération des surnageants cellulaires d'une part et la lyse des cellules par 500  $\mu$ l/puits de tampon d'isothiocyanate de guanidium 4M.

- *Northern Blot*:

L'ARN cellulaire total a été isolé par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation par l'isopropanol. Pour l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % de formaldéhyde,



10 à 30 µg d'ARN total ont été déposés dans chaque piste puis transférés sur une membrane de nylon (GeneScreen, DuPont, NEN). Le marqueur de taille utilisé (5 µg) permet de déterminer la taille des ARNm sur une échelle allant de 0,24 à 9,5 kb (Life Technologies, Inc.). Les conditions d'hybridation du Northern Blot sont les suivantes:

- hybridation à 42°C dans le tampon suivant: NaCl 1 M, formamide 50 %, solution de Denhardt's 1X, dextran 10 % et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé;
- 2 lavages à température ambiante, pendant 30 min, dans une solution de SSC 2X (saline sodium citrate), SDS 0,1 % (sodium dodécyl sulfate);
- 2 lavages à 55°C, pendant 30 min dans une solution SSC 0,1X, SDS 0,1%.

Les membranes ont ensuite été mises en contact avec des films autoradiographiques à -70°C pendant des durées variables (3 jours pour ESM-1 et une nuit pour la E-sélectine ou l'actine β). La sonde d'ADNc ESM-1 correspond au fragment de 1176 pb obtenu après digestion de la partie 5' de l'ADNc d'ESM-1 par *Hind* III. D'autres sondes ont été utilisées pour détecter l'ARNm de la E-sélectine (fragment *Pst*I-*Eco*RI, British Biotechnology) ou l'ARNm de l'actine β (Clontech Laboratories, Inc.).

## **2. régulation de la transcription d'ESM-1 par différentes cytokines**

### **• stimulation des HUVEC:**

La préparation initiale des HUVEC est identique à celle décrite dans le paragraphe précédent. La stimulation des HUVEC a été réalisée pendant plusieurs périodes (0, 1h, 6h, 12h, 18h et 24h) avec différentes cytokines: IL-1β (10 U/ml, Genzyme), IFNγ (1000 U/ml, Genzyme) et IL-4 (1000 U/ml, Roche Research Gent). Chaque période d'incubation s'achève par la récupération des surnageants cellulaires d'une part et la lyse des cellules par 500 µl/puits de tampon d'isothiocyanate de guanidium 4M.

• *Northern Blot:*

L'isolement des ARN et les Northern Blots ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour l'étude de la cinétique d'expression des ARNm d'ESM-1. Les sondes utilisées pour détecter l'ARNm de l'ICAM-1 ou l'ARNm du VCAM-1 sont respectivement le fragment *EcoRI-XhoI* (British Biotechnology) et le fragment *EcoRI-XhoI* d'une construction réalisée par RT-PCR à partir d'HUVEC stimulées par le TNF clonée dans pcDNA3 (Invitrogen).

**3. dosage d'ESM-1 dans les surnageants et les lysats cellulaires d'HUVEC.**

ESM-1 a été dosée dans les surnageants et les lysats cellulaires d'HUVEC par l'intermédiaire d'un ELISA (technique sandwich) mis au point dans notre laboratoire. MEP 21 (Mouse anti-ESM-1 derived from Prokariotic cells); un anticorps monoclonal de souris (IgG2a, $\kappa$  dirigée contre l'épitope Dag 3 d'ESM-1); est dilué à 5  $\mu\text{g/ml}$  en tampon carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, pH 9,5) et 100  $\mu\text{l}$  de cette solution sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration (MicrowellModule NUNC). Après une incubation sur la nuit à 4°C, la plaque est mise en saturation, 1 heure à température ambiante, avec 100  $\mu\text{l}$ /puits d'une solution de PBS contenant 0,1 % de BSA, 5 mM d'EDTA et 0,1 % de Tween 20 (TpE). Après deux lavages en TpE, les échantillons à doser sont déposés à raison de 100  $\mu\text{l}$ /puits. La gamme est réalisée dans le TpE avec un antigène étalon (100  $\mu\text{l}$ /puits) correspondant à un peptide recombinant d'ESM-1 purifié à partir de *E.coli* (GST-ESM-F0, peptide 79-184): le point le plus élevé de la gamme correspond à une concentration de 500 ng/ml et le point le plus bas à 100 pg/ml. Après une incubation d'1h à température ambiante, la plaque est rincée 3 fois avec le TpE. Un surnageant cellulaire contenant MEP 19, un deuxième anticorps monoclonal de souris (IgG1 $\kappa$  dirigée contre l'épitope Dag 1 d'ESM-1) est dilué au 1/10<sup>ème</sup> en TpE, et 100  $\mu\text{l}$  sont ajoutés dans chaque puits pour une période d'1h à température ambiante. Après 3 lavages en TpE, un anticorps dirigé contre les IgG1 de souris et marqué à la peroxydase (Pharmingen) est dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans le TpE, et distribué à raison de 100  $\mu\text{l}$  par puits. Après une

incubation d'1h à température ambiante, la plaque est rincée 3 fois en TpE puis 2 fois en PBS. La révélation de la peroxydase est réalisée en répartissant 100 µl par puits de la solution substrat (solution de citrate à 0,1 M pH 5 contenant 0,4 mg/ml d'o-phenylènediamine et 0,03 % d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> additionnés de façon extemporanée). Pour stopper le développement de la réaction colorimétrique (après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité), 100 µl d'HCl 4N sont ajoutés dans chaque puits et la DO est lue sur un spectrophotomètre à 492 nm.

#### **4. distribution cellulaire de la protéine ESM-1 à la surface d'HUVEC activées par différents cytokines.**

##### ***• stimulation des HUVEC:***

La culture des cellules endothéliales s'est faite sur lames dans de petites chambres de culture d'1 cm<sup>2</sup> (LABTEK) et recouvertes de fibronectine (5 µg/puits, Sigma). La préparation initiale des HUVEC est identique à celle décrite dans les paragraphes précédents. La stimulation des HUVEC a été réalisée pendant plusieurs périodes (0, 4h et 24h) avec différentes cytokines: TNFα (200 U/ml, Genzyme) et/ou IFNγ (1000 U/ml, Genzyme) en milieu RPMI supplémenté en SVF (5 %) et en L-Glutamine (2 mM). Chaque période d'incubation s'achève par 2 lavages doux en milieu RPMI, la fixation des cellules en acétone/méthanol (40 %/60 %) et de nouveau 2 lavages en RPMI. Les lames sont séchées et congelées en attendant de réaliser l'immunocytochimie.

##### ***• détection d'ESM-1 sur les HUVEC par une technique d'immunocytochimie:***

Les lames sont lavées 2 fois 10 min en TBS (Tris buffer saline, Tris 10 % - NaCl 1,5 M - HCl 0,5 M pH 7,6) avant d'être incubées 1h en présence de notre anticorps polyclonal de lapin anti-ESM-1 dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans le TBS ou en présence d'un sérum de lapin sain à la même concentration pour contrôle. Après 2 lavages de 10 min en TBS, les lames sont incubées pendant 1h en présence d'un anticorps dirigé contre le lapin et marqué à la peroxydase (Sigma). Après 2 lavages de 10 min en TBS, on procède à la révélation enzymatique avec une solution de 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrat. La réaction

est arrêtée avec de l'eau distillée et la contre-coloration est réalisée avec de l'hématoxyline pure (1 min). Les lames sont montées en Glycergel (Dako) et observées au microscope.

*Références*

*Bibliographiques*



## 7. Références bibliographiques

- Abu-Ghazaleh, R.I., Fujisawa, T., Mestecky, J., Kyle, R.A. and Gleich, G.J. (1989). IgA-induced eosinophil degranulation. *J. Immunol.* **142**: 2393-2400.
- Adeagbo, A.S.O. and Triggle, C.R. (1993). Varying extracellular (K<sup>+</sup>): a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**: 423-429.
- Alam, R., Stafford, S., Forsythe, P., Harrison, R., Faubion, D., Lett-Brown, M.A. and Grant, J.A. (1993). Rantes is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J. Immunol.* **150**: 3442-3447.
- 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.* **114**: 1059-1068.
- Alderson, M.R., Armitage, R.J., Tough, T.W., Stockbine, L., Fanslow, W.C. and Spriggs, M.K. (1993). CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* **178**: 669-674.
- Allavena, P., Paganin, C., Martin-Padura, I., Peri, G., Gaboli, M., Dejana, E., Marchisio, P.C. and Mantovani, A. (1991). Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J. Exp. Med.* **173**: 439-448.
- Altman, L.C., Ayars, G.H., Baker, C. and Luchtel, D.L. (1993). Cytokines and eosinophil-derived cationic proteins upregulate intercellular adhesion molecule-1 on human nasal epithelial cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 527-536.
- Anderson, D.C., Schmalsteig, F.C., Finegold, M.J., Hughes, B.J., Rothlein, R., Miller, L.J., Kohl, S., Tosi, M.F., Jacobs, R.L., Waldrop, T.C., Goldman, A.S., Shearer, W.T. and Springer, T.A. (1985). The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: Their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J. Inf. Dis.* **152**: 668-689.
- Anderson, M., Nolte, H., Baumgarten, C. and Pipkorn, U. (1991). Suppressive effects of loratadine on allergen-induced histamine release in the nose. *Allergy* **46**: 540-546.
- Arnaout, M.A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecule CD11/CD18. *Blood* **75**: 1037-1050.
- Arnaout, M.A., Lanier, L.L. and Faller, D.V. (1988). Relative contribution of the leukocyte molecules Mol, LFA-1, and p150/95 (LeuM5) in adhesion of granulocytes and monocytes to vascular endothelium is tissue- and stimulus-specific. *J. Cell Physiol.* **137**: 305-309.
- Asmussen, I. and Kjeldsen, K. (1975). Intimal ultrastructure of human umbilical arteries. *Circ. Res.* **36**: 579-589.
- Ausprunk, D.H. and Berman, H.J. (1978). Spreading of vascular endothelial cells in culture: spatial reorganization of cytoplasmic fibers and organelles. *Tiss. Cell* **10**: 707-724.
- Bachmann, F. and Kruihof, E.K.O. (1984). Tissue plasminogen activator: chemical and physiological aspects. *Semin. Thromb. Res.* **10**: 6-17.
- Baggiolini, M. and Dahinden, C.A. (1994). CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. Today* **15**: 127-133.
- 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**: 1045-1049.
- Bar-Shavit, R., Sabbah, V., Lampugnani, M.G., Marchisio, P.C., Fenton, J.W., Vlodavsky, I. and Dejana, E. (1991). An Arg-Gly-Asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J. Cell Biol.* **12**: 335-344.

**Barenholtz, H.A. and McLeod, D.C.** (1989). Loratadine: a non-sedating antihistamine with once-daily dosing. *DICP* **23**: 445-450.

**Barnes, P.J., Chung, K.F. and Page, C.P.** (1988). Inflammatory mediators and asthma. *Pharmacol. Rev.* **40**: 49-84.

**Barzu, T., Van Rijn, J.L.M.L., Petitou, M., Molho, P., Tobelem, G. and Caen, J.P.** (1986). Endothelial binding sites for heparin. Specificity and role in heparin neutralisation. *Biochem. J.* **238**: 847-854.

**Baskar, P., Silberstein, D.S. and Pincus, S.H.** (1990). Inhibition of IgG-triggered human eosinophil function by IL-4. *J. Immunol.* **144**: 2321-2326.

**Bass, D.A.** (1979). The functions of eosinophils. *Ann. Intern. Med.* **91**: 120-121.

**Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D. and Lasky, L.A.** (1993). Binding of L-selectin to the vascular sialomucin, CD34. *Science* **262**: 436-438.

