

Implication de l'immunité innée au-delà de la réponse à l'infection — Rôle de l'inflammation dans l'hypertension artérielle pulmonaire : chimiokines et remodelage vasculaire

Involvement of innate immunity beyond response to infection — Role of inflammation in pulmonary arterial hypertension: chemokines and vascular remodelling

F. Perros · M. Humbert

© SRLF et Springer-Verlag France 2011

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare avec une prévalence de 15 cas par million d'habitants en Europe. Celle-ci est probablement sous-estimée du fait de la faible spécificité des signes cliniques dominés par la dyspnée d'effort. Les symptômes surviennent surtout à l'effort et incluent un essoufflement, une fatigue, une faiblesse, des douleurs thoraciques, des lipothymies et des syncopes. Cette maladie peut survenir de façon sporadique (HTAP idiopathique [HTAPi]), dans un contexte familial (HTAP familiale, dont le mode de transmission est autosomique dominant et la pénétrance de l'ordre de 20 %, par mutations de *BMPR2*, un membre de la famille des récepteurs du TGF- β) ou compliquer l'évolution de certaines situations (HTAP associée à une connectivite, une cardiopathie congénitale, l'infection par le VIH, une hypertension portale, une prise d'anorexigènes...). Le traitement comporte en général des anticoagulants, des diurétiques et de l'oxygène si nécessaire. Les récentes avancées thérapeutiques (dérivés de la prostacycline administrés par voie intraveineuse, sous-cutanée ou nébulisée, antagonistes des récepteurs de l'endothéline et inhibiteurs des phosphodiésterases de type 5) permettent une amélioration symptomatique. Plusieurs médicaments ont ainsi obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne en tant que médicaments orphelins dans cette indication : le bosentan (2002),

l'iloprost (2003) et le sildénafil (2005). Néanmoins, il n'y a pas de traitement curatif, et la transplantation pulmonaire est réservée aux patients résistant au traitement médical.

L'HTAP est secondaire à une obstruction chronique des petites artères pulmonaires par un phénomène de vasoconstriction et d'oblitération endoluminale (due à l'existence de thromboses in situ et d'une hypertrophie concentrique de la paroi vasculaire avec épaissement endothélial et hypertrophie des cellules musculaires lisses [CMLs]). La physiopathologie de l'HTAP est mal élucidée, mais il est actuellement clairement établi que les mécanismes inflammatoires jouent un rôle central dans la genèse et la progression de la maladie. Des infiltrats de macrophages et de lymphocytes se forment dans la paroi des lésions plexiformes. Des autoanticorps anticellules endothéliales (CEs), antifibroblastes et antinucléaires ainsi que des taux sériques élevés de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IL-6) et une surexpression locale de chimiokines et de facteurs de croissance (RANTES, fractalkine, PDGF A et B, TGF- β) ont été retrouvés chez des patients porteurs d'HTAPi. Notre équipe a montré que l'HTAP s'accompagne de désordres immunologiques, tant au niveau pulmonaire que systémique. Nous avons mis en évidence que les cellules inflammatoires qui s'accumulent dans l'adventice des artères pulmonaires pourraient favoriser la prolifération des cellules vasculaires via la production de chimiokines telle que la fractalkine/CX3CL1.

F. Perros (✉) · M. Humbert
Université Paris-Sud, faculté de médecine,
F-94276 Kremlin-Bicêtre, France
e-mail : frederic.perros@gmail.com

Service de pneumologie et réanimation respiratoire,
centre national de référence de l'hypertension pulmonaire sévère,
hôpital Antoine-Béclère, AP-HP,
F-92140 Clamart, France

Inserm U999, centre chirurgical Marie-Lannelongue,
133, avenue de la Résistance,
F-92350 Le-Plessis-Robinson, France

Introduction

Définition de l'HTAP

Le terme « hypertension pulmonaire » (HTP) décrit l'existence d'une pression accrue dans la circulation pulmonaire. Sous le terme « d'hypertension artérielle pulmonaire » (HTAP) proprement dite sont regroupées différentes

maladies touchant les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation progressive des résistances artérielles pulmonaires et une défaillance ventriculaire droite. L'échographie cardiaque avec doppler pulsé permet le dépistage de l'HTAP, mais le diagnostic formel nécessite un cathétérisme cardiaque droit qui met en évidence une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos et une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15 mmHg, éliminant le diagnostic de cardiopathie gauche [1].

Inflammation et HTAP

Des mécanismes inflammatoires semblent jouer un rôle important dans certains types d'HTP comme l'HTAP induite chez le rat par la monocrotaline (MCT) et comme certaines HTAP humaines secondaires à des maladies auto-immunes ou à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [2]. Dans certaines HTAP sévères associées à un lupus érythémateux, les paramètres hémodynamiques et cliniques des patients ont été améliorés grâce à un traitement immunosuppresseur, soulignant l'importance de la composante inflammatoire chez ces malades [2]. Certaines HTAPi sont associées à des troubles immunologiques, ce qui plaide en faveur du rôle possible de l'inflammation dans cette maladie. En effet, de 10 à 40 % des patients atteints d'HTAP ont des autoanticorps circulants, dont des anticorps antinucléaires, ainsi que des concentrations plasmatiques élevées des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6 et des chimiokines fractalkine et MCP-1 [3,4]. L'analyse histologique des poumons révèle aussi la présence d'infiltrats inflammatoires (macrophages, lymphocytes B et T, mastocytes et cellules dendritiques) [5,6] au niveau des lésions plexiformes dans les HTAP sévères, ainsi qu'une expression accrue des chimiokines RANTES et fractalkine au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire [3]. Des études portant sur le rôle des mécanismes inflammatoires sont nécessaires pour comprendre si cette composante de l'HTAP est pertinente pour sa physiopathologie. Des travaux allant dans ce sens ont montré qu'un polymorphisme du gène de l'IL-6 augmente le risque de développement d'une HTAP secondaire à une bronchopneumopathie chronique obstructive [7]. Récemment, il a été prouvé que les lymphocytes T ont un rôle protecteur contre le remodelage vasculaire et contribuent au maintien de l'architecture vasculaire pulmonaire en situation de stress [8]. Dans cette étude, des rats athymiques soumis à un inhibiteur du *Vascular endothelial growth factor* ou VEGF développent une HTAP en normoxie, alors que les rats euthymiques n'en développent pas. Lorsque ces rats sont soumis à l'hypoxie, l'HTAP et la mortalité sont augmentées chez les rats athymiques par rapport aux rats euthymiques [8]. L'injection de splénocytes (cellules T) protège contre le développement de l'HTAP chez les rats athy-

