

Chimiokines et domiciliation des cellules du système de défense

par Pierre Galanaud, Yolande Richard & Dominique Emilie

Unité INSERM 131 (Cytokines et Immunomodulation) et Institut Paris-Sud Cytokines (IFR 13), 32, rue des Carnets, 92140 Clamart.

Reçu le 15 novembre 2000

RÉSUMÉ

Les propriétés générales des chimiokines et de leurs récepteurs sont présentées, et les perspectives ouvertes pour la thérapie cellulaire sont discutées.

Des exemples spécifiques sont présentés pour la CXC chimiokine SDF1 et pour les CC chimiokines ligands de CCR5.

SUMMARY Chemokines and defense cell trafic

The general properties of chemokines and their receptors are described, and the perspectives raised for cellular therapy are discussed. Specific examples

are provided in the cases of the CXC chemokine SDF1 and of chemokines ligands of CCR5.

L'impact d'une thérapie cellulaire est, dans de nombreuses situations, conditionné par la capacité des cellules vecteurs de l'effet thérapeutique à atteindre la destination souhaitée au sein de l'organisme receveur. Il est raisonnable d'anticiper que l'amélioration de nos connaissances sur les facteurs présidant aux relations topographiques entre cellules débouchera sur des progrès dans ce domaine.

Les mécanismes de domiciliation cellulaire sont particulièrement critiques pour le bon fonctionnement du système de défense, pour plusieurs raisons. L'élimination des agents pathogènes, notamment infectieux, repose sur une coopération entre des acteurs cellulaires multiples, selon des scénarios qui doivent être adaptés à la nature de l'agresseur. La circulation de ces cellules dans l'organisme est indispensable, en particulier pour le renouvellement permanent des lymphocytes naïfs à partir des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus), pour la co-localisation des antigènes (véhiculés notamment par les cellules dendritiques) et des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes secondaires, où vont se développer les réponses, pour la migration vers les autres tissus des lymphocytes effecteurs générés à la suite de ces réponses.

MÉCANISME GÉNÉRAL D'ACTION DES CHIMIOKINES

Les chimiokines sont des cytokines à effet chimio-tactique, susceptibles d'agir aux différentes étapes de la

domiciliation des leucocytes (Baggiolini, 1998 ; Foussat *et al.*, 2000). La traversée de l'endothélium vasculaire constitue une étape clé de cette domiciliation : elle repose sur des interactions entre chimiokines et molécules membranaires. Les premières étapes (capture et roulement), sont principalement médiées par les sélectines et leurs ligands : elles permettent à la cellule de progresser lentement au contact de la paroi vasculaire. Les chimiokines, produites par les cellules endothéliales (ou les ayant traversées par transcytose) agissent alors sur ceux des leucocytes qui expriment les récepteurs correspondants : il en résulte une activation des intégrines. La liaison de celles-ci à leurs ligands, exprimés sur les cellules endothéliales, conduira à l'arrêt ferme du leucocyte, en regard du site à atteindre. Ces phénomènes sont suivis par la diapédèse qui permet au leucocyte de franchir la barrière endothéliale, puis par sa migration intra-tissulaire au cours de laquelle la cellule se déplace vers la source de chimiokine.

Une des propriétés essentielles des chimiokines est leur capacité à se fixer aux héparanes sulfate et aux glycosaminoglycanes, qui tapissent le versant endoluminal des cellules endothéliales, dans le compartiment vasculaire, et/ou font partie de la matrice extra-cellulaire, dans le compartiment tissulaire. C'est ainsi que, dans la paroi vasculaire, les chimiokines s'accumulent dans une zone qui reste localisée, et que, dans les tissus, elles se répartissent selon un gradient de concentration. Ces propriétés de fixation doivent être prises en compte pour l'interprétation d'éventuels dosages de chimiokines dans les



fluides biologiques, et pour la discussion des perspectives d'utilisation de ces médiateurs eux-mêmes.