**Beasley, 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**: 806-817.

**Beil, W.J., Weller, P.F., Tzizik, P.M., Galli, S.J. and Dvorak, A.M.** (1993). Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor- $\alpha$  to the matrix compartment of eosinophil secondary granules in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 1611-1615.

**Benveniste, J., Chignard, M., Le Couedic, J.P. and Vargaftig, B.B.** (1982). Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-acether). II. Involvement of phospholipase A2 in the formation of PAF-acether and lyso PAF-acether from rabbit platelets. *Thromb. Res.* **25**: 375-385.

**Berg, E.L., Magnani, J., Warnock, R.A., Robinson, M.K. and Butcher, E.C.** (1992). Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: The L-selectin can bind to the E-selectin ligands sialyl Le<sup>x</sup> and sialyl Le<sup>a</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**: 1048-1055.

**Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A. and Butcher, E.C.** (1993).  $\alpha_4\beta_7$  integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* **74**: 180-185.

**Berman, M.E. and Muller, W.A.** (1995). Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocytes CR3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* **154**: 299-307.

**Berman, M.E., Xie, Y. and Muller, W.A.** (1996). Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and  $\beta_2$  integrin activation. *J. Immunol.* **156**: 1515-1524.

**Bevilacqua, M.P. and Nelson, R.M.** (1993). Selectins. *J. Clin. Invest.* **91**: 379-387.

**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. USA.* **84**: 9238-9242.

**Bianchi, G., Sironi, M., Ghibaudi, E., Selvaggini, C., Elices, M., Allavena, P. and Mantovani, A.** (1993). Migration of natural killer cells across endothelial cell monolayers. *J. Immunol.* **151**: 5135-5144.

**Bicknell, R.** (1993). Heterogeneity of the endothelial cell. *Behring Inst. Mitt.* **92**: 1-7.

**Bienvenu, K., Russel, J. and Granger, D.N.** (1993). Platelet-activating factor promotes shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *J. Lipid. Med.* **8**: 95-103.

- Blose, S.H.** (1979). Ten-nanometer filaments and mitosis: maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 3372-3376.
- Blose, S.H.** (1981). The distribution of 10nm filaments and microtubules in endothelial cells during mitosis: double-label immunofluorescence study. *Cell Motility* **1**: 417-431.
- Blose, S.H. and Chacko, S.** (1976). Ring of intermediate (100A) filament bundles in the perinuclear region of vascular endothelial cells: their mobilization by colcemid and mitosis. *J. Cell Biol.* **70**: 459-466.
- Bochner, B.S., Luscinikas, F.W., Gimbrone, M.A.Jr, Newman, W., Sterbinsky, S.A., Derse-Anthony, C.P., Klunk, D. and Schleimer, R.P.** (1991). Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin-1-activated human vascular endothelial cells: Contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J. Exp. Med.* **173**: 1553-1557.
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B. and Wagner, D.D.** (1989). PADGEM (GMP-140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**: 1109-1112.
- Booij-Noord, H., de Vries, K., Sluiter, H.J. and Orie, N.G.** (1972). Late bronchial obstructive reaction to experimental inhalation of house dust mite extract. *Clin. Allergy* **2**: 43-61.
- Booyse, F.M., Bell, S., Sedlak, B. and Rafelson, M.E.** (1975b). Development of an in vitro vessel wall model for studying certain aspects of platelet-vessel (endothelial) interactions. *Artery* **1**: 518-527.
- Booyse, F.M., Sedlak, B.J. and Rafelson, M.E.** (1975a). Culture of arterial endothelial cells. Characterization and growth of bovine aortic cells. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **34**: 825-839.
- Bourne, H.R., Melmon, K.L. and Lichtenstein, L.M.** (1971). Histamine augments leukocyte adenosine 3', 5'-monophosphate and blocks antigenic histamine release. *Science* **173**: 743-745.
- Boushey, H.A., Holtzman, M.J., Sheller, J.R. and Nadel, J.A.** (1980). Bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Respir. Dis.* **121**: 389-413.
- Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barnéon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafontaine, J., Godard, P. and Michel, F-B.** (1990). Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.* **323**: 1033-1039.
- Bousquet, J., Lebel, B., Chanal, I., Morel, A. and Michel, F.B.** (1988). Antiallergic activity of H1-receptor antagonists assessed by nasal challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **82**: 881-887.
- Bowman, P.D., Betz, A.L., Ar, D., Wolinsky, J.S., Penney, J.B., Shivers, R.R. and Goldstein, G.W.** (1981). Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro* **17**: 353-362.
- Boyum, A.** (1964). Separation of white blood cells. *Nature* **204**: 793-795.
- Braun, R.K., Franchini, M., Erard, F., Rihs, H., De Vries, I.J.M., Blaser, K., Hansel, T.T. and Walker, C.** (1993). Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur. J. Immunol.* **23**: 956-960.
- Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. and Snyder, S.** (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**: 714-718.
- Brewster, C.E., Howarth, P.H., Djukanovic, R., Wilson, J., Holgate, S.T. and Roche, W.R.** (1990). Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **3**: 507-511.
- Briskin, M.J., McEvoy, L.M. and Butcher, E.C.** (1993). MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* **363**: 461-464.
- Brooks, C., Stackpole, A. and Savage, C.O.S.** (1993). Synergistic interactions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets with human vascular endothelial cells in primary proliferative allogeneic responses. *Int. Immunol.* **5**: 1041-1048.



- Bruzney, S.M. and Massicotte, S.J.** (1979). Retinal vessels: proliferation of endothelium in vitro. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* **18**: 1195-1200.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. and Turner, C.** (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**: 487-525.
- Busch, C., Dawes, J., Pepper, D.S. and Wasteson, A.** (1980). Binding of platelet factor 4 to cultured human umbilical vein endothelial cells. *Thromb. Res.* **19**: 129-137.
- Busch, C., Ljungman, C., Heldin, C.H., Wasteson, A. and Öbrink, B.** (1973). Surface properties of cultured endothelial cells. *Haemostasis* **8**: 142-149.
- Butcher, E.C.** (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**: 1033-1036.
- Caen, J.** (1987). La paroi vasculaire: sa structure et ses fonctions. Chap IA dans "Le sang et les vaisseaux" Ed Hermann.
- Caldwell, P.R.B., Seegal, B.C., Shu, K.C., Das, M. and Soffer, R.L.** (1976). Angiotensin converting enzyme: Vascular endothelial localization. *Science* **191**: 1050-1051.
- Campbell, H.D., Tucker, W.Q.J., Hort, Y., Martinson, M.E., Mayo, G., Clutterbuch, E.J., Sanderson, C.J. and Young, I.G.** (1987). Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 6629-6633.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M., Ameisen, J-C. and Tonnel, A.B.** (1986). From parasites to allergy: the second receptor for IgE (FcεRII). *Immunol. Today* **7**: 15-18.
- 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**: 2087-2092.
- Capron, M., Kusnierz, J.P., Prin, L., Spiegelberg, H.L., Ovlaque, G., Gosset, P., Tonnel, A.B. and Capron, A.** (1985). Cytophilic IgE on human blood and tissue eosinophils: detection by flow microfluorometry. *J. Immunol.* **134**: 3013-3018.
- Carlos, T., Kovach, N., Schwartz, B., Rosa, M., Newman, B., Wayner, E., Benjamin, C., Osborn, L., Lobb, R. and Harlan, J.** (1991). Human monocytes bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood* **77**: 2266-2271.
- Carlos, T.M. and Harlan, J.M.** (1990a). Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol. Rev.* **114**: 5-28.
- Carlos, T.M. and Harlan, J.M.** (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101.
- Carlos, T.M., Schwartz, B.R., Kovach, N.L., Yee, E., Rosa, M., Osborn, L., Chi-Rosso, G., Newman, B., Lobb, R. and Harlan, J.M.** (1990b). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* **76**: 965-970.
- Carlson, M.G., Peterson, C.G., Venge, P.** (1985). Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. *J. Immunol.* **134**: 1875-1879.
- Carson, M.R., Shasby, S.S., Lind, S.E. and Shasby, D.M.** (1992). Histamine, actin-gelsolin binding, and polyphosphoinositides in human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **263**: L664-669.
- Casale, T.B., Erger, R.A. and Little, M.M.** (1993). Platelet-activating factor-induced human eosinophil transendothelial migration: evidence for a dynamic role of the endothelium. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **8**: 77-82.

- Cassatella, M.A., Guasparri, I., Ceska, M., Bazzoni, F. and Rossi, F. (1993b). Interferon- $\gamma$  inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* **78**: 177-184.
- Cassatella, M.A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M. and Constantin, G. (1993a). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes: evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 $\beta$  in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **178**: 2207-2211.
- Chan, B.M.C., Elices, M.J., Murphy, E. and Hemler, M.E. (1992). Adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin: Comparison of  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) and  $\alpha 4\beta 7$  on the human B cell line JY. *J. Biol. Chem.* **267**: 8366-8370.
- Chen, C.C. and Manning, A.M. (1996). TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. *Cytokine* **8**: 58-65.
- Choi, I., Kang, H.S., Yang, Y. and Pyun, K.H. (1994). IL-6 induces hepatic inflammation and collagen synthesis in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* **95**: 530-535.
- Chou, Y.K., Sherwood, T. and Virella, G. (1985). Erythrocyte-bound immune complexes trigger the release of interleukin-1 from human monocytes. *Cell. Immunol.* **91**: 308-314.
- Chua, B.H.L., Krebs, C.J., Chua, C.C. and Diglio, C.A. (1992). Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **262**: E412-E416.
- Clark, E.A. and Ledbetter, J.A. (1986). Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 4494-4498.
- Colotta, F., Sironi, M., Borré, A., Luini, W., Maddalena, F. and Mantovani, A. (1992). Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells. *Cytokine* **4**: 24-28.
- Conrad, D.H., Bazin, H., Sehon, A.H. and Froese, A. (1975). Binding parameters of the interaction between rat and rat mast cell receptors. *J. Immunol.* **114**: 1688-1691.
- Coomber, B.L. (1991). Cytoskeleton in TGF-beta- and bFGF-modulated endothelial monolayer repair. *Exp. Cell Res.* **194**: 42-47.
- Corrigan, C.J. and Kay, A.B. (1992). T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Immunol. Today* **13**: 501-507.
- Costa, J.J., Matossian, K., Resnick, M.B., Beil, W.J., Wong, D.T.W., Gordon, J.R., Dvorak, A.M., Weller, P.F. and Galli, S.J. (1993). Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J. Clin. Invest.* **91**: 2673-2684.
- Coughlin, S.R., Moskowitz, M.A., Zetter, B.R., Antoniades, H.N. and Levine, L. (1980). Platelet dependent stimulation of prostacyclin synthesis by platelet-derived growth factor. *Nature* **288**: 600-602.
- Coyle, A.J., Ackerman, S., Irvin, C.J. (1993). Cationic proteins induce airway hyperresponsiveness dependent on charge interactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 896-900.
- Crutchley, D.J. (1987). Hemostatic potential of the pulmonary endothelium. *Pulmonary endothelium in health and disease*. (U.S. Ryan eds) New York, Marcel Dekker Inc, 237-273.
- Curwen, C.A., Gimbrone, M.A. and Handin, R.I. (1980). In vitro studies of thromboresistance. *Lab. Invest.* **42**: 366-374.
- Cuss, F., Gulbenkian, A., Egan, R., Danzig, M. and Kreutner, W. (1990). Eosinophilia in nasal and bronchial lavage is inhibited by loratadine. *Clin. Exp. Allergy* **20s**: 57.
- Czervionke, R.L., Smith, J.B., Hoak, J.C., Fry, G.L. and Haycraft, D.L. (1979). Use of a radioimmunoassay to study thrombin-induced release of PGI<sub>2</sub> from cultured endothelium. *Thromb. Res.* **14**: 781-786.