miques. Des résultats similaires ont été obtenus chez les rats athymiques soumis à la MCT [9]. Il a également été montré que l'inflammation pulmonaire d'origine allergique augmente la sensibilité vasculaire pulmonaire à la sérotonine, au thromboxane, à l'angiotensine II et à l'endothéline-1 [10]. L'inflammation pourrait donc favoriser l'HTAP chez des sujets prédisposés, en augmentant la réactivité du lit vasculaire pulmonaire.

Objectif de l'étude

Prouver que le rôle des cytokines chimioattractantes (chimiokines) va au-delà du simple recrutement leucocytaire mis en jeu dans les processus inflammatoires, en étudiant les propriétés angiogéniques de la fractalkine (CX3C-chimiokine, CX3CL1).

CX3CL1 et angiogenèse

Rationnel

Des infiltrats périvasculaires composés de macrophages et de lymphocytes ont été décrits dans les biopsies pulmonaires de patients souffrant d'HTAP, suggérant que les cellules inflammatoires circulantes pourraient être recrutées dans les vaisseaux affectés par la maladie. La CX3C-chimiokine fractalkine (CX3CL1) est produite par les cellules endothéliales (CEs) et induit le recrutement des leucocytes qui expriment son récepteur (CX3CR1). Elle possède la faculté unique vis-à-vis des autres chimiokines, de pouvoir recruter les leucocytes rapidement et fermement sans l'aide des intégrines et sous des conditions de flux sanguin élevé [11]. Cette dernière propriété rend son étude très pertinente dans le cadre de l'HTAP. Les travaux réalisés au sein de notre équipe par Balabanian et al. [3] ont démontré l'implication de cette chimiokine dans la pathogenèse de cette maladie. Les résultats de cette étude furent les suivants :

- chez les patients hypertendus pulmonaires, l'expression de CX3CR1 était accrue dans les lymphocytes T circulants CD4+ et CD8+ par rapport aux témoins ;
- cette augmentation d'expression s'accompagnait d'une sensibilité plus élevée des lymphocytes T (CD4+ principalement) à l'effet chimiotactique de la fractalkine ;
- cette réponse anormale des lymphocytes T à CX3CL1 n'était pas la simple conséquence de l'HTP, puisqu'elle était absente chez les patients souffrant d'HTAP postembolique chronique [HTAP-PE] ;
- les concentrations plasmatiques de CX3CL1 soluble (sCX3CL1) étaient significativement augmentées chez les patients hypertendus pulmonaires, par rapport aux témoins et aux patients souffrant d'HTAP-PE ;

- par rapport aux échantillons témoins, le gène codant pour CX3CL1 était également surexprimé (ARNm) dans les échantillons pulmonaires d'HTAP et les CE artérielles pulmonaires de ces échantillons exprimaient CX3CL1 ;
- cette étude confirma également que les patients souffrant d'HTAP présentaient des signes d'inflammation chronique et de dysfonctions endothéliales.

En effet, les concentrations plasmatiques de CD25, d'IL-6, de *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, d'*intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, de E- et P-selectines, et de von Willebrand factor ont été retrouvées significativement augmentées par rapport aux témoins. De fait, la détection de sCX3CL1 dans le plasma des patients hypertendus pulmonaires pourrait être analysée comme un autre marqueur de la dysfonction endothéliale dans cette maladie [12,13]. Ce qui frappe dans cette étude, c'est la sensibilité particulière des lymphocytes T d'HTAP à CX3CL1 qui semble innée, puisque les cellules T d'HTAP-PE ne présentent pas cette singularité. Chez le rat, l'HTP induite par l'hypoxie chronique entraîne une surexpression vasculaire pulmonaire du gène et de la protéine CX3CL1. À l'image de la situation clinique, on retrouve dans ce modèle une augmentation des concentrations plasmatiques de sCX3CL1 [14].

Dans cette étude, nous avons exploré un autre versant de l'action de la fractalkine. Il est en effet maintenant reconnu, que le rôle des chimiokines va bien au-delà du simple chimiotactisme. Elles peuvent notamment intervenir dans l'organogenèse, l'angiogenèse normale ou pathologique (c'est-à-dire tumorale) et dans les processus vasculaires sténosants. Les rôles des CXC- et CC-chimiokines dans ces deux dernières fonctions ont été largement étudiés. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet potentiellement mitogène et chimiotactique de la fractalkine sur les CMLs vasculaires d'artère pulmonaire. En effet, les phénomènes qui régissent la néomuscularisation des artérioles distales ainsi que la migration des CMLs de la média vers la néointima, ainsi que leur prolifération sont encore mal compris. Nous avons également analysé le rapport qui existe entre expression pulmonaire de CX3CL1 et développement de l'HTAP dans un modèle animal d'HTP (rats exposés à la MCT).

Fonctions des chimiokines

Les chimiokines sont une famille de cytokines possédant des activités chimiotactiques vis-à-vis des différentes populations de leucocytes. Il y a actuellement plus de 50 chimiokines identifiées. Leurs récepteurs à la surface des cellules cibles sont variés. Plusieurs récepteurs peuvent lier une seule chimiokine et réciproquement, de sorte que le réseau des chimiokines est complexe. Cependant, certains récepteurs ou certaines chimiokines apparaissent relativement spécifiques d'un type cellulaire ou d'un groupe de cellules

particulier, impliquées dans le même type de réaction. Ces molécules agissent par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCRs). Toutefois, l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs a été observée dans une grande variété de types cellulaires avec des fonctions dépassant celles du chimiotactisme.

