

N° d'ordre :

Université Paris XIII – Léonard De Vinci  
U.F.R. Santé Médecine et Biologie Humaine

## THÈSE

Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13**

*Discipline* : **Biologie moléculaire et cellulaire**

Présentée et soutenue publiquement par :

***Hadjer MAMOUNE***

Le 20 novembre 2018

**Recrutement monocytaire : effet de  
la chimiokine RANTES/CCL5 sur les cellules  
endothéliales**

École doctorale : Institut Galilée

Unité de Recherche : Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science

Équipe : Bio-ingénierie Cardiovasculaire

Groupe : Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse : Pr. Nathalie CHARNAUX & Dr Angela SUTTON

---

### JURY

Pr Fabrice ALLAIN

Dr Jean-Loup DUBAND

Dr Eric HAY

Dr Pascale ZIMMERMANN

Pr Nathalie CHARNAUX

Dr Angela SUTTON

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Directrice de thèse

# Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie particulièrement mes rapporteurs, le Pr Fabrice Allain et le Dr Jean-Loup Duband, d'avoir accepté d'analyser et de critiquer mes travaux de recherche. Je remercie également le Dr Eric Hay et le Dr Pascale Zimmermann d'avoir accepté de juger mon travail et ma soutenance.

Je remercie le Dr Didier Letourneur de m'avoir permis de commencer mes travaux de recherche dans son équipe de Bio-ingénierie Cardiovasculaire de l'unité Inserm U1148 Laboratory for Vascular Translational Science.

Je remercie particulièrement le Pr Nathalie Charnaux et le Dr Angela Sutton de m'avoir accueillie au sein du groupe Biothérapies et Glycoconjugués depuis mon stage de deuxième année de master ; de m'avoir fait confiance en me proposant de continuer en thèse. Durant ces trois ans et demi passés j'aurai beaucoup appris. Grâce à leurs remarques, suggestions, réflexions, j'ai pris du recul et ma vision de la recherche a beaucoup évolué.

Je remercie notre collaboratrice le Dr Emmanuelle Blanchard pour son invitation au sein de son laboratoire à Tours. Je la remercie pour sa joie de vivre, sa bienveillance, son amour pour la science, sa curiosité scientifique tellement contagieuse. Ce fut un immense plaisir de travailler avec un tel personnage.

Je tiens à remercier le Dr Loic Maillard qui a commencé le travail sur l'implication du SDC-4 dans le recrutement monocyttaire induit par RANTES/CCL5. Je pense particulièrement aux deux étudiantes Emeline Desbois et Sana Bakhouche, que je n'ai pas connues personnellement, mais je tiens vraiment à les remercier pour leur aide.

Mes remerciements vont aussi aux membres du comité de suivi de thèse. Je remercie le Dr Valérie Bernard d'avoir accepté de présider ce comité. Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Dr Anne Denys mon tuteur pédagogique, pour son soutien, son accompagnement, son sens de l'engagement et ses conseils avisés. Je la remercie pour sa disponibilité, son honnêteté et sa générosité.

Je remercie le Pr. Olivier Oudar pour sa gentillesse, sa bonne humeur mais aussi pour ses conseils et ses réponses. Je le remercie sincèrement d'avoir toujours cru en moi.

Je remercie le Dr Christelle Laguillier-Morizot de m'avoir aidée, encouragée et de m'avoir toujours transmis que des ondes positives durant cette aventure.

Merci au Dr Hanna Hlawaty de son soutien et sa sympathie tout au long de ma période passée dans ce laboratoire.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe : le Dr Erwan Guyot, le Dr Benjamin Richard, Oualid Haddad et plus particulièrement Naima Zaidi et Odile Sainte-Catherine pour la bonne humeur qu'elles communiquent à tout le monde.

Je remercie les anciens étudiants passés : Merci à Nadjat Gacem et Soumaya Jadoui, à qui je souhaite beaucoup de courage pour la fin de leur thèse ; Merci à Caio Cohelo, avec qui le travail était à la fois très agréable et très amusant. Je remercie sincèrement Soumaya, Sabine, Nadjat et Caio pour les différents moments si formidables passés ensemble au laboratoire et en dehors. Merci à Abdellah Fergani pour son aide et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier ma petite stagiaire Anaëlle Chelli. J'espère que tes stages sous ma direction t'auront été agréables autant qu'il m'aura été agréable de t'encadrer. Je me rappellerai longtemps ta motivation, ton ambition mais aussi de ta chansonnette « donné donné ». Je continue à croire en toi et je te souhaite une bonne continuation. Merci à Coralie Carlot d'avoir été toujours agréable durant ses six mois de stage, même dans les moments les plus durs. Nous avons partagé des moments de joie, de pleurs mais surtout de soleil. C'était un réel plaisir de vous transmettre mon savoir et je vous souhaite à toutes les deux le meilleur pour la suite.

La fin de thèse est souvent difficile et nécessite beaucoup d'énergie alors bon courage à Kévin Bassand et un très bon courage à Oualid Haddad et Amena Butt pour la dernière ligne droite.

Je remercie l'ensemble des enseignants de l'IUT Paris 13 et de l'UFR SMBH avec qui j'avais la chance de travailler, particulièrement Anne Arlot, talentueuse comme tu es, j'ai beaucoup appris à tes côtés. Je remercie également Dorian Foissy-Robin, Maisha Mohammed Ali et Siham Boughiden avec qui j'ai passé beaucoup de bons moments et des situations parfois chaotiques mais qui restaient tout de même très drôles, plus tard bien évidemment. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous !

Je remercie également tous les membres de l'équipe du laboratoire de CSPBAT UMR 7244 CNRS de leur accueil, leur gentillesse, leur aide et leurs conseils spécialement Dr Sylvie Changotade et Dr Tewfik Kadri. Un grand Merci au Dr Florence Poirier de m'avoir donné un conseil, sincère et pragmatique, qui m'a changé la vie, je lui en suis profondément reconnaissante.

Je tiens à remercier mes parents de m'avoir soutenu pendant mes très longues années d'études et spécialement pendant ces trois ans de thèse. Je remercie mon meilleur ami Nazim de m'avoir toujours aidée et soutenue peu importe les circonstances. Je remercie également l'homme de ma vie pour sa patience et son soutien tout au long de la période de mon doctorat, dans les meilleurs moments mais surtout dans les pires. Je le remercie d'avoir eu l'extrême courage de me supporter pendant l'épreuve difficile de la rédaction. Je le remercie d'y avoir cru.

Pour finir, je remercie Mamie Féli sans son soutien et son appui cette thèse n'aurait pas été possible. Je lui dédie cette thèse. Là où tu es ma mamie, repose en paix.

# Table des matières

<b>Table des figures.....</b>	<b>10</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>14</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>15</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>20</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>21</b>
<b>A. L'endothélium vasculaire une barrière à part entière .....</b>	<b>22</b>
I. Endothélium vasculaire et perméabilité endothéliale.....	22
II. Jonctions endothéliales.....	26
1. Complexus adhérentes.....	27
2. Jonctions communicantes.....	28
3. Jonctions serrées.....	31
3.1. L'occludine.....	31
3.2. Les claudines .....	32
3.3. Les molécules d'adhérence jonctionnelles.....	32
4. Jonctions adhérentes.....	34
<b>B. La VE-cadhéine : stabilité des jonctions et contrôle de la perméabilité de la barrière endothéliale .....</b>	<b>35</b>
I. Structure .....	35
II. Partenaires et interactions de la VE-cadhéine.....	36
1. $\beta$ -caténine .....	36
1.1. Structure de la $\beta$ -caténine .....	36
1.2. Régulation des interactions de la $\beta$ -caténine avec ses partenaires .....	37
1.3. La $\beta$ -caténine : rôle de structure et de signalisation Wnt .....	40
2. $\alpha$ -caténine .....	42
2.1. Structure et caractérisation des interactions de l' $\alpha$ caténine .....	42
2.2. Rôle non jonctionnel de l' $\alpha$ -caténine .....	44

3.	p120-caténine (p120).....	46
4.	Plakoglobine ( $\gamma$ -caténine).....	48
III.	Régulation de la perméabilité endothéliale par le complexe VE-cadhérine .....	49
1.	Modifications post traductionnelle : la phosphorylation.....	50
2.	Modifications de position et de structure .....	53
2.1.	Endocytose de la VE-cadhérine .....	53
2.2.	Le clivage protéolytique de l'ectodomaine et du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine.....	56
2.2.1.	<i>Le clivage de l'ectodomaine.....</i>	56
2.2.2.	<i>Le clivage du domaine cytosolique de VE-cadhérine la et son recyclage</i>	57
2.3.	Rho GTPases .....	58
IV.	Fonctions de la VE-cadhérine .....	61
1.	Morphogenèse vasculaire .....	61
2.	Polarité apicale-basale.....	63
3.	Survie et prolifération cellulaire.....	64
4.	Rôle physiopathologique du complexe jonctionnel VE-cadhérine .....	66
4.1.	Cancers .....	66
4.2.	Inflammation .....	67
<b>C.</b>	<b>Les chimiokines et leurs récepteurs .....</b>	<b>69</b>
I.	Les chimiokines.....	69
1.	Structure, classification et nomenclature de chimiokines .....	69
2.	Homo et hétéro-oligomérisation de chimiokines .....	71
II.	Récepteurs classiques de chimiokines.....	72
1.	Généralités.....	72
2.	Structure des RCPG de classe A- et interaction avec les chimiokines.....	73
3.	Transduction du signal induite par l'interaction entre chimiokines et RCPG classiques.....	75
4.	Devenir du complexe chimiokines-RCPG .....	78
4.1.	Généralités.....	78
4.2.	Orientation de différents RCPG en fonction de leur ligand .....	80
III.	Récepteurs atypiques de chimiokines .....	80

1.	Structure .....	80
2.	Fonctions .....	80
IV.	Interaction entre chimiokines et glycosaminoglycanes.....	83
1.	Structure et classification des glycosaminoglycanes .....	83
2.	Interactions des GAGs .....	85
3.	Conséquences fonctionnelles des interactions GAGs-chimiokines .....	85
3.1.	Protection de la protéolyse et stabilité de la fonction des chimiokines.....	85
3.2.	Oligomérisation.....	86
3.3.	Immobilisation et présentation des chimiokines au récepteur .....	86
3.4.	Régulation de la réponse fonctionnelle du récepteur de chimiokine .....	87
V.	Fonctions des chimiokines et leurs récepteurs .....	87
1.	Hématopoïèse .....	88
2.	Organogenèse .....	88
3.	Réparation tissulaire /cicatrisation .....	89
4.	Angiogenèse .....	89
5.	Cancer et métastase .....	90
6.	Inflammation .....	91
<b>D.</b>	<b>Le recrutement des leucocytes par l'endothélium .....</b>	<b>93</b>
I.	Roulement des leucocytes .....	94
1.	Rôle des sélectines .....	95
II.	Arrêt et adhérence ferme des leucocytes.....	96
1.	Intégrines.....	97
2.	Les ligands des intégrines .....	98
3.	Interaction entre intégrines leucocytaires et ligands endothéliaux.....	98
III.	Migration trans-endothéliale des leucocytes .....	99
1.	Rôle des molécules d'adhérences ICAM-1 et VCAM-1.....	99
2.	Rôle de la VE-cadhérine .....	100
3.	Compartiment de recyclage de la bordure latérale.....	102
<b>E.</b>	<b>Rôle physiologique de RANTES et thérapies .....</b>	<b>107</b>
I.	Expression cellulaire de RANTES/CCL5 .....	107

II.	Régulation transcriptionnelle de RANTES/CCL5 .....	107
III.	Structure .....	108
IV.	Interaction de RANTES/CCL5 avec ses récepteurs.....	109
V.	Les co-récepteurs protéoglycaniques de RANTES/CCL5 .....	111
1.	Sélectivité de RANTES/CCL5 pour les GAGs.....	111
2.	Les syndécanes protéoglycanes à chaîne héparane sulfate .....	111
2.1.	L'expression des syndécanes .....	112
2.2.	Structure des syndécanes.....	112
3.	Le syndécane-4.....	114
3.1.	Le domaine extracellulaire du SDC-4.....	114
3.2.	Le domaine transmembranaire du SDC-4.....	116
3.3.	Le domaine intracellulaire du SDC-4.....	117
VI.	Rôle physiopathologique de RANTES/CCL5.....	118
1.	Infection par VIH .....	119
2.	RANTES CCL5 et l'angiogenèse .....	120
3.	Cancer et métastase .....	121
4.	Inflammation vasculaire.....	123
VII.	RANTES/CCL5 cible thérapeutique anti-inflammatoire.....	124
	<b>OBJECTIF.....</b>	<b>126</b>
A.	<b>Synthèse.....</b>	<b>127</b>
B.	<b>Hypothèse et objectif.....</b>	<b>127</b>
	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>131</b>
A.	<b>Involvement of RANTES-CCL5-GAGs interaction in monocyte recruitment.....</b>	<b>132</b>
I.	Article 1.....	132
1.	Supplementary data .....	169
1.1.	Involvement of Rho GTPases in RANTES-induced monocyte transendothelial migration .....	169

1.1.1. <i>Expression of Rho GTPases dominant negative GFP-constructs in HUVECs</i> .....	169
1.1.2. <i>Rho GTPases are involved in RANTES-induced monocyte transendothelial migration</i> .....	171
2.    Complementary data .....	173
2.1.    HUVECs monolayer integrity reduced permeability to FITC-dextran.....	173
2.2.    RANTES oligomerization and its binding to GAGs are required to promote vascular permeability .....	174
2.3.    RANTES binding with CCR1 is implicated in RANTES-induced permeability.....	175
3.    Bilan .....	178
<b>B. Intracellular domain of SDC-4 in RANTES-induced monocyte recruitment</b> .....	<b>180</b>
I.    Article 2 .....	180
II.    Bilan .....	208
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>209</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	<b>235</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>237</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>265</b>
<b>Matériels et méthodes</b> .....	<b>266</b>
<b>A. Modèles cellulaires</b> .....	<b>267</b>
I.    Cellules endothéliales HUVECs .....	267
II.    Monocytes Mono Mac 6 .....	267
<b>B. Matériels</b> .....	<b>268</b>
I.    Cytokines et chimiokines .....	268
II.    Anticorps .....	269
III.    Outils moléculaires d'inhibition.....	271



IV.	Plasmides.....	272
<b>C.</b>	<b>Méthodes.....</b>	<b>273</b>
I.	Amplification de plasmides et extraction de l'ADN plasmidique .....	273
1.	Transformation bactérienne.....	273
2.	Culture bactérienne .....	273
2.1.	Amplification des bactéries en petits volume (Miniculture).....	273
2.2.	Amplification des bactéries en grands volumes (Maxiculture).....	274
3.	Extraction d'ADN plasmidique.....	274
3.1.	Extraction d'ADN plasmidique en petite quantité (Miniprep).....	274
3.2.	Extraction d'ADN plasmidique en grande quantité (Maxiprep ).....	274
4.	Digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose .....	275
II.	Transfection cellulaire et contrôle de son efficacité.....	275
III.	Etude du recrutement monocytaire .....	276
1.	Arrêt des monocytes sur la barrière endothéliale en condition de flux .....	276
2.	Adhérence des monocytes sur la barrière endothéliale en conditions statique .....	277
3.	Migration trans-endothéliale des monocytes en chambre de Boyden (Transwell) .....	277
IV.	Evaluation des mécanismes impliqués dans le recrutement monocytaire.....	278
V.	La microscopie électronique à transmission .....	278
VI.	Cytométrie en Flux.....	279
1.	Etude de l'expression membranaire des molécules d'adhérences sur les HUVECs.....	279
2.	Etude de la liaison de RANTES avec les récepteurs membranaires des HUVECs .....	279
VII.	Etude de la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la $\beta$ -caténine.....	280
VIII.	Etude de la translocation membranaire des PKCs $\alpha$ et $\delta$ .....	281
IX.	Test de perméabilité .....	282
X.	Analyse statistique.....	283

# Table des figures

Figure 1. Perméabilité transcellulaire et paracellulaire : deux voies de la perméabilité endothéliale. ....	23
Figure 2. Mise en évidence de la perméabilité transcellulaire de l'albumine au niveau de l'endothélium par microscopie électronique .....	24
Figure 3. La perméabilité endothéliale : migration trans-endothéliale par voie transcellulaire ou paracellulaire. ....	25
Figure 4. Les principales jonctions inter-endothéliales.....	27
Figure 5. Les jonctions communicantes des cellules endothéliales. ....	29
Figure 6. Disposition des jonctions serrées et adhérentes dans les cellules endothéliales. ....	31
Figure 7. Le complexe d'adhérence de la VE-cadhérine .....	36
Figure 8. Représentation schématique de la structure de la $\beta$ -caténine. ....	36
Figure 9. Représentation schématique de la structure de la $\beta$ -caténine et quelques exemples de ses interactions .....	37
Figure 10. Protéines kinases et leurs résidus cibles de la $\beta$ -caténine. ....	38
Figure 11. Les deux rôles majeures de la $\beta$ -caténine dans le maintien des jonctions adhérentes et dans la signalisation Wnt.....	42
Figure 12. Représentation schématique de l' $\alpha$ caténine et de ses interactions protéiques. ....	43
Figure 13. Exemples de fonctions de l' $\alpha$ -caténine jonctionnelle et extra-jonctionnelle. ....	46
Figure 14. Représentation schématique de la structure de p120 et ses principales interactions. ....	47
Figure 15. Mécanismes régulateurs de l'assemblage du complexe jonctionnel impliquant la VE-cadhérine. ....	50
Figure 16. Les résidus tyrosines phosphorylables du domaine cytoplasmiques de la VE-cadhérine. ....	51
Figure 17. Régulation de la perméabilité endothéliale par l'endocytose de la VE-cadhérine suite à la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF. ....	54
Figure 18. Modèle de clivage du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine par la calpaïne .....	57
Figure 19. L'activation réversible des RhoGTPases .....	58

Figure 20. La balance entre RhoA et Cdc42/Rac1 est le point de contrôle de l'intégrité endothéliale. ....	61
Figure 21. Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des chimiokines. ...	70
Figure 22. Les quatre familles de chimiokines. ....	71
Figure 23. Les chimiokines et les récepteurs de chimiokines (classiques et atypiques). ....	73
Figure 24. Structure schématique d'un RCPG .....	74
Figure 25. Représentation schématique du modèle d'interactions à deux sites. ....	75
Figure 26. Schéma général du système de signalisation de RCPG chimiokine dépendant.....	76
Figure 27. Schéma de la désensibilisation et trafic du RCPG.....	78
Figure 28. Fonctions des récepteurs atypiques.....	81
Figure 29. Représentation schématique de la structure des GAGs et leur association à la protéine centrale du protéoglycane.....	84
Figure 30. Recrutement des leucocytes par l'endothélium .....	94
Figure 31. Représentation schématique du mécanisme du roulement leucocytaire.....	95
Figure 32. Modèle d'activation leucocytaire des intégrines suite à l'activation d'un RCPG par une chimiokine .....	96
Figure 33. Signalisation intra-endothéliale intégrines-dépendante. ....	100
Figure 34. La phosphorylation et l'internalisation de la VE-cadhérine dans le contrôle de la migration trans-endothéliale.....	102
Figure 35. Rôle du compartiment de recyclage de la bordure latérale dans la migration trans-endothéliale .....	103
Figure 36. Transmigration et transmigration inverse .....	104
Figure 37. Promoteur de RANTES/CCL5 et séquences d'interaction entre des séquences consensus du promoteur et des facteurs de transcription régulant l'expression de RANTES/CCL5. ....	108
Figure 38. Structure de RANTES .....	109
Figure 39. Représentation schématique des modèles d'interaction d'un dimère de RANTES/CCL5 avec un RCPG et des protéoglycans membranaires.....	110
Figure 40. Structure des syndécans .....	113
Figure 41. Clivage protéolytique de l'ectodomaine du SDC-4.....	115
Figure 42. Implication du domaine intracellulaire du SDC-4 dans la signalisation du FGF2. ....	118

Figure 43. Hypothèse 1 : l'interaction entre RANTES/CCL5 les RCPGs et les GAGs exprimés sur les cellules endothéliales pourrait induire le recrutement des monocytes.....	128
Figure 44. Hypothèse 2 : le SDC-4 pourrait être un co-recepteur fonctionnel de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocyttaire.....	129
Figure 45. Balance entre PKC $\alpha$ et PKC $\delta$ dans la migration trans-endothéliale induite par RANTES/CCL5. ....	226
<b>Figures Article 1.....</b>	<b>143</b>
Article 1 Figure 1 . RANTES/CCL5 induces monocyte recruitment on TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells.....	143
Article 1 Figure 2. RANTES binds to HUVEC .....	145
Article 1 Figure 3. RANTES/CCL5 oligomerization and its binding to GAGs and GPCRs expressed on endothelial cell membrane are required to induce monocyte recruitment.....	146
Article 1 Figure 4. RANTES/CCL5-induced variation of adhesion molecule expression at the membrane of endothelial cells.....	149
Article 1 Figure 5. Involvement of PKCs and Rho GTPases in RANTES-induced monocyte arrest, adhesion and transmigration.....	150
Article 1 Figure 6. PKC $\alpha$ /PKC $\delta$ balance and RANTES-induced PKC $\delta$ activation.....	152
Article 1 Figure 7. RANTES-induced PKC $\alpha$ / PKC $\delta$ balance disruption modulates $\beta$ -catenin and VE-cadherin phosphorylation. ....	154
Article 1 Figure 8. RANTES-induced adherens junction destabilization .....	156
Article 1 Figure 9. Schematic representation of RANTES effect on endothelial cells promoting monocyte arrest, adhesion and transmigration .....	160
<b>Figures supplémentaires Article 1.....</b>	<b>170</b>
Article 1 Figure S 1. Rho GTPases dominant negative transfection efficiency.....	170
Article 1 Figure S 2. Rho GTPases pathways involvement in RANTES-induced monocyte transmigration.....	171
<b>Figures complémentaires Article 1.....</b>	<b>173</b>
Article 1 Figure C 1. RANTES promotes permeability through HUVEC monolayer.....	173
Article 1 Figure C 2. RANTES-induced vascular permeability requires at least oligomerization or GAGs binding. ....	175
Article 1 Figure C 3. Inhibition of CCR1 and CCR5 expressed on HUVEC membrane cell by specific RNA interference .....	176

Article 1 Figure C 4. RANTES binding with its GPCR promotes RANTES-induced permeability.....	177
<b>Figures Article 2.....</b>	<b>190</b>
Article 2 Figure 1. SDC-4 intracellular domain involvement in monocyte arrest on endothelial cell monolayer .....	190
Article 2 Figure 2. SDC-4-induced endothelial cell-morphology change under laminar flow. ....	192
Article 2 Figure 3. SDC-4-induced endothelial cell-morphology change under laminar flow. ....	193
Article 2 Figure 4. SDC-4-induced variation of adhesion molecules expression at the membrane of endothelial cells. ....	195
Article 2 Figure 5. SDC-4 endodomain induced transendothelial migration.....	197
Article 2 Figure 6. Tyrosine 731 VE-cadherin phosphorylation is regulated by SDC-4. ....	199

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les différentes protéines membranaires endothéliales étudiées pour leur implication dans la migration trans-endothéliale.....	106
<b>Tableau 2.</b> Les anticorps et isotypes utilisés pour la cytométrie en flux.....	269
<b>Tableau 3.</b> Les anticorps et les isotypes utilisés en Western Blot.....	270
<b>Tableau 4.</b> Les outils moléculaires d'inhibition et d'activation .....	271
<b>Tableau 5.</b> Les plasmides codant le SDC-4 ou ses mutants fusionnés avec la GFP .....	272

# Liste des abréviations

AA : Acide Aminé

AC : Adénylate Cyclase

aCKR : *atypical Chemokine Receptor*

ADAM : *A Disintegrin And Metalloproteinases*

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AP-2 : *Adaptor-related Protein complex 2*

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

ApoE : Apolipoprotéine E

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

bEnd5 : cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique murine

bFGF : *basic Fibroblast Growth Factor*

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CASK : Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase

Cav-1 : Cavéoline-1

Cdc42 : cell division cycle 42

CHO : Cellules ovariennes de hamster chinois

CK : Caséine Kinase

CRS1 : *Chemokine Recognition Site 1*

CRS2 : *Chemokine Recognition Site 2*

CS : Chondroïtine Sulfate

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSK : C-terminal Src Kinase

CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses

Cx : Connexines

Cys : Cystéine

DAG : Diacylglycérol  
DARC : *Duffy Antigen Receptor for Chemokines*  
DS : Dermatane Sulfate  
Dvl : Disheveled  
EGF : Epidermal Growth Factor  
ELR : motif Glutamine-Leucine-Arginine  
ERK : Extracellular signal-regulated kinase  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
Fzd : Frizzled  
GAG : Glycosaminoglycanes  
GDP : Guanine Diphosphate  
GEF : *Guanine nucleotide Exchange Factors*  
GRK : G Protein-Coupled Receptor Kinase  
GTP : Guanine Triphosphate  
HA : Acide Hyaluronique  
HeLa : cellules de tumeur du col utérin  
HGF : Hepatocyte Growth Factor  
Hp : Héparine  
HS : Héparane Sulfate  
HUVEC : Human Umbilical Vein-Endothelial Cell  
ICAM-1 : Inter Cellular Adhesion Molecule-1  
ICAT: inhibitor of  $\beta$ -catenin and T cell factor  
IgSF : Immunoglobulin superfamily  
JMD : domaine juxta-membranaire  
IL-1 : Interleukine-1  
IL-4 : Interleukine-4  
IL-8 / CXCL8 : Interleukine-8



INF- $\gamma$  : Interferon- $\gamma$

IP 3 : Inositol 1,4,5-trisphosphate

JAMs : Junctional Adhesion Molecule

K : Acide aminé lysine

KLF13 : Kruppel-Like Factor 13

KS : Kératane Sulfate

LBRC : Lateral Border Recycling Compartement

LFA-1/  $\alpha$ L $\beta$ 2 : Lymphocyte Function-associate Antigen 1

LPS : Lipopolysaccharide

LRP 5/6 : Low-Protein Lipoprotein Receptor-Protein 5/6

Mac-1 / $\alpha$ M $\beta$ 2 : Macrophage-1 antigen

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCP-1 : Monocyte Chimioattractant Protein 1

MCP-1/CCL2 : Monocyte Chimioattractant Protein-1/CC Ligand n° 2

MDCK : Cellules épithéliales Madin-Darby Canine Kidney

MEC : Matrice Extracellulaire

MIP-1 $\beta$ /CCL4 : Macrophage Inflammatory Protein-1 $\beta$ / CC Ligand n° 4

MLCK : Myosin Light-Chain Kinase

MM6 : monocytes Mono Mac 6

MMP : Métalloprotéase Matricielle

MUPP1 : Multi-PDZ Protein 1

NFAT1 : Nuclear Factor of Activated T cells 1

NF-IL6 : Nuclear Factor of Interleukin 6

NF $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B

NRE : NF $\kappa$ B Response Element

N-terminal : Amino-terminal

OVV : Organites vésiculo-vacuolaires

p120 : p120-caténine

PAK : p21 Protein Activated Kinase

PAR-3 : Partitioning defective 3 homolog

PDZ : Postsynaptic Density-95/disc large protein (sur la thèse de Loïc c'est PSD95-Dlg1-Zo1)

PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

PF4 / CXCL4 : Platelet Factor 4 /CXC Ligand n° 4

PG : Protéoglycane

PGHS : Protéoglycane à chaînes Héparanes Sulfates

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PI3K-C2 $\alpha$  : PI3K classe 2 $\alpha$

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PP1 : Protein Phosphatase 1

PP2A : Protein Phosphatase 2A

PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1

PTP1B : Protéine Tyrosine Phosphatase 1B

Pyk2 : Protein tyrosine kinase 2

R : acide aminé arginine

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RANTES/CCL5 : Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted/CC Ligand n° 5

RCPG : Récepteur à sept domaines transmembranaires Couplé aux Protéines G

RGS : Regulator of G-protein Signaling

RhoG : Ras homolog family member G

RhoGDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors

ROCK : Rho Kinase

S : sérine

S179A : Sérine 179 du domaine intracellulaire du syndécane-4 substituée en Alanine

SDC-4 : Syndécane-4

SDF-1/CXCL12 : Stromal Derived Factor-1/CXC Ligand n° 12

SH2 : Src-Homology 2

SHP2 : Src Homology Phosphatase 2

Src : Schmidt-Ruppin A-2 avian sarcoma

T : Thréonine

TBP : TATA Box Binding Protein

TCF/LEF : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$

TH1: lymphocytes T Helper 1

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

V : domaine Variable intracellulaire du syndécane

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VE-cadhérine : Vascular Endothelial Cadherin)

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

VE-PTP : VE-Protéine Tyrosine Phosphatase

VH : Vinculin Homology Domain

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VLA4/  $\alpha 4\beta 1$  : Very Late Antigen 4

Wnt : Wingless integration site

Y : Tyrosine

ZO-1 : Zonula Occludens-1

## Résumé

L'inflammation vasculaire est caractérisée par le recrutement monocytaire qui englobe l'arrêt, l'adhérence puis la migration trans-endothéliale des monocytes à travers l'endothélium vasculaire. Ce processus nécessite une interaction entre les médiateurs inflammatoires tels que les chimiokines, les leucocytes et les cellules endothéliales. Dans ce projet, nous avons évalué les mécanismes moléculaires induits par la chimiokine RANTES/CCL5 sur les cellules endothéliales permettant le recrutement des monocytes. Sur les cellules endothéliales, RANTES/CCL5 exerce ses effets biologiques grâce à ses interactions avec ses récepteurs protéiques (CCR1 et CCR5) et protéoglycanniques tels que le syndécan-4. L'implication du domaine intracellulaire (C1, V, C2) du syndécan-4 dans le recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5 démontre son rôle de co-récepteur fonctionnel. La stimulation des cellules endothéliales par RANTES/CCL5 augmente fortement, par rapport aux cellules non stimulées, le recrutement monocytaire *via* les voies de signalisation Rho GTPases, PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  qui régulent la phosphorylation de protéines de jonctions inter-endothéliales notamment la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine. Ainsi, le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant le système endothélial pourrait permettre de réguler l'initiation du processus inflammatoire induit par la chimiokine RANTES/CCL5.