Les récepteurs de chimiokines appartiennent, comme les récepteurs β -adrénergiques, à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

CLASSIFICATION DES CHIMIOKINES ET DE LEURS RÉCEPTEURS

Les chimiokines se caractérisent par un motif de 4 cystéines, permettant l'établissement de deux ponts disulfures. La présence et le nombre d'acides aminés séparant les deux premières cystéines (reliées par le premier de ces ponts disulfures) permettent de distinguer quatre sous-familles de chimiokines CC, CXC, C, CX3C. Les familles CC et CXC comptent respectivement une trentaine et une vingtaine de membres, alors que les familles C et CX3C n'en comptent qu'une chacune. Chacune de ces chimiokines est désignée, soit par un (ou plusieurs) noms et/ou acronyme(s), soit selon une nouvelle nomenclature (CCL1 à CCL28, CXCL1 à CXCL15, CLI ou CX3CL1). Les récepteurs correspondants sont dénommés CCR (CCR1 à CCR10), CXCR (CXCR1 à CXCR5), XCR1 et CX3CR1.

Le membre unique de la famille CX3C, la fractalkine (FKN) peut se présenter sous forme soluble, mais également sous forme membranaire, présentée à la surface cellulaire par une tige clivable de type mucine. La FKN membranaire peut induire la fixation des leucocytes exprimant CX3CR1, dans des conditions particulières de flux et de signalisation.

RÉCEPTEURS DE CHIMIOKINES ET CIBLAGE CELLULAIRE DES EFFETS

La relation fonctionnelle chimiokine/récepteur est bien souvent de type « polygamique », dans laquelle un même ligand peut agir sur plusieurs récepteurs, tandis qu'un même récepteur peut fixer plusieurs ligands différents. Ainsi, parmi les CXC chimiokines, l'IL-8 utilise à la fois CXCR1 et CXCR2; réciproquement, si CXCR1 ne fixe que deux chimiokines (dont l'IL-8), CXCR2 possède un grand nombre de ligands. Parmi les CC chimiokines, RANTES se fixe sur CCR1, CCR3, CCR4, CCR9; réciproquement, CCR5 fixe à la fois MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES. L'exemple le mieux démontré de monogamie entre une chimiokine et son récepteur est fourni par le couple CXCR4/SDF1, puisque les souris dont le gène de l'un ou l'autre des partenaires est invalidé ont des phénotypes identiques (Horuk, 1998). Cette redondance complique considérablement la compréhension fonctionnelle du système.

Néanmoins, cette fonction peut être appréhendée plus directement lorsqu'on la considère du point de vue des récepteurs qu'elle ne peut l'être si on se place du point de vue des ligands. De fait, l'expression de certains

récepteurs permet un ciblage cellulaire d'effets qui prennent place au sein d'une logique physiologique. Les exemples suivants peuvent en être donnés.

Au sein des CXC chimiokines, la présence du motif ELR (Glu-Leu-Arg) est essentielle pour l'interaction avec les récepteurs CXCR1 et CXCR2. Les granulocytes neutrophiles sont les seules cellules à exprimer conjointement ces deux récepteurs qui ne sont pratiquement pas exprimés par les autres leucocytes. Ainsi, les CXC chimiokines ELR⁺ (CXCL1 à CXCL8) sont-elles actives sur ces cellules, alors que les CXC chimiokines ELR⁻ (CXCL8 à CXCL15) ont d'autres cibles cellulaires. Celles-ci sont partagées avec les CC chimiokines : diverses populations lymphocytaires, les monocytes, granulocytes éosinophiles, granulocytes basophiles.

Le récepteur CCR3 est présent sur les granulocytes éosinophiles, et l'un de ses ligands, l'éotaxine (CCL11, CCL24, CCL26) joue un rôle majeur dans l'accumulation des éosinophiles qui caractérise la réaction allergique. CCR3 est également exprimé sur les granulocytes basophiles, une autre population effectrice de l'hyper-sensibilité immédiate, et sur les lymphocytes T auxiliaires Th2, qui orientent la réponse immunitaire vers la production d'IgE. La place de CCR3 dans cet ensemble fonctionnel en fait une cible de choix pour le traitement des maladies allergiques (Teran, 2000).