Généralités

Par définition, les chimiokines sont une superfamille de molécules de bas poids moléculaire, qui sont chemoattractives vis-à-vis des cellules du système immunitaire. Malgré l'absence d'homologies dans leurs séquences primaires, elles ont pour point commun une structure tridimensionnelle relativement homogène. Elles se lient à des récepteurs spécifiques. Les chimiokines ont été regroupées en quatre familles distinctes (CXC, CC, C, CX3C) selon le nombre et la place des cystéines qu'elles contiennent, et donc du nombre et de la place des ponts disulfures qui contribuent à leur structure tridimensionnelle. Les CXC et les CC chimiokines sont celles qui ont le plus été étudiées jusqu'à présent. Une nouvelle nomenclature a été proposée pour les chimiokines et leurs récepteurs, dans laquelle les récepteurs sont appelés CC, CXC, C ou CX3C selon le groupe correspondant à leur ligand, suivi de R pour récepteur et d'un numéro correspondant à celui assigné au gène de la chimiokine correspondante. La chimiokine est appelée CC, CXC, C ou CX3C suivi de L (ligand) et du même numéro. Les limites de cette nomenclature sont évidemment la redondance du système (plusieurs récepteurs pour une chimiokine). Les récepteurs de chimiokines sont des hétérotrimères à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Les récepteurs confèrent une certaine spécificité aux réactions inflammatoires que leur activation entraîne, en fonction de leurs ligands (chaque récepteur ne pouvant fixer qu'un nombre discret de chimiokines différentes), et en fonction du type cellulaire qui les exprime. Une complexité supplémentaire vient du fait que certains récepteurs de chimiokines sont exprimés constitutivement par les cellules, tandis que d'autres sont inductibles. Par exemple, CCR1 et CCR2 sont exprimés constitutivement par les monocytes, mais sont exprimés par les lymphocytes stimulés par l'IL-2. De même, CXCR3 est exprimé constitutivement par les lymphocytes T mémoires mais est inductible sur les lymphocytes activés. De plus, certains récepteurs exprimés de façon constitutive peuvent disparaître sous l'action de cytokines anti-inflammatoires : c'est ainsi que l'IL-10 diminue l'expression de CCR1, CCR2 et CCR5 sur les cellules dendritiques et les monocytes [15,16]. In vitro, la plupart des chimiokines ne sont pas produites de façon constitutive mais sont sécrétées en réponse à des agents pro-inflammatoires. Ainsi, l'IL-1 α et β , le TNF α ou les IFN α et

γ sont les molécules responsables de l'induction de la plupart des chimiokines. La chimiokine MCP-1 est produite dans la plupart des types cellulaires sous l'action de l'IL-1 α et du TNF α . De même, le LPS bactérien est un puissant agent activant la production de CC-chimiokines. L'IP-10 et le MIG ont, par exemple, été clonés sur la base de leur expression en réponse à l'IFN [16].

Les chimiokines possèdent la faculté d'induire une migration cellulaire directionnelle selon leur propre gradient de concentration, c'est le chimiotactisme [17,18]. Par ce mécanisme, le tissu présentant une réaction inflammatoire et exprimant des chimiokines va attirer des cellules inflammatoires de différents types. Le recrutement des cellules circulantes dans le flux sanguin intravasculaire vers le tissu atteint est une phase critique, nécessitant l'attachement des leucocytes à l'endothélium et leur transmigration vers l'espace extravasculaire. Ce processus complexe comporte plusieurs étapes d'interactions coordonnées entre leucocyte et CE. Les chimiokines agissent en synergie avec d'autres régulateurs moléculaires. Dans une première phase de capture et de roulement, le leucocyte est ralenti par les sélectines et glisse lentement le long de l'endothélium vasculaire. C'est alors que les chimiokines produites par les CEs ou les ayant traversées par transcytose agissent sur les leucocytes exprimant les récepteurs correspondants. Il en résulte une activation des intégrines au niveau de la membrane leucocytaire, qui vont retrouver leurs ligands à la surface des CEs. Cette interaction permet un arrêt ferme des leucocytes. Ces phénomènes sont suivis de la diapédèse, processus par lequel le leucocyte franchit la barrière endothéliale, puis par la migration intratissulaire au cours de laquelle la cellule se déplace vers la source de chimiokine [19].

Chimiokines et angiogenèse

Bien que les chimiokines aient initialement été décrites pour leur rôle dans l'immunité, les conclusions de nombreuses expériences viennent élargir le champ de leurs cibles biologiques. En effet, les chimiokines et leurs ligands sont exprimés par des cellules n'appartenant pas au système immunitaire et orchestrent un grand nombre de fonctions inattendues. Par exemple, des souris déficientes pour le *stromal-derived factor* (SDF)-1 [20], ou son récepteur CXCR4 [21,22], meurent de malformations cardiaques. Il a été montré que le couple SDF-1/CXCR4 intervient dans la survie des myocytes [23] et module leur contractilité [24]. La défaillance du couple SDF-1/CXCR4 est également associée à une migration et une organisation aberrantes des neurones dans le cervelet des souris invalidées pour ces gènes [20–22]. De même, la fractalkine/CX3CL1 et son récepteur CX3CR1 sont constitutivement exprimés dans plusieurs régions du système nerveux central et sont impliqués dans l'interaction cellules microgliales–neurones, dans la

transmission synaptique, et dans la survie neuronale [25–27]. Plusieurs chimiokines sont également capables d'induire l'agrégation plaquettaire à des doses physiologiques, établissant ainsi un lien entre inflammation et cascades de coagulation [28].