**Mots-clés :** RANTES/CCL5, GAGs, Syndécan-4, Recrutement monocytaire, Jonctions adhérentes, PKC.

## Abstract

Vascular inflammation is characterized by monocytes recruitment which includes arrest, adhesion and trans-endothelial migration of leukocytes through the vascular endothelium. This process requires an interaction between inflammatory mediators such as chemokines, leukocytes and endothelial cells. In this study, we evaluated the molecular mechanisms induced by the chemokine RANTES/CCL5 on endothelial cells allowing monocytes recruitment. RANTES/CCL5 exerts its biological effects through its interaction with its protein receptors (CCR1 and CCR5) and its interaction with proteoglycans such as syndecan-4. The involvement of the intracellular domain of syndecan-4 (C1, V, C2) in RANTES/CCL5-induced monocytes recruitment demonstrates its role as functional co-receptor. The stimulation of endothelial cells by RANTES/CCL5 strongly increases monocytes recruitment through Rho GTPase, PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  signaling pathways. PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  regulate the phosphorylation of inter-endothelial junction proteins, mainly VE-cadherin and  $\beta$ -catenin. Thus, the development of a new therapeutic strategy targeting the endothelial system might be allowing to regulate the initiation of the inflammatory process induced by the chemokine RANTES.

**Keywords** RANTES/CCL5, GAGs, Syndecan-4, Monocyte recruitment, Adherens junctions, PKC.

# **INTRODUCTION**

## A. L'endothélium vasculaire une barrière à part entière

L'endothélium vasculaire tapisse la paroi interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques et forme une barrière physique séparant ainsi le sang / la lymphe des autres compartiments tissulaires sous-jacents. Cette barrière pavimenteuse est constituée de cellules endothéliales polygonales et jointives avec une capacité de s'aligner en direction du flux sanguin.

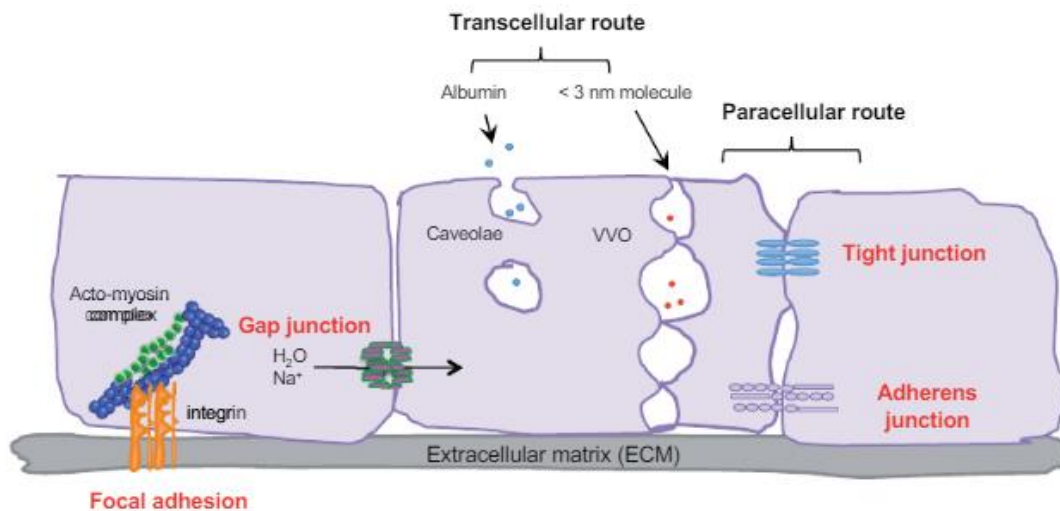
### I. Endothélium vasculaire et perméabilité endothéliale

En condition physiologique, l'endothélium vasculaire est quiescent, formant une barrière semi-perméable sélective qui contrôle le passage des fluides, des petites et grosses molécules ainsi que le passage des leucocytes circulants.

Cette perméabilité endothéliale est étroitement liée à la perturbation de l'intégrité de la barrière endothéliale qui peut être physiologique comme pathologique, elle est souvent en relation avec l'inflammation et/ou l'angiogenèse. La perméabilité de la barrière vasculaire endothéliale peut être modifiée en réponse à des stimuli spécifiques tels que des facteurs de croissance, des médiateurs inflammatoires ou une perturbation du flux sanguin. (*Kumar et al., 2009; Vandenbroucke et al., 2008*)

Il existe deux voies de perméabilité endothéliale : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire (**Figure 1**). (*Komarova and Malik, 2010*)

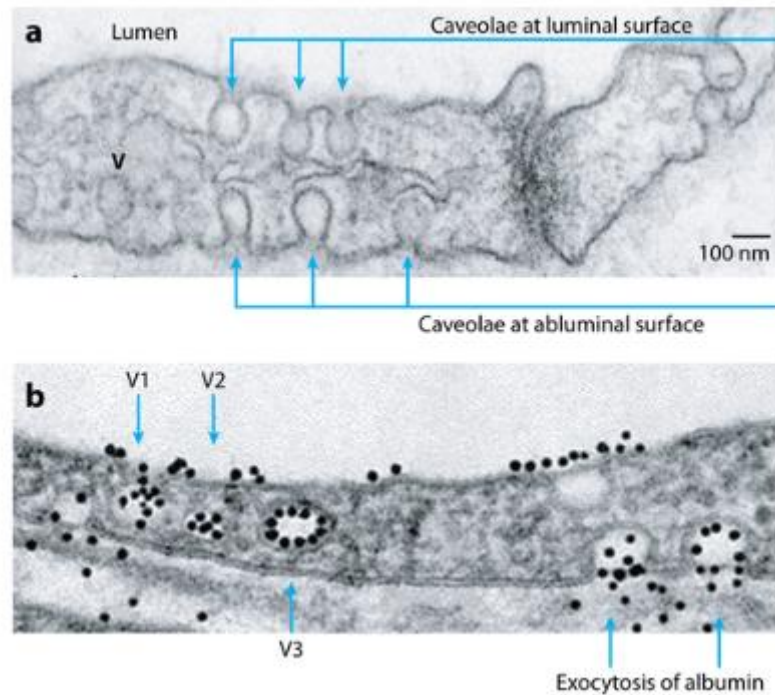
Le passage transcellulaire (ou transcytose) des solutés consiste en leur passage à travers une cellule par diffusion ou endocytose ; la diffusion des solutés à travers la membrane plasmique des cellules se fait soit par diffusion passive (diffusion bidirectionnelle d'ions ou de molécules lipophiles), soit par diffusion facilitée, soit par diffusion selon un gradient de concentration ou *via* un transport actif. De plus, la transcytose correspond à un passage transcellulaire par lequel les macromolécules (> 3 nm) telle que l'albumine passent à travers les cellules endothéliales, transportées par différents types de vésicules comme les cavéoles ou les organites vésiculo-vacuolaires (OVV) (**Figure 1**). (*Azzi et al., 2013*)



**Figure 1. Perméabilité transcellulaire et paracellulaire : deux voies de la perméabilité endothéliale.** Deux voies de perméabilité affectent la barrière endothéliale : 1) la voie transcellulaire qui transporte les macromolécules à travers la cellule endothéliale *via* différents systèmes vésiculaires : les vésicules de cavéoles ou les organites vésiculo-vacuolaires (OVV) ; 2) la voie paracellulaire qui assure le transport de macromolécules à travers deux cellules endothéliales adjacentes par le biais de jonctions inter-endothéliales. (Azzi *et al.*, 2013)

Les cavéoles sont des vésicules issues des invaginations de radeaux lipidiques de la membrane plasmique et dont la protéine structurale majeure est la cavéoline-1 (Cav-1). Bien que les cellules endothéliales expriment fortement Cav-1 et Cav-2, la transcytose des macromolécules se fait exclusivement par Cav-1. Le trafic transcellulaire de l'albumine est assuré principalement par des vésicules enrichies en Cav-1 transportées de la surface apicale de la cellule endothéliale vers la surface basale. Les vésicules fusionnent avec la membrane plasmique du côté abluminal et libèrent leur contenu en macromolécules par exocytose (**Figure 2**). (Komarova and Malik, 2010)

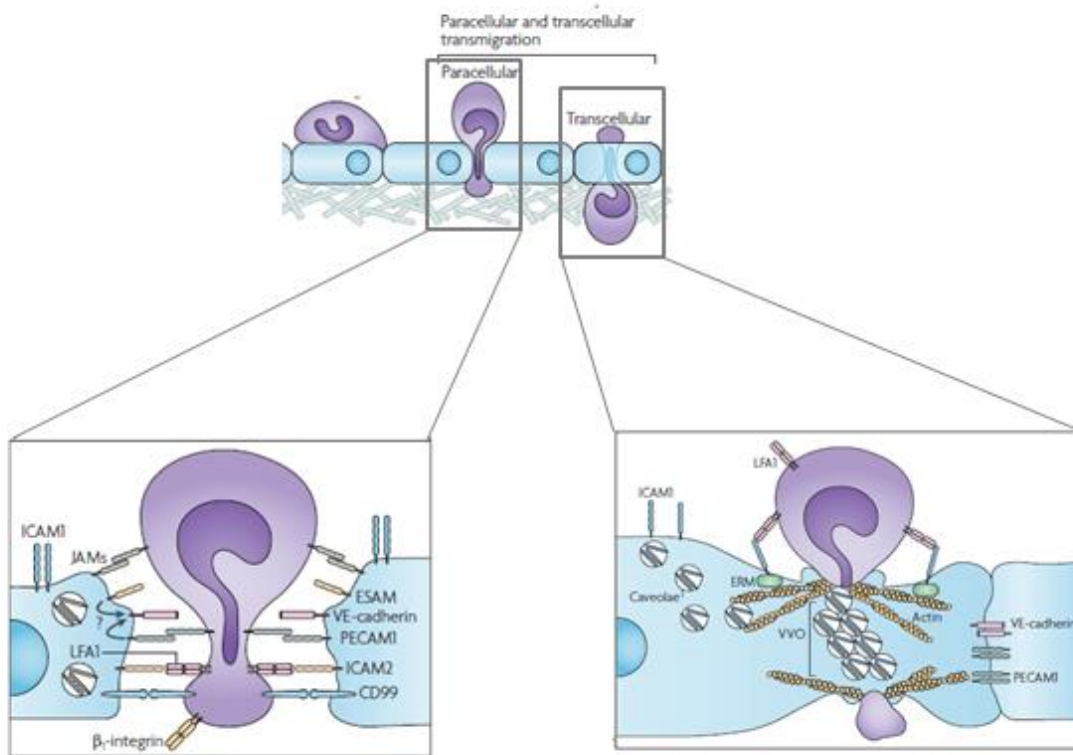
La perméabilité transcellulaire de l'albumine est un processus constitutif en condition physiologie saine et nécessaire au maintien de l'équilibre hydrique à travers l'endothélium. L'augmentation de la perméabilité vasculaire à l'albumine est la signature de certains processus pathologiques. (Komarova and Malik, 2010) L'augmentation accrue de la perméabilité de l'albumine a été observée dans les microvaisseaux pulmonaires lors de la septicémie. (Sun *et al.*, 2009) De plus, l'accumulation de liquide interstitiel riche en protéines associée à un transport d'albumine accru provoque une lésion tissulaire. (Komarova and Malik, 2010; Sun *et al.*, 2009; Tiruppathi *et al.*, 2008)



**Figure 2. Mise en évidence de la perméabilité transcellulaire de l'albumine au niveau de l'endothélium par microscopie électronique.** Endothélium microvasculaire non perfusé (a) ou perfusé avec l'albumine (b). (a) des structures cavéolaires (V) indiquées à la surface luminale et abluminale et dans le cytoplasme. (b) trafic transcellulaire (transcytose). Les vésicules 1 et 2 (V1 et V2) représentent le transport de l'albumine par macropinocytose, alors que V3 est un exemple de transport lié à un récepteur. La libération de l'albumine à partir de vésicules se fait par exocytose à la surface abluminale. (Komarova and Malik, 2010)

Même s'il s'agit d'un phénomène rare et très peu observé, la perméabilité transcellulaire permettant l'infiltration des leucocytes à travers l'endothélium tout en laissant les jonctions inter-endothéliales intactes a été confirmée *in vivo*. Pour ce faire, la membrane des leucocytes et des cellules endothéliales fusionnent pour former un canal transcellulaire entre la membrane apicale et la membrane basale facilitant la transmigration des leucocytes (Figure 3). (Carman et al., 2007; Filippi, 2016)





**Figure 3. La perméabilité endothéliale : migration trans-endothéliale par voie transcellulaire ou paracellulaire.** La migration transcellulaire des leucocytes à travers l'endothélium nécessite essentiellement que les vésicules cavéolaires entourent le leucocyte et favorisent son passage à travers le corps de la cellule endothéliale ; alors que la transmigration paracellulaire est dépendante du passage par les jonctions entre deux cellules endothéliales adjacentes jointives. Figure modifiée à partir de (Ley *et al.*, 2007)

Il a été montré que Cav-1 est plus exprimé sur les leucocytes (notamment les lymphocytes et les neutrophiles) qui s'infiltrent *via* la voie transcellulaire. (Millán *et al.*, 2006) De plus, l'inhibition de la Cav-1 dans les cellules endothéliales a réduit la migration transcellulaire, suggérant un rôle spécialisé pour la Cav-1 dans la migration transcellulaire. (Millán *et al.*, 2006) Par la suite, Marmon *et al.* ont confirmé ce résultat en montrant qu'un taux élevé de Cav-1 dans les cellules endothéliales favorise la voie transcellulaire et à l'inverse, son inhibition favorise la voie paracellulaire. (Marmon *et al.*, 2009)

La perméabilité paracellulaire permet les flux moléculaires et cellulaires entre cellules endothéliales adjacentes suite à une **désorganisation transitoire et réversible des jonctions inter-endothéliales**. L'ouverture et la fermeture des jonctions intercellulaires sont finement

régulées. Cette régulation est primordiale pour maintenir l'intégrité de l'endothélium et prévenir voire éviter l'exposition possible de la matrice sous-endothéliale. (*Rho et al., 2017*)

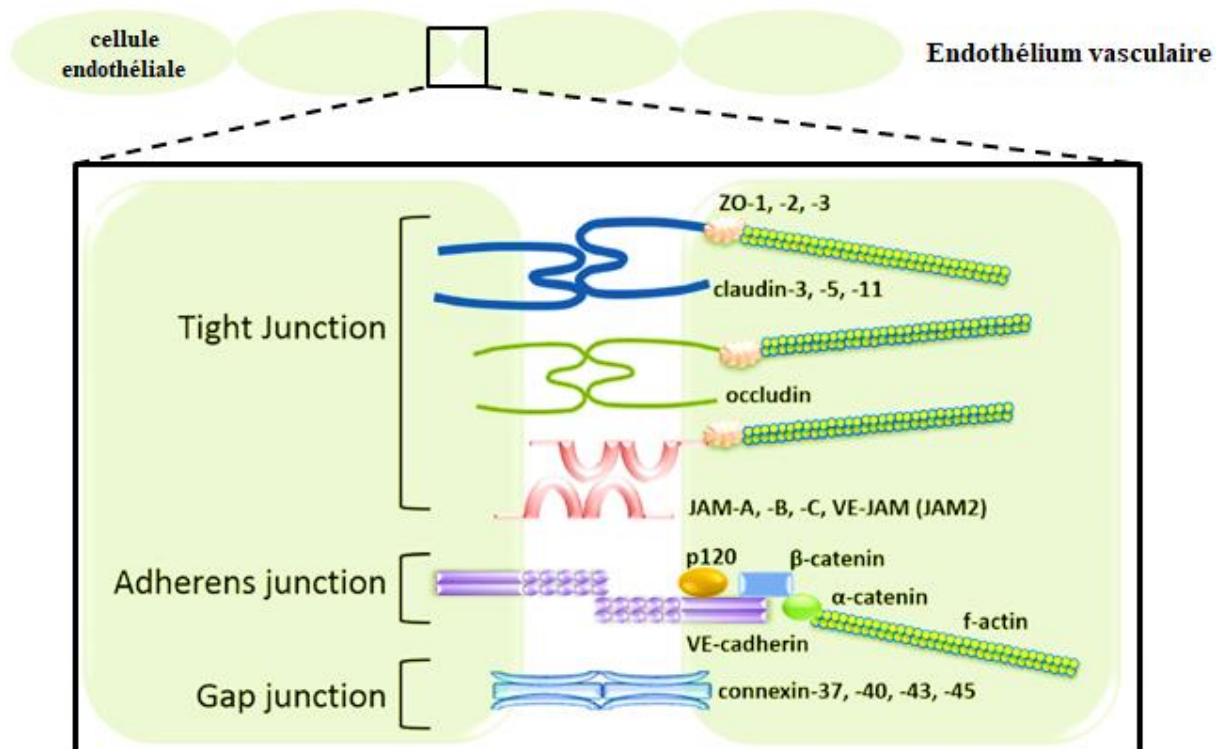
Dans des conditions normales, environ 30 % des jonctions inter-endothéliales dans les veinules post-capillaires, où la régulation de la perméabilité active se produit, sont ouvertes et perméables aux molécules d'environ 60Å. Après stimulation par des médiateurs pro-inflammatoires comme l'histamine, les jonctions cellulaires dans les veinules post-capillaires s'ouvrent sélectivement et permettent le passage de molécules plus grosses. (*Murakami and Simons, 2009*)

Tout dysfonctionnement peut avoir de graves conséquences sur la perméabilité endothéliale et par conséquent sur l'homéostasie du système vasculaire. L'hyperperméabilité endothéliale a été observée dans l'angiogenèse pathologique et dans l'inflammation chronique. (*Kumar et al., 2009*) La perte de perméabilité vasculaire pourrait bloquer la diffusion et la délivrance de xénobiotiques tels que les médicaments. (*Omicinski et al., 2011; Weis and Cheresh, 2005*)

## **II. Jonctions endothéliales**

Les jonctions endothéliales permettent l'intégrité de l'endothélium à travers deux systèmes d'adhérence, assurant ainsi la cohésion entre les cellules homotypiques adjacentes et entre cellules et MEC sous-jacente. De part ce rôle architectural, les composantes du complexe jonctionnel participent à diverses signalisations intracellulaires et régulent différents effets biologiques notamment la perméabilité vasculaire et la migration trans-endothéliale des leucocytes, cependant le mécanisme moléculaire n'est pas entièrement connu. (*Dejana et al., 2009*)

Il existe quatre types de jonctions principales : les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes, les jonctions serrées et les desmosomes (**Figure 4**). Contrairement aux cellules épithéliales, les cellules endothéliales ne sont pas dotées de jonctions desmosomales. Cependant, certains types de cellules endothéliales telles que celles de la veine ou celle du système lymphatique possèdent un autre type de jonctions appelé *Complexus adhearentes*, qui se rapproche d'un point de vue structural des desmosomes (*Moll et al., 2009; Schmelz and Franke, 1993; Valiron et al., 1996; Zhou et al., 2004*).



**Figure 4. Les principales jonctions inter-endothéliales.** Les cellules endothéliales vasculaires possèdent des jonctions serrées (*tight junction*), des jonctions adhérentes (*adhérens junction*) et des jonctions communicantes (*Gap junction*). Modifiée à partir de (Komarova et al., 2017)

### 1. Complexus adhearentes

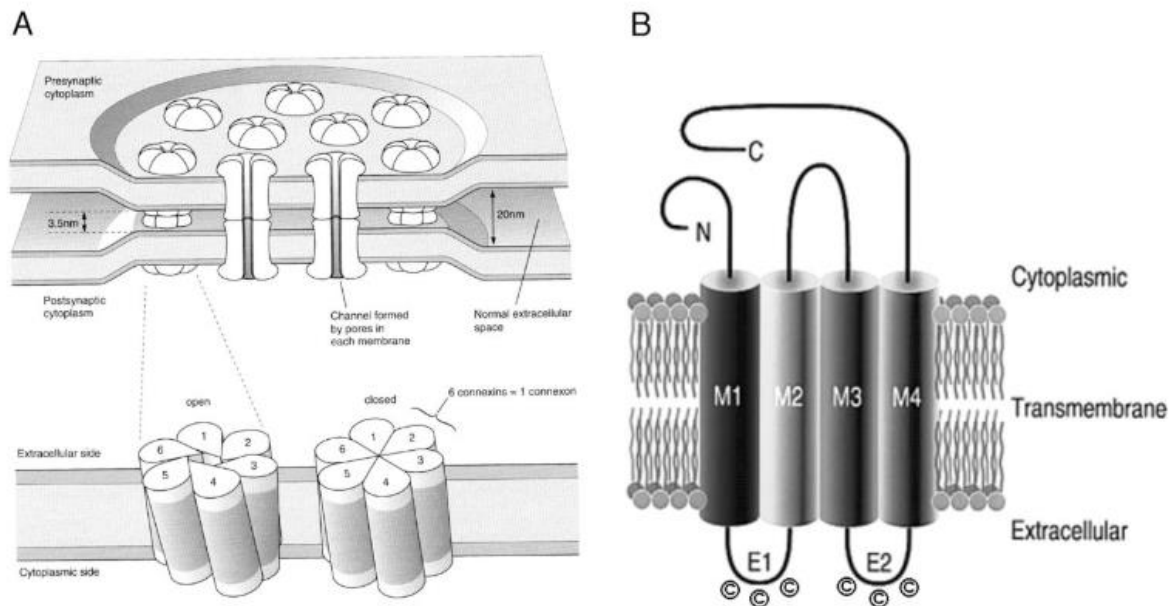
*Complexus adhaerentes* est une jonction de taille et de forme variables qui peut occuper des parties étendues de la surface cellulaire. Ce type de jonctions est intégré dans le ganglion lymphatique dans un système structurel plus large appelé *syndesmos*. Contrairement aux véritables desmosomes, les *complexus adhaerentes* sont non seulement dépourvus des cadhérines desmosomales connues telles que la desmoglérine et la desmocolline, mais également de la E- et de la M-cadhérine. Cependant, *Complexus adhaerentes* est riche en cadhérine-5 (VE-cadhérine) qui se colocalise avec la desmoplakine et la plakoglobine dans la majorité des sites inter-endothéliaux. (Schmelz and Franke, 1993; Valiron et al., 1996) La structure moléculaire de cette jonction s'est ensuite avérée plus complexe car plusieurs travaux affirment que *complexus adhaerentes* est un hybride de recombinaison de protéines provenant des autres jonctions. Elle comprend des protéines de jonctions adhérentes (VE-cadhérine,  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténine, protéine p120), les composants des jonctions desmosomales (desmoplakine et plakoglobine) et les protéines des jonctions serrées (claudin-5 et *Zonula Occludens-1*(ZO-1)).