Ainsi, les phénomènes de migration cellulaire seront conditionnés à la fois par la gamme de chimiokines produites au site de l'agression et par un code d'entrée exprimé par les cellules à recruter. Ce code d'entrée comporte au moins deux éléments : les sélectines et les récepteurs de chimiokines (Dunon & Imhof, 2000).

RÉCEPTEURS DES CHIMIOKINES ET CIBLAGE THÉRAPEUTIQUE

Deux grandes classes de molécules permettent d'antagoniser l'effet des chimiokines en interférant avec l'interaction chimiokine/récepteur : (i) des chimiokines mutées, délétées de leur extrémité N-terminale, qui se fixent sur le récepteur sans induire d'effet agoniste; leur mode d'action semble mixte : compétition avec la fixation de la chimiokine naturelle, mais également internalisation du récepteur; (ii) de petites molécules, biodisponibles par voie orale.

La fréquente polygamie des relations entre chimiokines et leurs récepteurs ne constitue pas un obstacle infranchissable pour l'utilisation thérapeutique d'agonistes ou antagonistes des récepteurs de chimiokines. Celle-ci bénéficie de deux atouts essentiels. L'un est d'ordre cognitif : les recoupements entre les données obtenues dans différents modèles animaux et en pathologie humaine permettent d'attribuer à certains récepteurs un rôle prépondérant dans certains domaines de la physiologie, ou dans certaines situations pathologiques (cf. ci-dessus). L'autre est d'ordre industriel : les récepteurs β -adrénergiques, qui constituent des cibles thérapeutiques pour des médicaments à large diffusion, ont

fait l'objet d'investissements massifs de la part des compagnies pharmaceutiques, ce qui constitue une base solide pour le développement d'une pharmacologie classique en matière de chimiokines.

CHIMIOKINES INFLAMMATOIRES ET CHIMIOKINES CONSTITUTIVES

Les premières chimiokines décrites étaient induites par l'inflammation (et les réponses immunes) : leur rôle est de susciter l'attraction des cellules de défense vers le site d'une agression. Par la suite, des chimiokines d'expression constitutive ont été décrites : elles interviennent dans la recirculation permanente des leucocytes, notamment entre les organes lymphoïdes primaires et secondaires. Néanmoins, la distinction entre ces deux types de chimiokines (Sallusto *et al.*, 1998) n'est pas aussi absolue. Ainsi, les cellules dendritiques immatures des muqueuses, en attente d'antigène, expriment des récepteurs pour certaines chimiokines inflammatoires. Elles cesseront de les exprimer lorsqu'elles auront internalisé un antigène, ce qui leur permettra de quitter le foyer inflammatoire pour transporter l'antigène vers les organes lymphoïdes. Les cellules dendritiques matures, porteuses d'antigène, rejoignent les lymphocytes T dans les organes lymphoïdes sous l'effet de ces mêmes chimiokines constitutives (ligands de CCR7) qui y ont attiré les lymphocytes naïfs, en attente d'antigène. Cette description schématique permet d'évoquer plusieurs notions générales importantes.

Un même système ligand/récepteur peut être constitutif pour un type cellulaire et induit pour un autre type.

Si l'expression de certains récepteurs est nécessaire pour pénétrer dans un tissu, l'extinction de celle-ci peut être nécessaire pour le quitter.

L'expression coordonnée de certains récepteurs joue un rôle dans la colocalisation de cellules coopérant dans diverses étapes d'une réponse inflammatoire ou immunitaire.

RÉSULTATS PRÉSENTÉS AU COURS DE L'EXPOSÉ

Au cours de cet exposé, des résultats récents seront présentés sur deux systèmes chimiokines/récepteurs.

La chimiokine SDF1

SDF1 (CXCL12), ligand monogamique de CXCR4, également co-récepteur des souches X4 du VIH (Littman, 1998). SDF1 est chimioattractante pour les précurseurs hématopoïétiques CD34+, pour les précurseurs lymphoïdes B, pour certaines sous-populations T et B, et pour les monocytes. SDF1 est également un facteur de croissance pour les cellules lymphoïdes B, et elle joue un rôle dans le développement anténatal (Horuk, 1998).