Dans le cadre de l'HTAP, nous nous sommes intéressés aux propriétés angiogéniques des chimiokines. Parmi elles, la famille des CXC-chimiokines est une famille pléiotropique de cytokines impliquées dans la migration de nombreux leucocytes, mais aussi de progéniteurs mésenchymateux comme les fibrocytes [29], la régulation de l'angiogenèse et le remodelage vasculaire. Les CXC chimiokines sont importantes dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire et dans la formation de la néointima dans les pathologies athérogènes en induisant la prolifération et/ou la migration des CEs et des CMLs, ainsi que la synthèse de matrice extracellulaire [30,31]. Les membres de cette famille qui favorisent l'angiogenèse sont les suivants : CXCL1/Gro α , CXCL2/GRO β , CXCL3/GRO γ , CXCL5/ENA-78, CXCL8/IL-8 et CXCL16 [32,33]. C'est principalement par l'expression endothéliale ou musculaire lisse de CXCR2 que ces CXC-chimiokines produisent leurs effets proangiogéniques [31,34]. À l'inverse, une autre classe de CXC-chimiokines (CXCL4/PF4, CXCL9/MIG, CXCL10/IP10, CXCL11/ITAC) génère des signaux angiostatiques via CXCR3 [35–38]. C'est la présence ou non d'un motif peptidique important pour la fixation des CXC-chimiokines sur CXCR2, Glu-Leu-Arg (ELR) qui détermine leur fonction angiogénique (ELR+) ou angiostatique (ELR–) [39]. Les CC-chimiokines sont elles aussi très impliquées dans les processus athérogènes et en particulier CCL2/MCP-1 via son récepteur CCR2 [40]. Dans un modèle murin d'atteinte vasculaire par angioplastie, des souris invalidées pour CCR2 présentent une accumulation leucocytaire à l'endroit de la lésion, équivalente à celle retrouvée chez les souris non invalidées. Cependant, les souris invalidées pour CCR2 présentent une sténose artérielle profondément réduite par rapport aux souris sauvages [41]. Cette expérience met en lumière le fait que CCR2 n'est pas dévolu au seul recrutement inflammatoire, processus par ailleurs hautement redondant, mais qu'il pourrait être une clé dans la migration, la prolifération et la survie des CMLs dans les processus athérogènes. Concernant l'HTAP, l'expérience la plus édifiante concernant cette chimiokine a été réalisée par Ikeda et al. [42]. Dans un modèle d'HTAP induite par la MCT, des rats exprimant de façon constitutive un dominant négatif de MCP-1 (7ND MCP-1) présentent une réduction significative de tous les paramètres hémodynamiques et morphologiques associés à l'HTAP. Bien que les auteurs imputent ce succès thérapeutique à l'effet potentiellement anti-inflammatoire du traitement, ce résultat peut également être analysé comme le blocage spécifique de l'hyperplasie des CMLs induite par MCP-1 dans les artères pulmonaires des rats exposés à la

MCT. D'autres couples ligands/récepteurs de cette famille de CC-chimiokines sont également impliqués dans le remodelage vasculaire pathologique (CCL1-vCCL1/CCR8, CCL11/CCR3) [43,44]. La liste des médiateurs de l'inflammation stimulant la division et la migration des cellules musculaires lisses des vaisseaux est encore longue. Les cytokines pro-inflammatoires, IL-1, IL-6, et TNF, mais aussi IL-3 et IL-18 sont également de puissants mitogènes et chimioattractants des CMLs [45–50]. Réciproquement, des cytokines reconnues comme ayant une action anti-inflammatoire comme l'IL-10 et l'IL-11 diminuent l'activation et la prolifération des CMLs via l'inhibition de NF- κ B [51,52].

Les CMLs ne font pas que subir leur environnement. Elles ont la capacité de contribuer à la régulation de l'inflammation vasculaire en facilitant l'infiltration leucocytaire par l'expression des molécules d'adhésion [53,54] et en contribuant à son expansion via la synthèse d'un grand nombre de cytokines et de chimiokines proinflammatoires (c'est-à-dire IL-1, IL-6, IL-8, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CX3CL1/fractalkine) [55,56]. Cette synthèse auto-/paracrine est stimulée par les cytokines elles-mêmes, telles que l'IL-1 ou le TNF, ou par les produits bactériens, tels que les endotoxines (lipopolysaccharide [LPS]) [57].

Les CMLs ne sont donc pas des éléments contractiles inertes, de simples briques constituant la paroi vasculaire, mais des acteurs majeurs, au même titre que les CEs, dans la régulation locale de l'inflammation.

CX3CL1

Généralités

La fractalkine (CX3CL1) se distingue des autres chimiokines (à l'exception de CXCL16) par sa capacité à exister sous une forme soluble (protéine chimiotactique) ou membranaire [58]. Sous cette dernière forme, elle se comporte alors comme une molécule d'adhésion pour le recrutement des leucocytes CX3CR1+. La forme soluble résulte du clivage de la forme membranaire par la *TNF- α -converting enzyme* (TACE [ADAM17]) et ADAM10 [59,60]. CX3CL1 est exprimée par les CEs, les CMLs, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales et les neurones [27,61–64]. Dans les CEs et musculaires lisses, CX3CL1 est induite par les cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF et l'INF γ [56,65]. L'action de CX3CL1 est médiée par CX3CR1. CX3CR1 est exprimé par différents types cellulaires dont les cellules myéloïdes, les CEs microvasculaires, les plaquettes, les cellules mononuclées du sang périphérique, mais aussi par les cellules microgliales et les neurones [66–69]. CX3CR1 est également surexprimé en réponse à un stimulus inflammatoire comme le TNF [56].

Les chimiokines et les molécules d'adhésion régulent l'adressage et le recrutement appropriés de chaque type de

leucocyte vers les tissus sains ou malades [70]. La première étape de la migration « classique » des leucocytes implique l'interaction transitoire entre les sélectines exprimées à la surface des CEs et les intégrines exprimées à la surface des leucocytes roulant sur l'endothélium (attachement). Puis les intégrines leucocytaires sont activées par les chimiokines produites localement et présentées par les glycosaminoglycans (activation). Il en résulte une adhésion ferme entre leucocytes et CEs (adhésion ferme). Les leucocytes s'extravasent à travers la paroi vasculaire et dans le compartiment tissulaire (transmigration) [71]. Avant la découverte de CX3CL1, on pensait que toutes les chimiokines étaient sécrétées sous une forme soluble et qu'elles s'associaient avec les protéoglycans de surface ou les composants de la matrice extracellulaire, afin de créer un gradient local de chimiokines. Après cette association, l'interaction entre les chimiokines et leurs récepteurs déclenche l'activation des molécules d'adhésion de la famille des intégrines via un mécanisme dépendant des protéines G [72].