(Baluk et al., 2007; Hämmerling et al., 2006; Pfeiffer et al., 2008). Il peut également se former des interdigitations adhérentes uniques ou multiples. (Hämmerling et al., 2006)

Ce type de jonction interagit de façon indirecte avec les filaments d'actine *via* la desmoplakine. (Calkins et al., 2003; Valiron et al., 1996) De par cette liaison, *Complexus adhaerentes* joue un rôle important dans la vasculogénèse, la perméabilité endothéliale et l'angiogénèse. (Gallicano et al., 2001; Zhou et al., 2004)

## **2. Jonctions communicantes**

Les jonctions communicantes sont constituées de canaux par centaines ou milliers qui s'oligomérisent en réseau dense formant ainsi une plaque de jonctions communicantes appelée plaque jonctionnelle (**Figure 5**). Chaque canal est le résultat d'association de deux hémicanaux, autrement appelés connexons, qui traversent la membrane plasmique des cellules adjacentes, reliant ainsi leurs cytoplasmes. Différents échanges entre le cytoplasme des cellules voisines peuvent avoir lieu à travers les jonctions communicantes par exemple l'échange d'ions inorganiques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , etc.) et le passage d'un certain nombre de petites molécules, comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP 3). (Bruzzone et al., 1996; Falk et al., 2014; Kumar and Gilula, 1996; Sanderson et al., 1994; Söhl and Willecke, 2004; Thévenin et al., 2017)



**Figure 5. Les jonctions communicantes des cellules endothéliales. (A)** La plaque jonctionnelle entre deux cellules endothéliales est constituée de plusieurs connexons dont la protéine majeure est la connexine. **(B)** Structure de la connexine, protéine composée de quatre domaines transmembranaires (M1, M2, M3, M4) dont les extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le cytoplasme des cellules. (Willecke et al., 2005)

L'unité structurelle principale des connexons est la connexine (Cx), caractérisée par deux boucles extracellulaires et ses extrémités amino (N) et carboxyl (C) terminales cytoplasmiques et de quatre domaines transmembranaires. Vingt connexines sont exprimées chez l'Homme et chez la souris. Les cellules endothéliales expriment principalement trois isoformes de connexines Cx37, Cx40 et Cx43. (Bruzzone et al., 1996; Sáez et al., 2003; Willecke et al., 2005) La Cx43 est la connexine la plus étudiée. Elle a un intérêt particulier en raison de son expression ubiquitaire dans la plupart des tissus et elle joue un rôle central dans le cœur et le système vasculaire. (Falk et al., 2014; Solan and Lampe, 2014; Thévenin et al., 2017; Willecke et al., 2005)

La localisation membranaire et la stabilité des connexines confèrent une stabilité aux jonctions communicantes. L'interaction des connexines avec les protéines associées au cytosquelette favorise leur stabilité. Cette interaction dépend de l'état de phosphorylation des connexines sur des résidus spécifiques. Il a été rapporté que la phosphorylation de la Cx43 par la tyrosine kinase Src sur le résidu tyrosine (Y) 247 inhibe l'interaction de la Cx43 avec la  $\beta$ -tubuline. L'inhibition

de cette interaction pourrait être un mécanisme impliqué dans le processus de désassemblage des jonctions communicantes. (*Sorgen et al., 2018*)

De plus, la Cx43 peut être phosphorylée par une variété de protéines kinases (Akt, PKA, PKC, ERK1/2) notamment sur les résidus sérine S373, S365, et S368, qui contrôlent l'assemblage des jonctions communicantes et les interactions avec différents partenaires tels que les ZO et les caténines. (*Falk et al., 2014, 2016; Solan and Lampe, 2014, 2016; Thévenin et al., 2017*)

L'extrémité C-terminale de la Cx43 interagit avec une variété de molécules de signalisation et de protéines structurales conduisant au concept de la jonction communicante comme un carrefour de signalisation. La Cx43 interagit avec une gamme de protéines : des jonctions serrées ZO-1 (*Thévenin et al., 2017*), des éléments du cytosquelette (microtubules,  $\alpha$ -actinine, tubuline) qui la lient au filament d'actine et des protéines des jonctions adhérentes. (*Sorgen et al., 2018*) Il a été montré que Cx43 interagit directement avec la  $\beta$ -caténine et que cette interaction serait inhibée par la phosphorylation par Src kinase des résidus Y265 et Y313 de la région C-terminale de Cx43. (*Spagnol et al., 2018*)

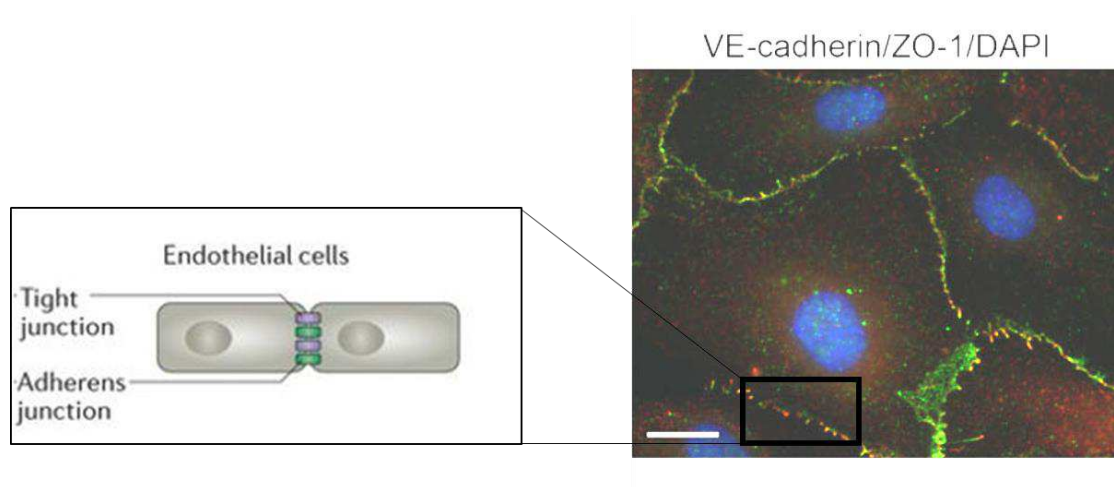
Le couplage médié par les jonctions de communication permet la formation d'un réseau de cellules interconnectées, coordonnées et synchrones. Ainsi, le couplage jonctionnel peut compenser une hétérogénéité fonctionnelle d'un groupe de cellules appartenant au même tissu, permettant ainsi le recrutement fonctionnel de cellules qui n'auraient pas été activées individuellement. (*Meda, 1996; Spagnol et al., 2018*)

En plus de son rôle de communication, ces jonctions sont impliquées dans l'adhérence cellulaire et dans la vasculogénèse. *Simon et McWhorter* ont démontré que les souris dont le gène Cx37 ou Cx40 a été invalidé, présentent une défaillance importante de leurs systèmes vasculaires et une mortalité élevée quelques jours seulement après leur naissance. (*Simon and McWhorter, 2002*) Par la suite, il a été montré que les souris doublement invalidées pour les gènes Cx37 et Cx40 présentent de graves malformations vasculaires ce qui a conduit à leur mort durant la gestation. (*Söhl and Willecke, 2004*) Une étude récente a montré que l'augmentation d'expression de la connexine Cx43 dans des cellules endothéliales du cerveau est associée à une hyperperméabilité endothéliale dépendante d'une expression réduite des jonctions serrées claudine-5 et ZO-1. (*Johnson et al., 2018*)

### 3. Jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des structures qui associent deux cellules adjacentes d'une façon très étroite entraînant une résistance électrique trans-endothéliale élevée et une faible perméabilité paracellulaire avec une sélectivité de taille et de charge. (Abbott et al., 2006; Zihni et al., 2016)

Les jonctions serrées endothéliales, contrairement à celle de l'épithélium, sont mal définies dû au fait qu'elles sont chevauchantes avec les jonctions adhérentes le long du contact inter-endothélial (**Figure 6**). Ce type de jonctions se compose d'un complexe hétérogène de familles protéiques. Les plus connues sont : l'occludine, la claudine, les molécules d'adhérences jonctionnelles (*Junctional Adhesion molecules* : JAMs).



**Figure 6. Disposition des jonctions serrées et adhérentes dans les cellules endothéliales.** Photographie d'une observation microscopique d'immunomarquage de jonctions endothéliales : VE-cadherine (marqueur de jonctions adhérentes en vert), ZO-1 (marqueur de jonctions serrées en rouge). Les jonctions inter-endothéliales serrées et adhérentes ne sont pas distinctes à cause du chevauchement entre les deux structures comme illustré dans le schéma à gauche. Modifiée à partir de (Harris and Nelson, 2010; Zihni et al., 2016)

#### 3.1. L'occludine

L'occludine possède deux boucles extracellulaires, quatre domaines transmembranaires et deux extrémités C- et N-terminales cytoplasmiques. Les boucles extracellulaires de l'occludine de deux cellules voisines se rejoignent directement et contrôlent la perméabilité endothéliale. L'extrémité C-terminale de l'occludine est liée aux filaments d'actine du cytosquelette *via* des protéines adaptatrices telle que les ZO notamment ZO-1, ZO-2 et ZO-3. (Furuse, 2010; Wallez and Huber, 2008). La phosphorylation de l'occludine affecte la structure des jonctions serrées et régule la perméabilité paracellulaire. La perturbation des jonctions serrées induite par le facteur de croissance *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) est due à la phosphorylation

de l'occludine sur le résidu sérine S490 favorisant son ubiquitinylation, augmentant ainsi la perméabilité vasculaire. (*Murakami et al., 2012*)

### **3.2. Les claudines**

La famille des claudines a la même structure que celle de l'occludine mais sans aucune similarité de séquences. Les parties extracellulaires des claudines de deux cellules adjacentes forment un polymère et régulent le passage des solutés à travers la barrière endothéliale. Grâce à un motif d'acide aminé Tyrosine-Valine (YV), l'extrémité cytoplasmique C-terminale interagit avec plusieurs protéines adaptatrices, comme ZO-1, ZO -2 et ZO-3 et *Multi-PDZ Protein 1* via leurs domaines *postsynaptic density-95/disc large protein and ZO-1* (PDZ) qui assure une interaction avec le cytosquelette. (*Lal-Nag and Morin, 2009; Morita et al., 1999*)

Environ 27 membres de la famille des claudines seraient présents chez l'Homme. Les claudines-1, -2, -3, -5, -12 et -15 ont été identifiées dans l'endothélium vasculaire de certains organes. (*Mineta Katsuhiko et al., 2011; Morita et al., 1999*)

La claudine-5 est la plus connue comme étant spécifique à l'endothélium. (*Mineta Katsuhiko et al., 2011; Morita et al., 1999*) *Nitta et al.* ont montré que les souris déficientes en claudine-5 (claudine-5<sup>-/-</sup>) ne présentent aucun défaut morphologique ou fonctionnel du système vasculaire embryonnaire et mettent en évidence par microscopie électronique que les jonctions serrées sont bien présentes. Cependant, ces souris présentent une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour les petites molécules, menant à la mort post-natale. Les jonctions serrées chez ces souris, sont constituées majoritairement de claudine-12 connue pour sa fonction de filtre de molécules d'un poids moléculaire supérieur à 800Da, expliquant l'augmentation de perméabilité aux petites molécules dans ce modèle expérimental. (*Nitta et al., 2003*)

D'autre part, il a été montré que claudine-5 inhibe la perméabilité endothéliale vasculaire en régulant la prolifération et la migration cellulaire. Ainsi, la surexpression de la claudine-5 dans les cellules endothéliales vasculaires du cerveau entraîne une diminution de la perméabilité paracellulaire accompagnée d'une diminution des taux de migration cellulaire et une augmentation de la prolifération cellulaire. (*Ma et al., 2017*)

### **3.3. Les molécules d'adhérence jonctionnelle**

Les molécules d'adhérence jonctionnelle (JAMs) appartiennent à la superfamille transmembranaire des immunoglobulines (IgSF). Elles sont constituées de deux domaines



extracellulaires, un domaine transmembranaire et une courte extrémité cytoplasmique. La famille des JAMs est actuellement composée de plusieurs membres dont JAM-A, -B, -C, JAM-4, *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) et de *coxsackie adenovirus receptor* (CAR) qui se localisent au niveau intercellulaire. Certaines d'entre elles comme JAM-A étant directement impliquées dans la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Furuse, 2010; Zhang and Lei, 2016*)

JAM-B (aussi appelée VE-JAM) a une distribution restreinte aux cellules endothéliales de différents vaisseaux, mais surtout dans les veinules endothéliales hautes (HEVs), qui sont des portes d'entrée dans les tissus lymphatiques pour les lymphocytes transportés par le sang. JAM-A et JAM-C ont une plus large distribution que JAM-B. Elles sont exprimées par un large nombre de cellules notamment les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales vasculaires, y compris les HEVs ainsi que les cellules endothéliales lymphatiques. Les JAMs essentiellement les JAM-A possèdent un motif de liaison au domaine PDZ, à travers lequel elles peuvent se lier à d'autres protéines de jonction serrées contenant un domaine PDZ, comme la protéine ZO-1, *Partitioning defective 3 homolog* (PAR-3) et Afadin 6 (AF-6). (*Bazzoni, 2003; Zhang and Lei, 2016*)

Les domaines extracellulaires de l'ensemble des JAMs forment des interactions homotypiques. Par contre, JAM-B avec JAM-C sont les seules qui peuvent former une interaction hétérotypique. Les JAMs interagissent également avec les intégrines. Par exemple JAM-A interagit avec l'intégrine  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ . Ce type d'interactions permet des associations de cellules hétérotypiques par exemple entre les cellules endothéliales et les leucocytes. De ce fait, les JAMs jouent un rôle important dans de la migration trans-endothéliale vers les sites inflammatoires. L'inflammation des tissus peut induire la redistribution des JAMs sur le côté luminal des cellules endothéliales, entraînant une augmentation de l'arrêt des leucocytes sur la couche endothéliale, suivie d'une migration trans-endothéliale accrue. (*Hintermann et al., 2016*)

Les molécules d'adhérence jonctionnelle classiques JAM-A, JAM-B et JAM-C régulent la perméabilité vasculaire, la polarité cellulaire ainsi que le recrutement et la migration trans-endothéliale des leucocytes dans les tissus inflammatoires. Par exemple, les souris dont le gène codant pour JAM-A a été invalidé, présentent non seulement une forte perméabilité intestinale mais également une augmentation de l'inflammation. (*Severson and Parkos, 2009*)

De plus, ces 3 protéines transmembranaires (occludines, claudines, JAMs) s'associent avec des protéines cytosoliques telle que la famille *Membrane-Associated GUanylate Kinase* (MAGUK) dont ZO-1 est le membre le plus connu. ZO-1 peut interagir directement avec l'actine comme elle peut interagir avec des protéines liant l'actine comme l' $\alpha$ -caténine,  $\alpha$ -actinine ou la vinculine. Dans les vaisseaux de faible diamètre, ZO-1 est présente dans les jonctions serrées et dans les jonctions adhérentes. (*Furuse, 2010*)

Les jonctions serrées sont stabilisées par les jonctions adhérentes. Il est même admis qu'il existe une interconnexion entre les deux types de jonctions. L'organisation des jonctions serrées a été altérée après un blocage des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales. (*Dejana, 2004; Dejana et al., 2008*) De plus, l'expression de la VE-cadhérine et son regroupement aux niveaux des jonctions sont un prérequis pour l'expression de la claudine-5. Ainsi, il a été montré que le taux d'expression de la claudine-5 est très élevé dans une lignée de cellules endothéliales surexprimant la VE-cadhérine par rapport au contrôle. Ces résultats ont été confirmés dans des cellules endothéliales dont le gène de la VE-cadhérine a été invalidé. (*Taddei et al., 2008*)

#### **4. Jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes forment des liens physiques entre deux cellules adjacentes pour assurer la cohésion de la barrière et l'intégrité de sa fonction. Les jonctions adhérentes sont constituées selon nos connaissances actuelles d'un complexe multiprotéique incluant essentiellement les cadhérines et les caténines.

Les cellules endothéliales expriment trois cadhérines majeures, la *Vascular Endothelial Cadherin* (VE-cadhérine), la VE-cadhérine-2 (protocadhérine 12), la N- (Neural) et T-cadhérine (cadhérine 13) mais seule la première participe systématiquement à l'organisation des jonctions adhérentes. Comme les autres cadhérines connues, le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine favorise une adhérence homotypique, dépendante du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Le domaine intracellulaire de la VE-cadhérine interagit avec trois protéines cytoplasmiques appelées caténines :  $\beta$ -caténine, p120 caténine et plakoglobine. La  $\beta$ -caténine et la plakoglobine à leur tour lient l' $\alpha$ -caténine. L'association des jonctions adhérentes à l'actine est nécessaire pour l'assemblage et le maintien de la jonction. (*Dejana et al., 2009; Komarova et al., 2017; Telo' et al., 1998; Wallez and Huber, 2008*)

## B. La VE-cadhéine : stabilité des jonctions et contrôle de la perméabilité de la barrière endothéliale

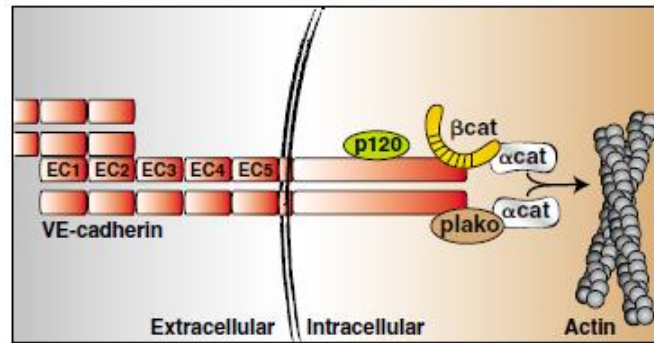
### I. Structure

La VE-cadhéine est une glycoprotéine transmembranaire de 125 kDa. Elle fait partie de la famille des cadhérines classiques de type II. Sa partie extracellulaire (ectodomaine) est constituée de 5 domaines extracellulaires EC (EC1-5) avec le domaine EC-5 proche de la membrane plasmique. La VE-cadhéine s'engage dans des liaisons homotypiques dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . La saturation des sites de fixation de ce dernier assure la rigidité de l'ectodomaine. (*Dejana and Vestweber, 2013*)

La VE-cadhéine s'auto-associe et forme une unité d'adhérence. Il a été suggéré pendant plusieurs années et par plusieurs équipes que les molécules de VE-cadhéine de deux cellules adjacentes interagissent entre elles pour former une structure hexamérique antiparallèle et hélicoïdale. (*Al-Kurdi et al., 2004; Hewat et al., 2007; Legrand et al., 2001*) La structure précise de l'hexamère constitué de dimères ou de trimères est encore l'objet de débats et d'études structurales. (*Brasch et al., 2011*)

En plus de son domaine extracellulaire, la VE-cadhéine possède un domaine transmembranaire et un autre cytosolique qui contient des séquences *Catenin Binding Domain* (CBD) permettant ainsi son interaction avec p120-caténine,  $\beta$ -caténine et plakoglobine. Ces deux dernières se lient à l' $\alpha$ -caténine qui à son tour interagit d'une façon directe ou indirecte aux filaments d'actine du cytosquelette (**Figure 7**). (*Dejana and Vestweber, 2013; Rho et al., 2017*)

La dissociation de la VE-cadhéine de ses partenaires rend la barrière endothéliale vulnérable, celle-ci perdant son intégrité et sa fonction de barrière. Ainsi, les cellules endothéliales des souris transgéniques exprimant un mutant de VE-cadhéine dépourvu de son domaine intracellulaire sont incapables de former une barrière endothéliale intègre et jointive. (*Carmeliet et al., 1999*)



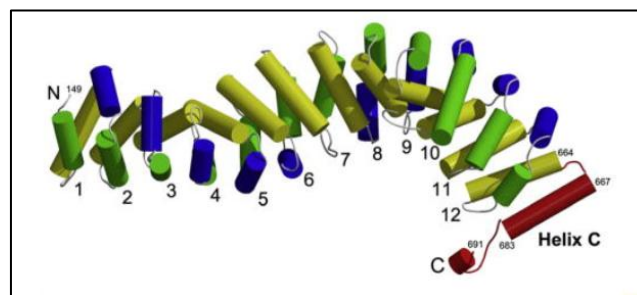
**Figure 7. Le complexe d'adhérence de la VE-cadhérine.** La VE-cadhérine se lie avec la  $\beta$ -caténine ( $\beta$ -cat), la plakoglobine (plako) et la p120-caténine (p120). L' $\alpha$ -caténine se lie indirectement à la VE-cadhérine *via* son interaction avec plako et  $\beta$ -cat. Elle interagit également avec l'actine et renforce les jonctions adhérentes. (Dejana *et al.*, 2008)

## II. Partenaires et interactions de la VE-cadhérine

### 1. $\beta$ -caténine

#### 1.1. Structure de la $\beta$ -caténine

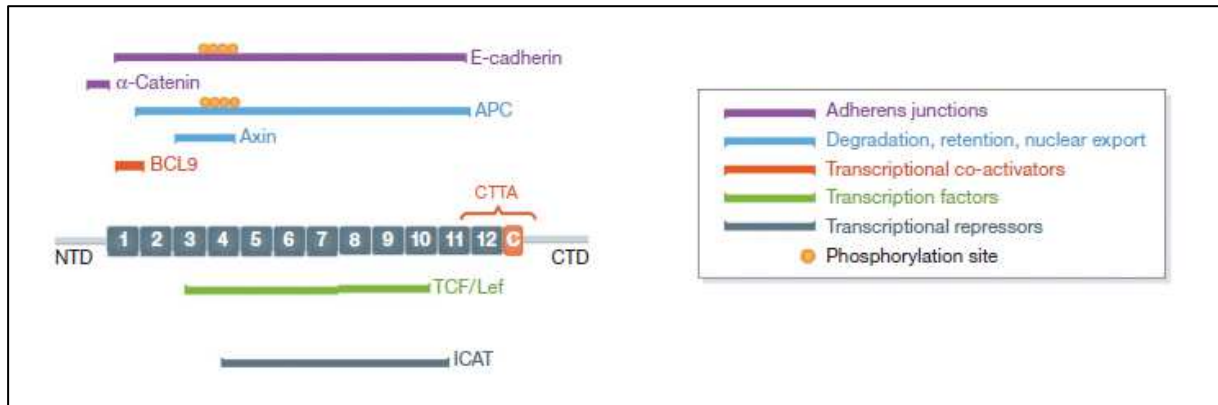
La  $\beta$ -caténine est une protéine de 781 AA chez l'Homme, présente au niveau des jonctions adhérentes. Elle est dotée de deux régions N- et C-terminales flexibles et d'une région centrale (AA 141-664) constituée d'une répétition de 12 motifs *Armadillo* (environ 42 résidus par motif) suivie d'une hélice spécifique conservée (hélice-C). Chaque motif est constitué de trois hélices disposées sous forme triangulaire. L'ensemble de ces petites hélices confère à la  $\beta$ -caténine une structure de super-hélice (**Figure 8**). (Valenta *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2008)



**Figure 8. Représentation schématique de la structure de la  $\beta$ -caténine.** La  $\beta$ -caténine possède deux régions N- (verte) et C-terminales (rouge) flexibles et d'une région centrale constituée d'une répétition de 12 motifs *Armadillo* suivie d'une hélice spécifique conservée (hélice-C, rouge). Chaque motif est constitué de trois hélices (jaune, vert et bleu) disposées sous forme triangulaire. L'ensemble de ces petites hélices confère une structure de super-hélice à la  $\beta$ -caténine. (Xing *et al.*, 2008)

## 1.2. Régulation des interactions de la $\beta$ -caténine avec ses partenaires

La  $\beta$ -caténine interagit non seulement avec la VE-cadhérine et l' $\alpha$ -caténine mais aussi avec des coactivateurs transcriptionnels tel que BCL9 et la protéine de liaison à TATA Box (TBP); des facteurs de transcription telle que *T-cell factor/lymphoid enhancer factor* (TCF/Lef) et des inhibiteurs de facteurs de transcription comme *inhibitor of  $\beta$ -catenin and T cell factor* (ICAT) ainsi que les protéines du complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine : *Adenomatous Polyposis Coli* (APC) et axine (**Figure 9**). (Valenta et al., 2012)



**Figure 9. Représentation schématique de la structure de la  $\beta$ -caténine et quelques exemples de ses interactions.** La  $\beta$ -caténine interagit avec les protéines de jonctions adhérentes (cadhérine et  $\alpha$ -caténine), des co-activateurs de transcriptions (BCL9), des facteurs de transcriptions (TCF/Lef) et des inhibiteurs de facteurs de transcriptions (ICAT) et avec les protéines du complexe de dégradation (APC et Axine). Modifiée à partir de (Valenta et al., 2012) NTD : domaine N-terminal, CTD : domaine C terminal de la  $\beta$ -caténine, TCF/Lef : *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*, ICAT : *inhibitor of  $\beta$ -catenin and T cell factor*, APC : *Adenomatous Polyposis Coli*.

En conditions physiologiques, la  $\beta$ -caténine joue un rôle important dans le maintien et la stabilité des jonctions adhérentes en liant la VE-cadhérine aux filaments d'actine du cytosquelette, assurant ainsi une fonction de barrière. Il a été montré *in vitro* que le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine humaine recombinante (rVE-cad-CPD) a un effet inhibiteur compétitif de l'interaction entre la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine endogènes dans un modèle de cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Dans la même étude, la transfection de rVE-cad-CPD *ex vivo* dans des veinules coronaires porcines saines, a induit une hyperperméabilité microvasculaire. (Guo et al., 2004)

Sous l'effet des médiateurs inflammatoires favorisant la perméabilité endothéliale, l'interaction de la VE-cadhérine avec la  $\beta$ -caténine peut être perturbée d'une façon réversible et transitoire. L'histamine, par exemple, modifie transitoirement l'interaction entre la VE-cadhérine et la  $\beta$ -

caténine dans un modèle de cellules HUVEC et par conséquent augmente leur perméabilité endothéliale. La  $\beta$ -caténine utilise les mêmes résidus d'acides aminés pour interagir avec la VE-cadhérine et ICAT. De ce fait, ICAT est considéré comme un inhibiteur compétitif de la liaison de la VE-cadhérine à la  $\beta$ -caténine. Ainsi, la transfection de la protéine de fusion FLAG-ICAT dans les cellules endothéliales *in vitro* induit non seulement une diminution de l'interaction entre la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine d'une façon dose-dépendante mais permet également de prolonger la durée d'hyperperméabilité induite par l'histamine. (Guo et al., 2008)

La  $\beta$ -caténine peut également se lier à l' $\alpha$ -caténine avec des parties distales de son extrémité N-terminale et son premier motif *Armadillo* à proximité. (Xing et al., 2008)

L'interaction de la  $\beta$ -caténine avec ses partenaires peut être régulée par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation de ses résidus Sérine/Thréonine ou Tyrosine (**Figure 10**). En ce qui concerne la régulation de l'interaction de la  $\beta$ -caténine avec la VE-cadhérine et l' $\alpha$ -caténine, deux tyrosines sont connues : Y654 et Y142 respectivement. (Valenta et al., 2012)



**Figure 10. Protéines kinases et leurs résidus cibles de la  $\beta$ -caténine.** Les résidus cible de GSK3 $\beta$  (S33, S37 ou T41), de CK1 $\alpha$  (S45), de Src (Y333), de Akt (S552) ou de PKA (S675) favorisent la dégradation de la  $\beta$ -caténine. La phosphorylation du résidu Y654 (violet) diminue l'affinité avec la VE-cadhérine. (Valenta et al., 2012) S : résidu sérine ; Y : résidu tyrosine ; CK1 $\alpha$  : Caséine Kinase1 $\alpha$  ; GSK : Glycogen Synthase Kinase ; PKA : Proteine Kinase A ; Akt : Proteine Kinase B.

La  $\beta$ -caténine non phosphorylée sur le résidu Y654 présente une extrémité C-terminale repliée essentiellement sur l'hélice-C l'empêchant ainsi d'interagir avec les coactivateurs transcriptionnels de cette zone. (Xing et al., 2008) Suite à la phosphorylation du résidu Y654, la  $\beta$ -caténine peut changer de conformation en adoptant une structure ouverte (sans le repliement) qui bloque ses interactions. Cette phosphorylation stabilise la nouvelle conformation de la  $\beta$ -caténine en favorisant une deuxième phosphorylation médiée par la protéine kinase A (PKA) sur la S675 au niveau de l'hélice-C (**Figure 10**). (Valenta et al., 2012)

Des expériences *in vitro* dans des modèles de cellules épithéliales et cancéreuses ont montré que l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et les cadhérines était régulée par la phosphorylation de la Y654- $\beta$ -caténine. (Piedra et al., 2001; Roura et al., 1999; Tominaga et al., 2008)

D'autre part, *in vivo*, un modèle phosphomimétique (phosphorylation constitutive) chez la souris Y654E- $\beta$ -caténine. Ce modèle largement utilisé pour comprendre l'importance de la phosphorylation du résidu Y654 de la  $\beta$ -caténine a permis de mettre en évidence : une diminution d'interaction entre la  $\beta$ -caténine et les cadhérines, une augmentation de l'activité de la voie Wnt et une augmentation de la phosphorylation de la S675 dépendante de la PKA. (van Veelen et al., 2011)

De plus, les fibroblastes embryonnaires issus de souris Y654E- $\beta$ -caténine présentent des interactions entre la  $\beta$ -caténine et les cadhérines nettement altérées par rapport aux cellules issues de souris sauvages. Bien que l'interaction réduite entre la Y654E- $\beta$ -caténine et les cadhérines suggère un défaut d'adhérence cellulaire, la formation de structures épithéliales dans les embryons Y654E- $\beta$ -caténine n'a pas été altérée. (van Veelen et al., 2011) Ceci suggère qu'il existe *in vivo* un mécanisme de compensation, ou que la phosphorylation de Y654 seule n'est pas suffisante pour détruire complètement les jonctions de cadhérines exprimées par les cellules épithéliales. L'effet exercé par cette phosphorylation de Y654- $\beta$ -caténine sur les jonctions entre cellules endothéliales n'est pas encore connu.