Nous avons précisé l'expression anténatale de la protéine SDF1 dans l'espèce humaine : SDF1 est exprimée dans le placenta, dans le tube neural, dans le foie fœtal, dans la splanchnopleure embryonnaire et dans les séreuses fœtales. Dans le foie fœtal, SDF1 est produite par les cellules épithéliales de la plaque ductale, au contact de ceux des précurseurs lymphoïdes qui expriment VpréB, un marqueur des cellules B immatures. Ces données indiquent une relation lympho-épithéliale du même ordre que ce qui est connu pour la lymphopoïèse T dans le thymus et la lymphopoïèse B dans la bourse de Fabricius chez les oiseaux (Coulomb-Lherminé *et al.*, 1999).

Nous avons également montré que SDF1 est exprimée par le péritoine murin adulte, et qu'elle joue un rôle dans la physiologie des cellules B péritonéales (Foussat *et al.*, 2000), une sous-population capable d'auto-renouvellement, et impliquée dans la production de certains auto-anticorps. Les relations fonctionnelles entre SDF1 et les cytokines classiques (Llorente *et al.*, 1995) ou plus récemment mises en cause (Thompson *et al.*, 2000) dans le développement des auto-anticorps sont en cours d'étude.

Les chimiokines ligands de CCR5

CCR5, récepteur commun aux CC chimiokines MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4) et RANTES (CCL5), est exprimé sur les lymphocytes T activés (notamment récemment activés, et clones Th1), sur les lymphocytes NK, les monocytes et les cellules dendritiques immatures. C'est donc un récepteur important pour l'immunité à médiation cellulaire. CCR5 est également le co-récepteur des souches R5 du VIH, co-récepteur quasi-exclusif pour la primo-infection : cela explique la protection vis-à-vis de celle-ci des individus homozygotes pour la mutation $\Delta 32$ de CCR5, ainsi que l'intérêt thérapeutique potentiel des antagonistes de CCR5 (Littman, 1998).

Un exemple du rôle des chimiokines dans la co-localisation des acteurs d'une réponse immunitaire sera présenté. Nous avons montré que les lymphocytes B du follicule lymphoïde activés par le récepteur pour l'antigène produisent les CC chimiokines MIP-1 α et MIP-1 β . Celles-ci ont un effet chimio-attractant sur les lymphocytes T CD4 activés exprimant CCR5 (Krzysiek *et al.*, 1999), contribuant ainsi à attirer les lymphocytes T auxiliaire dans le follicule (où ils vont collaborer avec les lymphocytes B) à partir du centre germinatif (où l'antigène leur a été présenté par les cellules dendritiques).

L'immunothérapie peut moduler l'expression de récepteurs de chimiokines, et modifier indirectement la domiciliation des cellules de défense. Ainsi, les injections cycliques d'IL-2, associées au traitement anti-rétroviral chez des patients séropositifs pour le VIH, entraînent une augmentation importante et transitoire de l'expression de CCR5, notamment par les lymphocytes T CD4 mémoire (Zou *et al.*, 1999). Cet effet est probablement impliqué dans l'augmentation de la charge virale décrite chez les patients traités par IL-2 en absence de thérapie anti-rétrovirale efficace (ce qui n'était pas le cas de nos patients). Elle peut expliquer la redistribu-

tion aiguë des lymphocytes T CD4 sous IL-2, mais pourrait également avoir des effets à long terme sur l'équilibre immunitaire.

Nous montrerons également que les chimiokines peuvent constituer des cibles pour la modulation (physiologique ou pharmacologique) des réactions inflammatoires. La chimiokine RANTES, produite par les macrophages du granulome d'hypersensibilité retardée et par les cellules endothéliales péri-granulomateuses (Devergne *et al.*, 1994) joue un rôle majeur dans le développement de ces lésions. Sa production est régulée par les cytokines Th2 et les glucocorticoïdes (Marfaing-Koka *et al.*, 1995; Marfaing-Koka *et al.*, 1996) en faisant intervenir une cible moléculaire commune (Berrebi *et al.*, soumis pour publication).