Dans le cas de CX3CL1, le domaine chimiokine de la protéine est présenté à l'extrémité d'une ancre membranaire de type mucine, et la fractalkine elle-même sert de molécule d'adhésion, éliminant ainsi la nécessité de l'interaction avec les protéoglycans et d'autres molécules d'adhésion. En effet, les cellules CX3CR1+ se lient rapidement et avec une haute affinité à la fractalkine immobilisée ou à des cellules exprimant CX3CL1 dans des conditions statiques ou dans des contraintes de flux [11,73]. De plus, CX3CR1 peut transmettre via les protéines G, des signaux qui vont augmenter l'avidité des intégrines pour leur ligand. Ainsi, l'engagement de CX3CR1 et des intégrines, avec CX3CL1 et les ligands des intégrines tels l'ICAM-1 et le VCAM-1, entraîne une adhésion plus grande qu'avec chaque système isolé [74].

CX3CL1 et pathologies vasculaires

Les modèles animaux ainsi que les études de polymorphismes associés à des maladies humaines ont montré l'importance de CX3CL1 et de son récepteur CX3CR1 dans les maladies vasculaires. Dans un modèle murin d'athérosclérose (souris ApoE^{-/-}), les souris ApoE^{-/-} CX3CR1^{-/-} présentent une réduction de la formation des lésions athérosclérotiques dans l'aorte par rapport aux souris ApoE^{-/-} [75,76]. Des souris invalidées pour CX3CL1 ont également une réduction des plaques athérosclérotiques dans le tronc brachio-céphalique principalement [77]. Les souris CX3CR1^{-/-} sont protégées de l'hyperplasie intimale artérielle provoquée par une lésion vasculaire (dénudation endothéliale) [78]. Dans ce modèle, l'invalidation de CX3CR1 diminue le recrutement des monocytes dans la lésion, ainsi que l'accumulation et la prolifération de

CMLs dans la néointima. Chez l'homme, le polymorphisme V249I/T280M du gène codant pour CX3CR1 protégerait contre les maladies vasculaires coronariennes [79–81] et contre les occlusions carotidiennes [82]. De plus, les lésions artérielles avancées d'athérosclérose expriment fortement le couple CX3CL1/CX3CR1 [83] suggérant que CX3CL1 pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de cette maladie vasculaire fréquente. Chez les patients souffrant d'HTAPi, Balabanian et al. [3] ont mesuré une expression accrue de CX3CR1 dans les lymphocytes T circulants CD4+ et CD8+ par rapport aux témoins. Cette augmentation d'expression s'accompagnait d'une sensibilité plus élevée des lymphocytes T (CD4+ principalement) à l'effet chimiotactique de la fractalkine. Cette réponse anormale des lymphocytes T à CX3CL1 n'était pas la simple conséquence de l'HTAP, puisqu'elle était absente chez les patients souffrant d'HTAP postembolique [HTAP-PE]. Les concentrations plasmatiques de CX3CL1 soluble (sCX3CL1) étaient significativement augmentées chez les patients hypertendus pulmonaires, par rapport aux témoins et aux patients souffrant d'HTAP-PE. Par rapport aux échantillons témoins, le gène codant pour CX3CL1 était également surexprimé (ARNm) dans les échantillons pulmonaires d'HTAP et les CE artérielles pulmonaires de ces échantillons exprimaient CX3CL1. Cette étude confirma également que les patients souffrant d'HTAP présentaient des signes d'inflammation chronique et de dysfonction endothéliale. En effet, leurs concentrations plasmatiques de CD25, d'IL-6, de VCAM-1, d'ICAM-1, de E- et P-selectines, et de *von Willebrand factor* ont été retrouvées significativement augmentées par rapport aux témoins. De fait, la détection de sCX3CL1 dans le plasma des patients hypertendus pulmonaires pourrait être analysée comme un autre marqueur de la dysfonction endothéliale dans cette maladie [12,13]. Dans cette étude, la sensibilité accrue des lymphocytes T à CX3CL1 au cours de l'HTAPi et non au cours de l'HTAP-PE, semble indiquer que CX3CL1 pourrait jouer un rôle particulier dans l'HTAPi.

Le récepteur de chimiokines d'origine virale US28, encodé par le cytomégalo virus (CMV) humain, peut fixer un grand nombre de cytokines dont la fractalkine (soluble et membranaire), avec une haute affinité. Les infections à CMV ont été rendues responsables de l'exacerbation des pathologies vasculaires après angioplastie ou transplantation d'organes [84]. Une infection à CMV a également été retrouvée dans un cas d'HTAP secondaire à l'infection par le VIH [85]. Dans ce cas, les CE infectées par le CMV étaient réparties dans tous les poumons et faisaient saillie à la surface de l'endothélium vasculaire pulmonaire, réduisant la lumière des vaisseaux atteints (circulation microvasculaire). Les auteurs proposent que l'obstruction vasculaire provoquée par les CE hypertrophiques infectées par le CMV pourrait induire une augmentation significative de la pression artérielle pulmonaire.

Récemment, il a été démontré que les plaquettes expriment CX3CR1 et qu'elles peuvent être activées par CX3CL1. En effet, des plaquettes de rats préincubées avec CX3CL1 exposent d'avantage de P-sélectines à leur surface [86]. De plus, la préincubation des plaquettes avec CX3CL1 augmente leur adhésion au collagène et au fibrinogène. Dans un modèle murin d'athérosclérose (souris ApoE^{-/-}), il a été prouvé que les plaquettes interagissent avec les lésions athérosclérotiques, entraînant la libération des chimiokines RANTES et CXCL4 au site de l'atteinte endothéliale, et augmentent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium [86]. Ainsi, exposées à CX3CL1, les plaquettes deviennent plus athérogènes.