- Dahinden, C.A., Geiser, T., Brunner, T., von Tschanner, V., Caput, D., Ferrara, P., Minty, A. and Baggiolini, M.** (1994). Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J. Exp. Med.* **179**: 751-756.
- Daugherty, B.L., Siciliano, S.J., DeMartino, J.A., Malkowitz, L., Sirotna, A. and Springer, M.S.** (1996). Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J. Exp. Med.* **183**: 2349-2354.
- Davis, B.W., Fells, A.G., Xiu-Hong, S., Gadek, E.J., Venet, A. and Crystal, R.G.** (1984). Eosinophil-mediated injury to lung parenchymal cells and interstitial matrix. *J. Clin. Invest.* **74**: 269-278.
- Davison, P.M., Bensch, K. and Karasek, M.A.** (1980). Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *J. Invest. Derm.* **75**: 316-321.
- De Nucci, G., Thomas, R. and D'Orléans Juste, P.** (1988). Pressors 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**: 9797-9800.
- de Fougerolles, A.R. and Springer, T.A.** (1992). Intercellular adhesion molecule 3, a third counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**: 185-190.
- de Fougerolles, A.R., Qin, X. and Springer, T.A.** (1994). Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J. Exp. Med.* **179**: 619-629.
- Delneste, Y., Gosset, P., Jeannin, P., Lassalle, P., Joseph, M. and Tonnel, A.B.** (1994). Histamine induces IL-6 production by human endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **98**: 344-349.
- Delneste, Y., Jeannin, P., Gosset, P., Lassalle, P., Cardot, E., Tillie-Leblond, I., Joseph, M., Pestel, J. and Tonnel, A.B.** (1995). Allergen-stimulated T lymphocytes from allergic patients induce vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression and IL-6 production by endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **101**: 164-171.
- Desreumaux, P., Janin, A., Colombel, J.F., Prin, L., Plumas, J., Emilie, D., Torpier, G., Capron, A. and Capron, M.** (1992). Interleukin-5 messenger, RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J. Exp. Med.* **175**: 293-296.
- Detmers, P.A., Powell, D.E., Walz, A., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Cohn, Z.A.** (1991). Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. *J. Immunol.* **147**: 4211-4217.
- Devreotes, P.N. and Zigmond, S.H.** (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**: 649-686.
- 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**: 434-457.
- Dobrina, A., Menegazzi, R., Carlos, T.M., Nardon, E., Cramer, R., Zacchi, T., Harlan, J.M. and Patriarca, P.** (1991). Mechanisms of eosinophil adherence to cultured vascular endothelial cells: Eosinophils bind to the cytokine-induced endothelial ligand vascular cell adhesion molecule-1 via the very late activation antigen-4 integrin receptor. *J. Clin. Invest.* **88**: 20-26.
- Dransfield, I. and Hogg, N.** (1989). Regulated expression of Mg<sup>2+</sup> binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits. *EMBO J.* **8**: 3759-3765.
- Dugas, B., Arock, M., Czarlewski, W. and Bousquet, J.** (1994). Activation of membrane markers from purified human eosinophils by histamine. Abstract AAI 1994.
- Dunlop, L.C., Skinner, M.P., Bendall, L.J., Favaloro, E.J., Castaldi, P.A., Gorman, J.J., Gamble, J.R., Vadas, M.A. and Berndt, M.C.** (1992). Characterization of GMP-140 (P-selectin) as a circulating plasma protein. *J. Exp. Med.* **175**: 1147-1150.

- Dunnill, M.S.** (1982). *Pulmonary pathology*. Edinburg/London/Melbourne/New York, Churchill Livingstone.
- 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**: 176-179.
- Durham, S.R. and Kay, A.B.** (1985). Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clin. Allergy* **15**: 411-418.
- Dustin, M.L. and Springer, T.A.** (1988b). Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107**: 321-331.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A. and Springer, T.A.** (1986). Induction by IL-1 and interferon gamma, tissue distribution, biochemistry and function of natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* **137**: 245-254.
- Dustin, M.L., Staunton, D.E. and Springer, T.A.** (1988a). Supergene families meet the immune system. *Immunol. Today* **9**: 213-215.
- Dusting, G.J., Moncada, S. and Vane, J.R.** (1977). Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins* **13**: 3-16.
- Ebisawa, M., Bochner, B.S., Georas, S.N. and Schleimer, R.P.** (1992). Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. I: role of endothelial and eosinophil adhesion molecules in IL-1 $\beta$  induced transendothelial migration. *J. Immunol.* **149**: 4021-4028.
- Eda, R., Sugiyama, H., Hopp, R.J., Bewtra, A.K. and Townley, R.G.** (1993). Effect of loratadine on human eosinophil function in vitro. *Annals of Allergy* **71**: 373-378.
- Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. and Lobb, R.R.** (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**: 577-584.
- Elovic, A., Wong, D.T.W., Weller, P.F., Matossian, K. and Galli, S.J.** (1994). Expression of transforming growth factors- $\alpha$  and - $\beta$ 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. *J. Allergy Clin. Immunol.* **93**: 864-869.
- Ennis, E., Isberg, R.R. and Shimizu, Y.** (1993). Very late antigen 4-dependent adhesion and costimulation of resting human T cells by the bacterial  $\beta$ 1 integrin ligand invasins. *J. Exp. Med.* **177**: 207-212.
- Erbe, D.V., Wolitzky, B.A., Presta, L.G., Norton, C.R., Ramos, R.J., Burns, D.K., Rumberger, J.M., Narasinga Rao, B.N., Foxall, C., Brandley, B.K. and Lasky, L.A.** (1992). Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* **119**: 215-227.
- Eschenbacher, W.L. and Gravelyn, T.R.** (1987). A technique for isolated airway segment lavage. *Chest* **92**: 105-109.
- Esmon, C.T.** (1983). Protein C: Biochemistry, physiology and clinical implications. *Blood* **62**: 1155-1158.
- Etzioni, A., Frydman, M., Pollack, S., Avidor, I., Phillips, M.L., Paulson, J.C. and Gershoni-Baruch, R.** (1992). Recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *N. Engl. J. Med.* **327**: 1789-1792.
- Fahey, T.J.III, Tracey, K.J., Tekamp-Olson, P., Cousens, L.S., Jones, W.G., Shires, G.T., Cerami, A. and Sherry, B.** (1992). Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J. Immunol.* **148**: 2764-2769.

- Favaloro, E.J.** (1993). Differential expression of surface antigens on activated endothelium. *Immunol. Cell Biol.* **71**: 571-581.
- Feinmark, S.J. and Cannon, P.J.** (1986). Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotrien A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **261**: 16466-16472.
- Ferrero, E., Ferrero, M.E., Pardi, R. and Zocchi, M.R.** (1995). The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett.* **374**: 323-326.
- Filley, W.V., Holley, K.E., Kephart, G.M. and Gleich, G.J.** (1982). Identification by immunofluorescence of eosinophil granule major basic protein in lung tissues of patients with bronchial asthma. *Lancet* **2**: 11-16.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M.** (1987). Angiogenic factors. *Science* **235**: 442-447.
- Folkman, J., Haudenschild, C.C. and Zetter, B.R.** (1979). Longterm culture of capillary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5217-5221.
- Foreman, K.E., Vaporciyan, A.A., Bonish, B.K., Jones, M.L., Johnson, K.J., Glosky, M.M., Eddy, S.M. and Ward, P.A.** (1994). C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **94**: 1147-1155.
- Förstermann, U., Mulsch, A., Bohme, E. and Busse, R.** (1986). Stimulation of a soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Cir. Res.* **58**: 531-538.
- Forsyth, K.D., Simpson, A.C. and Levinsky, R.J.** (1989). CD15 antibodies increase neutrophil adhesion to endothelium by an LFA-1-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* **19**: 1331-1335.
- Fox, B., Bull, T.B. and Guz, A.** (1981). Mast cells in the human alveolar wall: an electron microscopic study. *J. Clin. Pathol.* **34**: 1333-1342.
- Frank, R., Adelmanngriß, B.C., Herrmann, K., Haustein, U.F., Petri, J.B. and Heckmann, M.** (1996). Transforming growth factor-beta controls cell-matrix interaction of microvascular dermal endothelial cells by downregulation of integrin expression. *J. Invest. Dermatol.* **106**: 36-41.
- Frank, R.M., Weidemann, P. and Fellingner, E.** (1977). Ultrastructure of lymphatic capillaries in the human dental pulp. *Cell Tiss. Res.* **178**: 229-238.
- 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**: 5034-5038.
- Franke, W.W., Schmid, E., Osborn, M. and Weber, K.** (1979). Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* **81**: 570-580.
- Freudenthal, P.S. and Steinman, R.M.** (1990). The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 7698-7702.
- Frew, A.J. and Kay, A.B.** (1990). Eosinophils and T-lymphocytes in late phase allergic reactions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **85**: 533-539.
- Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, G.O., Farrow, G.M. and Gleich, G.J.** (1981). Elevated levels of eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clin. Proc.* **56**: 345-353.
- Fukuda, T., Ackerman, S.J., Reed, C.E., Peters, M.S., Dunnette, S.L. and Gleich, G.J.** (1985). Calcium ionophore A23187 causes calcium-dependent cytolytic degranulation in human eosinophils. *J. Immunol.* **135**: 1349-1356.
- Fuller, R.W., Morris, P.K., Richmond, R., Sykes, D., Varndell, I.M., Kemeny, D.M., Cole, P.J., Dollery, C.T. and MacDermot, J.** (1986). Immunoglobulin E-dependent stimulation of human alveolar macrophages: significance in type 1 hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.* **65**: 416-426.



- Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V.** (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **299**: 373-376.
- Galdal, K.S.** (1984). Thromboplastin synthesis in endothelial cells. *Haemostasis* **14**: 378-385.
- Galy, A.H. and Spits, H.** (1992). CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J. Immunol.* **149**: 775-782.
- Gamble, J.R. and Vadas, M.A.** (1988). Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor- $\beta$ . *Science* **242**: 97-99.
- Gamble, J.R. and Vadas, M.A.** (1991). Endothelial adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Immunol.* **146**: 1149-1154.
- Gamble, J.R., Khew-Goodall, Y. and Vadas, M.A.** (1993). Transforming growth factor- $\beta$  inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J. Immunol.* **150**: 4494-4503.
- Garcia-Zepeda, E.A., Rothenberg, M.E., Ownbey, R.T., Celestin, J., Leder, P. and Luster, A.D.** (1996). Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Med.* **2**: 449-456.
- Gauchat, J.F., Henchoz, Sybille, Fattah, D., Mazzei, G., Aubry, J.P., Jomotte, T., Dash, L., Page, K., Solari, R., Aldebert, D., Capron, M., Dahinden, C. and Bonnefoy, J.Y.** (1995). CD40 ligand is functionally expressed on human eosinophils. *Eur. J. Immunol.* **25**: 863-865.
- Gearing, A.J.H. and Newman, W.** (1993). Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today*. **14**: 506-512.
- Geiser, T., Dewald, B., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I. and Baggiolini, M.** (1993). The interleukin-8-related chemotactic cytokines GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , and GRO $\gamma$  activate human neutrophil and basophil leukocytes. *J. Biol. Chem.* **268**: 15419-15424.
- Geng, J.G., Bevilacqua, M.P., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A., Zimmerman, G.A. and McEver, R.P.** (1990). Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **343**: 757-760.
- Gerblich, A.A., Cambell, A.E. and Schuyler, M.R.** (1984). Changes in T-lymphocytes subpopulations after antigenic bronchial provocation in asthmatics. *N. Engl. J. Med.* **310**: 1349-1352.
- Giacomelli, F., Wiener, J. and Spiro, D.** (1970). Cross-striated arrays of filaments in endothelium. *J. Cell Biol.* **45**: 188-192.
- Gilat, D., Hershkoviz, R., Mekori, Y.A., Vlodavsky, I. and Lider, O.** (1994). Regulation of adhesion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 $\beta$ . *J. Immunol.* **153**: 4899-4906.
- Gimbrone, M.A., Cotran, R.S. and Folkman, J.** (1974). Human vascular endothelial cells in culture. *J. Cell Biol.* **60**: 673-674.
- Gimbrone, M.A.Jr., Obin, M.S., Brock, A.F., Luis, E.A., Hass, P.E., Hébert, C.A., Yip, Y.K., Leung, D.W., Lowe, D.G., Kohr, W.J., Dardonne, W.C., Bechtol, K.B. and Baker, J.B.** (1989). Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. *Science* **246**: 1601-1603.
- Gleich, C.J. and Adolphson, C.R.** (1986). The eosinophilic leukocyte. *Adv. Immunol.* **39**: 177-183.
- Goldman, R.D., Milsted, A., Schloss, J.A., Starger, J. and Yerna, M.J.** (1979). Cytoplasmic fibers in mammalian cells: cytoskeletal and contractile elements. *Annu. Rev. Physiol.* **41**: 703-722.
- 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**: 774-783.