La phosphorylation du résidu Y654- $\beta$ -caténine est effectuée par des récepteurs tyrosine kinases tels que le récepteur pour le facteur *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ou par la c-src kinase ; d'autres tyrosines kinases sont également impliquées, telle que la protéine de fusion BCR-ABL dans des cellules de leucémie myéloïde chronique. (Coluccia et al., 2007; Valenta et al., 2012)

La déphosphorylation du résidu Y654- $\beta$ -caténine est effectuée par la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) qui se lie directement au domaine cytoplasmique de la cadhérine. (Xu et al., 2004)

Cependant, la surexpression de K-Ras qui phosphoryle à la fois les résidus Y654 et Y142 de la  $\beta$ -caténine, inhibe l'interaction de cette dernière avec l'E-cadhérine et l' $\alpha$ -caténine dans les cellules épithéliales intestinales IEC-18. (Piedra et al., 2003) Dans la même étude, il a été montré que la surexpression de la protéine de fusion GST- $\beta$ -caténine (GST pour glutathione S-

transférase) est phosphorylée *in vitro* sur le résidu Y142 par les tyrosines kinases Fyn et Fer en favorisant ainsi la dissociation de la  $\beta$ -caténine avec l' $\alpha$ -caténine. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un mutant Y142F  $\beta$ -caténine non phosphorylable. (Piedra et al., 2003)

Dans un modèle d'étude de la perméabilité induite par le VEGF (capable d'induire la phosphorylation du résidu Y654) chez la souris, il a été rapporté que la protéine *Focal-Adhesion Kinase* (FAK) dépendante du VEGF phosphoryle la  $\beta$ -caténine sur le résidu Y142. Cette phosphorylation de Y142 induite par FAK ainsi que la phosphorylation de Y654 induite par le VEGF favorisent la dissociation entre la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine. Par contre, les mutants Y142F ou Y654F- $\beta$ -caténine (non phosphorylables) empêchent cette dissociation induite par le VEGF. (Chen et al., 2012)

### 1.3. La $\beta$ -caténine : rôle de structure et de signalisation Wnt

Le complexe cadhérine-caténine est doté d'interactions dynamiques. Ainsi, l'adhérence cellulaire au niveau des jonctions adhérentes peut favoriser la libération de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme et donc favoriser son activité de signalisation.

La  $\beta$ -caténine, en plus de jouer un rôle d'adhésif cellulaire, est un effecteur nucléaire clé de la voie de **signalisation Wnt (Figure 11)**. Wnt est une protéine extracellulaire qui en interagissant avec ses récepteurs de la famille Frizzled (Fzd) et les co-récepteurs *Low-Protein Lipoprotein Receptor-Protein* (LRP) induit des signalisations intracellulaires impliquées dans différents processus, notamment dans l'embryogenèse, la morphogenèse et la prolifération tumorale. (Yang, 2012)

L'interaction entre les différentes isoformes de Wnt et leurs récepteurs, par exemple l'interaction entre Wnt1 aux récepteurs Fzd et les co-récepteurs LRP5/6 déclenche une **signalisation canonique médiée par la  $\beta$ -caténine**. L'interaction du ligand aux récepteurs induit le recrutement de la protéine cytoplasmique Disheveled (Dvl) au niveau de la membrane plasmique favorisant son oligomérisation ainsi que son activation. Par le biais de Dvl, Wnt inhibe la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le complexe de destruction (**Figure 11**). Par conséquent, le taux de la  $\beta$ -caténine cytosolique devient important. Elle est transloquée par la suite dans le noyau. (Valenta et al., 2012)

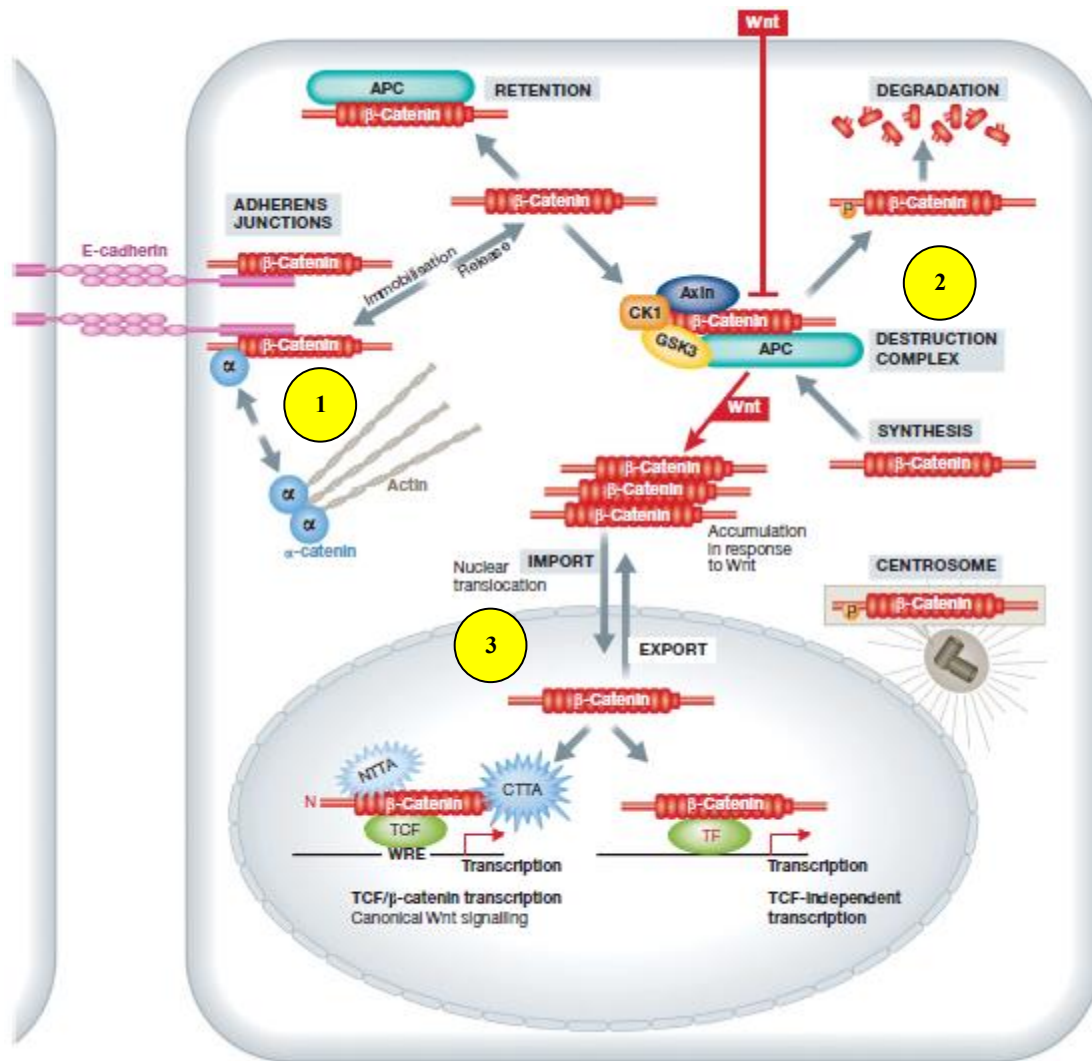


La  $\beta$ -caténine nucléaire interagit avec le complexe TCF/Lef et le dissocie du complexe de séquestration *Groucho* et du-*transducin-like Enhancer* (TLE). L'ensemble de ces événements permet la transcription des gènes cibles tel que cyclin D1 et c-myc impliqués dans la prolifération cellulaire. (Valenta et al., 2012; Zhang and Lei, 2016)

En absence du ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine cytosolique est prise en charge par le complexe de destruction, qui contient les protéines adaptatrices axine et APC en plus des kinases *Glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK3 $\beta$ ) et Caséine Kinase1 (CK1). La  $\beta$ -caténine est phosphorylée par GSK3 $\beta$  sur ses résidus S33 et S37 ce qui permet le recrutement de  $\beta$ -TrCP qui entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Dans ce cas, La transcription des gènes cibles de Wnt est réprimée par la séquestration de TCF/Lef dans un complexe avec la protéine répressive TLE/*Groucho*. (Valenta et al., 2012; Zhang and Lei, 2016)

Par conséquent, du fait de son expression ubiquitaire, une régulation altérée de la  $\beta$ -caténine est associée à de nombreuses pathologies comme le cancer de l'intestin, la fibrose pulmonaire idiopathique ou la polyarthrite rhumatoïde. (Miao et al., 2013)

Ainsi, il a été montré que les souris hétérozygotes  $\beta$ -caténine <sup>Y654/Y654E</sup> expriment de manière constitutive la Y654 sous sa forme phosphorylée, qui conduit à une signalisation Wnt constitutive, développent des adénomes intestinaux et présentent une augmentation du nombre de tumeurs intestinales. Ces effets seraient liés au complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine défectueux en raison de la perte de l'APC. (van Veelen et al., 2011)



**Figure 11. Les deux rôles majeurs de la  $\beta$ -caténine dans le maintien des jonctions adhérentes et dans la signalisation Wnt.** (1) La  $\beta$ -caténine joue un rôle dans la stabilité des jonctions adhérentes en connectant la cadhérine à l' $\alpha$ -caténine et à l'actine du cytosquelette. Quand la  $\beta$ -caténine est cytosolique, (2) elle est soit dégradée par le complexe de destruction (en absence de Wnt) soit (3) elle est transloquée dans le noyau (signalisation Wnt active). Sa translocation nucléaire lui permet d'activer la transcription des gènes cibles de Wnt. (Valenta et al., 2012)  $\alpha$  :  $\alpha$ -caténine, APC : *Adenomatous Polyposis Coli*, CK1 : Caséine Kinase1, GSK3 : Glycogen synthase kinase 3, TF : facteur de transcription, TCF : T-cell factor enhancer factor, CTTA : *C-Terminal Transcriptional Activators*, NTA : *N-Terminal Transcriptional Activators*. WRE : *Wnt reponse Element*.

## 2. $\alpha$ -caténine

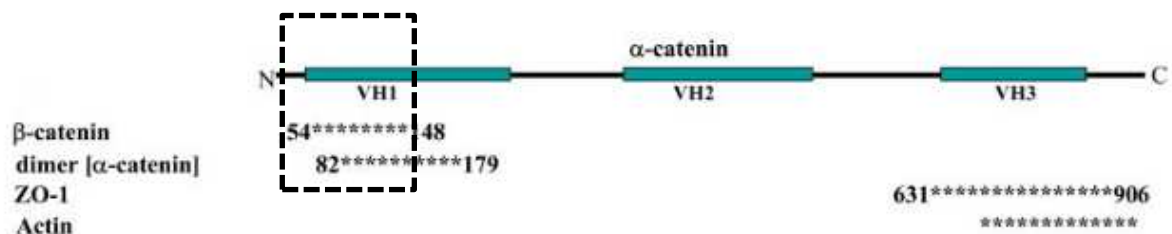
### 2.1. Structure et caractérisation des interactions de l' $\alpha$ caténine

L' $\alpha$  caténine a une structure différente des autres caténines et elle participe aussi aux jonctions adhérentes. Elle est constituée de trois *Vinculin Homology Domain* (VH) et forme de multiples

faisceaux d'hélices comprenant principalement quatre hélices- $\alpha$  comme dans la structure des domaines de la vinculine. (Hartsock and Nelson, 2008)

L' $\alpha$ -caténine interagit avec la  $\beta$ -caténine par son domaine N-terminal (**Figure 12**). Grâce à son domaine central, elle interagit avec les protéines liant l'actine (*actin binding protein*) telle que la vinculine. À l'aide de son domaine C-terminal, l' $\alpha$ -caténine se lie aux filaments d'actine du cytosquelette. (Takeichi, 2018)

Jusqu'en 2005, l' $\alpha$ -caténine était considérée comme une protéine intermédiaire connectant la  $\beta$ -caténine l'actine du cytosquelette permettant ainsi la stabilisation du complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine *via* un ancrage aux filaments d'actine. Cependant, cette conclusion a été remise en question après la découverte que l' $\alpha$ -caténine ne peut interagir simultanément avec la  $\beta$ -caténine et les filaments d'actine dans un modèle de liaison *in vitro*. En effet, l' $\alpha$ -caténine sous sa forme homodimérique se lie aux filaments d'actine et induit leur polymérisation. En revanche, elle ne peut interagir avec la  $\beta$ -caténine que sous sa forme monomérique en raison de chevauchement entre la séquence d'interaction et celle d'homodimérisation entre les résidus 57-143 sur l' $\alpha$ -caténine (**Figure 12**). (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005)



**Figure 12. Représentation schématique de l' $\alpha$  caténine et de ses interactions protéiques.** L' $\alpha$ -caténine interagit avec la  $\beta$ -caténine *via* une séquence entre les AA 54 à 148 ; avec la ZO-1 *via* une séquence entre les AA 631 à 906, avec l'actine *via* le domaine *Vinculin Homology Domain 3* (VH3). La zone encadrée représente la séquence de dimérisation de l' $\alpha$ -caténine, qui est chevauchante avec la séquence d'interaction avec la  $\beta$ -caténine. (Hartsock and Nelson, 2008)

Pour expliquer la possibilité d'interaction de l' $\alpha$ -caténine à la fois avec la  $\beta$ -caténine et avec les filaments d'actine, il a été suggéré que le regroupement des cadhérines au niveau des jonctions adhérentes engendre une augmentation locale des taux de l' $\alpha$ -caténine membranaire et favorise son homodimérisation dans le cytosol. Ce modèle prédit que l'interaction de l' $\alpha$ -caténine avec

le complexe cadhérine/ $\beta$ -caténine est dynamique ce qui permet à l' $\alpha$ -caténine monomérique de se dissocier du complexe jonctionnel afin de s'homodimériser dans le cytoplasme. (Drees et al., 2005; Hartsock and Nelson, 2008)

La dissociation entre l' $\alpha$ -caténine et la VE-cadhérine est nécessaire pour la perméabilité vasculaire et le recrutement leucocytaire. Une étude *in vivo* a été menée sur des souris génétiquement modifiées qui expriment la protéine de fusion VE-cadhérine- $\alpha$ -caténine. Ces souris transgéniques présentent des jonctions inter-endothéliales fortement stabilisées, provoquant une résistance de ces souris à l'induction de la perméabilité endothéliale par le VEGF ou l'histamine ainsi qu'au recrutement des lymphocytes et des neutrophiles aux sites inflammatoires. (Schulte et al., 2011)

L' $\alpha$ -caténine possède des sites de phosphorylation tels que les résidus S655, S652 et S641. Il a été montré que l' $\alpha$ -caténine est phosphorylée sur la S641 par la caséine kinase 2 (CK2), ce qui semble favoriser d'autres phosphorylations séquentielles par CK1 sur les résidus S652, S655 et T658. La surexpression des mutants phosphomimétiques ou non phosphorylables de ces résidus *in vivo* chez la drosophile et *in vitro* dans les cellules épithéliales *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) suggère que la phosphorylation de la S641 de l' $\alpha$ -caténine favorise la fonction adhésive de cette dernière avec la cadhérine. (Escobar et al., 2015)

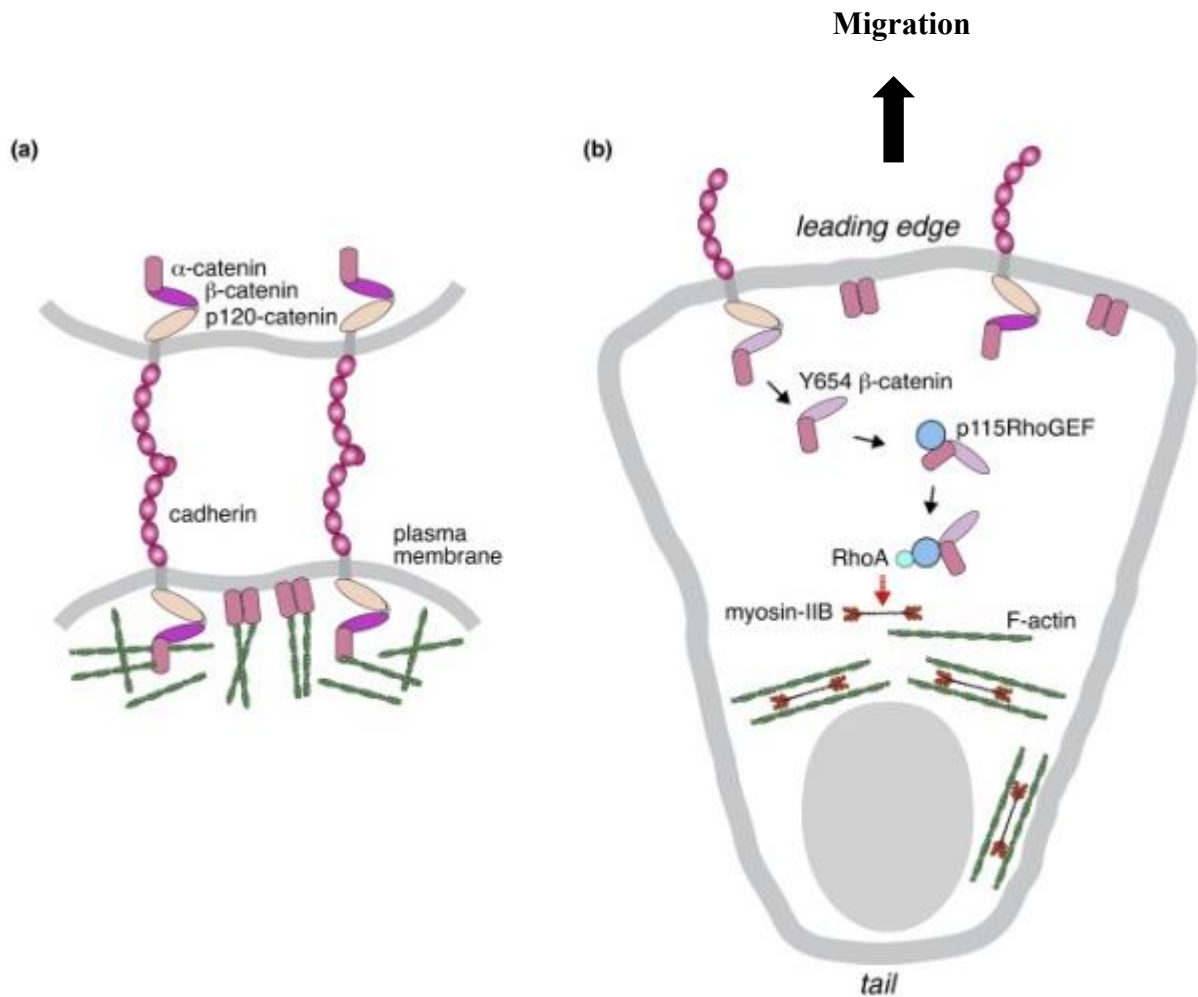
Des études de « *knock-out* » ciblées montrent que l' $\alpha$ -caténine joue un rôle indispensable dans l'adhérence cellulaire et la morphogenèse des tissus. Il a été montré *in vivo* que la drosophile déficiente en  $\alpha$ -caténine présente un dysfonctionnement de l'embryogenèse et de l'ovogenèse. Ces défauts ont été associés à une perte de fonction de la cadhérine. (Sarpal et al., 2012)

## 2.2. Rôle non jonctionnel de l' $\alpha$ -caténine

**L' $\alpha$ -caténine non jonctionnelle** peut jouer différents rôles. Cette caténine peut être un effecteur nucléaire inhibiteur de la  $\beta$ -caténine. Il a été rapporté que l' $\alpha$ -caténine est colocalisée avec la  $\beta$ -caténine dans le noyau. L'inhibition de la  $\beta$ -caténine avec un ARN interférent a favorisé la redistribution de l' $\alpha$ -caténine dans le cytoplasme. Ceci démontre que la localisation de l' $\alpha$ -caténine dépend de la  $\beta$ -caténine. De plus, l' $\alpha$ -caténine inhibe la transcription de certains gènes sous l'influence de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Ainsi, les fibroblastes de peau humaine déficients en  $\alpha$ -caténine et activés avec Wnt3a montrent une expression accrue de gènes cibles de Wnt, tels que AXIN2, NKD1 et LEF1. (Daugherty et al., 2014)

Récemment, il a été montré que l' $\alpha$ -caténine sous sa forme homodimérique ne participant pas à la formation des jonctions, est recrutée à la membrane plasmique à l'avant des cellules migrantes d'une manière dépendante de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). La transfection stable de cellules de carcinome épidermoïde A431D (caractérisée par l'absence d'expression de cadhérines et de caténines) avec un plasmide codant pour la protéine de fusion GFP- $\alpha$ -caténine a révélé une localisation membranaire de cette  $\alpha$ -caténine exogène. Dans la même étude, il a été montré par résonance plasmonique de surface que l'homodimère de l' $\alpha$ -caténine fixe sélectivement les vésicules lipidiques contenant du phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) avec une forte affinité. La fixation du PIP3 requiert les résidus basiques, lysine (K) 488, K493 et arginine (R) 496. Ainsi, le mutant KRR- $\alpha$ -caténine entraîne une diminution du recrutement membranaire, une adhérence inter-cellulaire faible et une migration cellulaire altérée. (Wood et al., 2017)

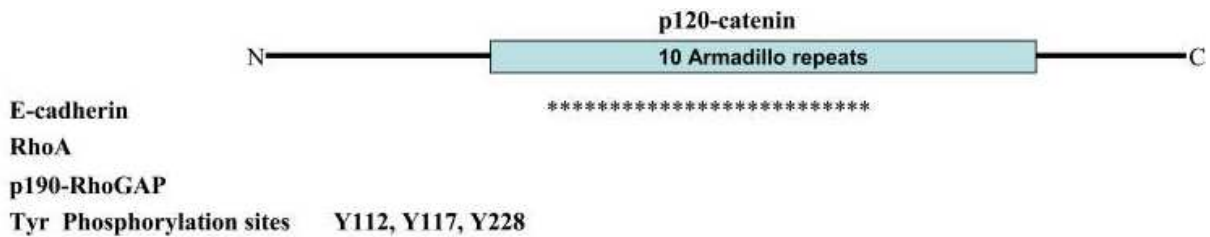
Les cellules en cours de migration établissent un axe de polarité avant-arrière. L' $\alpha$ -caténine extra-jonctionnelle homodimérique est ancrée à la membrane plasmique en se liant au PIP3 (au niveau du point d'attaque) à l'avant des cellules en cours de mouvement (**Figure 13**). Suite à la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur le résidu Y654, le complexe pY654- $\beta$ -caténine/ $\alpha$ -caténine jonctionnelle est transloqué vers le cytosol, où l' $\alpha$ -caténine se lie à p115RhoGEF et active la myosine-IIIB au niveau péri-nucléaire sous l'action de RhoA. Cette voie de signalisation induite par le complexe  $\alpha$ -caténine- $\beta$ -caténine non-jonctionnelle permet de stabiliser la polarité avant-arrière de la cellule durant sa migration (**Figure 13**). (Takeichi, 2018; Vassilev et al., 2017)



**Figure 13. Exemples de fonctions de l' $\alpha$ -caténine jonctionnelle et extra-jonctionnelle.** (a) L' $\alpha$ -caténine jonctionnelle monomérique est importante pour la cohésion cellulaire en liant le complexe jonctionnel VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/p120 au cytosquelette d'actine. (b) L' $\alpha$ -caténine extra-jonctionnelle homodimérique est ancrée à la membrane plasmique en se liant au PIP3 (non illustré) à l'avant des cellules (*leading edge*) en cours de migration. Suite à la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur le résidu Y654, le complexe pY654- $\beta$ -caténine/ $\alpha$ -caténine se dissocie des jonctions et migre vers le cytosol, où l' $\alpha$ -caténine se lie à p115RhoGEF, puis active à son tour la myosine-II ce qui permet de stabiliser la polarité avant/arrière de la cellule. (Takeichi, 2018)

### 3. p120-caténine (p120)

La p120-caténine (p120) est une protéine cytosolique présente au niveau des jonctions adhérentes. La p120, la  $\beta$ -caténine et la plakoglobine appartiennent à la même famille. La p120 possède 10 motifs répétés *Armadillo*, une région N- et C-terminales (**Figure 14**). Contrairement aux autres caténines, la région C-terminale de la p120 ne possède pas de motif de liaison au domaine PDZ (Hartsock and Nelson, 2008)



**Figure 14. Représentation schématique de la structure de p120 et ses principales interactions.** La p120 interagit principalement avec les cadhérines et la RhoA GTPase. (Hartsock and Nelson, 2008)

La p120 interagit avec la VE-cadhérine au niveau d'une séquence octapeptidique hautement conservée (YDEEGGGE) dans le domaine juxta-membranaire (JMD). Cette association a pour but de stabiliser les cadhérines au niveau membranaire notamment lors de la formation des jonctions adhérentes. Ainsi, la surexpression des mutants de la VE-cadhérine dépourvus de la séquence octapeptidique du domaine JMD altère la fonction adhésive de la VE-cadhérine. (Ferber et al., 2002; Hartsock and Nelson, 2008) L'interaction entre la p120 et la VE-cadhérine dépend de la phosphorylation du résidu S879 de la p120 par la PKC $\alpha$  en réponse à la thrombine ou au lipopolysaccharide (LPS). L'affinité de liaison entre la p120 et la VE-cadhérine favorise ainsi la désorganisation des jonctions adhérentes des cellules endothéliales. (St Amant et al., 2012)

La p120 joue un rôle critique dans le maintien de la fonction de la barrière endothéliale associée à la VE-cadhérine. En effet, la diminution des taux d'expression de la p120 avec des ARN interférents diminue les taux de la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales microvasculaires alors que l'effet inverse a été observé après sa surexpression. (Xiao et al., 2003) En outre, les cellules endothéliales microvasculaires dermiques transfectées avec des ARNsh (petits acides ribonucléiques (ARN) en épingle à cheveux (sh pour *short hair*)) ciblant la p120, induit une diminution d'expression de l' $\alpha$ -caténine, de la  $\beta$ -caténine et de la plakoglobine en plus de la VE-cadhérine, altérant ainsi la formation de la monocouche de cellules endothéliales. (Herron et al., 2011)

En revanche, la restauration de la p120 par le biais d'une transfection stable avec la protéine de fusion p120-1A-GFP (p120-1A est l'isoforme de la p120 endogène) a rétabli les jonctions permettant la formation d'un tapis cellulaire. (Herron et al., 2011) D'autre part, la surexpression p120-1A dans les cellules endothéliales de HUVEC stabilise l'expression membranaire de la VE-cadhérine et inhibe la migration trans-endothéliale des leucocytes. (Alcaide et al., 2008,