CONCLUSIONS

Le système des chimiokines et de leurs récepteurs offre la possibilité d'intervenir sur la domiciliation des cellules. On peut en attendre un ciblage dans l'espace pour la thérapie cellulaire et/ou l'immuno-intervention.

Il convient également de souligner que le champ d'application de ces médiateurs n'est pas strictement limité au système de défense, et qu'ils ont des implications pour la compréhension et le développement des thérapeutiques conventionnelles.

BIBLIOGRAPHIE

- Baggiolini M., Chemokines and leucocyte traffic. *Nature*, 1998, 392, 565-568.
- Coulomb-L'Hermine A., Amara A., Schiff C., Durand-Gasselini I., Foussat A., Delaunay T., Chaouat G., Capron F., Ledec N., Galanaud P., Arenzana-Seisdedos F. & Emilie D., Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B-cell lymphopoiesis: expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 8585-8590.
- Devergne O., Marfaing-Koka A., Schall T., Leger-Ravet M.B., Sadick M., Peuchmaur M., Crevon M.C., Kim T., Galanaud P. & Emilie D., Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 1689-1694.
- Dunon D. & Imhof B.A., Adressage et migration : le mouvement perpétuel des leucocytes. *Med. Sci.*, 2000, 16, 757-766.
- Foussat A., Galanaud P. & Emilie D., Les chimiokines et la longue marche des leucocytes. *Med. Sci.*, 2000, 16, 767-775.
- Foussat A., Balabanian K., Amara A., Bouchet-Delbos L., Durand-Gasselini I., Baleux F., Couderc J., Galanaud P., Emilie D., Production of stromal cell-derived factor 1 by mesothelial cells: a mechanism of targeting BI lymphocytes to the peritoneal cavity. *Eur. J. Immunol.*, 2000, sous presse.
- Horuk R., Chemokines beyond inflammation. *Nature*, 1998, 393, 524-525.
- Krzysiek R., Lefevre E., Bernard J., Portier A., Galanaud P. & Richard Y., MIP-1alpha and MIP-1beta chemokine expression by human B cells after B cell antigen receptor (BCR) and CD40 triggering. *J. Immunol.*, 1999, 162, 4455-4463.
- Littman D.R., Chemokines and receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell*, 1998, 93, 677-680.
- Llorente L., Zou W., Levy Y., Richaud-Patin Y., Wijdenes J., Alcocer-Varela J., Morel-Fourrier B., Brouet J.-C., Alarcon-Segovia D., Galanaud P. & Emilie D., Role of Interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 839-844.
- Marfaing-Koka A., Devergne O., Portier A., Schall T.J., Galanaud P. & Emilie D., Regulation of the production of the chemokine RANTES by endothelial cells: synergistic induction by IFN-gamma + TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL13. *J. Immunol.*, 1995, 154, 1870-1878.
- Marfaing-Koka A., Maravic M., Humbert M., Galanaud P. & Emilie D., Contrasting effects of interleukin-4, interleukin-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *Int. Immunol.*, 1996, 8, 1587-1594.
- Sallusto F., Lanzavecchia A. & Mackay C.R., Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today*, 1998, 19, 568-574.
- Teran L.M., CCL chemokines and asthma. *Immunol. Today*, 2000, 21, 235-242.
- Thompson J.S., Schneider P., Kalled S.L., Wang L.C., Lefevre E.A., Cachero T.G., Mackay F., Bixler S.A., Zafari M., Liu Z.-Y., Woodcock S.A., Qian F., Batten M., Madry C., Richard Y., Benjamin C.D., Browning J.L., Tsapis A., Tschopp J., Ambrose C., BAFF binds to the TNF receptor-like molecule BCMA and is important for maintaining the peripheral B cell population. *J. Exp. Med.*, 2000, 192, 129-135.
- Zou W., Foussat A., Houhou S., Durand-Gasselini I., Dulioust A., Bouchet L., Galanaud P., Levy Y. & Emilie D., Acute upregulation of CCR-5 expression by CD4+ T lymphocytes in HIV-infected patients treated with interleukin-2. *AIDS*, 1999, 13, 455-463.