- 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**: 40-46.
- Gosset, P., Malaquin, F., Delneste, Y., Wallaert, B., Capron, A., Joseph, M. and Tonnel, A.B. (1993). IL-6 and IL-1 $\alpha$  production is associated with antigen-induced late nasal response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 878-890.
- 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**: 827-834.
- Gosset, P., Tsicopoulos, A., Wallaert, B., Joseph, M., Tonnel, A.B. and Capron, A. (1991). Increased secretion of tumor necrosis factor and interleukin 6 by alveolar macrophages during late asthmatic reaction after bronchial allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**: 561-571.
- Gotlieb, A.I., May, L.McB., Subrahmanyam, L. and Kalnins, V.I. (1981). Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J. Cell Biol.* **91**: 589-594.
- Green, P.J., Tamatani, T., Watanabe, T., Miyasaka, M., Hasegawa, A., Kiso, M., Yuen, C.T., Stoll, M.S. and Feizi, T. (1992). High affinity binding of the leukocyte adhesion molecule L-selectin to 3'-sulphated-Le<sup>a</sup> and -Le<sup>x</sup> oligosaccharides and the predominance of sulphate in this interaction demonstrated by binding studies with a series of lipid-linked oligosaccharides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**: 244-251.
- Griffiths-Johnson, D.A., Collins, P.D., Rossi, A.G., Jose, P.J. and Williams, T.J. (1993). The chemokine, Eotaxin, activates guinea-pig eosinophils in vitro, and causes their accumulation into the lung in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**: 1167-1172.
- Gundel, R.H., Wegner, C.D., Torcellini, C.A. and Letts, L.G. (1992). The role of intercellular adhesion molecule-1 in chronic airway inflammation. *Clin. Exp. Allergy* **22**: 569-575.
- Gundel, R.H., Wegner, C.D., Torcellini, C.A., Clarke, C.C., Haynes, N., Rothlein, R., Smith, W.C. and Letts, L.G. (1991). Endothelial leukocyte adhesion molecule-1 mediates antigen-induced acute airway inflammation and late-phase airway obstruction in monkeys. *J. Clin. Invest.* **88**: 1407-1411.
- Gurevitch, V. and Pannell, R. (1984). Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro in two animal species. *J. Clin. Invest.* **73**: 1731-1739.
- Hadley, T.J., Lu, Z., Wasniowska, K., Martin, A.W., Peiper, S.C., Hesselgesser, J. and Horuk, R. (1994). Postcapillary venule endothelial cells in kidney express a multispecific chemokine receptor that is structurally and functionally identical to the erythroid isoform, which is the Duffy blood group antigen. *J. Clin. Invest.* **94**: 985-991.
- Hakansson, L., Westerlund, D. and Venge, P. (1987). New method for the measurement of eosinophil migration. *J. Leukoc. Biol.* **42**: 689-696.
- Hamaguchi, Y., Kanakura, Y., Fujita, J., Takeda, S., Nakado, T., Tarui, S., Honjo, T. and Kitamura, Y. (1987). Interleukin 4 as an essential factor for *in vitro* clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *J. Exp. Med.* **165**: 268-273.
- Hamid, Q., Barkans, J., Meng, Q., Ying, S., Abrams, J.S., Kay, A.B. and Moqbel, R. (1992). Human eosinophils synthesize and secrete IL-6 *in vitro*. *Blood* **80**: 1496-1501.
- Handa, K., Neudelman, E.D., Stroud, M.R., Shiozawa, T. and Hakomori, S. (1991). Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le<sup>x</sup> and sialosyl-Le<sup>a</sup>, and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**: 1223-1230.
- Hansel, T.T., De Vries, I.J.M., Iff, T., Rihs, S., Wandzilak, M., Betz, S., Blaser, K. and Walker, C. (1991). An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J. Immunol. Meth.* **145**: 105-110.

- Hart, M.N., Fabry, Z., Lovehoman, L., Keiner, J., Sadewasser, K.L. and Moore, S.A. (1992). Brain microvascular smooth muscle and endothelial cells produce granulocyte macrophage colony-stimulating factor and support colony formation of granulocyte-macrophage like cells. *Am. J. Pathol.* **141**: 421-427.
- Hartnell, A., Moqbel, R., Walsh, B., Bradley, B. and Kay, A.B. (1990). Fc $\gamma$  and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* **69**: 264-270.
- Hatton, M.W.C., Berry, L.R. and Regoeczi, E. (1978). Inhibition of thrombin by antithrombin III in the presence of certain glycosaminoglycans found in the mammalian aorta. *Thromb. Res.* **13**: 665-670.
- Haudenschild, C.C., Cotran, R.S., Gimbrone, M.A. and Folkman, J. (1975). Fine structure of the vascular endothelium. *J. Ultrastruct. Res.* **50**: 22-32.
- Haudenschild, C.C., Zahniser, D., Folkman, J. and Klagsburn, M. (1976). Human vascular endothelial cells in culture: lack of response to serum growth factors. *Exp. Cell Res.* **98**: 175-183.
- Hayes, L.W., Coguen, C.A., Ching, S.F. and Slakey, L.L. (1978). Angiotensin converting enzyme: accumulation in medium from cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**: 1147-1153.
- Hechtman, D.H., Cybulsky, M.I., Fuchs, H.J., Baker, J.B. and Gimbrone, M.A.Jr. (1991). Intravascular IL-8: inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute accumulation. *J. Immunol.* **147**: 883-892.
- Hemler, M.E. (1990). VLA proteins in the integrin family: Structures, functions, and their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **8**: 365-400.
- Henderson, W.R. and Kaliner, M. (1978). Immunologic and nonimmunologic generation of superoxide from mast cells and basophils. *J. Clin. Invest.* **61**: 187-196.
- Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Schiffer, S.B., Goff, D., Moy, P., Chi-Rosso, G., Luhowskyj, S., Lobb, R. and Osborn, L. (1991). Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J. Biol. Chem.* **266**: 6682-6685.
- Heutlin, L.M., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. and Thomas, L.L. (1985). Donor sensitivity to basophil activation by eosinophil granule major basic protein. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **77**: 216-217.
- Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y. and Marumo, F. (1989). Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **78**: 225-228.
- Hoak, J., Fry, G., Czervionke, R., Haycraft, D. and Smith, J.B. (1981). The endothelial surface and platelet interaction. In: *Chemistry and Biology of Heparin* (Lundblad et al. eds.). New York, Elsevier/North-Holland Inc, 115.
- Hollenbaugh, D., Mischel-Petty, N., Edwards, C.P., Simon, J.C., Denfeld, R.W., Kiener, P.A. and Aruffo, A. (1995). Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* **182**: 33-40.
- Hopkins, N.U. and Gorman, R.R. (1981). Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J. Clin. Invest.* **67**: 540-546.
- Horuk, R., Chitnis, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J. and Miller, L.H. (1993). A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science* **261**: 1182-1184.
- Howell, G., Pham, P., Taylor, D., Foxwell, B. and Feldmann, M. (1991). Interleukin 4 induces interleukin 6 production by endothelial cells: synergy with interferon- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* **21**: 97-101.
- Hoyer, L.W. (1981). The factor VIII complex: structure and function. *Blood* **58**: 1-13.
- Hsu-Lin, S.C., Berman, C.L., Furie, B.C., August, D. and Furie, B. (1984). A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. *J. Biol. Chem.* **259**: 9121-9126.



- Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F. and Weiss, S.J.** (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**: 99-102.
- Ichinose, M. and Barnes, P.J.** (1989). Inhibitory histamine H3 receptors on cholinergic nerves in human airways. *Eur. J. Pharmacol.* **163**: 383-386.
- Ihle, J.N., Keller, J., Oroszalan, S., Henderson, L.E., Copeland, T.D., Fitch, F., Prystowsky, M.B., Goldwasser, E., Schrader, J.W., Palaszynski, E., Dy, M. and Lebel, B.** (1983). Biologic properties of homogenous interleukin 3. Demonstration of WEHI-3 growth factor activity, mast cell growth factor activity, P cell-stimulating factor activity, colony-stimulating factor activity, and histamine-producing cell-stimulating factor activity. *J. Immunol.* **131**: 282-287.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. 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**: 2863-2867.
- 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**: 339-345.
- Issekutz, A.C. and Movat, H.Z.** (1980). The in vivo quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. *Lab. Invest.* **42**: 310-317.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, 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**: 2745-2756.
- Jaffe, E.A.** (1977). Endothelial cells and the biology of factor VIII. *N. Eng. J. Med.* **296**: 377-383.
- Jaye, M., Howk, R., Burgess, W.H., Ricca, G.A., Chiu, I.M., Ravera, M.W., O'Brien, S.J., Modi, W.S., Maciag, T. and Drohan, W.N.** (1986). Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science* **223**: 541-545.
- Jeannin, P., Delneste, Y., Gosset, P., Molet, S., Lassalle, P. Hamid, Q., Tsiopoulos, A. and Tonnel, A.B.** (1994). Histamine induces IL-8 secretion by endothelial cells. *Blood* **84**: 2229-2233.
- Jiang, Y., Beller, D.I., Frenzl, G. and Graves, D.T.** (1992). Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* **148**: 2423-2428.
- Jirik, F.R., Podor, T.J., Hirano, T., Kishimoto, T., Loskutoff, D.J., Carson, D.A. and Lotz, M.** (1989). Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J. Immunol.* **142**: 144-147.
- Johnson, A.R.** (1980). Human pulmonary endothelial cells in culture: activities of cells from arteries and cells from veins. *J. Clin. Invest.* **65**: 841-850.
- Johnson, A.R. and Erdos, E.G.** (1977). Metabolism of vasoactive peptides by human endothelial cells in culture: angiotensin I converting enzyme and angiotensinase. *J. Clin. Invest.* **59**: 684-695.
- Jose, P.J., Griffiths-Johnson, D.A., Collins, P.D., Walsh, D.T., Moqbel, R., Totty, N.F., Truong, O., Hsuan, J.J. and Williams, T.J.** (1994). Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J. Exp. Med.* **179**: 881-887.
- Joseph, M.** (1988). Platelets in allergy: assays and interpretation. *Clin. Rev. Allergy* **6**: 191-210.
- Joseph, M., Tonnel, A.B., Capron, A. and Voisin, C.** (1980). Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. *Clin. Exp. Immunol.* **40**: 416-422.