Toutes ces données expérimentales et cliniques indiquent que CX3CL1 pourrait intervenir dans le développement et la progression des maladies vasculaires courantes comme l'athérosclérose, mais aussi plus rares comme l'HTAP.

Méthodes et objectifs

Dans ce travail nous avons choisi le modèle d'HTAP induite par un agent toxique, la MCT. L'exposition de rats Wistar à la MCT (une injection unique en sous-cutanée de 60 mg/kg) induit successivement une intense inflammation périvasculaire pulmonaire de j1 à j15, puis la constitution de lésions proliférantes vasculaires pulmonaires (à partir de j15) et une HTAP sévère conduisant au décès des animaux dans un tableau d'insuffisance cardiaque droite terminale, proche de ce que l'on observe en pathologie humaine.

Nous avons étudié l'expression de CX3CL1 et CX3CR1 dans les poumons totaux des rats témoins et 0,5, 1, 5, 10, 15 et 21 jours après l'exposition à la MCT (j0,5, j1, j5, j10, j15 et j21). Nous avons également mesuré l'expression du couple CX3CL1/CX3CR1 de façon plus ciblée, dans la média des artères pulmonaires de petit calibre (100 à 200 µm de diamètre), grâce à une technique de microdissection laser. Nous avons localisé l'expression protéique de CX3CL1 et CX3CR1 dans les lésions vasculaires des rats hypertendus pulmonaires par immunohistochimie. Nous avons vérifié par Western blot que les CML-AP mises en culture après digestion enzymatique des artères pulmonaires de rats témoins et exposés à la MCT exprimaient bien CX3CR1. Nous avons étudié le potentiel mitogène et chimiotactique de CX3CL1 sur ces CML-AP. Nous avons quantifié la prolifération des CML-AP grâce à la technique d'incorporation de thymidine tritiée et évalué la réponse migratoire des CML-AP stimulées par CX3CL1, par des tests de Transwell et de polymérisation d'actine.

Résultats

L'injection de MCT a induit une surexpression pulmonaire très significative de CX3CL1 et CX3CR1. Les lésions

vasculaires pulmonaires aiguës induites par la MCT ont entraîné une surexpression précoce de ces gènes. Par rapport aux valeurs de bases, cela s'est traduit par une expression de CX3CL1 et CX3CR1 augmentée d'un facteur 29 et 26, 12 heures après l'injection de la toxine. Après ce pic initial, l'expression de CX3CL1 et CX3CR1 est restée élevée pendant la phase inflammatoire et asymptomatique du développement de l'HTP (de j1 à j15), mais également pendant la phase moins inflammatoire et symptomatique qui accompagne l'apparition du remodelage vasculaire et l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires (de j15 à j21). À l'image de ce que nous avons mesuré dans le poumon total, les cellules de la média des artères pulmonaires micro-disséquées à j21 surexprimaient CX3CR1 par rapport aux valeurs de base chez les rats témoins.

Nous avons montré par immunohistochimie que l'infiltrat inflammatoire périvasculaire se composait de macrophages CD68+ et de lymphocytes T CD3+. À j21, les marquages immunohistochimiques nous ont également révélé que les cellules de la média des artères pulmonaires (principalement des CML-AP), exprimaient faiblement CX3CL1 alors que les cellules inflammatoires périvasculaires l'exprimaient fortement. Par contre, CX3CR1 était exprimé à la fois par les CML-APs et les cellules inflammatoires périvasculaires.

L'analyse par Western blot des CML-AP en culture a confirmé que les CML-AP expriment CX3CR1 avec deux bandes attendues à 27 et 30 kDa [87].

Nous avons mis en évidence grâce à la technique d'incorporation de thymidine tritiée que CX3CL1 est capable d'induire une prolifération des CML-AP (indépendamment du statut hémodynamique du rat donneur). Par contre, dans nos conditions expérimentales, CX3CL1 ne s'est pas révélé être un stimulus chimiotactique pour les CML-AP. À la différence du PDGF, qui est un puissant inducteur connu de la migration des CML-AP, aucune polymérisation d'actine n'a été détectée en réponse au CX3CL1. Les tests en Transwell ont confirmé un effet chimiotactique dose-réponse du PDGF ($p < 0,0001$) et l'absence d'effet de CX3CL1.

Discussion et conclusion

L'HTAP expérimentale chez le rat s'accompagne d'une sur-expression pulmonaire de CX3CL1 et CX3CR1, indiquant que cette chimiokine pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HTAP, comme le suggéraient les données obtenues chez l'homme par Balabanian et al. [3]. Nous avons montré que les CML-AP de rat expriment in vivo et in vitro CX3CR1 et que cette expression est significativement augmentée chez les rats hypertendus pulmonaires. De plus, nous avons pu démontrer que le rôle de CX3CL1 va au-delà du seul recrutement leucocytaire. Cette chimiokine pourrait directement participer au remodelage vasculaire en induisant la prolifération des CML-AP. Les cellules inflammatoires

périvasculaires qui expriment fortement CX3CL1 pourraient donc favoriser l'hyperplasie des cellules de la média.

Nos résultats rejoignent les conclusions d'autres auteurs qui ont étudié l'implication de CX3CL1 dans la genèse des lésions vasculaires, notamment dans l'athérosclérose :

- il a été montré que les CMLs présentes dans les plaques athérosclérotiques expriment CX3CR1 [83] ;
- la stimulation des CMLs aortiques avec du CX3CL1 soluble augmente leur survie et leur prolifération [56] ;
- l'adhésion des monocytes aux CMLs présentes dans la néointima est dépendante de CX3CL1 [64] ;
- CX3CL1 induit la migration de CMLs isolées de plaques athérosclérotiques [88].