2012) De plus, la surexpression de la p120 dans les HUVECs inhibe l'interaction entre la kinase src activée (pY416-src) et la VE-cadhérine, empêchant ainsi toutes phosphorylations qui permettent la dissociation entre cette dernière et ses partenaires. (Garrett et al., 2017)

Au-delà de ce rôle dans la stabilisation de la VE-cadhérine, la p120 protège la VE-cadhérine de l'endocytose et de la dégradation. Il a été montré que l'inhibition de la p120 dans les cellules endothéliales favorise l'endocytose de la VE-cadhérine dépendante de la clathrine. (Chiasson et al., 2009) De même, la surexpression d'un mutant de VE-cadhérine de forte affinité pour la p120 engendre la dégradation de la VE-cadhérine endogène. (Xiao et al., 2003) Cependant, la p120 ne régule pas la fonction de la barrière uniquement en régulant les taux de VE-cadhérine en la protégeant de l'endocytose puisque la surexpression du mutant DEE-VE-cadhérine, incapable d'interagir avec p120 et de subir une endocytose, n'a pas pu rétablir la fonction de la barrière altérée évaluée par l'étude de la résistance électrique trans-endothéliale dans les cellules endothéliales HUVEC. (Garrett et al., 2017)

Enfin, la p120 est impliquée dans le recrutement de la plakoglobine. Ainsi, la restauration de l'expression de la VE-cadhérine par transfection avec un adénovirus VE-cadhérine-GFP dans des cellules endothéliales déficientes en VE-cadhérine et p120 (VE-cad<sup>-/-</sup> et p120<sup>-/-</sup>) a montré une co-localisation de la VE-cadhérine-GFP avec l' $\alpha$ -caténine et la  $\beta$ -caténine au niveau des jonctions mais pas la plakoglobine. (Herron et al., 2011)

#### **4. Plakoglobine ( $\gamma$ -caténine)**

La plakoglobine est un paralogue de la  $\beta$ -caténine et constitue un autre membre de la famille des protéines *Armadillo*. La plakoglobine est constituée d'une extrémité N-terminale, d'une région centrale de 13 motifs *Armadillo* et d'une extrémité C-terminale avec des taux de similarité avec les domaines de la  $\beta$ -caténine de 57 %, 83 % et 15 % respectivement. Cette structure lui permet d'interagir avec les mêmes partenaires que la  $\beta$ -caténine. (Aktary et al., 2017) La plakoglobine interagit de façon directe avec la VE-cadhérine et l' $\alpha$ -caténine. (Dejana, 2010; Dejana et al., 2009)

Cette interaction dépend d'une part des sites de phosphorylation de la plakoglobine et d'autre part de la kinase impliquée. La phosphorylation du résidu Y683 de la plakoglobine par src kinase réduit son affinité pour les cadhérines et pour l' $\alpha$ -caténine. En revanche la phosphorylation de Y549 dépendante de FER kinase augmente son affinité avec l' $\alpha$ -caténine. (Adam, 2015)



La plakoglobine joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale. L'inhibition de la plakoglobine dans les cellules endothéliales induit une redistribution de la VE-cadhérine, désorganisant ainsi les jonctions inter-endothéliales et entraînant une augmentation de la perméabilité. En revanche, cette inhibition n'affecte ni la prolifération ni la migration cellulaire. (*Muramatsu et al., 2017*)

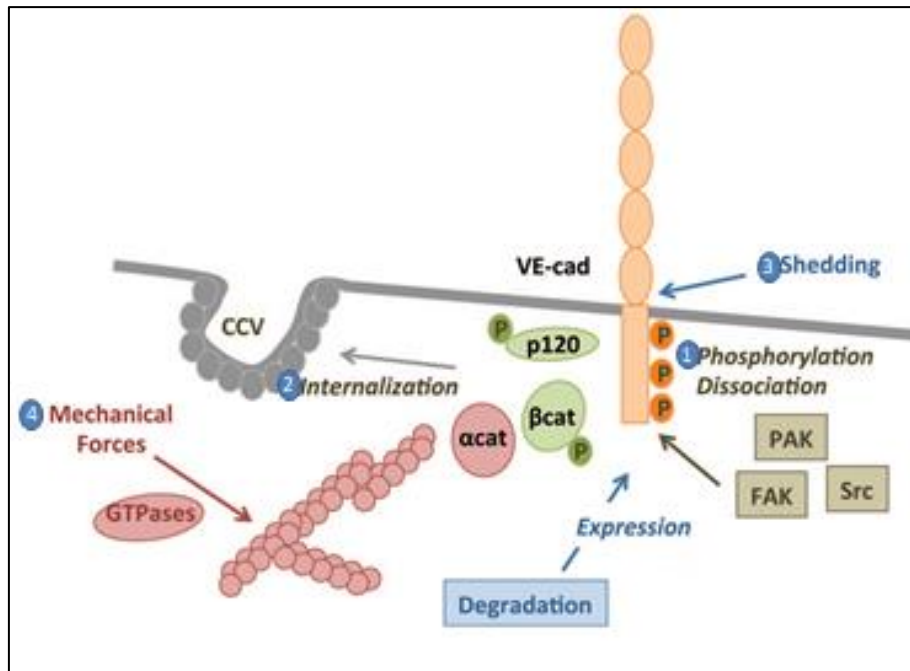
La plakoglobine a donc un rôle essentiel dans la régulation de l'adhérence cellule-cellule similaire à celui de la  $\beta$ -caténine. D'ailleurs, il a été montré que la plakoglobine peut compenser l'absence de la  $\beta$ -caténine. La plakoglobine est ainsi capable de maintenir les jonctions adhérentes en recrutant la desmoplakine et la vimentine à la place de l' $\alpha$ -caténine dans les cellules endothéliales issues des embryons de souris déficientes en  $\beta$ -caténine. Cependant ces jonctions endothéliales restent fragiles en réponse à une tension artérielle élevée. (*Cattelino et al., 2003*)

De plus, elle pourrait participer à la signalisation cellulaire Wnt dans les cellules épithéliales. La surexpression de Wnt1 dans des cellules épithéliales induit une augmentation de l'expression de la plakoglobine et modifie sa localisation, entraînant une redistribution de la plakoglobine de la membrane vers le noyau, suggérant que la plakoglobine pourrait être un effecteur de cette signalisation. (*Aktary et al., 2017*) Cependant, une étude *in vivo* a montré que l'adhérence inter-cellulaire chez des embryons de souris déficientes en  $\beta$ -caténine, est intacte malgré l'absence de la  $\beta$ -caténine. Cependant, le développement de l'axe antéro-postérieur de ces embryons est altéré. Ces observations mettent en évidence qu'en absence de la  $\beta$ -caténine, alors que la plakoglobine est capable de préserver l'intégrité structurale d'un tissu, elle ne peut conserver l'intégrité fonctionnelle de ce dernier. (*Huelsken et al., 2000*)

### **III. Régulation de la perméabilité endothéliale par le complexe VE-cadhérine**

La régulation de la perméabilité endothéliale (transcellulaire ou paracellulaire) est étroitement associée à la régulation méticuleuse de l'ouverture et de la fermeture des jonctions adhérentes. L'état d'ouverture et de fermeture de la voie paracellulaire est la conséquence des modifications aussi bien chimiques (modifications post-traductionnelles) que des modifications de la localisation des composants de la jonction, principalement la VE-cadhérine. La phosphorylation, l'endocytose et le clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine aboutissent à la dissociation de ses partenaires. Cette dissociation aura à la fois un impact

structural et un impact sur la transmission d'un signal extracellulaire (**Figure 15**). (*Rho et al., 2017*)



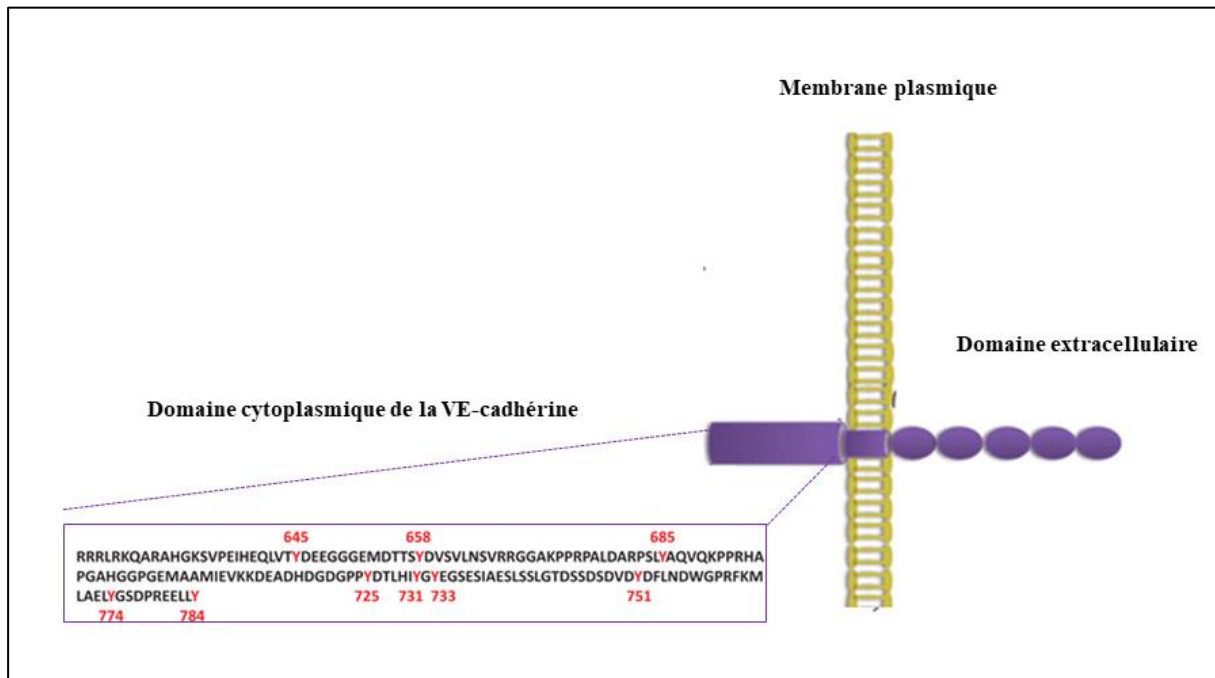
**Figure 15. Mécanismes régulateurs de l'assemblage du complexe jonctionnel impliquant la VE-cadhérine.** Trois voies principales régulent le complexe adhésif de VE-cadhérine participant à la régulation de la perméabilité endothéliale. **(1)** La phosphorylation du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine par différentes kinases (PAK, src, FAK) conduit à la dissociation du complexe VE-cadhérine/caténines. **(2)** L'internalisation de la VE-cadhérine dans des vésicules revêtues de clathrine (CCV), dépend de la phosphorylation de la p120 et de la VE-cadhérine et **(3)** du clivage protéolytique (shedding) de l'ectodomaine de la VE-cadhérine. **(4)** Les forces mécaniques et la tension exercées sur l'adhérence cellulaire, notamment à travers le cytosquelette d'actine et les Rho GTPases. (*Gavard, 2013*)

### 1. Modifications post-traductionnelles : la phosphorylation

L'intégrité du complexe jonctionnel VE-cadhérine/caténines dépend d'un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation, dans la majorité des cas, un stimulus qui affecte l'intégrité de la barrière endothéliale joue sur cet état de phosphorylation des protéines du complexe jonctionnel et notamment sur la VE-cadhérine. (*Adam, 2015*)

La VE-cadhérine possède neuf résidus tyrosines phosphorylables au niveau de son domaine cytoplasmique (**Figure 16**). L'utilisation des mutants non phosphorylables (Y658F-, Y685F ou Y731F-VE-cadhérine) ou des phosphomimétiques (Y658E-, Y685E ou Y731E-VE-cadhérine) de chacun de ces résidus a montré que l'état de phosphorylation de Y658, Y685 et Y731 est important dans la régulation de la perméabilité vasculaire et dans la migration trans-

endothéliale. (Adam, 2015; Allingham et al., 2007; Garrett et al., 2017; Rho et al., 2017; Wessel et al., 2014) Nous pouvons retenir que ces tyrosines sont impliquées dans l'interaction de la VE-cadhérine avec ses partenaires. La Y658 se trouve dans la séquence d'interaction avec la p120 ; les résidus Y685 et Y731 sont localisés dans les domaines d'interaction avec la tyrosine-protéine *C-terminal Src Kinase* (CSK) et la  $\beta$ -caténine respectivement. (Dejana et al., 2008)



**Figure 16. Les résidus tyrosines phosphorylables du domaine cytoplasmiques de la VE-cadhérine.** La VE-cadhérine interagit avec ses partenaires *via* son domaine intracellulaire qui possède neuf résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés et pouvant donc modifier les interactions entre la VE-cadhérine et les autres protéines du complexe jonctionnel. Modifié à partir de (Blaise et al., 2015).

L'importance et l'implication dans la perméabilité des différents sites de phosphorylation de la VE-cadhérine ont été largement démontrées *in vitro* sur les cellules HUVEC transfectées par les différents mutants et *in vivo* sur des souris transgéniques.

La surexpression du mutant non phosphorylable Y658F-VE-cadhérine dans les HUVECs déficientes en p120 (p120<sup>-/-</sup>) permet de restaurer la fonction de la barrière endothéliale évaluée en utilisant le système de mesure de la résistance électrique trans-endothéliale. (Garrett et al., 2017) Une autre étude a montré que les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) transfectées avec les mutants Y685E- ou Y731E-VE-cadherine ne présentent pas de liaison

entre la VE-cadhérine et la p120 ou la  $\beta$ -caténine respectivement. De plus, la transfection de ce même type cellulaire par un double mutant non phosphorylable Y658F/ Y731F-VE-cadhérine a diminué d'une façon drastique la perméabilité induite par le pervanadate, un inhibiteur de phosphatase. (Potter *et al.*, 2005)

D'autre part, le traitement des cellules microvasculaires pulmonaires humaines par le VEGF qui, comme je l'ai déjà mentionné, augmente le passage des protéines plasmatiques et des fluides (sang et lymphe), a induit la phosphorylation de VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine sur Y731 et Y654 respectivement, empêchant ainsi leur interaction. Dans la même étude, l'expression du double mutant Y658F/Y731F-VE-cadhérine bloque la perméabilité induite par le VEGF. (Monaghan-Benson and Burridge, 2009)

Dans un contexte inflammatoire la régulation de la perméabilité est importante afin de permettre le passage des leucocytes. Allingham *et al.* ont montré que les HUVECs exprimant Y658F- ou Y731F-VE-cadhérine inhibent la migration trans-endothéliale des neutrophiles. (Allingham *et al.*, 2007)

L'implication des résidus Y685- et Y731-VE-cadhérine dans la perméabilité vasculaire et la migration trans-endothéliale a également été validée *in vivo* en utilisant des souris transgéniques Y731F- et Y685F-VE-cadhérine. Cette étude a rapporté que la phosphorylation de la Y731-VE-cadhérine est constitutive *in vitro* dans les HUVECs et *in vivo* dans les poumons de souris. La déphosphorylation de la Y731 est due de manière spécifique à l'adhérence des leucocytes, étant donné que le traitement avec le VEGF, l'histamine ou le TNF- $\alpha$  n'a présenté aucun effet sur l'état de phosphorylation du résidu Y731-VE-cadhérine. En revanche, ces stimuli ont augmenté la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine ainsi que la perméabilité vasculaire. (Wessel *et al.*, 2014)

Le taux de phosphorylation de la VE-cadhérine est régulé par un équilibre entre des kinases comme src kinase et des phosphatases telle que la VE-protéine tyrosine phosphatase (VE-PTP) et la *src* homology phosphatase (SHP2). (Adam, 2015)

Ainsi, la co-transfection dans les cellules CHO de plasmides codant la VE-cadhérine et la src kinase active a induit une augmentation de la phosphorylation de Y658-VE-cadhérine. L'inhibition de Src kinase a aboli cette phosphorylation. (Wallez *et al.*, 2007)

De plus, il a été montré que le regroupement des molécules d'adhérence ICAM-1 dans les cellules HUVEC induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur les résidus Y658 et Y731, qui sont localisés dans les sites d'interaction avec la p120 et avec la  $\beta$ -caténine respectivement. Cette phosphorylation nécessite l'activation de Src kinase et de la Protéine tyrosine kinase-2 (Pyk2) dépendantes de ICAM-1. (*Allingham et al., 2007*)

La VE-PTP est connue pour son association à la VE-cadhérine pour maintenir son état déphosphorylé, favorisant ainsi sa fonction adhésive. Le rôle de la VE-PTP a été étudié dans les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique murine bEnd5 qui ont la particularité de former une monocouche cellulaire caractérisée par une résistance électrique trans-endothéliale très élevée. (*Yang et al., 2007*) Les cellules bEnd5 déficientes en VE-PTP (bEnd5 VE-PTP<sup>-/-</sup>) présentent une perméabilité endothéliale et une migration trans-endothéliale accrue des neutrophiles. De plus, quand la VE-PTP est inhibée, la phosphorylation de Y685-VE-cadhérine augmente alors que SHP2 déphosphoryle la Y731-VE-cadhérine, ce qui permet le recrutement du complexe *Adaptor-related Protein complex 2* (AP-2) au niveau du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine induisant ainsi l'endocytose de la VE-cadhérine. (*Wessel et al., 2014*)

Enfin, la dissociation de la VE-PTP de la VE-cadhérine peut être induite par l'adhérence des neutrophiles ou des lymphocytes T sur les cellules endothéliales murine bEnd5 prétraitées avec le TNF- $\alpha$ , ce qui favorise la phosphorylation de la VE-cadhérine, de la  $\beta$ -caténine et de la plakoglobine. (*Nottebaum et al., 2008*)

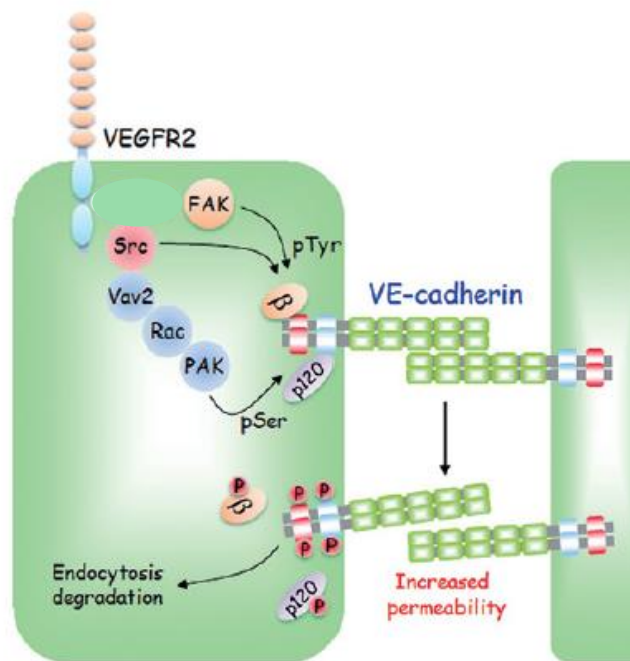
Ainsi, la perméabilité endothéliale dépend de l'intégrité du complexe jonctionnel régulée par la phosphorylation/déphosphorylation de résidus tyrosines de ses composants. Les modifications des états de phosphorylation de ces résidus peuvent être régulées par des agents augmentant le passage des protéines plasmatiques et des fluides (sang et lymphe) tels que le VEGF, la bradykinine ou la thrombine ou par l'adhérence des leucocytes grâce à la liaison entre les intégrines leucocytaires et les molécules d'adhérence endothéliales. (*Adam, 2015*)

## **2. Modifications de position et de structure**

### **2.1. Endocytose de la VE-cadhérine**

Le mécanisme de l'endocytose de la VE-cadhérine a été décrit la première fois dans un modèle de cellules endothéliales HUVEC soumises à un traitement avec du VEGF. En interagissant

avec son récepteur VEGFR2, le VEGF active la kinase Src qui phosphoryle la protéine vav2, un facteur d'échange guanine-nucléotide (GEF), afin d'activer la GTPase Rac. L'activation de cette dernière permet la phosphorylation de la VE-cadhérine par le biais d'une voie *p21-activated kinase* (PAK). Les sérines phosphorylées permettent le recrutement de la  $\beta$ -arrestine-2, qui favorise l'internalisation de la VE-cadhérine dépendante de la clathrine (**Figure 17**). (Gavard and Gutkind, 2006)



**Figure 17. Régulation de la perméabilité endothéliale par l'endocytose de la VE-cadhérine suite à la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF.** L'axe VEGF/VEGFR2 induit la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par Src et FAK et active la voie Vav2/Rac/PAK dépendante de Src pour phosphoryler la p120, l'ensemble aboutit à l'endocytose de l'endodomaine de la VE-cadhérine. (Rho et al., 2017) FAK : Focal adhesion Kinase,  $\beta$  :  $\beta$ -caténine, p120 : p120-caténine, pTyr : phosphorylation de résidus tyrosine, pSer : phosphorylation de résidus sérine, p : phosphorylation, PAK : p21-activated kinase, Rac : Rac GTPase, VEGFR2 : récepteur 2 du VEGF.

Il a été montré que la phosphorylation de la VE-cadhérine essentiellement sur des résidus tyrosines et sérines, est impliquée dans son internalisation, conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Dans le cadre de l'étude de la fonction du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine, des constructions chimères contenant un endodomaine modifié de la VE-cadhérine fusionné à un domaine extracellulaire et transmembranaire de l'IL-2R (chaîne  $\alpha$  du récepteur de

l'interleukine-2) ont été utilisées. La délétion des résidus 658 à 664 localisés dans la queue cytoplasmique de la VE-cadhérine a provoqué une perte partielle de l'interaction entre la VE-cadhérine et la p120, une perte totale de cette interaction a été observée quand la délétion a été effectuée à partir du résidu Y644 (VE-cadhérine d644). De plus, la surexpression de la protéine chimère IL-2R-VE-cadherine d644 abolit l'internalisation de la VE-cadhérine. Ainsi cette construction a permis d'établir que la liaison entre la p120 et la VE-cadhérine masque un signal d'endocytose de la VE-cadhérine, conduisant à l'inhibition de l'internalisation de la VE-cadhérine. (*Nanes et al., 2012, 2017*)

Pour aller plus loin, *Wessel et al.* ont montré que la VE-cadhérine phosphorylée sur Y685 et déphosphorylée sur Y731 est internalisée par le complexe AP-2, effecteur majeur de l'endocytose clathrine-dépendante. (*Wessel et al., 2014*)

Cependant, l'internalisation de la VE-cadhérine n'est pas seulement liée à la phosphorylation de tyrosines puisque la phosphorylation de sérines (S) peut également être requise, notamment en présence de médiateurs inflammatoires comme l'IL-8. Ainsi, des cellules endothéliales murines exprimant le mutant de la VE-cadhérine humaine non phosphorylable sur le résidu S665 (S665V) ne sont plus capables d'internaliser la VE-cadhérine lorsqu'elles sont stimulées par l'IL-8. (*Gavard et al., 2009*)

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'internalisation de la VE-cadhérine en plus de celle médiée par la kinase Src. Leur activation dépend de différents facteurs comme des facteurs de croissance (VEGF) ou des médiateurs pro-inflammatoires (IL-8).

L'implication de la voie de signalisation de la PI3K est largement étudiée dans l'internalisation de la VE-cadhérine et dans la perte de la fonction de la barrière endothéliale. Il a été rapporté qu'en fonction du stimulus, différentes isoformes de la PI3K peuvent être engagées. (*Gavard, 2013*) Dans un contexte de perméabilité induite par l'IL8, l'inhibition de la sous-unité catalytique de PI3K $\gamma$  a empêché l'activation à la fois de son substrat direct Akt, l'activation de Rac et a provoqué une diminution importante de la phosphorylation de la S665-VE-cadhérine. (*Gavard et al., 2009*) Le VEGF, quant à lui active l'isoforme PI3K classe 2 $\alpha$  de (PI3K-C2 $\alpha$ ) qui est localisée dans les endosomes et dans les vésicules entourées de clathrine. Ce point a été confirmé dans une étude montrant que les HUVECs déficientes en PI3K-C2 $\alpha$  présentent un transport endosomal défectueux et une dissociation entre la VE-cadhérine et la p120 ainsi

qu'une diminution de la protéine RhoA endosomale active (RhoA-GTPase). (*Yoshioka et al., 2012*)

## **2.2. Le clivage protéolytique de l'ectodomaine et du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine**

En plus de l'internalisation et de l'endocytose, la VE-cadhérine peut subir un clivage protéolytique au niveau de son domaine extracellulaire aussi bien au niveau de son domaine extracellulaire qu'au niveau de son domaine intracellulaire. Nous verrons que dans le second cas le processus est étroitement lié au mécanisme d'endocytose.