- 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**: 221-230.
- Jung, T.M. and Dailey, M.O.** (1990). Rapid modulation of homing receptors (gp90<sup>MEL14</sup>) induced by activators of protein kinase C: Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J. Immunol.* **144**: 3130-3136.
- Kaliner, M.** (1989). Asthma and mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **83**: 510-520.
- Kaneko, M., Horie, S., Kato, M., Gleich, G.J. and Kita, H.** (1995b). IgG-induced eosinophil degranulation is dependent on cellular adhesion through CD11b/18. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **151**: A218.
- Kaneko, M., Swanson, M.C., Gleich, G.J. and Kita, H.** (1995a). Allergen-specific IgG1 and IgG3 through FcγRII induce eosinophil degranulation. *J. Clin. Invest.* **95**: 2813-2821.
- Karmann, K., Hughes, C.C.W., Schechner, J., Fanslow, W.C. and Pober, J.S.** (1995). CD40 on human endothelial cells: Inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4342-4346.
- Kay, A.B.** (1991a). T lymphocytes and their products in atopic allergy and asthma. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **94**: 189-193.
- Kay, A.B.** (1991c). Asthma and inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**: 893-910.
- Kay, A.B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S.R., Moqbel, R., Wardlaw, A.J. and Hamid, Q.** (1991b). 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**: 775-778.
- Kelley, J.** (1990). Cytokines of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**: 765-788.
- Khalife, J., Capron, M., Cesbron, J-Y., Tai, P-C., Taelman, H., Prin, L. and Capron, A.** (1986). Role of specific IgE antibodies in peroxidase (EPO) release from human eosinophils. *J. Immunol.* **137**: 1659-1664.
- Khew-Goodall, Y., Butcher, C.M., Litwin, M.S., Newlands, S., Korpelainen, E.I., Noack, L.M., Berndt, M.C., Lopez, A.F., Gamble, J.R. and Vadas, M.A.** (1996). Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood* **87**: 1432-1438.
- Kimani, G., Tonnesen, M.G. and Henson, P.M.** (1988). Stimulation of eosinophil adherence to human vascular endothelial cells in vitro by platelet-activating factor. *J. Immunol.* **140**: 3161-3166.
- Kinet, J.P., Blank, U., Ra, C., White, K., 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. USA.* **85**: 6483-6487.
- 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**: 4605-4610.
- King, G.L. and Buchwald, S.** (1984). Characterization and partial purification of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J. Clin. Invest.* **73**: 392-398.
- Kirk, J.E.** (1959). Anticoagulant activity of human arterial mucopolysaccharides. *Nature* **184**: 369-371.
- Kishimoto, T.** (1989b). The biology of the interleukin-6. *Blood* **74**: 1-10.
- Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L. and Butcher, E.C.** (1989a). Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* **245**: 1238-1241.

- Kita, H., Abu-Ghazaleh, R.I., Sur, S. and G.J. Gleich.** (1995). Eosinophil major basic protein induces degranulation and IL-8 production by human eosinophils. *J Immunol.* **154:** 4749-4758.
- Kita, H., Ohnishi, T., Okubo, Y., Weiler, D., Abrams, J.S. and Gleich, G.J.** (1991). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.* **174:** 745-748.
- Knauer, K.A., Kagey-Sobotka, A., Adkinson, N.F. and Lichtenstein, L.M.** (1984). Platelet augmentation of IgE-dependent histamine release from human basophils and mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **74:** 29-35.
- 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:** 1404-1407.
- Kojima, S., Vernooy, D., Moscatelli, D., Amanuma, H. and Rifkin, D.B.** (1995). Lipopolysaccharide inhibits activation of latent transforming growth factor-beta in bovine endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **163:** 210-219.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. and Seed, B.** (1996).  $\alpha$ L $\beta$ 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* **86:** 233-242.
- Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. and Köhler, G.** (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368:** 339-342.
- Kotovuori, P., Tontti, E., Pigott, R., Shepherd, M., Kiso, M., Hasegawa, A., Renkonen, R., Nortamo, P., Altieri, D.C. and Gahmberg, C.G.** (1993). The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. *Glycobiology* **3:** 131-136.
- Kowalski, M.L. and Kaliner, M.A.** (1988). Neurogenic inflammation, vascular permeability, and mast cells. *J. Immunol.* **140:** 3905-3911.
- Kreutner, W., Chapman, R.W., Gulbenkian, A. and Siegel, M.I.** (1987). Antiallergic activity of loratadine, a non-sedating antihistamine. *Allergy* **42:** 57-63.
- Kubes, P., Suzuki, M. and Granger, D.N.** (1991). Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88:** 4651-4655.
- Kuijpers, T.W., Hoogerwerf, M., van der Laan, L.J.W., Nagel, G., van der Schoot, C.E., Grunert, F. and Roos, D.** (1992). CD66 nonspecific crossreacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. *J. Cell Biol.* **118:** 457-466.
- Kumar, P., Kumar, S., Marsden, H.B., Lynch, P.G. and Earnshaw, E.** (1980). Weibel-Palade bodies in endothelial cells as marker for angiogenesis in brain tumors. *Cancer Res.* **40:** 2010-2019.
- Kuna, P., Reddigari, 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:** 1920-1924.
- Lai, C.K.W. and Holgate, S.T.** (1988). The mast cell in asthma. In: Kay, A.B. ed. *Clinical immunology and allergy: the allergic basis of asthma*. London: Balliere Tindall, 37-65.
- 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:** 599-606.
- Lamas, A.M., Mulrone, C.M. and Schleimer, R.P.** (1988). Studies on the adhesive interaction between purified human eosinophils and cultured vascular endothelial cells. *J. Immunol.* **140:** 1500-1505.
- Lamkhioued, B., Aldebert, D., Soussi-Gouni, A., Delaporte, E., Goldman, M., Capron, A. and Capron, M.** (1995). Synthesis of cytokines by eosinophils and their regulation. *Int. Arch. All. Immunol.* **107:** 122-123.



- Langner, J., Riemann, D. and Machulla, H.K.G.** (1995). Antigen processing and presentation by vascular endothelial cells: biochemical and cell physiological preconditions. *Endothelium* **3**: 141-150.
- Larsen, C.G., Anderson, A.O., Appella, E., Oppenheim, J.J. and Matsushima, K.** (1989b). The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* **243**: 1464-1466.
- Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G.E., Furie, B.C., Erban, J.K., Bonfanti, R., Wagner, D.D. and Furie, B.** (1989a). PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* **59**: 305-312.
- 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**: 467-474.
- Larson, D.M. and Sheridan, J.D.** (1982). Intercellular junctions and transfer of small molecules in primary vascular endothelial cultures. *J. Cell Biol.* **92**: 183-191.
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Dowbenko, D., Imai, Y., Henzel, W.J., Grimley, C., Fennie, C., Gillet, N., Watson, S.R. and Rosen, S.D.** (1992). An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* **69**: 927-938.
- Lassalle, P., Gosset, P., Delneste, Y., Tsicopoulos, A., Capron, A., Joseph, M. and Tonnel, A.B.** (1993). 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**: 105-110.
- Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Van der Heyden, J., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R. and Tonnel, A.B.** (1996). ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J. Biol. Chem.* **271**: 20458-20464.
- Lawrence, M.B. and Springer, T.A.** (1993). Neutrophils roll on E-selectin. *J. Immunol.* **151**: 6338-6346.
- Lazarides, E.** (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* **283**: 249-256.
- Lee, C.E., Neuland, M.E., Teaford, H.G., Villacis, B.F., Dixon, P.S., Valtier, S., Yeh, C.H., Fournier, D.C. and Charlesworth, E.N.** (1992). Interleukin-6 is released in the cutaneous response to allergen challenge in atopic individuals. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 878-890.
- Leeuwenberg, J.F.M., Jeunhomme, T.M. and Buurman, W.A.** (1992). Role of ELAM-1 in adhesion of monocytes to activated human endothelial cells. *Scand. J. Immunol.* **35**: 335-341.
- Leeuwenberg, J.F.M., von Asmuth, E.J.U., Jeunhomme, T.M.A.A. and Buurman, W.A.** (1990). IFN $\gamma$  regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J. Immunol.* **145**: 2110-2114.
- Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S. and Westweber, D.** (1994). Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell Biol.* **125**: 471-481.
- Leonard, E.J., Skeel, A., Yoshimura, T., Noer, K., Kutvirt, S. and Van Epps, D.** (1990). Leukocyte specificity and binding of neutrophil attractant/activation protein-1. *J. Immunol.* **144**: 1323-1330.
- Leung, D.Y.M. and Geha, R.S.** (1987). Regulation of the human IgE antibody response. *Int. Rev. Immunol.* **2**: 75-91.
- Levi-Schaffer, F., Barkans, J., Newman, T.M., Ying, S., Wakelin, M., Hohenstein, R., Barak, V., Lacy, P., Kay, A.B. and Moqbel, R.** (1996). Identification of interleukin 2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunol.* **87**: 155-161.
- Levin, E.G.** (1983). Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme-inhibitor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 6804-6808.

- Levin, E.G., Marzec, U., Anderson, J. and Harker, A. (1979). Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured endothelial cells *J. Clin. Invest.* **74**: 1988-1995.
- 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**: 1432-1438.
- Lim, K., Wan, H.C., Resnick, M., Wong, D.T.W., Cruikshank, W.W., Kornfeld, H., Center, D.M., Weller, P.F. (1996). Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J. Immunol.* **156**: 2566-2570.
- Lin, P.S., Ho, K.C., Sung, S.J. and Gladding, J. (1992). Effect of tumour necrosis factor, heat, and radiation on the viability and microfilament organization in cultured endothelial cells. *Int. J. Hyperthermia.* **8**: 667-677.
- Lincoln, T.M. and Cornwell, T.L. (1991). Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* **28**: 129-137.
- Lobb, R.R., Chi-Rosso, G., Leone, D.R., Rosa, M.D., Bixler, S., Newman, B.M., Luhowskyj, S., Benjamin, C.D., Douglas, I.G., Goelz, S.E., Hession, C. and Chow, P.C. (1991a). Expression and functional characterization of a soluble form of endothelial adhesion molecule 1 (ELAM-1). *J. Immunol.* **147**: 124-129.
- Lobb, R.R., Chi-Rosso, G., Leone, D.R., Rosa, M.D., Newman, B.M., Luhowskyj, S., Osborn, L., Schiffer, S., Benjamin, C., Douglas, I.G., Hession, C. and Chow, P.C. (1991b). Expression and functional characterization of a soluble form of vascular cell adhesion molecule-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**: 1498-1504.
- 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 alpha and beta differ in their capacities to generate interleukin-1 release from human endothelial cells. *J. Immunol.* **139**: 1891-1895.
- Lopez, A.F., Williamson, D.J., Gamble, J.R., Begley, C.G., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J., Waltersdorff, A., Wong, G., Clark, S.C. and Vadas, M.A. (1986). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates in vitro mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J. Clin. Invest.* **78**: 1220-1228.
- 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**: 223-234.
- Lorant, D.E., Topham, M.K., Whatley, R.E., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A. (1993). Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* **92**: 559-570.
- Lüsher, T.F., Oemar, B.S., Boulanger, C.M. and Hahn, A.W.A. (1993a). Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. Part I. *J. Hypertens.* **11**: 7-11.
- Lüsher, T.F., Oemar, B.S., Boulanger, C.M. and Hahn, A.W.A. (1993b). Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors. Part II. *J. Hypertens.* **11**: 121-126.
- Lyberg, T., Galdal, K.S., Evensen, S.A. and Prydz, H. (1983). Cellular cooperation in endothelial cell thromboplastin synthesis. *Br. J. Hematol.* **53**: 85-95.
- Lyons, C.R., Orloff, G.J. and Cunningham, J.M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **267**: 6370-6374.
- Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P.R. and Forand, R. (1979). An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5674-5678.
- Marcum, J., Mc Kenney, J. and Rosenberg, R. (1984). The acceleration of thrombin-anti-thrombin complex formation in rat hindquarters via heparin-like molecules bound to endothelium. *J. Clin. invest.* **74**: 341-350.