En conclusion de ces articles, CX3CL1 peut agir non seulement sur les monocytes, mais également sur les CML de la néointima en stimulant leur prolifération et leur migration.

Dans nos conditions expérimentales, CX3CL1 n'a pas induit la migration des CML-APs. Cependant, dans leur étude, Lucas et al. ont utilisé des CMLs isolées de lésion d'athérosclérose [88]. Ces cellules expriment un phénotype différent des CML « quiescentes » de la média. En effet, Zeiffer et al. [64] ont montré que les CMLs de la néointima (niCMLs) présentent un phénotype « proinflammatoire ». Elles surexpriment la P-sélectine, ainsi que les chimiokines Gro- α , SDF-1 α et CX3CL1. La P-sélectine, et les chimiokines CX3CL1 et Gro- α augmentent significativement l'adhésion des monocytes aux niCMLs sous des conditions de flux, alors que le récepteur de SDF-1 α (CXCR4) médie l'arrêt sélectif des lymphocytes T mémoires via VLA-4. Zeiffer et al. ont également mis en évidence que ce phénotype était dépendant de l'activation de NF- κ B dans ces cellules [64]. Chandrasekar et al. [56] ont également montré que la prolifération des CMLs aortiques stimulées par CX3CL1 était dépendante de NF- κ B et que CX3CL1 induit sa propre expression via une voie de signalisation PI3-kinase/PDK1/Akt/NIK/IKK/NF- κ B. Dans les CMLs, l'expression de CX3CL1 et CX3CR1 est fortement induite par le TNF- α , et l'interféron- γ . On peut imaginer qu'un prétraitement des CML-AP avec l'une de ces cytokines proinflammatoires pourrait rendre les CML-AP sensibles à l'effet chimiotactique de CX3CL1.

Récemment, Lee et al. [89] ont démontré les propriétés angiogéniques de CX3CL1 in vitro et in vivo. Dans cette étude, CX3CL1 induit la prolifération, la migration et la formation de tubes in vitro, ainsi que la formation de vaisseaux sanguins in vivo. Alors qu'un grand nombre de chimiokines proangiogéniques comme MCP-1 et CXCL12 induisent l'expression du VEGF pour médier leur action [90,91], les voies de signalisations activées par CX3CL1 seraient indépendantes du VEGF. Réciproquement, les voies du VEGF seraient indépendantes de CX3CL1. Cette étude démontre que CX3CL1 stimule l'angiogenèse en activant

deux voies indépendantes, Raf-1/MEK/ERK et PI3-kinase/Akt/eNOS/NO, via l'activation de son récepteur à protéine G, CX3CR1.

En conclusion, cette étude met en lumière le lien qui existe entre inflammation et angiogenèse, en particulier par le biais de CX3CL1 et CX3CR1. L'HTAP se caractérisant par une obstruction des artères de petit calibre par la prolifération endoluminale de CEs et de CMLs, le couple CX3CL1/CX3CR1 pourrait devenir une cible thérapeutique innovante à tester dans le traitement de cette maladie.

Conflit d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Référence

- Rubin LJ (1997) Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 336:111–7
- Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M (2003) Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 22:358–63
- Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, et al (2002) CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1419–25
- Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, et al (2006) Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology* 11:158–63
- Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, et al (2005) Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J* 26:1110–8
- Perros F, Dorfmueller P, Souza R, et al (2007) Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 29:462–8
- Eddahibi S, Chaouat A, Tu L, et al (2006) Interleukin-6 gene polymorphism confers susceptibility to pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 3:475–6
- Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius DK, Burns N, et al (2005) The protective role of T-lymphocytes in pulmonary vascular remodeling. *Chest* 128:571S–2S
- Miyata M, Sakuma F, Ito M, et al (2000) Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration. *Int Arch Allergy Immunol* 121:246–52
- Witzenrath M, Ahrens B, Kube SM, et al (2006) Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 28:370–7
- Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al (1998) Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 188:1413–9
- Loscalzo J (1992) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327:117–9
- Veyradier A, Nishikubo T, Humbert M, et al (2000) Improvement of von Willebrand factor proteolysis after prostacyclin infusion in severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 102:2460–2
- Chen XJ, Cheng DY, Yang L, et al (2006) Effect of breviscapine on fractalkine expression in chronic hypoxic rats. *Chin Med J (Engl)* 119:1465–8
- Samson M, Aubry F, Parmentier M (1999) Que sont les chimiokines ? *Médecine/sciences* 15:966–73
- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, et al (2003) Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *J Allergy Clin Immunol* 111:1185–99; quiz 200
- Luster AD (1998) Chemokines — chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436–45
- Taub DD, Lloyd AR, Wang JM, et al (1993) The effects of human recombinant MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES on the chemotaxis and adhesion of T cell subsets. *Adv Exp Med Biol* 351:139–46
- Galanaud P, Richard Y, Emilie D (2001) Chemokines and defense-system cell homing. *J Soc Biol* 195:9–12
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382:635–8
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 393:591–4
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, et al (1998) Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393:595–9
- Zhang M, Mal N, Kiedrowski M, et al (2007) SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 21(12):3197–207
- Pyo RT, Sui J, Dhume A, et al (2006) CXCR4 modulates contractility in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 41:834–44
- Adler MW, Geller EB, Chen X, Rogers TJ (2006) Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS J* 7(4):E865–E70
- Adler MW, Rogers TJ (2005) Are chemokines the third major system in the brain? *J Leukoc Biol* 78:1204–9
- Bertollini C, Ragozzino D, Gross C, et al (2006) Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices. *Neuropharmacology* 51:816–21
- Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, et al (2000) The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res* 86:131–8
- Mehrad B, Keane MP, Strieter RM (2007) Chemokines as mediators of angiogenesis. *Thromb Haemostasis* 97:755–62
- Yue TL, Wang X, Sung CP, et al (1994) Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 75:1–7
- Li A, Dubey S, Varney ML, Singh RK (2002) Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* 64:476–81
- Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68:1–8
- Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S (2004) CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 279:3188–96
- Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al (2003) Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem* 278:8508–15
- Soto H, Wang W, Strieter RM, et al (1998) The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8205–10
- Yang J, Richmond A (2004) The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol Ther* 9:846–55
- Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, et al (2001) Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 107:53–63