### **2.2.1. Le clivage de l'ectodomaine**

Il a été rapporté que le VEGF et le TNF- $\alpha$  induisent une augmentation significative de la libération de l'ectodomaine de VE-cadhérine dans le surnageant d'une culture de cellules endothéliales. (*Zhang et al., 2012*)

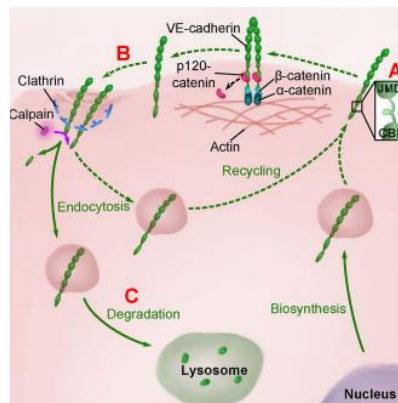
Le clivage protéolytique de l'ectodomaine de la VE-cadhérine est dû à l'action de différentes enzymes telles que les métalloprotéases transmembranaires de la famille des *A Disintegrin And Metalloprotease* (ADAM). Parmi les membres de cette famille, ADAM-10 est la métalloprotéase la plus connue pour son implication dans le clivage protéolytique de l'ectodomaine de la VE-cadhérine. Par conséquent, ADAM-10 joue sur la stabilité des jonctions adhérentes et régule la perméabilité endothéliale. Ainsi, il a été montré que la perméabilité endothéliale induite par la thrombine dans les HUVECs est médiée par le clivage protéolytique de l'ectodomaine de la VE-cadhérine par ADAM-10. Le prétraitement des HUVECs avec l'inhibiteur pharmacologique d'ADAM-10 (GI254023X) ou la diminution des taux d'expression d'ADAM-10 avec un ARN interférent dans le même modèle cellulaire a diminué la migration trans-endothéliale des lymphocytes. (*Schulz et al., 2008*) Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant des HUVECs primaires transfectées avec un ARN interférent ciblant ADAM-10. (*Reyat et al., 2017*) D'autre part, l'utilisation de la même stratégie d'ARN interférent dans les lymphocytes, a également réduit le taux de leur migration trans-endothéliale. Ceci suggère un rôle supplémentaire de la métalloprotéase ADAM-10 exprimée par les leucocytes dans le clivage protéolytique de la VE-cadhérine au niveau des jonctions inter-endothéliales. (*Schulz et al., 2008*)



### 2.2.2. Le clivage du domaine cytosolique de VE-cadhérine $\alpha$ et son recyclage

Le clivage du domaine cytosolique de la VE-cadhérine nécessite son endocytose. Ainsi, les mutants de la VE-cadhérine qui sont résistants à l'endocytose, sont également résistants au clivage. En outre, la surexpression de la p120 bloque à la fois l'internalisation et le clivage de la cadhérine (**Figure 18**). (Su and Kowalczyk, 2017) La VE-cadhérine est clivée par la calpaïne, une protéase non-lysosomale, lors de son internalisation au niveau des domaines enrichis en clathrine. Le clivage médié par la calpaïne s'effectue entre les domaines de liaison de la  $\beta$ -caténine et de la p120 au niveau du domaine cytoplasmique de la cadhérine (**Figure 18**). (Su and Kowalczyk, 2017)

L'endocytose constitutive de la VE-cadhérine et son recyclage membranaire contribuent à la dynamique des jonctions adhérentes sans entraîner de désassemblage des jonctions. (Nanes et al., 2017) Cependant, le clivage du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine altère le trafic post-endocyttaire de la cadhérine, entraînant un taux de renouvellement plus élevé en raison d'une diminution du recyclage et d'une dégradation accrue (**Figure 18**). (Su and Kowalczyk, 2017)



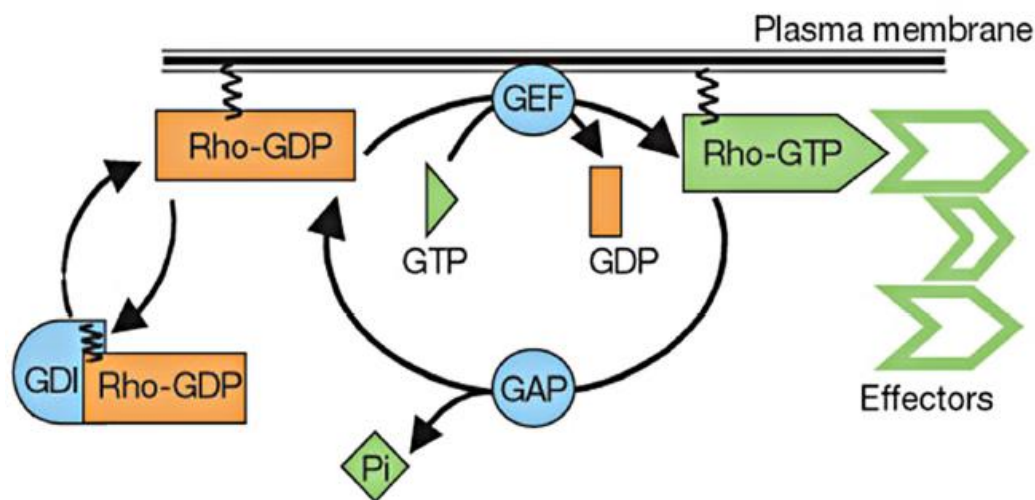
**Figure 18. Modèle de clivage du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine par la calpaïne. (A)** ancrage membranaire de la VE-cadhérine qui forme les jonctions en s'associant à ses partenaires. **(B)** la dissociation de la p120 du complexe formé avec la VE-cadhérine, engendre son internalisation *via* des vésicules recouvertes de clathrines. **Voie alternative en (B)** Suite à son endocytose dans les vésicules de clathrines, la calpaïne peut cliver le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine permettant son recyclage à la membrane cellulaire. **(C)** endocytose et dégradation de la VE-cadhérine. (Su and Kowalczyk, 2017)

### 2.3. Rho GTPases

La fonction d'adhérence inter-cellulaire de la VE-cadhérine associée au maintien de l'intégrité endothéliale peut être régulée par les Rho GTPases. Il s'agit de la super famille des protéines Ras monomériques.

Dans leur état inactif, ces protéines cytosoliques interagissent avec des protéines régulatrices de la famille *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors* (RhoGDI) qui sont associées au nucléotide GDP (Guanine diphosphate). Lors de l'activation des Rho GTPases, le GDP est échangé contre la forme triphosphate, le GTP (Guanine triphosphate) *via* des protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors) et se dissocie des RhoGDI (**Figure 19**). Les Rho GTPases actives peuvent interagir avec différents effecteurs de voies de signalisations.

Les Rho GTPases les plus étudiés dans la régulation du maintien de l'intégrité endothéliale sont : Rac1, Cdc42 et RhoA. (Komarova et al., 2017)



**Figure 19. L'activation réversible des RhoGTPases.** Rho inactif est lié un GDP et interagit avec un GDI. Grâce à l'action des protéines GEF, Rho est activée en échangeant le GDP contre un GTP. Le retour à l'état inactif se fait *via* la protéine GAP, qui stimule l'activité GTPasique intrinsèque de Rho, ce qui induit l'hydrolyse du GTP en GDP. (Komarova et al., 2017)

L'activation de Rac1 et de Cdc42 est initiée par la VE-cadhérine engagée dans une interaction homophile au niveau des jonctions adhérentes. (Birukova et al., 2012; Kouklis et al., 2003)  
Il a été montré que Cdc42 et Rac1 favorisent la réorganisation du cytosquelette en intervenant

plus particulièrement sur l'organisation des filaments d'actine lors de la protrusion de filopodes et lamellipodes entraînant ainsi la stabilisation des jonctions. (Komarova et al., 2017)

La Rho GTPase Cdc42 peut également générer une tension de faible amplitude aux jonctions par l'activation de la myosine II jonctionnelle. (Komarova et al., 2017) Elle peut également contrôler l'association de l' $\alpha$ -caténine avec le complexe VE-cadhérine- $\beta$ -caténine et donc indirectement la stabilité des jonctions adhérentes. (Broman et al., 2006) Ainsi, Cdc42 joue un rôle crucial dans l'assemblage et la maintenance des jonctions protégeant ainsi la barrière endothéliale. Dans un modèle de perméabilité utilisant des cellules endothéliales pulmonaires stimulées par la thrombine, l'activation de la Cdc42 et sa translocation du cytosol vers la membrane plasmique ont induit la restauration des jonctions inter-endothéliales. De plus, l'expression du dominant négatif de Cdc42 (N17Cdc42) a retardé cette restauration. (Kouklis et al., 2003) D'autre part, une augmentation de la résistance électrique trans-endothéliale a été mise en évidence dans une culture en monocouche de cellules endothéliales HUVEC dont l'expression de Cdc42 est déficiente. (Amado-Azevedo et al., 2017) La Rho GTPase Cdc42 a donc un rôle important dans le maintien des jonctions adhérentes pour limiter la perméabilité.

Concernant la Rho GTPase Rac1, en fonction du stimulus, le signal induit peut avoir des effets divergents sur les jonctions allant de la stabilisation au désassemblage du complexe VE-cadhérine. En réponse au sphingosine-1-phosphate (S1P), un médiateur lipidique circulant associé à la lipoprotéine de haute densité (HDL pour *High Density Lipid*), l'activation de Rac1 limite la perméabilité endothéliale. (Zhao et al., 2009) Dans d'autres cas, comme lors de la stimulation des cellules endothéliales avec le TNF- $\alpha$ , le facteur d'activation plaquettaire (PAF), ou le VEGF, l'activation de Rac1 a induit une altération de la barrière endothéliale et a augmenté la perméabilité. (Komarova et al., 2017)

En ce qui concerne l'activité de la Rho GTPase RhoA, en conditions physiologiques basales, l'activité de RhoA, elle est absente au niveau des jonctions (contrairement à l'activité de Rac1 et Cdc42). (Komarova et al., 2017) Ainsi, l'inhibition de RhoA GTPases par ARN interférents ou par l'endotoxine C3 dans les cellules endothéliales immortalisées EAhy926, n'a aucun effet sur la perméabilité endothéliale basale. (Mikelis et al., 2015)

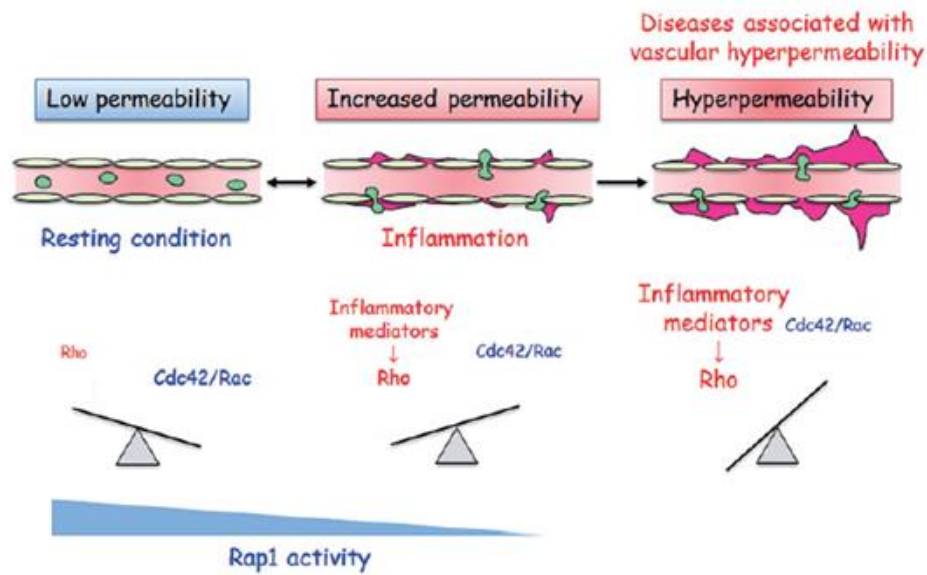
RhoA favorise la formation de fibres de stress formés de microfilaments d'actine reliés à des filaments de myosine. Ces fibres sont directement liées à la MEC permettant ainsi le déplacement des cellules. Dans le cas des jonctions, la contraction des fibres de stress par

l'activation d'effecteurs en aval de RhoA tels que Rho kinase (ROCK) et la formine conduit à la génération de tension intracellulaire au niveau des jonctions provoquant leur désorganisation. Ainsi, la signalisation RhoA contribue principalement à déstabiliser le complexe jonctionnel et à augmenter la perméabilité endothéliale. (*Rho et al., 2017*)

Plusieurs modèles de perméabilité endothéliale ont montré l'implication de la signalisation de RhoA. La perméabilité des cellules endothéliales humaines EAhy926 induite par la thrombine est réduite après inhibition de RhoA. En outre, l'inhibition de la voie Rho-ROCK par Fasudile abolit la perméabilité vasculaire induite par l'anaphylaxie et fournit ainsi une protection contre l'anaphylaxie systémique létale chez la souris. (*Mikelis et al., 2015*)

Nous avons vu l'implication des différentes Rho GTPases de manière isolée. Seulement l'interaction des différentes Rho GTPases entre elle, permet de réguler l'effet de chacune sur la stabilité des jonctions et par conséquent sur la perméabilité endothéliale. Ainsi, RhoA est finement neutralisée par la signalisation Rac1. Cependant, le mécanisme par lequel Rac1 inhibe l'activité de RhoA au niveau des jonctions reste inconnu. (*Daneshjou et al., 2015*)

De plus, L'activité de RhoA est également régulée par une autre GTPase appelée Rap1. Cette GTPase interagit également avec la Cdc42 active en induisant son accumulation au niveau des jonctions, elle est également capable d'activer la voie Rac1 afin de préserver l'intégrité endothéliale. Toutes ces données, comme le montre la **Figure 20** mettent en évidence que l'équilibre entre la voie Rho et Rac/Cdc42 est un point de contrôle clé de la perméabilité endothéliale (**Figure 20**). (*Rho et al., 2017*)



**Figure 20. La balance entre RhoA et Cdc42/Rac1 est le point de contrôle de l'intégrité endothéliale.** Au repos, les cellules endothéliales sont jointives et forment une barrière intacte *via* une voie Cdc42/Rac prédominante médiée par Rap1. En conditions inflammatoires, la balance penche vers la voie Rho au détriment de Cdc42/Rac1 et favorise la perméabilité endothéliale (fuites et infiltration leucocytaire). L'absence de Rap1 et le prolongement de l'inflammation favorisent l'hyperperméabilité associée à différentes pathologies. (*Rho et al., 2017*)

#### IV. Fonctions de la VE-cadhérine

Le contrôle de l'intégrité endothéliale dépendant de la VE-cadhérine régule une multitude de processus cellulaires, telles que la prolifération, la survie, la migration, la polarité. La fonction adhésive de la VE-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes endothéliales dépend de l'intégrité du complexe jonctionnel VE-cadhérine, qui constitue un des points de contrôle clés de la perméabilité vasculaire et du recrutement des leucocytes dans les tissus. (*Dejana and Vestweber, 2013*)

##### 1. Morphogenèse vasculaire

Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins sont formés initialement par un processus de vasculogénèse qui consiste en la formation de vaisseaux sanguins *de novo* puis par un processus d'angiogénèse, une expansion de vaisseaux par bourgeonnement des capillaires à partir des vaisseaux pré-existants. Au cours de la vasculogénèse, des cellules mésodermiques appelé hémangioblastes migrent et se différencient en formant des structures en grappes appelées des îlots sanguins. Ces structures sont formées par des cellules dérivées des hémangioblastes : angioblastes précurseurs des cellules endothéliales (à la périphérie) et les hémocytoblastes précurseurs des cellules sanguines (au centre). Les cellules endothéliales

subissent un phénomène de polarité basale-apicale pour former la lumière du vaisseau et lui donner la forme tubulaire. (*Patel-Hett and D'Amore, 2011*)

Chez la souris, la VE-cadhérine est exprimée dans les hémangioblastes à partir du jour 7.5 de la gestation (E7.5) et à E9.5 l'expression de la VE-cadhérine est observée au niveau des angioblastes. (*Breier et al., 1996*) Puis, de manière constitutive dans toutes les cellules endothéliales. (*Carmeliet et al., 1999*)

Les interactions de la VE-cadhérine avec ses partenaires permettent à la VE-cadhérine de réguler l'intégrité de l'endothélium vasculaire au cours de l'embryogenèse et d'orienter la vasculogenèse. (*Dejana and Vestweber, 2013; Dejana et al., 2008*) Les embryons de souris déficientes en VE-cadhérine (VE-cad<sup>-/-</sup>) présentent de lourdes altérations de la vasculogenèse et meurent à 10.5 jours de gestation (E10.5). (*Gory-Faure et al., 1999*) De même, les souris transgéniques VE-cad<sup>-/-</sup> ou exprimant une VE-cadhérine dépourvue de son domaine cytoplasmique présentent une vasculogenèse défectueuse provoquant une mortalité à E9.5. (*Carmeliet et al., 1999*)

Alors que le réseau vasculaire primitif se forme même en l'absence de VE-cadhérine, les vaisseaux ne peuvent plus se développer et le système vasculaire est altéré. La VE-cadhérine n'est pas responsable de la formation du réseau vasculaire primitif mais elle intervient dans l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse. Ainsi, l'injection intraveineuse d'anticorps neutralisant anti-VE-cadhérine chez les embryons de souris à E7.5 n'a pas affecté la différenciation *in situ* des angioblastes en cellules endothéliales ni l'organisation de ces dernières pour former les vaisseaux. (*Carmeliet et al., 1999*) En revanche, l'injection intracardiaque du même anticorps dans des embryons, avec un réseau vasculaire primitif déjà formé, à E8.5 a induit un développement anormal du réseau vasculaire caractérisé par un détachement accru des cellules endothéliales. (*Carmeliet et al., 1999*)

L'intégrité du réseau vasculaire adulte requiert à son tour la VE-cadhérine. Les souris adultes âgées de 10 à 12 semaines ayant reçu une injection intraveineuse d'anticorps anti-VE-cadhérine neutralisant présentent une altération irréversible des vaisseaux. Sur la base des caractéristiques histologiques, les vaisseaux du poumon et du myocarde présentent des lésions très importantes et des lacunes causant des hémorragies et une infiltration leucocytaire. (*Corada et al., 1999*)

Les atteintes vasculaires chez l'Homme sont d'ordre pathologique. Des anomalies de structures vasculaires ont été observées dans de nombreuses maladies qui étaient associées à la VE-cadhérine. Par exemple, l'étude du cavernome cérébral, une maladie cérébrale caractérisée par une malformation de la lumière des vaisseaux du cerveau, a révélé que la désorganisation vasculaire est associée à une diminution d'expression de la VE-cadhérine jonctionnelle. (*Blaise et al., 2015*)

## **2. Polarité apicale-basale**

La polarité apicale-basale des cellules endothéliales est nécessaire pour la formation de la lumière du vaisseau en lui donnant une forme tubulaire. (*Patel-Hett and D'Amore, 2011*)

La polarité apicale-basale est définie principalement par rapport à la surface de l'épithélium et la membrane basale. La surface apicale est l'extrémité cellulaire vers le milieu extérieur de l'organe par exemple la lumière du vaisseau, alors que la surface basale est l'extrémité cellulaire vers le milieu intérieur. La polarité apicale-basale est également caractérisée par la répartition caractéristique de protéines par exemple la podocalyxine, une sialoglycoprotéine considérée comme marqueur de la face apicale. (*Lampugnani et al., 2010*)

La mise en place de la polarité apicale-basale est régulée par des complexes protéiques intracellulaires conservées notamment le complexe PAR (PAR3/6/PKC $\zeta$ ,) et le complexe CRB3 (CRB3-Pals1-PATJ). (*Brinkmann et al., 2016*)

La VE-cadhérine est impliquée dans la polarité des cellules endothéliales. Il a été montré *in vitro* dans un modèle de culture tridimensionnel que les cellules endothéliales transfectées avec des ARN interférents ciblant la VE-cadhérine, présentent une polarité apicale-basale altérée mise en évidence par un immunomarquage de la podocalyxine, marqueur la surface apicale et le collagène IV marqueur de la face basale. De même, les embryons de souris VE-cad<sup>-/-</sup> à E8.5 présentent une altération de la formation de la lumière des vaisseaux due à une polarité apicale-basale défectueuse. (*Lampugnani et al., 2010*)

Afin de mettre en place la polarité apicale-basale endothéliale et par conséquent réguler la formation de la lumière du vaisseau, la VE-cadhérine favorise la localisation et l'activation correcte des protéines du complexe PAR : PAR3, PAR6 et PKC $\zeta$ . (*Lampugnani et al., 2010*) Elle interagit directement avec PAR3/6,. (*Iden et al., 2006*) D'autre part, dans un modèle de culture tridimensionnel, les cellules endothéliales murines dont le gène de la VE-cadhérine a

été invalidé présentent des taux faibles de la forme active de PKC $\zeta$  (thr410- PKC $\zeta$ ) et altère la polarité apicale-basale. (*Dejana and Vestweber, 2013; Lampugnani et al., 2010*)

Une étude récente a montré que la VE-cadhérine interagit avec Pals1, une des protéines du complexe de polarité cellulaire CRB3 et avec PAR3 respectivement *via* son domaine JMD et son extrémité C-terminale. La transfection des cellules HUVECs avec une forme de VE-cadhérine mutée au niveau du domaine JMD, au niveau du domaine C-terminal ou au niveau du domaine JMD et l'extrémité C-terminale altère la polarité apicale-basale des cellules endothéliales et affecte la formation de la lumière vasculaire. (*Brinkmann et al., 2016*)

### **3. Survie et prolifération cellulaire**

Les vaisseaux matures sains (correctement organisés) présentent un endothélium jointif qui ressemble à une monocouche de cellules endothéliales confluentes quiescente en culture. La stabilité vasculaire est régie par la signalisation de la VE-cadhérine aboutissant à l'inhibition de la croissance des cellules endothéliales dès qu'elles rentrent en contact avec les cellules voisines. (*Dejana and Vestweber, 2013*)

La nature des signaux reçus et émis par la VE-cadhérine pour contrôler la prolifération cellulaire des cellules endothéliales confluentes est largement analysée et certaines études donnent quelques pistes pour comprendre ce mécanisme. Ainsi, la VE-cadhérine peut interagir voire s'associer avec les récepteurs des facteurs de croissance et contrôler leur signal intracellulaire. (*Lampugnani et al., 2003; Rudini et al., 2008*) Le VEGF est un facteur de croissance clé dans le développement vasculaire et il est souvent ciblé dans des pathologies liées à un développement vasculaire type angiogenèse. (*Kim et al., 2015*) L'action du VEGF dépend de 3 types de récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3. Le VEGFR2 est un récepteur tyrosine kinase, son activation par le VEGF induit la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosines au niveau de son domaine intracellulaire. Parmi les résidus phosphorylés, Y996-VEGFR2 permet l'activation de la MAP Kinase p44/p42 impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF. La VE-cadhérine peut s'associer avec le VEGFR2 et inhibe son signal de prolifération en aval. (*Lampugnani et al., 2003*) Lors de la stimulation des cellules endothéliales HUVEC à l'état de confluence avec le VEGF, le VEGFR-2 s'associe au complexe VE-cadhérine- $\beta$ -caténine, se concentre au niveau des jonctions inter-cellulaires et présente un taux faible de phosphorylation. (*Lampugnani et al., 2003*) Cependant, la stimulation du VEGF d'une lignée de cellules endothéliales murines dont le gène de la VE-cadhérine a été invalidé



n'induit pas de diminution de la phosphorylation du VEGFR2, et par conséquent le récepteur VEGFR2 reste activé par le VEGF et les cellules continuent à proliférer. (Lampugnani et al., 2003) De plus, la pré-incubation des cellules HUVECs avec un anticorps anti-VE-cadhérine neutralisant induit une diminution de la phosphorylation du résidu Y996-VEGFR2, de l'activation de la MAP kinase p44/p42 et de la prolifération cellulaire. (Lampugnani et al., 2003) La phosphorylation de Y996-VEGFR2 a été restaurée après transfection d'un dominant négatif de DEP-1, une protéine tyrosine phosphatase qui interagit avec la VE-cadhérine. Ces données suggèrent que la VE-cadhérine joue le rôle d'une protéine adaptatrice qui permet l'inactivation du VEGFR2 en favorisant l'interaction entre ce dernier et les phosphatases jonctionnelles. Ainsi, la VE-cadhérine inhibe les signaux prolifératifs induits par le VEGF dans les cellules endothéliales confluentes. (Lampugnani et al., 2003)

Par ailleurs, le *Growth Factor-β* (TGF-β) est un autre facteur de croissance qui contrôle le développement et l'homéostasie des tissus dans des situations normales et pathologiques telles que l'inflammation. Le TGF-β exerce un effet anti-prolifératif important sur différents types cellulaires y compris les cellules endothéliales. La réponse cellulaire induite par le TGF-β dépend de son interaction avec récepteurs sérine /thréonine kinases de type I et de type II (TβRI et TβRII). Les récepteurs TβR existent sous forme de complexes multimériques à la surface cellulaire et leur assemblage augmente la signalisation du TGF-β. La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques conservées au cours de l'évolution, les Smads. (Xu et al., 2018)

Le regroupement de la VE-cadhérine recrute le TβRII et peut favoriser la signalisation du TGF-β en améliorant l'assemblage de TβRII / TβRI dans un complexe de récepteur actif. Ainsi la VE-cadhérine amplifie la signalisation du TGF-β par la phosphorylation de Smad et provoquer une inhibition de la prolifération et de la motilité des cellules endothéliales. (Rudini et al., 2008) En effet, il a été montré que les lignées de cellules endothéliales murines VE-cadhérine<sup>-/-</sup> ou les cellules endothéliales HUVEC primaires transfectées avec des ARN interférents ciblant la VE-cadhérine présentent un faible effet antiprolifératif induit par le TGF-β, et donc continuent à proliférer. (Rudini et al., 2008) De plus, la VE-cadhérine est nécessaire pour la phosphorylation de Smad dépendante du complexe de récepteur TβR. Ainsi, les cellules endothéliales VE-cad<sup>+/+</sup> présentent une augmentation de la phosphorylation des protéines Smad. Dans la même étude, les HUVEC prétraitées avec un anticorps neutralisant la VE-cadhérine et stimulées avec le TGF-β, présentent une phosphorylation Smad largement atténuée, démontrant clairement que

la signalisation du TGF- $\beta$  dans les cellules endothéliales dépend de manière critique de la VE-cadhérine. (*Rudini et al., 2008*)

D'autres voies pouvant contribuer à l'inhibition de la croissance cellulaire peuvent être impliquées. Celles-ci comprennent la liaison de la kinase CSK au domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine sur le résidu Y685. L'inhibition de CSK dans les cellules HUVECs induit la prolifération cellulaire. (*Baumeister et al., 2005*)

La VE-cadhérine participe également à la protection contre l'apoptose pour promouvoir la survie cellulaire. Les embryons de souris déficientes en VE-cadhérine meurent à E9.5 en raison de défaut vasculaire induit par l'apoptose massive des cellules endothéliales. (*Carmeliet et al., 1999*) En effet la VE-cadhérine associée à l'activation du VEGFR2 peut également induire l'activation de PI3K entraînant une inhibition de l'apoptose favorisant la survie cellulaire. (*Carmeliet et al., 1999*)

La compréhension de certains mécanismes de dysrégulation de la survie, la prolifération et la mort cellulaire a permis également de comprendre le processus de développement de certaines pathologies.

#### **4. Rôle physiopathologique du complexe jonctionnel VE-cadhérine**

##### **4.1. Cancers**

Les cancers sont caractérisés par la multiplication anarchique des cellules. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la VE-cadhérine est capable de réguler la prolifération cellulaire et joue un rôle dans le développement de cancers (angiosarcome, myélome, cancer du sein...). (*Blaise et al., 2015; Rezaei et al., 2012; Wrobel et al., 2006; Zanetta et al., 2005*)

L'absence de VE-cadhérine diminue non seulement l'intégrité de la barrière endothéliale mais favorise également l'invasion tumorale locale et les métastases. Il a été découvert lors d'une autopsie d'un patient atteint d'un angiosarcome du cuir chevelu qui présente des métastases multiples, au poumon, à la paroi thoracique, aux vertèbres et aux côtes, que l'expression de la VE-cadhérine est absente dans les cellules endothéliales des sites primaires de la tumeur, les sites métastatiques étant également dépourvus de VE-cadhérine. (*Tanioka et al., 2001*)

Dans le cadre de cette pathologie, il a été également montré que la xéno greffe sous-cutanée des cellules endothéliales dépourvues de VE-cadhérine (VE-cad<sup>-/-</sup>) forment de plus grandes tumeurs

vasculaires chez les souris *nude* par rapport aux cellules VE-cad<sup>+/+</sup>. Des résultats similaires ont été observés suite à la xélogreffe sous-cutanée des cellules endothéliales surexprimant la forme de la VE-cadhérine dépourvue de sa séquence d'interaction avec la  $\beta$ -caténine. Ceci démontre l'importance de l'association de la VE-cadhérine avec la  $\beta$ -caténine dans la carcinogénèse. (Zanetta et al., 2005)

De plus, l'injection d'anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine chez la souris diminue la croissance tumorale et la formation de métastases pulmonaires, tandis que la perméabilité endothéliale a augmenté. (Blaise et al., 2015; Liao et al., 2000)

D'autre part, en analysant les taux sériques de la VE-cadhérine soluble chez des patients atteints de différents cancers dont le myélome, il a été observé que ces taux sont augmentés par rapport aux valeurs basales ( $1,36 \pm 0,55$  ng/mL chez les malades *versus*  $0,63 \pm 0,56$  ng/mL chez les individus sains). Les patients atteints de cette pathologie lymphoproliférative présentent un taux sérique élevé de VE-cadhérine dû à un clivage protéolytique important de l'ectodomaine de la VE-cadhérine membranaire. Le taux de la VE-cadhérine sérique a diminué après la chimiothérapie reflétant la restructuration de la barrière endothéliale vasculaire. De ce fait, la VE-cadhérine a été proposée comme étant un biomarqueur utile dans le pronostic de cette maladie. (Blaise et al., 2015; Wrobel et al., 2006)

La VE-cadhérine soluble régule négativement l'angiogénèse et la croissance tumorale. La greffe sous-cutanée de cellules cancéreuses de colon (C51) transfectées avec un fragment de l'ectodomaine de la VE-cadhérine a induit des tumeurs plus petites et moins vascularisées par rapport au contrôle. De même, l'injection locale de l'ectodomaine de la VE-cadhérine dans les tumeurs a réduit considérablement leur croissance et l'angiogénèse intra-tumorale. (Li et al., 2010)

#### **4.2. Inflammation**

La fonction initiale de la VE-cadhérine dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale est associée à sa fonction dans l'inflammation. Cette dernière est liée au recrutement des leucocytes induit par des chimiokines sur le site d'une blessure ou d'une infection. Une série élaborée d'événements d'adhérence entre les leucocytes et l'endothélium garantit que les leucocytes quittent la circulation sanguine vers les sites inflammatoires *via* une migration trans-

endothéliale qui nécessite une ouverture des jonctions médiée essentiellement par la VE-cadhérine.