- Marcus, A.J., Weksler, B.B. and Jaffe, E.A. (1978). Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide H<sub>2</sub> and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **253**: 7138-7141.
- Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T.J., Galanaud, P. and Emilie, D. (1995). Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. *J. Immunol.* **154**: 1870-1878.
- 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**: 813-819.
- Marom, Z., Shelhamer, J.N. and Kaliner, M. (1985). Human monocyte-derived mucus secretagogue. *J. Clin. Invest.* **75**: 191-198.
- Marsden, P.A., Schappert, K.T., Chen, H.S., Flowers, M., Sundell, C.L., Wilcox, J.N., Lamas, S. and Michel, T. (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* **307**: 187-293.
- Marsh, W.R., Irvin, C.G., Murphy, K.R., Behrens, B.L. and Larsen, G.L. (1985). Increases in airway hyperreactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* **131**: 875-879.
- Masaki, T. (1993). Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocrine Rev.* **14**: 256-268.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolffwiniski, B., Jouvin, M.H., Kilgus, O., Kinet, J.P. and Stingl, G. (1994). Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J. Exp. Med.* **179**: 745-750.
- Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* **74**: 541-554.
- McEver, R.P. (1994). Selectins. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 75-84.
- McEver, R.P. and Martins, M.N. (1984). A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelet. *J. Biol. Chem.* **259**: 9799-9804.
- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L. and Bainton, D.F. (1989). GMP-140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* **84**: 92-99.
- McLaren, D.J., McKean, J.R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A.B. (1981). Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins *in vitro*. *Parasite Immunol.* **3**: 359-373.
- Messer, J.W., Peters, G.A. and Bennett, W.A. (1960). Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma. *Chest* **38**: 616-624.
- Metcalf, D., Begley, C.G., Johnson, G.R., Nicola, N.A., Vadas, M.A., Lopez, A.F., Williamson, D.J., Wong, G.G., Clark, S.C. and Wang, E.A. (1986). Biologic properties *in vitro* of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **67**: 37-45.
- Miadonna, A., Milazzo, N., Lorini, M., Marchesi, E. and Tedeschi, A. (1994). Inhibitory effect of the H1 antagonist loratadine on histamine release from human basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**: 12-17.
- Moncada, S. and Vane, J.R. (1979). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* **30**: 293-331.
- Moncada, S., Gryglewski, S., Bunting, S. and Vane, J.R. (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* **263**: 663-665.

- Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A. and Vane, Jr. (1977). Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI<sub>2</sub>) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb. Res.* **11**: 323-344.
- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A. and McEver, R.P. (1992). Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* **118**: 445-456.
- Moqbel, R., Levi-Schaffer, F. and Kay, A.B. (1994). Cytokine generation by eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **94**: 1183-1188.
- Morland, C.M., Wilson, S.J., Holgate, S.T. and Roche, W.R. (1992). Selective eosinophil leukocyte recruitment by transendothelial migration and not by leukocyte-endothelial cell adhesion. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **6**: 557-566
- Moser, R., Fehr, J. and Bruijnzeel, P.L.B. (1992). IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J. Immunol.* **149**: 1432-1438.
- Moy, J.N., Gleich, G.J. and Thomas, L.L. (1990). Noncytotoxic activation of neutrophils by eosinophil granule major basic protein. *J. Immunol.* **145**: 2626-2632.
- Muller, W.A. and Weigl, S.A. (1992). Monocyte-selective transendothelial migration: Dissection of the binding and transmigration phases by an in vitro assay. *J. Exp. Med.* **176**: 819-828.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X. and Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J. Exp. Med.* **178**: 449-460.
- Munro, J.M., Lo, S.K., Corless, C., Robertson, M.J., Lee, N.C., Barnhill, R.L., Weinberg, D.S. and Bevilacqua, M.P. (1992). Expression of sialyl-Lewis<sup>x</sup>, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* **141**: 1397-1408.
- Murphy, K.R., Wilson, M.C., Irvin, C.G., Glezen, L.S., Marsh, W.R., Haslett, C., Henson, P.M. and Larsen, G.L. (1986). The requirement for polymorphonuclear leukocytes in the late asthmatic response and heightened airways reactivity in an animal model. *Am. Rev. Respir. Dis.* **134**: 62-68.
- Nathan, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**: 319-326.
- Nawroth, P.P., Stern, D.M., Kiesel, W. and Bach, R. (1985). Cellular requirements for tissue factor generation by bovine aortic endothelial cells in culture. *Thromb. Res.* **40**: 677-691.
- Nazario, B., Hu, R-M., Pedram, A., Prins, B. and Levin, E.R. (1995). Atrial and brain natriuretic peptides stimulate the production and secretion of C-type natriuretic peptide from bovine aortic endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **95**: 1151-1157.
- Neote, K., Darbonne, W., Ogez, J., Horuk, R. and Schall, T.J. (1993). Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 12247-12249.
- Nonaka, M., Nonaka, R., Woolley, K., Adelroth, E., Miura, K., Okhawara, Y., Glibetic, M., Nakano, K., O'Byrne, P., Dolovitch, J. and Jordana, M. (1995). Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils. *J. Immunol.* **155**: 3234-3244.
- Nossel, H.L. and Vogel, H.J. (1982). Pathobiology of the endothelial cell. *Academic Press New York*.
- O'Byrne, P. (1995). Neutrophil dynamics in airway disease. In: Busse, W.W., Holgate, S.T. eds. *Asthma and rhinitis*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 389-396.
- O'Byrne, P.M., Dolovich, J. and Hargrave, F.E. (1987). Late asthmatic responses. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**: 740-751.

- O'Donnell, M.C., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. and Thomas, L.L. (1983). Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J. Exp. Med.* **157**: 1981-1991.
- Ohmori, K., Takada, A., Yoneda, T., Buma, Y., Hirashima, K., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A. and Kannagi, R. (1993). Differentiation dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I-antigens on human lymphoid cells and its implications for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium. *Blood* **81**: 101-111.
- Ohmori, Y. and Hamilton, T.A. (1994). IFN- $\gamma$  selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **153**: 2204-2212.
- Ohnaka, K., Takayanagi, R., Ymauchi, T., Okazaki, H., Ohashi, M., Umeda, F. and Nawata, H. (1990). Identification and characterization of endothelin converting activity in cultured bovine endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**: 1128-1136.
- 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**: 1192-1198.
- Okahara, K., Kambayashi, J.-I., Ohnishi, T., Fujiwara, Y., Kawasaki, T. and Monden, M. (1995). Shear stress induces expression of CNP gene in human endothelial cells. *FEBS Lett.* **373**: 108-110.
- Ookawa, K., Sato, M. and Ohshima, N. (1992). Changes in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress. *J. Biochem.* **25**: 1321-1328.
- Oppenheim, J.J., Kovaks, E.J., Matsushima, K. and Durum, S.K. (1986). There is more than one interleukin 1. *Immunol. Today* **7**: 45-56.
- Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N. and Matsushima, K. (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 617-648.
- Oppenheimer-Marks, N., Davis, L.S., Bogue, D.T., Ramberg J. and Lipsky, P.E. (1991). Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**: 2913-2921.
- Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**: 664-666.
- Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.
- Peiper, S.C., Wang, Z.-X., Neote, K., Martin, A.W., Showell, H.J., Conklyn, M.J., Ogborne, K., Hadley, T.J., Lu, Z.-H., Hesselgesser, J. and Horuk, R. (1995). The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) is expressed in endothelial cells of Duffy negative individuals who lack the erythrocyte receptor. *J. Exp. Med.* **181**: 1311-1317.
- Pelikan, P., Gimbrone, M.A.Jr. and Cotran, R.S. (1979). Distribution and movement of anionic cell surface sites in cultured human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **32**: 69-80.
- Persson, C.G.A. (1986). Role of plasma exudation in asthmatic airways. *Lancet* **2**: 1126-1129.
- Peterson, C.G.B., Skoog, V. and Venge, P. (1986). Human eosinophil cationic proteins (ECP and EPX) and their suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Immunobiology* **171**: 1-13.
- Peunica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennet, W.F., Velverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V. and Collen, D. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in E. Coli. *Nature* **301**: 214-221.
- Phillips, M.L., Nudelman, E., Gaeta, F.C.A., Perez, M., Singhal, A.K., Hakomori, S.I. and Paulson, J.C. (1990). ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le<sup>x</sup>. *Science* **250**: 1130-1132.



- Phillips, P., Kumar, P., Kumar, S. and Woghe, M. (1979). Isolation and characterization of endothelial cells from rat and cow brain white matter. *J. Anat.* **129**: 261-272.
- Phillips, P.G. (1994). Thrombin-induced alterations in endothelial cell cytoarchitectural and functional properties. *Semin. Thromb. Hemost.* **20**: 417-425.
- Picker, L.J., Warnock, R.A., Burns, A.R., Doerschuk, C.M., Berg, E.L. and Butcher, E.C. (1991). The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* **66**: 921-933.
- Pinola, M., Renkonen, R., Majuri, M-L., Tiisala, S. and Saksela, E. (1994). Characterization of the E-selectin ligand on NK cells. *J. Immunol.* **152**: 3586-3594.
- Plaut, M., Pierce, J.H., Watson, C.J., Haley-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**: 64-67.
- Pober, J. and Cotran, R.S. (1990). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* **70**: 427-451.
- Pober, J.S., Gimbrone, M.A.Jr., Cotran, R.S., Reiss, C.S., Burakoff, S.J., Fiers, W., Ault, K.A. (1983). Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human γ-interferon. *J. Exp. Med.* **157**: 1339-1353.
- Pober, J.S.M., Gimbrone, M.A.Jr, Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R. and Springer, T.A. (1986). Overlapping patterns of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.* **137**: 1893-1896.
- Ponath, P.D., Qin, S., Ringler, D.J., Clark-Lewis, I., Wang, J., Kassam, N., Smith, H., Shi, X., Gonzalo, J-A, Newman, W., Gutierrez-Ramos, J-C. and Mackay, C.R. (1996). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J. Clin. Invest.* **97**: 604-612.
- Porter, J.G., Catalano, R., McEnroe, G., Lewicki, J.A. and Protter, A.A. (1992). C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **263**: C1001-C1006.
- 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**: 3534-3538.
- Prin, L., Plumas, J., Gruart, V., Loiseau, S., Aldebert, D., Ameisen, J.C., Vermersch, A., Fenaux, P., Bletry, O. and Capron, M. (1991). Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptor: a marker of disease activity in the hypereosinophilic syndrome. *Blood* **78**: 2626-2632.
- Reidy, M.A. and Schwartz, S.M. (1981). Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium. *Lab. Invest.* **44**: 301-309.
- Resink, T.J., Scott-Burden, T., and Bühler, F.R. (1988). Endothelin stimulates phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 1360-1368.
- Rhodes, J.M., Engelman, E., Tilberg, A.F. and Gifford, R.R.M. (1995). Transforming growth factor-beta 1 serves as an autocrine inhibitor of human endothelial cell lymphocyte adhesion. *J. Surg. Res.* **59**: 719-724.
- Ribeiro, S.F.M., Schultzcherry, S. and Murphyullrich, J.E.C. (1995). Heparin-binding vitronectin up-regulates latent TGF-beta production by bovine aortic endothelial cells. *J. Cell Sci.* **108**: 1553-1561.
- Rijken, D.C., Van Hinsberg, V.W.M. and Sens, H.E.C. (1984). Quantitation of tissue-type plasminogen activator in human endothelial cell culture by use of an enzyme immunoassay. *Thromb. Res.* **33**: 145-153.

- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R. and Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**: 471-478.
- Robinson, D., Hamid, Q., Bentley, A., Ying, S., Kay, A.B. and Durham, S.R. (1993). Activation of CD4+ T cells, increased TH-2 type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **92**: 313-324.
- Robinson, D.S., 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. *N. Engl. J. Med.* **326**: 298-304.
- Roche, W.R. (1991). Fibroblasts and asthma. *Clin. Exp. Allergy* **21**: 545-548.
- Roche, W.R., Beasley, R., Williams, J.H. and Holgate, S.T. (1989). Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* **1**: 520-524.
- Rodgers, G.M. and Shuman, M.A. (1983). Prothrombin is activated on vascular endothelium cells by factor Xa and calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 7001-7005.
- Rohrbach, M.S., Wheatley, C.L., Slifman, N.R. and Gleich, G.J. (1990). Activation of platelets by eosinophil granule protein. *J. Exp. Med.* **172**: 1271-1274.
- Rollins, B.J. and Pober, J.S. (1991). Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **138**: 1315-1319.
- Rollins, B.J., Yoshimura, T., Leonard, E.J. and Pober, J.S. (1990). Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* **136**: 1229-1233.
- Romer, L.H., McLean, N.V., Yan, H-C., Daise, M., Sun, J. and DeLisser, H.M. (1995). IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J. Immunol.* **154**: 6582-6592.
- Rosenthal, R.R., Norman, P.S., Summer, W.R. and Permutt, S. (1977). Role of the parasympathetic system in antigen-induced bronchospasme. *J. Appl. Physiol.* **42**: 600-606.
- Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S.C., Schall, T.J. and Dahinden, C.A. (1992). RANTES and macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* **176**: 1489-1495.
- 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**: 1167-1176.
- Rubanyi, G.M., Romero, J.C. and Vanhoute, P.M. (1986). Flow induced release of endothelium derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* **250**: 1145-1149.
- Ryan, U.S., Ryan, J.W., Whitaker, C. and Chiu, A. (1976). Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tiss. Cell* **8**: 125-134.
- Samuelson, B. (1983). Leukotriens: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**: 568-575.
- Sanderson, C.J., Warren, D.J. and Strath, M. (1985). Identification of a lymphokine that stimulates eosinophil differentiation *in vitro*. *J. Exp. Med.* **162**: 60-70.
- Savage, C.O.S., Brooks, C.J., Harcourt, G.C., Picard, J.K., King, W., Sansom, D.M. and Willcox, N. (1995). Human vascular endothelial cells process and present autoantigen to human T cell lines. *Int. Immunol.* **7**: 471-479.
- Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J. and Goeddel, D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**: 669-671.

- Schleiffenbaum, B., Spertini, O. and Tedder, T.F. (1992). Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J. Cell Biol.* **119**: 229-238.
- Schleimer, R.P., Sterbinsky, S.A., Kaiser, J., Bickel, C.A., Klunk, D.A., Tomioka, K., Newman, W., Lusinskas, F.W., Gimbrone, M.A.Jr., McIntyre, B.W. and Bochner, B.S. (1992). IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium: Association with expression of VCAM-1. *J. Immunol.* **148**: 1086-1092.
- Schwartz, D., Andalibi, A., Chaverri-Almada, L., Berliner, J.A., Kirchgessner, T., Fang, Z.T., Tekamp-Olson, P., Lulis, A.J., Gallegos, C., Fogelman, A.M. and Territo, M.C. (1994). Role of the GRO family of chemokines in monocyte adhesion to MM-LDL-stimulated endothelium. *J. Clin. Invest.* **94**: 1968-1973.
- Scott, T. and Kaliner, M. (1993). Mast cells in asthma. *The mast cell in health and disease*. Ed Kaliner, M.A. and Metcalf, D.D., Marcel Dekker, New York, 575-608.
- Seltzer, J., Bigby, B.G., Stulbarg, M., Holtzman, M.J., Nadel, J.A., Ueki, I.F., Leikauf, G.D., Goetzl, E.J. and Boushey, H.A. (1986). O<sub>3</sub><sup>-</sup> induced change in bronchial reactivity to metacholine and airway inflammation in humans. *J. Appl. Physiol.* **60**: 1321-1326.
- Shapiro, R., Riordan, J.F. and Vallee, B.L. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiotensin. *Biochemistry* **25**: 3527-3532.
- Shelhamer, J.H., Marom, Z. and Kaliner, M. (1980). Immunologic and neuropharmacologic stimulation of mucous glycoprotein release from human airways *in vitro*. *J. Clin. Invest.* **66**: 1400-1408.
- Shelhamer, J.H., Marom, Z., Sun, F., Black, M.K. and Kaliner, M. (1981). The effects of arachinoids and leukotrienes on the release of mucus from human airways. *Chest* **81S**: 36-37.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y. and Shaw, S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol. Today* **13**: 106-112.
- 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**: 1296-1303.
- Shirahama, T. and Cohen, A.S. (1972). The role of mucopolysaccharides in vesicle architecture and endothelial transport. An electron microscope study of myocardial blood vessels. *J. Cell Biol.* **52**: 198-206.
- Shyy, Y.J., Wickham, L.L., Hagan, J.P., Hsieh, H.J., Hu, Y.L., Telian, S.H., Valente, A.J., Sung, K.L.P. and Chien, S. (1993). Human monocyte colony-stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemotactic protein-1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers. *J. Clin. Invest.* **92**: 1745-1751.
- Sica, A., Wang, J.M., Colotta, F., Dejana, E., Mantovani, A., Oppenheim, J.J., Larsen, C.G., Zachariae, C.O.C. and Matsushima, K. (1990). Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and TNF. *J. Immunol.* **144**: 3034-3038.
- Simionescu, M., Simionescu, N., Silbert, J.E. and Palade, G.E. (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites. *J. Cell Biol.* **90**: 614-621.
- Simmons, D.L., Walker, C., Power, C. and Pigott, R. (1990). Molecular cloning of CD31, a putative intercellular adhesion molecule closely related to carcinoembryonic antigen. *J. Exp. Med.* **171**: 2147-2152.
- Skinner, M.P., Fournier, D.J., Andrews, R.K., Gorman, J.J., Chesterman, C.N. and Berndt, M.C. (1989). Characterization of human platelet GMP-140 as a heparin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**: 1373-1379.

- Smeets, E.F., de Vries, T., Leeuwenberg, J.F., van den Eijnden, D.H., Buurman, W.A. and Neeffjes, J.J.** (1993). Phosphorylation of surface E-selectin and the effect of soluble ligand (sialyl Lewis <sup>x</sup>) on the half-life of E-selectin. *Eur. J. Immunol.* **23**: 147-151.
- 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**: 491-497.
- Smyth, S.S., Joneckis, C.C. and Parise, L.V.** (1993). Regulation of vascular integrins. *Blood* **81**: 2827-2843.
- Snyder, J.A. and McIntosh, R.J.** (1976). Biochemistry and physiology of microtubules. *Ann. Rev. Biochem.* **45**: 699-720.
- Soussi-Gouni, A., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Delaporte, A., Capron, A., Kinet, J.P. and Capron, M.** (1994). High affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. *Nature* **367**: 183-186.
- Soussi-Gouni, A., Vorng, H., Capron, M., Capron, A., Kinet, J.P. and Joseph, M.** (1995). The high affinity receptor for IgE on human platelets triggers their cytotoxic functions. 51 Ann. Meet. Am. Acad. All. Immunol. (AAAI), 24 February-1 March 1995, New York. *J. Allergy Clin. Immunol.* **95**: 176.
- Spiegelberg, H.L.** (1984). Structure and function of Fc receptors for IgE on lymphocytes, monocytes and macrophages. *Adv. Immunol.* **35**: 61-88.
- Springer, T.A.** (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434.
- Standen, N.B., Quayle, J.M., Dawies, N.W., Brayden, J.E., Huang, Y. and Nelson, M.T.** (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial muscle. *Science* **245**: 177-180.
- Standiford, T.J., Kunkel, S.L., Liebler, J.M., Burdick, M.D., Gilbert, A.R. and Strieter, R.M.** (1993). Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **9**: 182-198.
- Standiford, T.J., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Westwick, J., Kasahara, K. and Kunkel, S.L.** (1990). IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J. Immunol.* **145**: 1435-1439.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L. and Springer, T.A.** (1989). Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**: 61-64.
- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L. and Springer, T.A.** (1988). Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**: 925-933.
- Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V. and Bainton, D.F.** (1985). A platelet  $\alpha$ -granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.* **101**: 880-886.
- Stern, D.M., Drillings, M., Kisiel, W., Nawroth, P., Nossel, H.L. and La Gamma, K.S.** (1984b). Activation of factor IX bound to cultured bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 913-917.
- Stern, D.M., Drillings, M., Nossel, H.L., Hurlet-Jensen, A., La Gamma, K.S. and Owen, J.** (1983). Binding of factors IX and IXa to cultured vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 4119-4123.
- Stern, D.M., Nawroth, P.P., Kisiel, W., Handley, D., Drillings, M. and Bartos, J.** (1984a). A coagulation pathway on bovine aortic segments leading to generation of factor Xa and calcium. *J. Clin. Invest.* **74**: 1910-1921.

- Stewart, R.J., Kashour, T.S. and Marsden, P.A.** (1996). Vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression is decreased by TNF-alpha and IFN-gamma. Evidence for cytokine-induced destabilization of messenger ribonucleic acid transcripts in bovine endothelial cells. *J. Immunol.* **156**: 1221-1228.
- Stockinger, H., Gadd, S.J., Eher, R., Majdic, O., Schreiber, W., Kasinrerck, W., Strass, B., Schnabl, E. and Knapp, W.** (1990). Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* **145**: 3889-3897.
- Streeter, P.R., Lakey-Berg, E., Rouse, B.T.N., Bargatze, R.F. and Butcher, E.C.** (1988). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* **331**: 41-46.
- Strieter, R.M., Koch, A.E., Antony, V.B., Fick, R.B.Jr., Standiford, T.J. and Kunkel, S.L.** (1994). The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Lab. Clin. Med.* **123**: 183-197.
- 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- $\alpha$ , LPS, and IL-1 $\beta$ . *Science* **243**: 1467-1469.
- Suga, S., Nakao, K., Otoh, H., Komatsu, Y., Ogawa, Y., Hama, N. and Imura, H.** (1992). Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor- $\beta$ . Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". *J. Clin. Invest.* **90**: 1145-1149.
- Sylvester, I., Suffredini, A.F., Boujoukos, A.J., Martich, G.D., Danner, R.L., Yoshimura, T. and Leonard, E.J.** (1993). Neutrophil attractant protein-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human serum. Effects of intravenous lipopolysaccharide on free attractants, specific IgG autoantibodies and immune complexes. *J. Immunol.* **151**: 3292-3298.
- Symon, F.A., Walsh, G.M., Watson, S.R. and Wardlaw, A.J.** (1994). Eosinophil adhesion to nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. *J. Exp. Med.* **180**: 371-376.
- Taborda-Barata, L., Grant, J.A., Humbert, M., Kochan, J.P. and Kay, A.B.** (1995). Kinetics of expression of the high affinity receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RI) during the allergen-induced cutaneous late phase reaction in atopic patients. Abstract XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology, Madrid, Spain, 25-30 June 1995, *Allergy* **50**: OC-121.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U. and Shaw, S.** (1993a). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 $\beta$ . *Nature* **361**: 79-82.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Shaw, S.** (1993b). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol. Today* **14**: 111-115.
- Tanaka, Y., Albelda, S.M., Horgan, K.J., van Seventer, G.A., Shimizu, Y., Newman, W., Hallam, J., Newman, P.J., Buck, C.A. and Shaw, S.** (1992). CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of  $\beta$ 1 integrin-mediated adhesion. *J. Exp. Med.* **176**: 245-253.
- Tang, D.G., Timar, J., Grossi, I.M., Renaud, C., Kimler, V.A., Diglio, C.A., Taylor, J.D. and Honn, K.V.** (1993). The lipoxygenase metabolite, 12(S)-HETE, induces a protein kinase C-dependent cytoskeletal rearrangement and retraction of microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **207**: 361-375.
- Tangelder, G.J. and Arfors, K.E.** (1991). Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. *Blood* **77**: 1565-1571.
- Tateson, J.E., Moncada, S. and Vane, J.R.** (1977). Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins* **13**: 389-397.
- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J. and Kelvin, D.J.** (1993a). Preferential migration of activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science* **260**: 355-358.