38. Burdick MD, Murray LA, Keane MP, et al (2005) CXCL11 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 171:261–8
39. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 270:27348–57
40. Selzman CH, Miller SA, Zimmerman MA, et al (2002) Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1455–61
41. Roque M, Kim WJ, Gazdoin M, et al (2002) CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:554–9
42. Ikeda Y, Yonemitsu Y, Kataoka C, et al (2002) Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2021–H8
43. Haque NS, Fallon JT, Pan JJ, et al (2004) Chemokine receptor-8 (CCR8) mediates human vascular smooth muscle cell chemotaxis and metalloproteinase-2 secretion. *Blood* 103:1296–304
44. Kodali RB, Kim WJ, Galaria II, et al (2004) CCL11 (Eotaxin) induces CCR3-dependent smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1211–6
45. Sasu S, Beasley D (2000) Essential roles of I κ B kinases alpha and beta in serum- and IL-1-induced human VSMC proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1823–H31
46. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, et al (1991) Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* 260:H1713–H7
47. Wang Z, Rao PJ, Castresana MR, Newman WH (2005) TNF-alpha induces proliferation or apoptosis in human saphenous vein smooth muscle cells depending on phenotype. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H293–301
48. Brizzi MF, Formato L, Dentelli P, et al (2001) Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. *Circulation* 103:549–54
49. Park CC, Morel JC, Amin MA, et al (2001) Evidence of IL-18 as a novel angiogenic mediator. *J Immunol* 167:1644–53
50. Maffia P, Grassia G, Di Meglio P, et al (2006) Neutralization of interleukin-18 inhibits neointimal formation in a rat model of vascular injury. *Circulation* 114:430–7
51. Selzman CH, McIntyre RC, Jr, Shames BD, et al (1998) Interleukin-10 inhibits human vascular smooth muscle proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 30:889–96
52. Mazighi M, Pelle A, Gonzalez W, et al (2004) IL-10 inhibits vascular smooth muscle cell activation in vitro and in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H866–H71
53. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, et al (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140:665–73
54. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, et al (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 92:945–51
55. Jordan NJ, Watson ML, Williams RJ, et al (1997) Chemokine production by human vascular smooth muscle cells: modulation by IL-13. *Br J Pharmacol* 122:749–57
56. Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, et al (2003) Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J* 373:547–58
57. Loppnow H, Stelter F, Schonbeck U, et al (1995) Endotoxin activates human vascular smooth muscle cells despite lack of expression of CD14 mRNA or endogenous membrane CD14. *Infect Immun* 63:1020–6
58. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640–4
59. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276:37993–8001
60. Tsou CL, Haskell CA, Charo IF (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem* 276:44622–6
61. Ancuta P, Moses A, Gabuzda D (2004) Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology* 209:11–20
62. Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, et al (1999) Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 29:2551–9
63. Lucas AD, Chadwick N, Warren BF, et al (2001) The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo. *Am J Pathol* 158:855–66
64. Zeiffer U, Schober A, Lietz M, et al (2004) Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines. *Circ Res* 94:776–84
65. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, et al (2004) Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:34–40
66. Volin MV, Woods JM, Amin MA, et al (2001) Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 159:1521–30
67. Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, et al (2004) Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood* 103:407–12
68. Sechler JM, Barlic J, Grivel JC, Murphy PM (2004) IL-15 alters expression and function of the chemokine receptor CX3CR1 in human NK cells. *Cell Immunol* 230:99–108
69. Lauro C, Catalano M, Trettel F, et al (2006) The chemokine CX3CL1 reduces migration and increases adhesion of neurons with mechanisms dependent on the beta1 integrin subunit. *J Immunol* 177:7599–606
70. Kunkel EJ, Butcher EC (2002) Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16:1–4
71. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, et al (2002) Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 100:3853–60
72. Moser B, Loetscher P (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2:123–8
73. Kerfoot SM, Lord SE, Bell RB, et al (2003) Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Eur J Immunol* 33:729–39
74. Umehara H, Goda S, Imai T, et al (2001) Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1. *Immunol Cell Biol* 79:298–302
75. Combadiere C, Potteaux S, Gao JL, et al (2003) Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation* 107:1009–16
76. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF (2003) Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest* 111:333–40
77. Teupser D, Pavlides S, Tan M, et al (2004) Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17795–800

78. Liu P, Patil S, Rojas M, et al (2006) CX3CR1 deficiency confers protection from intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2056–62
79. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, et al (2003) Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 111:1241–50
80. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, et al (2001) Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res* 89:401–7
81. Moatti D, Faure S, Fumeron F, et al (2001) Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 97:1925–8
82. Ghilardi G, Biondi ML, Turri O, et al (2004) Internal carotid artery occlusive disease and polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1: a genetic risk factor. *Stroke* 35:1276–9
83. Wong BW, Wong D, McManus BM (2002) Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease. *Cardiovasc Pathol* 11:332–8
84. Streblov DN, Kreklywich CN, Smith P, et al (2005) Rat cytomegalovirus-accelerated transplant vascular sclerosis is reduced with mutation of the chemokine-receptor R33. *Am J Transplant* 5:436–42
85. Smith FB, Arias JH, Elmquist TH, Mazzara JT (1998) Microvascular cytomegalovirus endothelialitis of the lung: a possible cause of secondary pulmonary hypertension in a patient with AIDS. *Chest* 114:337–40
86. Huo Y, Schober A, Forlow SB, et al (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 9:61–7
87. Garin A, Tarantino N, Faure S, et al (2003) Two novel fully functional isoforms of CX3CR1 are potent HIV coreceptors. *J Immunol* 171:5305–12
88. Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, et al (2003) Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 108:2498–504
89. Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, et al (2006) Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H2836–H46
90. Hong KH, Ryu J, Han KH (2005) Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 105:1405–7
91. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, et al (2004) CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 25:201–9