L'altération de la régulation de cette fonction de la VE-cadhérine induit une perméabilité pathologique et une migration trans-endothéliale accrue des leucocytes. Comme détaillé précédemment, la diminution des niveaux membranaires de la VE-cadhérine peut avoir des conséquences physiologiques majeures. En effet, outre les conséquences de la perte d'intégrité des jonctions adhérentes, il y a une perte de son rôle de coordination et de coopération avec d'autres protéines participant à sa fonction de stabilisation de la barrière endothéliale. (*Dejana and Vestweber, 2013*) Ainsi, les souris adultes âgées de 10 semaines ayant reçu une injection d'anticorps anti-VE-cadhérine présentent un œdème pulmonaire et cardiaque avec une infiltration leucocytaire massive due à l'altération irréversible de la fonction de la barrière vasculaire. (*Corada et al., 1999*)

La mesure de la VE-cadhérine soluble peut être un marqueur de l'inflammation au même titre qu'elle peut être un marqueur de tumeurs comme dit dans le paragraphe précédent. Ainsi, le clivage de la VE-cadhérine et sa libération accrue dans le milieu extracellulaire sont liés à la rupture de la barrière endothéliale dans l'inflammation systémique lors d'une septicémie. (*Flemming et al., 2015*)

Une étude clinique portant sur l'athérosclérose coronarienne caractérisée par une infiltration massive de monocytes au niveau de l'artère coronaire et un niveau élevé de chimiokines pro-inflammatoires, a également montré que le niveau sérique de la VE-cadhérine est élevé chez les patients par rapport aux individus sains. Les auteurs ont conclu que la libération accrue de la VE-cadhérine par les artères épocardiques est associée au degré de l'athérosclérose coronarienne. (*Blaise et al., 2015*)

## C. Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines sont de petites protéines de 8 à 12 kDa, impliquées dans l'inflammation et caractérisées entre autres par leur pouvoir chimioattractant. Elles sont sécrétées par des cellules endothéliales, des mastocytes, des plaquettes, des macrophages et des lymphocytes. Il existe des chimiokines homéostatiques, des chimiokines pro-inflammatoires et des chimiokines avec double fonction homéostatique et inflammatoire. (*Deshmane et al., 2009; Stone et al., 2017*)

Les chimiokines homéostatiques et leurs récepteurs spécifiques sont exprimés de manière constitutive. Ces chimiokines sont sécrétées dans les tissus sains et jouent un rôle dans le maintien des fonctions immunitaires telles que la différenciation des lymphocytes T, l'organogenèse lymphoïde et la migration des cellules souches hématopoïétiques. Ainsi, la chimiokine *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1/CXCL12) exprimée constitutivement par les cellules stromales de la moëlle osseuse active son récepteur spécifique CXCR4 (*CXC chemokine receptor 4*) exprimé lui aussi de manière constitutive sur les cellules souches hématopoïétiques favorisant ainsi la migration des cellules souches hématopoïétique vers la moëlle osseuse. (*Stone et al., 2017; Zlotnik et al., 2011*)

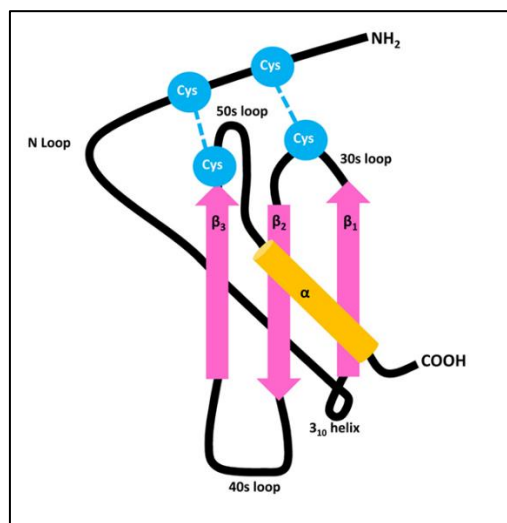
La majorité des chimiokines sont pro-inflammatoires et leurs récepteurs sont exprimés suite à des stimuli dans le cadre d'une réponse inflammatoire, que ça soit sur des sites d'infection ou de lésions tissulaires. Le rôle principal de ces chimiokines et de leurs récepteurs est de guider la migration leucocytaire vers les sites d'inflammation. En outre, elles peuvent être impliquées dans l'activation, la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que dans la dégranulation. (*Vielhauer et al., 2002*) Les chimiokines interviennent également dans les processus d'angiogenèse et dans la tumorigenèse. (*Maillard et al., 2014; Suffee et al., 2012*)

### I. Les chimiokines

#### 1. Structure, classification et nomenclature de chimiokines

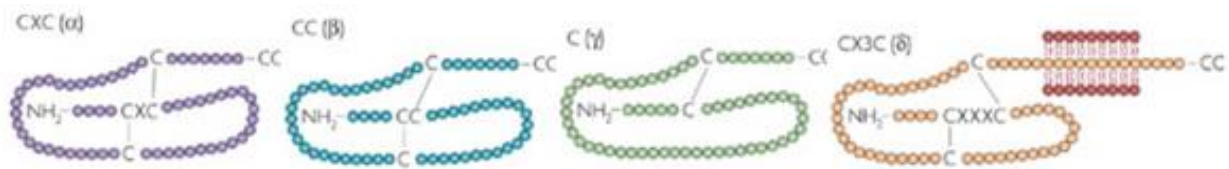
Toutes les chimiokines possèdent la même structure monomérique. Elles sont constituées d'un feuillet  $\beta$  central formé par trois brins antiparallèles ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ) avec des boucles reliant  $\beta 1$  avec  $\beta 2$  et  $\beta 2$  avec  $\beta 3$  appelées respectivement 30s et 40s, et une boucle 50s qui relie le feuillet  $\beta 3$  à l'hélice  $\alpha$  dans la partie C-terminale. À cela s'ajoute une région N-terminale flexible suivie

de la boucle N, une boucle non structurée impliquée dans l'interaction avec les récepteurs et une hélice  $3_{10}$  qui représente une extension d'hélice  $\alpha$  à l'extrémité N-terminale (**Figure 21**). (Cecchinato Valentina et al., 2015; Zlotnik et al., 2011) Les chimiokines possèdent dans la majorité des cas quatre cystéines (Cys) dont deux situées du côté N-terminal sont conservées. La première Cys est la plus proche de l'extrémité N-terminale ; elle entre dans la formation d'un pont disulfure avec une Cys localisée dans la boucle 30s. Le deuxième pont disulfure est localisé entre la deuxième Cys sur la boucle N et la Cys du brin  $\beta_3$  (**Figure 21**). (Deshmane et al., 2009) Les ponts disulfure assurent l'intégrité structurale des chimiokines ce qui est un prérequis pour la liaison chimiokine-récepteur (Miller and Mayo, 2017; Thomas et al., 2015).



**Figure 21. Représentation schématique de la structure tridimensionnelle des chimiokines.** Les chimiokines possèdent un feuillet  $\beta$  formé de trois brins  $\beta$  antiparallèles (roses) et une hélice  $\alpha$  COOH-terminale (orange), reliés entre eux par des boucles (loop) 30s, 40s et 50s. Le domaine NH<sub>2</sub>-terminal flexible est suivi d'une boucle N (N-loop) et d'une hélice  $3_{10}$  située à proximité du brin  $\beta_1$ . La structure tridimensionnelle de la protéine mature sécrétée est stabilisée par deux ponts disulfures dont le premier pont disulfure lie un résidu cystéine (Cys, bleu) du côté N-terminal et un résidu Cys de la boucle 30s située entre les brins  $\beta_1$  et  $\beta_2$  et le deuxième pont disulfure lie le deuxième résidu Cys de la boucle N avec la Cys du brin  $\beta_3$ . (Metzemaekers et al., 2018)

La position séquentielle des Cys permet de classer les chimiokines en quatre sous-familles de chimiokines : C, CC, CXC et CX<sub>3</sub>C (**Figure 22**). (Murphy et al., 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000).



**Figure 22. Les quatre familles de chimiokines.** La disposition des deux cystéines (C dans le schéma) conservées permet de diviser les chimiokines en quatre familles : C, CC, CXC et CX3C chimiokines. (Rostène et al., 2007).

Les familles CC et CXC représentent les deux grandes familles majeures de chimiokines. La famille des CC chimiokines possède deux cystéines adjacentes (motif CC). Les familles CXC et CX3C possèdent respectivement deux cystéines séparées par un résidu d'AA ou trois résidus d'AA. La sous-famille des chimiokines C représente une exception, elle ne possède qu'un seul résidu cystéine N-terminal. (Hughes and Nibbs 2018; Murphy et al., 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000)

La première nomenclature des chimiokines était basée sur les fonctions spécifiques des chimiokines ; ainsi, le *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) est une protéine régulant la migration et l'infiltration monocytaire/macrophage ou *Regulated on Activation, Normal cell T Expressed and Secreted* (RANTES) une protéine exprimée par les lymphocytes T normal et dont l'expression augmente après l'activation de ces cellules. Une autre nomenclature dite systématique a été proposée par Murphy et al. en 2000, établie à partir de la base structurale (C, CC, CXC et CX3C) des chimiokines suivie de la lettre **L pour ligand**, puis d'un **nombre** selon l'ordre d'identification du gène (ex : **CXCL12**). (Murphy et al., 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000) La chimiokine RANTES peut ainsi être identifiée sous son nom indiquant sa fonction ou sous la nouvelle nomenclature : CCL5 pour CC chimiokine Ligand n° 5.

## 2. Homo et hétéro-oligomérisation de chimiokines

Malgré leurs structures monomériques conservées, les chimiokines forment différents oligomères en s'associant soit en dimères telle que l'inteleukine-8 (IL-8/CXCL8) (Pichert et al., 2012), soit en tétramères tels que le facteur plaquettaire-4 (PF4/CXCL4) ou MCP-1/CCL2 (Deshmane et al., 2009) ou en oligomères d'ordres supérieurs (polymère) comme RANTES/CCL5. (Wang et al., 2011) Cette oligomérisation est notamment importante pour l'affinité de liaison entre les chimiokines et les glycosaminoglycanes (GAG). Ainsi, l'oligomérisation de RANTES/CCL5 augmente son affinité pour les GAGs. (Øynebråten et al., 2015; Proudfoot et al., 2017).

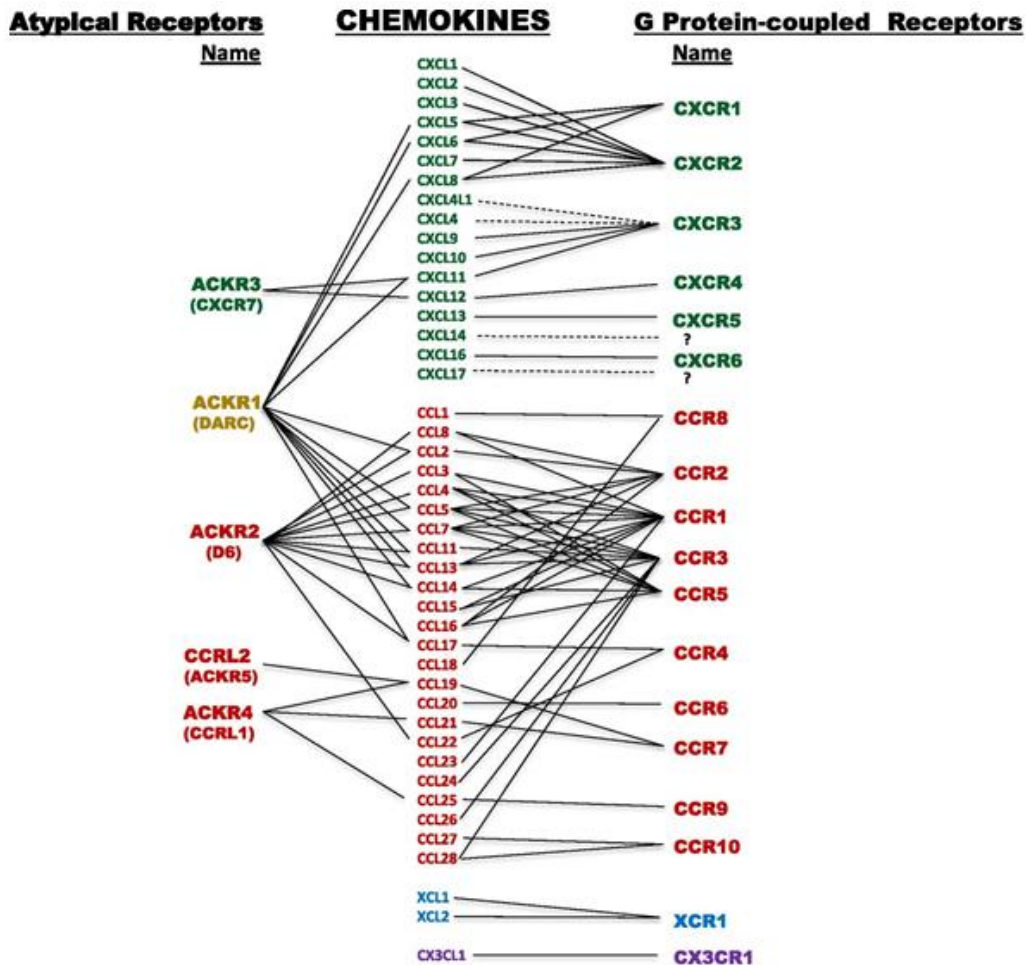
Les chimiokines IL-8/CXCL8 et PF4/CXCL4 peuvent quant à elle former un hétérodimère. En effet, il a été montré *in vitro* que l'incubation des tétramères de PF4/CXCL4 et des dimères de l'IL-8/CXCL8 aboutissait à un échange de sous-unités et à la formation d'hétérodimères PF4/CXCL4-IL-8/CXCL8. De même, l'incubation de deux CC chimiokines MCP-1/CCL2 avec MCP-2/CCL8 a conduit à une forte hétérodimérisation. La formation des hétérocomplexes a été également observée entre deux sous-familles de chimiokines (CC et CXC) impliquant RANTES/CCL5 et PF4/CXCL4. Cet hétérocomplexe RANTES-PF4 a une efficacité plus grande sur l'arrêt leucocytaire par rapport aux homodimères de RANTES/CCL5. (*Von Hundelshausen et al., 2005*) La chimiokine IL-8/CXCL8 peut également former un hétérodimère avec PF4/CXCL4 et CXCL12 ; cet hétérodimère induit la migration des neutrophiles. (*Gowry et al., 2004*) Ainsi, les combinaisons de chimiokines y compris celles appartenant à des sous-familles différentes, et celles qui activent différents récepteurs, peuvent amplifier la réponse fonctionnelle induite par une chimiokine sous forme d'homodimère. (*Proudfoot et al., 2017*) À l'heure actuelle, les conséquences fonctionnelles de la formation des hétérocomplexes de chimiokines dans d'autres effets biologiques autre que la chimiotaxie et la migration directionnelle des leucocytes, ne sont pas connues.

## II. Récepteurs classiques de chimiokines

### 1. Généralités

Les chimiokines interagissent soit avec des récepteurs protéiques à sept domaines transmembranaires classiques couplés aux protéines G (RCPG classique), soit avec des RCPG atypiques n'activant pas une signalisation intracellulaire dépendante des protéines G, soit avec les GAGs des protéoglycanes. (*Proudfoot et al., 2017*) Le système de chimiokines et leurs récepteurs présentent une grande redondance. Ainsi, différentes chimiokines peuvent activer un seul récepteur et plusieurs récepteurs peuvent être activés par la même chimiokine (**Figure 23**). (*Bachelerie et al., 2014*)





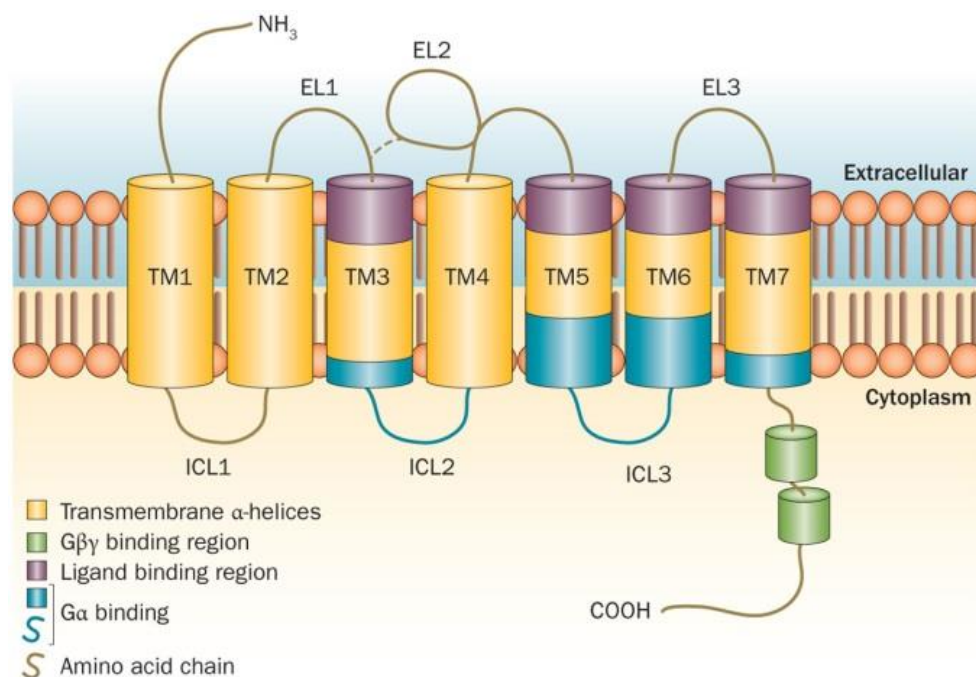
**Figure 23. Les chimiokines et les récepteurs de chimiokines (classiques et atypiques).** Il existe dix-huit RCPG classiques (à droite) qui induisent une activité chimiotactique et cinq RCPG atypiques (à gauche) qui sont non chimiotactiques et ne sont pas couplés aux protéines G. Les chimiokines peuvent se fixer sur plusieurs RCPG et un RCPG peut reconnaître plusieurs chimiokines à l'exception de certains couples qui sont spécifiques. (Bachelierie et al., 2014) Le code couleur fait référence à la famille des chimiokines : CXC (vert) CC (bleu) XC (bleu) CX3C (violet), les récepteurs prennent la couleur de la famille de chimiokine avec laquelle ils interagissent.

Sur la base de l'homologie de séquences et la similarité fonctionnelle, la classification **GRAFS** divise la superfamille des RCPG en cinq familles principales; **G**lutamate (Classe C), **R**hodopsine (Classe A), **A**dhérence (Classe B), **F**rizzled (Classe F), et **S**ecretin (Classe B). Les chimiokines interagissent avec la classe A qui représente la classe majeure des RCPGs classiques. (Krishnan et al., 2012) .

## 2. Structure des RCPG de classe A- et interaction avec les chimiokines

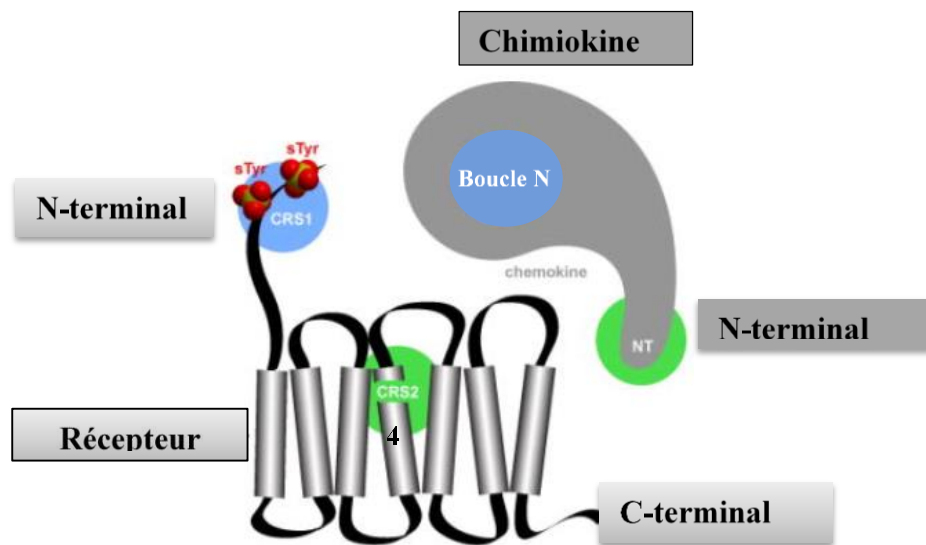
Les récepteurs de RCPG de classe A (Rhodopsine) comme les autres RCPGs, sont constitués de sept hélices  $\alpha$  transmembranaires (TM1-TM7) alignées en parallèle et disposées à proximité

les unes des autres. La face extracellulaire du récepteur comprend une région N-terminale, en grande partie non-structurée et trois boucles extracellulaires de liaison (EL1-3), avec des ponts disulfure conservés reliant l'extrémité N-terminale à EL3 et la boucle EL1 à EL2. Cette dernière est connue pour être la plus longue boucle et forme une structure semblable à un couvercle. La face cytoplasmique du récepteur comprend les trois boucles intracellulaires (ICL1, ICL2, ICL3) (**Figure 24**). (Neumann et al., 2014; Stone et al., 2017) La seconde boucle intracellulaire (ICL2) du RCPG possède le motif DRYLAIV, qui est impliqué dans l'activation de la protéine G. (Nomiya and Yoshie, 2015)



**Figure 24. Structure schématique d'un RCPG.** Le RCPG est constitué de sept domaines transmembranaires (TM1-TM7) reliés à l'aide de trois boucles extracellulaires (EL1-EL3) et de trois boucles intracellulaires (ICL1-ICL3). **Du côté extracellulaire**, le ligand se lie au récepteur au niveau des régions de liaison des ligands (zone violette) ; **du côté cytoplasmique** le récepteur est lié à la protéine G (soit avec la sous-unité G $\beta$  et  $\gamma$  au niveau des zones vertes, soit avec la sous-unité G $\alpha$  au niveau de la zone bleue). (Neumann et al., 2014)

Les chimiokines interagissent avec leurs récepteurs *via* un modèle d'interactions appelé «modèle à deux sites» (**Figure 25**).



**Figure 25. Représentation schématique du modèle d'interactions à deux sites.** L'interaction des chimiokines avec leur récepteur se fait au niveau de deux sites. La boucle N (bleu) de la chimiokine se lie au site de reconnaissance **CRS1** au niveau la partie N-terminale du récepteur (bleu). Ensuite la partie N-terminale (NT) de la chimiokine interagit avec le récepteur au niveau du site de reconnaissance **CRS2** sur le domaine transmembranaire TM4. (Kufareva et al., 2017)

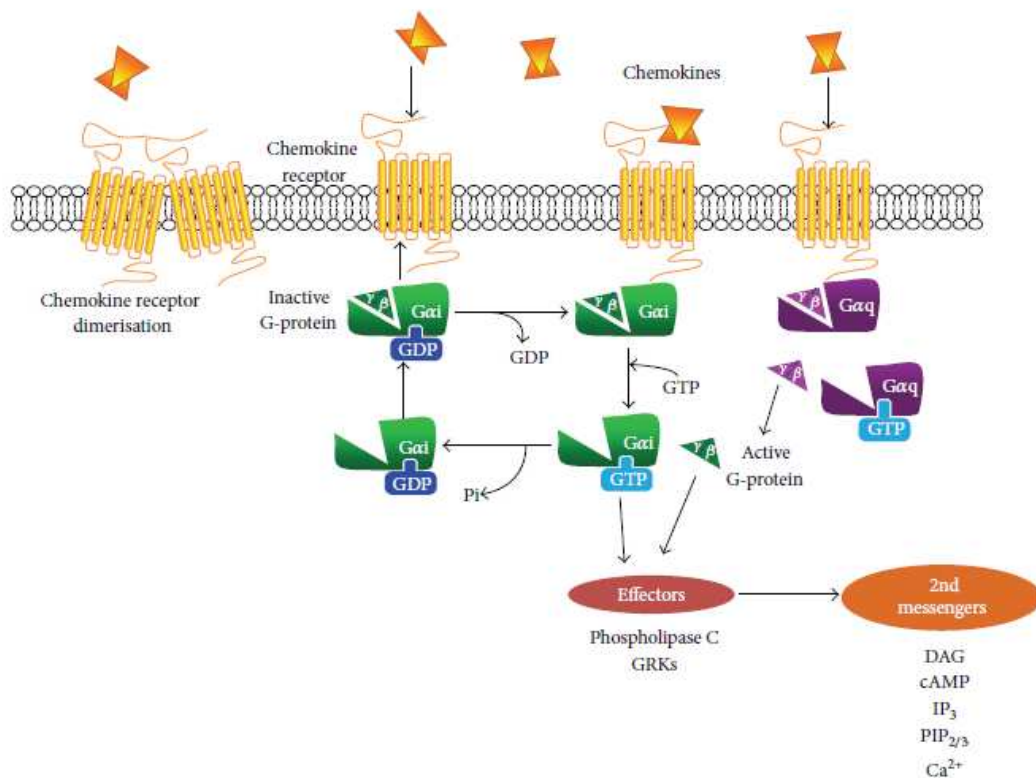
Cette interaction se produit séquentiellement. Premièrement, la boucle N de la chimiokine se lie à l'extrémité N-terminale du récepteur au niveau du site de reconnaissance CRS1 (*chemokine recognition site 1*). Deuxièmement, l'extrémité N-terminale de la chimiokine se lie au site de reconnaissance CRS2 (*chemokine recognition site 2*), site qui se trouve à l'intérieur du TM4. (Kufareva et al., 2017; Rajagopalan and Rajarathnam, 2006)

### 3. Transduction du signal induite par l'interaction entre chimiokines et RCPG classiques

Les RCPG transmettent des signaux extracellulaires à travers la membrane plasmique vers des effecteurs intracellulaires *via* des protéines G. Les protéines G appartiennent à la famille des GTPases et se composent de trois sous-unités protéiques ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  forment un complexe dimérique stable appelé sous-unité  $\beta\gamma$ .