- Taub, D.D., Lloyd, A.R., Conlon, K., Wang, J.M., Ortaldo, J.R., Harada, A., Matsushima, K., Kelvin, D.J. and Oppenheim, J.J. (1993b). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J. Exp. Med.* **177**: 1809-1814.
- Teien, A., Abildgaard, U. and Hook, M. (1976). The anti-coagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. *Thromb. Res.* **8**: 859-867.
- Temple, D.M. and McCluskey, M. (1988). Loratadine, an antihistamine, blocks antigen- and ionophore-induced leukotriene release from human lung in vitro. *Prostaglandins* **35**: 549-555.
- Tesfamariam, B., Brown, M.L., Deykin, D. and Cohen, R.A. (1990). Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* **85**: 929-932.
- 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 $\gamma$  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**: 592-598.
- Tiemeyer, M., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P. and Brandley, B.K. (1991). Carbohydrate ligands for endothelial-leucocyte adhesion molecule-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 1138-1142.
- Tomassini, M., Tscopoulos, A., Tai, P-C., Gruart, V., Tonnel, A.B., Prin, L., Capron, A. and Capron, M. (1991). Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **88**: 365-375.
- Tomioka, M., Ida, S., Shindoh, Y., Ishihara, T. and Takishima, T. (1984). Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **129**: 1000-1005.
- Vaddi, K. and Newton, R.C. (1994a). Regulation of monocyte integrin expression by  $\beta$ -family chemokines. *J. Immunol.* **153**: 4721-4732.
- Vaddi, K. and Newton, R.C. (1994b). Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine- $\beta$  family. *J. Leukoc. Biol.* **55**: 756-762.
- Valent, P., Majdic, O., Maurer, D., Bodger, M., Muhm, M. and Bettelheim, P. (1990). Further characterization of surface membrane structures expressed on human basophils and mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **91**: 198-203.
- Van Mourik, J.A., Lawrence, D.A. and Loskutoff, D.J. (1984). Purification of an inhibitor of plasminogen activator (antiactivator) synthesized by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **259**: 14914-14921.
- Van Renterghem, C., Vigne, P., Barhanin, J., Schmid-Alliana, A., Frelin, C. and Lazdunski, M. (1988). Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**: 977-985.
- Van Snick, J., Cayphas, S., Vinck, A., Uytendove, C., Coulie, P.G., Rubira, M. and Simpson, R.J. (1986). Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T cell derived lymphokine with growth activity for B cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 9679-9683.
- Vanhoutte, P.M. (1989). Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* **13**: 658-667.
- Vannier, E. and Dinarello, C.A. (1993). Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H<sub>2</sub> receptors in peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* **92**: 281-287.
- Vannier, E., Miller, L.C. and Dinarello, C.A. (1991). Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis  $\alpha$  via histamine H<sub>2</sub> receptors. *J. Exp. Med.* **174**: 281-284.

Vazeux, R., Hoffman, P.A., Tomita, J.K., Dickinson, E.S., Jasman, R.L., St. John, T. and Gallatin, M. (1992). Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature* **360**: 485-488.

Venge, P., Dahl, R. and Peterson, C.G.B. (1988). Eosinophil granule proteins in serum after allergen challenge of asthmatic patients and the effects of anti-asthmatic medication. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **87**: 306-312.

Vignola, A.M., Crampette, L., Mondain, M., Sauvère, G., Michel, F.B., Czarlewski, W., Bousquet, J. and Campbell, A.M. (1995). Inhibitory activity of loratadine and descarboethoxyloratadine on expression of ICAM-1 and HLA-DR by nasal epithelial cells. *Allergy* **50**: 200-203.

Vlodavski, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J. and Klagsbrun, M. (1987). Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition in subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2292-2296.

von Adrian, U.H., Chambers, J.D., Berg, E.L., Michie, S.A., Brown, D.A., Karolak, D., Ramezani, L., Berger, E.M., Arfors, K.E. and Butcher, E.C. (1993). L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl Lewis<sup>x</sup>-dependent and -independent recognition pathways. *Blood* **82**: 182-191.

von Adrian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L.M., Bargatze, R.F., Arfors, K.E. and Butcher, E.C. (1991). Two-step model of leukocyte-endothelial interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte  $\beta_2$  integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7538-7542.

Walsh, G.M., Hartnell, A., Wardlaw, A.J., Kurihara, K., Sanderson, C.J. and Kay, A.B. (1990). IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leukocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology* **71**: 258-265.

Walz, A., Meloni, F., Clark-Lewis, I., von Tscherner, V. and Baggiolini, M. (1991).  $(Ca^{2+})_i$  changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/IL-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J. Leukoc. Biol.* **50**: 279-286.

Wang, E. and Goldman, R.D. (1978). Functions of cytoplasmic fibers in intracellular movements in BHK-21 cells. *J. Cell Biol.* **79**: 708-726.

Wardlaw, A.J., Dunette, S., Gleich, G.J., Collins, J.V. and Kay, A.B. (1988). Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am. Rev. Resp. Dis.* **137**: 62-69.

Wardlaw, A.J., Moqbel, R., Cromwell, O. and Kay, A.B. (1986). Platelet activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J. Clin. Invest.* **78**: 1701-1706.

Warringa, R.A.J., Koenderman, L., Kok, P.T.M., Kreukniet, J. and Bruijnzeel, P.L.B. (1991). Modulation and induction of eosinophil chemotaxis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Blood* **77**: 2694-2700.

Warringa, R.A.J., Mengelers, H.J.J., Raaijmakers, J.A.M., Bruijnzeel, P.L.B. and Koenderman, L. (1993). Upregulation of formyl-peptide and interleukin-8-induced eosinophil chemotaxis in patients with allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **91**: 1198-1205.

Wasserman, S.I. (1980). The lung mast cell: its physiology and potential relevance to defense of the lung. *Environ. Health Perspect.* **35**: 153-164.

Wasteson, A., Höök, M. and Westermarck, B. (1976). Demonstration of a platelet enzyme, degrading heparan sulfate. *FEBS Lett.* **64**: 218-221.

Watson, M.L., Kingsmore, S.F., Johnson, G.I., Siegelman, M.H., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Bora, N.S., Howard, T.A., Weissman, I.L., McEver, R.P. and Seldin, M.F. (1990). Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J. Exp. Med.* **172**: 263-272.

- Wayner, E.A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M.J., McDonald, J.A. and Carter, W.G. (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* **109**: 1321-1330.
- Wei, C-M., Aarhus, L., Miller, V.M. and Burnett, J.C. (1993). Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am. J. Physiol.* **264**: H71-H73.
- Weibel, E.R. and Palade, G.E. (1964). New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell Biol.* **23**: 101-112.
- Weksler, B.B., Ley, C.W. and Jaffe, E.A. (1978). Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore A23187. *J. Clin. Invest.* **62**: 923-930.
- Weksler, B.B., Marcus, A.J. and Jaffe, E.A. (1977). Synthesis of prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 3922-3926.
- Weller, P.F., Rand, T.H., Barrett, T., Elovic, A., Wong, D.T. and Finberg, R.W. (1993). Accessory cell function of human eosinophils: HLA-DR dependent, MHC-restricted antigen-presentation and interleukin-1 $\alpha$  expression. *J. Immunol.* **150**: 2554-2562.
- Weller, P.F., Rand, T.H., Goelz, S.E., Chi-Rosso, G. and Lobb, R.R. (1991). Human eosinophil adherence to vascular endothelium mediated by binding to vascular cell adhesion molecule 1 and endothelial leukocyte adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 7430-7433.
- Wellicome, S.M., Thornhill, M.H., Pitzalis, C., Thomas, D.S., Lanchbury, J.S., Panayi, G.S. and Haskard, D.O. (1990). A monoclonal antibody that detects a novel antigen on endothelial cells that is induced by TNF, IL-1 or LPS. *J. Immunol.* **144**: 2258-2265.
- White, M.V., Slater, J.E. and Kaliner, M.A. (1987). Histamine and asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **135**: 1165-1176.
- White, M.V., Yoshimura, T., Hook, W., Kaliner, M.A. and Leonard, E.J. (1989). Neutrophil attractant/activating protein-1 (NAP-1) causes human basophil histamine release. *Immunol. Lett.* **22**: 151-154.
- Wolinsky, H. (1980). A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis. *Circ. Res.* **47**: 301-311.
- Wong, D.T.W., Elovic, A., Matossian, K., Nagura, N., McBride, J., Gordon, J.R., Rand, T.H., Galli, S.J. and Weller, P.F. (1991). Eosinophils from patients with blood eosinophilia express transforming growth factor  $\beta$ 1. *Blood* **78**: 2702-2707.
- Wright, H.P. (1972). Mitosis pattern in aortic endothelium. *Atherosclerosis* **15**: 93-100.
- Wright, S.D., Weitz, J.I., Huang, A.J., Levin, S.M., Silverstein, S.C. and Loike, J.D. (1988). Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7734-7738.
- Wu, D., LaRosa, G.J. and Simon, M.I. (1993). G protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* **261**: 101-103.
- 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**: 225-228.
- Yabkowitz, R., Dixit, V.M., Guo, N., Roberts, D.D. and Shimizu, Y. (1993). Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA-4) and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (VLA-5) integrins. *J. Immunol.* **151**: 149-158.
- Yanasigawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**: 411-415.



**Yellin, M.J., Brett, J., Baum, D., Matsushima, A., Szabolcs, M., Stern, D. and Chess, L. (1995a).** Functional interactions of T cells with endothelial cells: The role of CD40L-CD40-mediated signals. *J. Exp. Med.* **182**: 1857-1864.

**Yellin, M.J., Winikoff, S., Fortune, S.M., Baum, D., Crow, M.K., Lederman, S. and Chess, L. (1995b).** Ligation of CD40 on fibroblasts induces CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) upregulation, IL-6 production and proliferation. *J. Leukoc. Biol.* **58**: 209-216.

**Ying, S., Meng, Q., Taborda-Barata, L., Corrigan, C.J., Barkans, J., Assoufi, B., Moqbel, R., Durham, S.R. and Kay, A.B. (1996).** Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur. J. Immunol.* **26**: 70-76.

**Yousefi, S., Hemman, S., Weber, M., Holzer, C., Hartung, K., Blaser, K. and Simon, H.U. (1995).** IL-8 is expressed by human peripheral blood eosinophils. *J. Immunol.* **154**: 5481-5490.

**Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. and McIntyre, T.M. (1992).** Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *J. Immunol. Today* **13**: 93-100.