À l'état de repos du RCPG, la sous-unité  $G\alpha$  est liée à un GDP et est associée au dimère de sous-unité  $\beta\gamma$  formant ainsi un complexe hétérotrimérique. La liaison des chimiokines au récepteur induit un réarrangement intermoléculaire du RCPG en particulier entre les TM3 et TM6. Ce changement de conformation favorise l'activation des protéines G hétérotrimériques. Les RCPGs fonctionnent alors comme un facteur d'échange GEF qui va activer la sous-unité

$G\alpha$  en catalysant l'échange de la GDP en GTP. Par conséquent, la sous-unité  $G\alpha$  active (liée au GTP) se dissocie de la sous-unité  $\beta\gamma$ . De ce fait, chacune des sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  est libre d'activer ou d'inhiber les effecteurs de signalisation en aval (**Figure 26**). (Duc et al., 2015; Neumann et al., 2014; Patel et al., 2013; Vilardaga et al., 2010)



**Figure 26. Schéma général du système de signalisation de RCPG chimiokine-dépendant.** La liaison de la chimiokine à son récepteur RCPG lui permet à la fois de s'oligomériser et de recruter la protéine G hétérotrimérique vers la membrane plasmique. Un échange de GDP/GTP au niveau du site de liaison nucléotidique de la sous-unité  $G\alpha$  induit son activation et sa dissociation des autres sous-unités du RCPG. Ceci déclenche une cascade de signalisation en aval conduisant à la production de seconds messagers. (Patel et al., 2013) DAG : Diacylglycérol, cAMP : cyclic Adenosine Monophosphate, GRKs : G Protein-Coupled Receptor Kinase, IP3 : Inositol Triphosphate, PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate, Pi : Phosphate inorganique.

Les sous-unités  $G\alpha$  présentent toutes une activité GTPase mais elles sont divisées en quatre groupes en fonction de la similarité des sous-unités  $\alpha$  :  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12/13}$ . Les groupes  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_{i/o}$  activent ou inhibent respectivement l'activité de l'adénylate cyclase conduisant respectivement à une augmentation ou à une diminution de la production d'AMPc.

La famille  $G\alpha_{q/11}$  stimule la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le PIP2 en inositol trisphosphate ( $IP_3$ ) et au diacylglycérol (DAG), conduisant à la libération de calcium à partir des réserves du réticulum endoplasmique (RE) et à l'activation de la protéine kinase C (PKC) impliquée dans la régulation du récepteur.

Enfin, la famille  $G\alpha_{12/13}$  active de petites GTPases incluant la famille Rho (*Patel et al., 2013; Roux and Cottrell, 2014*).

De nombreuses combinaisons sont possibles entre sous-groupes de la sous-unité  $G\alpha$  et les autres sous unités aboutissant à une diversité de structure et d'assemblage du complexe trimérique ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Ceci peut expliquer la variété des signalisations intracellulaires associées à un RCPG.

Les sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  peuvent activer indépendamment la PI3K, ce qui entraîne l'activation des kinases Akt et les protéines *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK). Après activation, la PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate (PIP2) en PIP3 au niveau membranaire. L'augmentation des taux de PIP3 à la membrane cellulaire conduit au recrutement d'effecteurs de signalisation possédant un domaine *PIP3-Pleckstrin-Homology* (PH). (*Patel et al., 2013*).

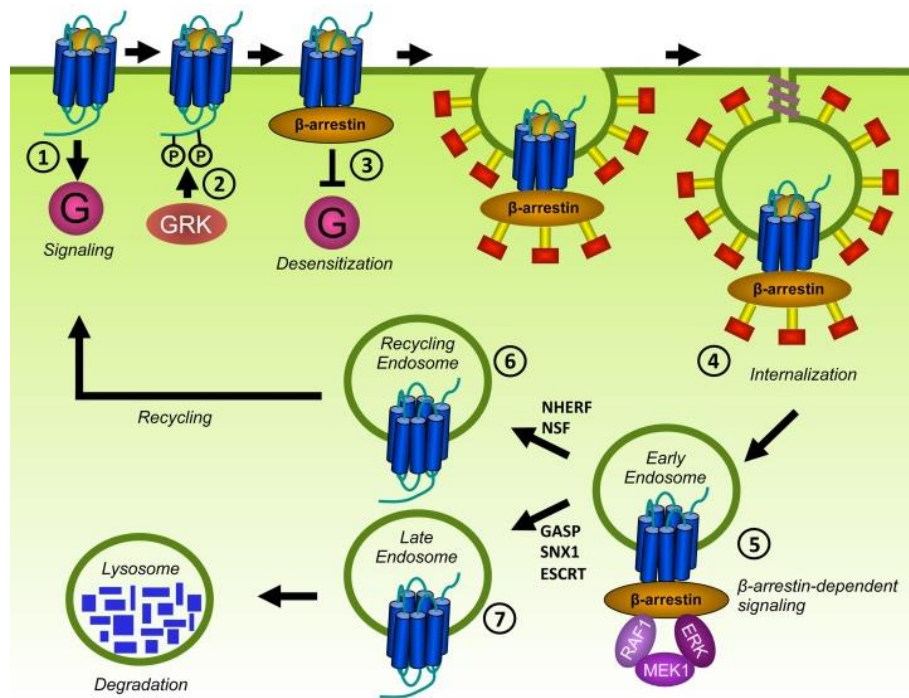
Grâce à son activité GTPase intrinsèque, l'hydrolyse du GTP en GDP par la sous-unité  $G\alpha$  met un terme à la signalisation cellulaire dépendante de la protéine G. La sous-unité  $G\alpha$  se réassocie avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Ainsi s'achève le cercle d'activation. D'autres événements moléculaires peuvent atténuer une nouvelle activation du même récepteur ; ce processus s'appelle la désensibilisation. En dehors de l'internalisation du récepteur, d'autres régulateurs tels que les *Regulators of G-protein signaling* (RGS) sont capables d'inactiver la sous-unités  $G\alpha$  en s'y fixant, en maintenant sa liaison avec le GDP et en empêchant son activité GTPase. Ainsi les RCPG maintiennent le système à l'état inactif. (*Patel et al., 2013*)

Nous retiendrons que l'effet chimioattractant des RCPG dépend de leurs unités  $G\beta\gamma$ . (*Patel et al., 2013*)

## 4. Devenir du complexe chimiokines-RCPG

### 4.1. Généralités

Après l'interaction et leur activation par les chimiokines, les RCPG subissent un phénomène de désensibilisation afin d'éviter toute signalisation accrue. Ce phénomène assure ainsi l'homéostasie cellulaire et tissulaire. La désensibilisation implique trois processus : la phosphorylation, la séquestration (internalisation) du récepteur et sa dégradation (**Figure 27**).



**Figure 27. Schéma de la désensibilisation et trafic du RCPG.** (1) L'interaction du RCPG avec son ligand (ex chimiokine) induit une signalisation dépendante des protéines G. (2) GRK phosphoryle les RCPG sur les résidus sérines et thréonines au niveau C-terminal. (3) Les  $\beta$ -arrestines se lient aux RCPG phosphorylés et empêchent une association supplémentaire des protéines G en réponse à de nouvelles chimiokines (désensibilisation). (4) Les RCPGs phosphorylés subissent un processus d'endocytose médié par la clathrine et sont séquestrés dans des endosomes précoces. (5) Les récepteurs internalisés dans les endosomes précoces peuvent activer la signalisation dépendante de la  $\beta$ -arrestine (RAF, MEK1, ERK1). Les endosomes précoces évoluent en endosomes tardifs lesquels (6) se dirigent vers la membrane plasmique pour le recyclage des RCPG ou (7) vers les lysosomes pour leur dégradation. (*de Munnik et al., 2015*)

**La phosphorylation du récepteur** se fait principalement par la famille des RCPG Kinases (GRKs, *G Protein-Coupled Receptor Kinase*). Il s'agit des Sérines/Thréonine kinases qui ciblent ces résidus localisés dans les boucles intracellulaires notamment la troisième boucle (ICL3) du récepteur ainsi que son extrémité C-terminale favorisant ainsi le recrutement des  $\beta$ -



arrestine. La fixation de la  $\beta$ -arrestine dissocie le récepteur de la protéine G mettant un terme à la signalisation de cette dernière. (Hilger et al., 2018)

Cependant, les protéines kinases dépendantes de seconds messagers telles que la PKA et la PKC peuvent également intervenir dans la désensibilisation des récepteurs. En effet, ces kinases phosphorylent au niveau des séquences consensus spécifiques localisées au niveau des boucles intracellulaires et de son extrémité C-terminale, ce qui empêche l'association du RCPG avec la protéine G. Cependant, ce système de désensibilisation hétérologue affecte les RCPG activés mais aussi les RCPG inactifs qui n'ont jamais été exposés à leurs stimuli agonistes. Dans ce cas de figure, les kinases empêchent l'activation du récepteur au préalable, avant que le RCPG soit en contact de la chimiokine. (Walther and Ferguson, 2013)

**La séquestration du récepteur** a lieu après son endocytose clathrine-dépendante induite par l'interaction entre les GRKs et la  $\beta$ -arrestine. Au cours de cette endocytose, les arrestines attachées au récepteur fonctionnent comme des molécules adaptatrices et jouent un rôle dans des voies de signalisation indépendantes de la protéine G. (Lefkowitz, 2013)

Thomsen et al. ont montré récemment que la signalisation de la protéine G peut être maintenue après l'endocytose du récepteur grâce à des mégaplexes. Les mégaplexes ou super-complexes contenant un RCPG simultanément engagé avec une protéine G et la  $\beta$ -arrestine, maintiennent la signalisation de la protéine G après l'internalisation dans les endosomes. (Thomsen et al., 2016)

Après l'internalisation, **le sort des récepteurs RCPG dépend à la fois du type de cellule et du type du ligand.**

Typiquement, suite à l'internalisation induite par une chimiokine, les RCPG sont efficacement **recyclés** à la surface de la cellule.

Cependant, de nombreux RCPG sont acheminés vers une **voie de dégradation** et détruits par protéolyse dans le lysosome, ce processus est appelé régulation négative. (Roux and Cottrell, 2014) La résistance des différents récepteurs de chimiokines à la dégradation lysosomale reste variable. Alors que certains récepteurs, comme CCR5 ou CCR7, résistent à la dégradation dans le lysosome, le CXCR4 activé subit une dégradation lysosomale par ubiquitinylation au niveau du résidu K44 à l'extrémité C-terminale par l'ubiquitine ligase E3. (Marchese and Benovic, 2001; Stone et al., 2017)

## 4.2. Orientation de différents RCPG en fonction de leur ligand

**Un même ligand peut orienter différents RCPG dans différentes voies.** Ainsi, les récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5 peuvent interagir avec RANTES/CCL5 mais ces récepteurs n'ont pas le même sort après leur internalisation. RANTES/CCL5 induit le recyclage de CCR5, une dégradation partielle de CCR3 et une dégradation complète de CCR1. (*Patel et al., 2013; Zimmermann et al., 1999*)

**Un même récepteur lié à des ligands différents sera orienté différemment.** Il a été montré que CCR7 interagissant avec MIP-3 $\beta$ /CCL19 présente une forte internalisation contrairement à CCR7 liant SLC/CCL21 (*Ligand Lymphoid tissue chemokine/CCL21*). De plus, il a été montré que lorsqu'il est internalisé, ce récepteur peut emprunter différentes voies ; il peut dicter la voie d'internalisation dépendante ou indépendante de la  $\beta$ -arrestine. En effet, l'internalisation du récepteur CCR7 liant la chimiokine CCL19 se fait d'une façon dépendant de la  $\beta$ -arrestine contrairement au CCR7 interagissant avec la chimiokine CCL21. (*Patel et al., 2013; Walther and Ferguson, 2013*)

## III. Récepteurs atypiques de chimiokines

### 1. Structure

Les récepteurs de chimiokines atypiques (aCKR, *atypical chemokine Receptor*) se lient à plusieurs chimiokines de différentes sous-classes avec une grande affinité. Ces récepteurs partagent la structure des sept domaines transmembranaires RCPGs. Cependant, les aCKR sont incapables d'induire une signalisation dépendante de la protéine G, en raison de l'absence ou de la modification du motif DRYLAIV dans la seconde boucle intracellulaire (ICL2), qui est impliquée dans l'activation de la protéine G. (*Stone et al., 2017*)

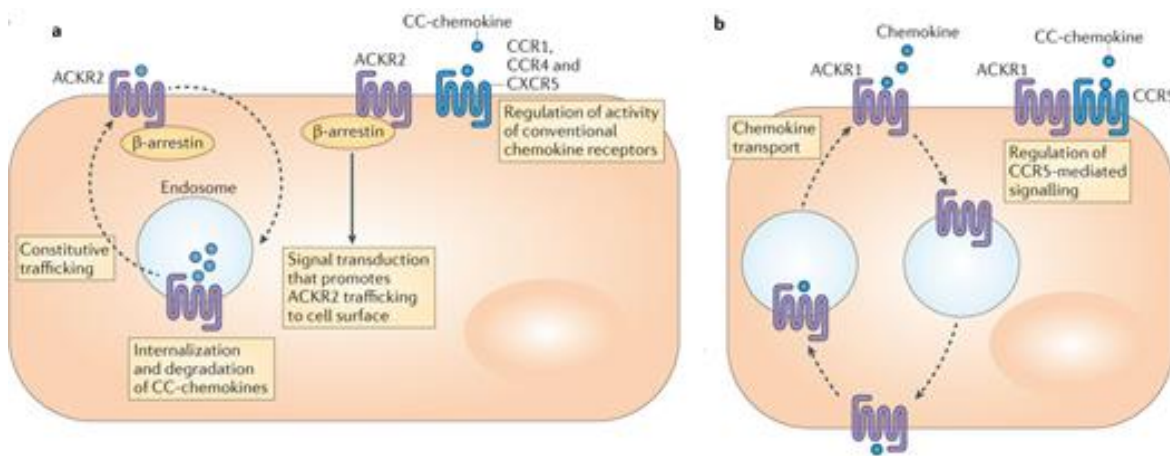
À l'heure actuelle, cette famille de récepteurs est constituée de six aCKR majeurs : (aCKR1/DARC, aCKR2/D6, aCKR3/CXCR7, aCKR4/CCX-CKR /CCRL1 et la fonctionnalité des récepteurs aCKR5/CCRL2 et aCKR6/PITPNM3 est toujours en cours d'étude. (*Stone et al., 2017*)

### 2. Fonctions

Les aCKR peuvent réguler la signalisation chimiokines-dépendante *via* leur internalisation, leur dégradation ou par la régulation de leur transport intracellulaire. Les aCKR peuvent également



former des dimères avec les RCPGs classique afin de réguler leur signalisation (**Figure 28**).  
(Bonecchi and Graham, 2016)



**Figure 28. Fonctions des récepteurs atypiques.** (a) Les récepteurs atypiques des chimiokines (aCKR) phosphorylés recrutent la  $\beta$ -arrestine puis sont internalisés constitutivement indépendamment de leurs interactions avec les chimiokines. Les aCKR induisent l'internalisation et la dégradation des chimiokines avec lesquelles ils sont liés ou se dimérisent avec un récepteur RCPG classique pour moduler sa signalisation. (b) aCKR1 est impliqué dans le transport des chimiokines du côté basal vers le côté apical. (Nibbs and Graham, 2013)

**Les chimiokines liées aux récepteurs aCKR2/D6, aCKR3/CXCR7, aCKR4/CCX-CKR seront dégradées.** Les récepteurs aCKR2/D6, aCKR3/CXCR7, aCKR4/CCX-CKR sont internalisés de façon constitutive indépendamment des chimiokines ; ainsi le récepteur est internalisé qu'il soit lié ou non à une chimiokine. Lorsque le récepteur est lié à une chimiokine, celle-ci sera dégradée après son internalisation avec le récepteur. Ce type de fonctionnement a été le mieux caractérisée pour aCKR2/D6. Il a été le premier récepteur à être fonctionnellement classé comme un récepteur de chimiokine atypique. Il a été montré qu'il circule de façon constitutive dans la cellule s'éloignant d'abord de la membrane plasmique puis revenant à la surface cellulaire selon un cycle répété. Le récepteur sera internalisé qu'une chimiokine se soit fixée ou non dessus. Lorsqu'une chimiokine se lie au récepteur aCKR2/D6, l'ensemble est internalisé grâce à une signalisation dépendante de la  $\beta$ -arrestine. La chimiokine internalisée est libérée dans les endosomes tardifs et dégradées par voie lysosomale. À la fin, aCKR2/D6 est recyclé à la surface cellulaire. (Nibbs and Graham, 2013) Les récepteurs aCKR2/D6, aCKR3/CXCR7, aCKR4/CCX-CKR pourraient réduire l'inflammation par la clairance des chimiokines et l'inhibition du recrutement accru des leucocytes induit par ces chimiokines. (Bonecchi and Graham, 2016)

**L'internalisation via aCKR1 n'aboutit pas à la dégradation des chimiokines.** Il a été montré *in vitro*, que les chimiokines internalisées par aCKR1 peuvent subir un processus de transcytose au lieu de la dégradation et peuvent être présentées aux leucocytes pour entraîner la transmigration. (Nibbs and Graham, 2013) En effet, Pruenster et al. ont montré qu'en absence de stimulation, le récepteur aCKR1 est caractérisé par une distribution cellulaire à la fois apicale et basale des cellules épithéliales. Cependant, en cas de stimulation avec un de ses ligands tels que MCP-1/CCL2, aCKR1 devient cytosolique. Les expériences d'immunomarquage ont montré que la liaison de MCP-1/CCL2 au récepteur aCKR1 induit son endocytose dans des vésicules de cavéole qui s'enfoncent dans la cellule. Il a été également observé que le trafic transcellulaire de MCP-1/CCL2 médié par aCKR1 a induit une accumulation de la chimiokine à la surface apicale des cellules. (Pruenster et al., 2009)

La conséquence fonctionnelle de la transcytose de MCP-1/CCL2 par aCKR1 du côté basal vers le côté apical des cellules a été confirmée par un test de migration « *transwell* » ou essai de chambre de Boyden. En effet, des monocytes (ensemencés dans le compartiment supérieur de la chambre) sont capables de passer à travers une monocouche de cellules épithéliales surexprimant aCKR1 non stimulées vers le compartiment inférieur de la chambre contenant un milieu de culture supplémenté en MCP-1/CCL2. Dans la même étude, il a été montré par microscopie électronique, que les cellules épithéliales formant la monocouche transportent MCP-1/CCL2 de la partie inférieure de la chambre de boyden vers la partie supérieure par transcytose. Ainsi, MCP-1/CCL2 transportée et immobilisée à la surface apicale des cellules épithéliales aura été présentée aux monocytes afin de favoriser leur transmigration. (Pruenster et al., 2009)

**Les récepteurs atypiques régulent les récepteurs de chimiokines classiques par le biais d'une dimérisation des récepteurs.** Le récepteur aCKR1 et les récepteurs des CC-chimiokines peuvent s'associer formant des hétéro-oligomères. Il a été montré *in vitro*, que l'hétérodimère aCKR1-CCR5 altère la signalisation et le chimiotactisme dirigé par CCR5.

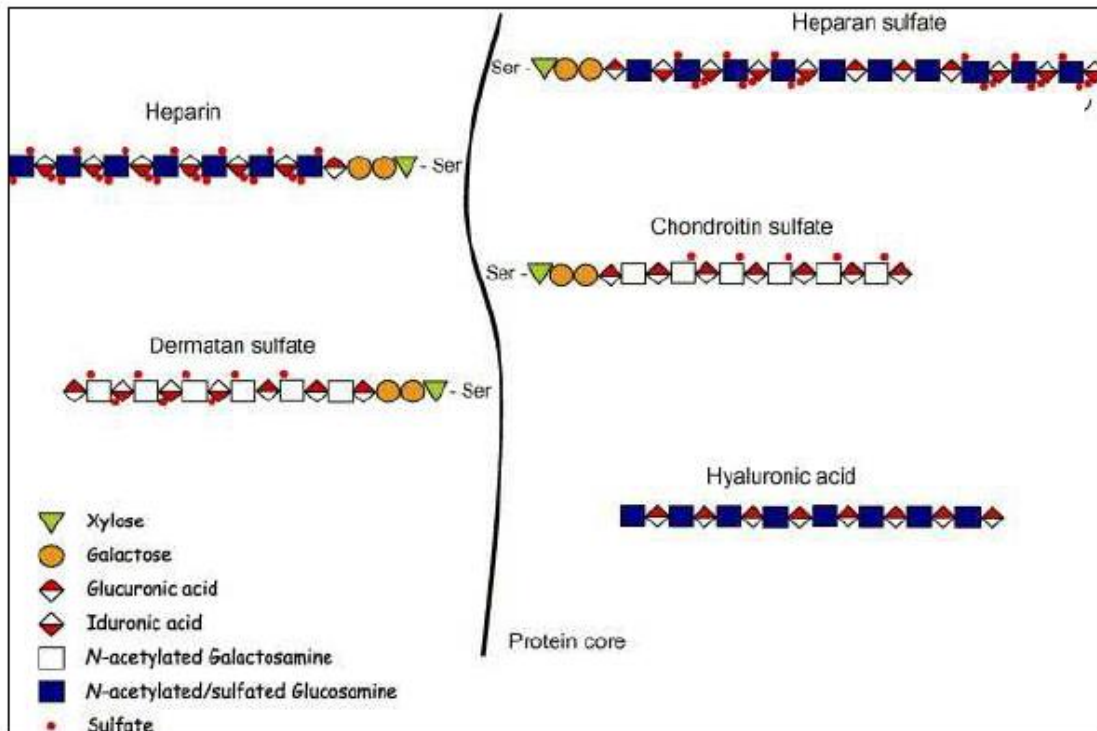
Quant au récepteur aCKR2 il ne peut s'associer qu'avec des CCR et ne pourra ainsi former que des hétéro-oligomères aCKR2/CCR. Ce récepteur peut supprimer *in vitro* la migration cellulaire induite par CCR4 *via* la formation de l'hétérodimère aCKR2/CCR4. L'aCKR3 peut former un hétérodimère avec le récepteur classique CXCR4 (aCKR3/CXCR4). Cet hétérodimère régule la distribution subcellulaire de CXCR4, recrute la  $\beta$ -arrestine et modifie les réponses contrôlées par CXCL12 par l'intermédiaire de CXCR4. (Nibbs and Graham, 2013)

## IV. Interaction entre chimiokines et glycosaminoglycanes

### 1. Structure et classification des glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des hétéropolysaccharides linéaires non ramifiés. Tous les GAGs exceptés les Kératanes Sulfates (KS), sont constitués de répétition d'unités de disaccharides composés d'acide uronique et d'hexosamine reliés par une liaison glycosidique. L'acide uronique peut être soit  $\beta$ -D-glucuronique soit  $\alpha$ -L-iduronique. L'hexosamine est soit à base de glucose ( $\alpha$ -D- ou  $\beta$ -D-glucosamine), soit de galactose (N-acétyl- $\beta$ -D-galactosamine). En se basant sur la structure de l'unité disaccharidique (nature du sucre et le type de la liaison glycosidique), les GAGs sont divisés en différentes familles : Chondroïtines Sulfates (CS), Dermatanes Sulfates (DS), Héparine/Héparanes Sulfates (Hp/HS), les KS et l'acide hyaluronique (HA) (**Figure 29**). (*Lindahl et al., 2015*)

Les GAGs peuvent être localisés dans la MEC ou insérés dans la membrane plasmique, associés à une protéine pour former un protéoglycane (PG). La formation des PGs commence par la synthèse de la protéine centrale au sein du réticulum endoplasmique. Parallèlement, les GAGs sont synthétisés dans différents compartiments de l'appareil de Golgi et capables de se lier de façon covalente à des sites « Sérine-Glycine » de la protéine centrale du protéoglycane PG. Ceci par le biais d'une liaison O-glycosidique entre le xylose le saccharide initial de l'élongation des GAGs, et le résidu sérine de la protéine centrale. (*Prydz, 2015*)



**Figure 29. Représentation schématique de la structure des GAGs et leur association à la protéine centrale du protéoglycane.** Les GAGs sont divisés en différentes familles : héparine, héparanes sulfates, chondroïtines sulfates, dermatanes sulfate et l'acide hyaluronique. Les GAGs sont formés d'une répétition d'un disaccharide définissant le type de GAGs : Acide glucuronique ou iduronique et glucosamine pour les héparanes, acide glucuronique ou iduronique et galactosamine pour les dermatanes et acide glucuronique et galactosamine pour les chondroïtines. Les GAGs sont fixés par O-glycosylation par un motif xylose-galactose-galactose-acide glucuronique sur la sérine de la protéine centrale du protéoglycane. Les GAGs sont sulfatés à différentes positions, 2-O pour l'acide iduronique, 4-O et 6-O pour le galactosamine ou 3-O et 6-O pour le glucosamine. (Imberty et al., 2007) Protein core : protéine centrale du protéoglycane, Ser : résidu sérine.

Les chaînes GAGs subissent plusieurs modifications principalement la sulfatation. Tous les GAGs sont sulfatés à l'exception de l'acide hyaluronique. La sulfatation des GAGs peut se faire sur plusieurs sites. Ce processus permet de moduler plusieurs signaux extracellulaires. La sulfatation est variable d'un polysaccharide à un autre. De ce fait, le schéma de sulfatation des GAGs est appelé « code de sulfatation » : 2-O sulfatation pour l'acide iduronique, 4-O et 6-O sulfatation pour les galactosamines ou 3-O et 6-O sulfatation pour le glucosamine. L'héparine et l'héparane sulfate sont les GAGs les plus sulfatés. La sulfatation et la carboxylation sont importantes pour l'acquisition de la charge négative nécessaire à l'interaction électrostatique avec les ligands possédant des résidus basiques appelés « *Heparin Binding Proteins* ». (Esko et al., 2009; Pomin and Mulloy, 2018)

## 2. Interactions des GAGs

Parmi les familles des GAGs sulfatés, la famille Hp/ HS est la plus étudiée. Cette famille peut interagir avec les « *Heparin Binding Proteins* ». Ces dernières peuvent être des protéines de la MEC telles que la fibronectine des facteurs de croissance par exemple le *fibroblast growth factor* (FGF)-2 ou des chimiokines telles que RANTES/CCL5 ou SDF1/CXCL12. Ces différentes interactions confèrent aux GAGs un rôle dans la régulation d'un large éventail de fonctions biologiques. (*Gandhi and Mancera, 2008*)

L'interaction électrostatique entre les groupes carboxyles et sulfates des GAGs chargés négativement et les résidus d'acides aminés chargés positivement telles que les acides aminés lysine et arginine des protéines, sont les principaux contributeurs à l'interaction GAGs-chimiokines. À l'exception de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 et MIP-1 $\beta$ /CCL4, qui sont acides, les chimiokines sont des protéines hautement basiques. Elles ont tendance à avoir une forte affinité pour HS et l'héparine par rapport aux autres GAGs qui sont faiblement sulfatés. Dans plusieurs chimiokines, les motifs de liaison aux GAGs sont définis par des motifs de séquence caractéristiques "BBXB" où B est un élément basique et X est un acide aminé quelconque. (*Gandhi and Mancera, 2008; Pomin and Mulloy, 2018*)

## 3. Conséquences fonctionnelles des interactions GAGs-chimiokines

Les GAGs ont pour rôle de protéger la protéine qui y est associée contre la protéolyse et de contribuer à l'oligomérisation de leurs ligands. (*Proudfoot et al., 2017*)

Les GAGs de la surface cellulaire localisent et/ou immobilisent les chimiokines facilitant leur liaison au récepteur classique RCPG, favorisant ainsi en aval la transduction de signal. (*Proudfoot et al., 2017*)

Les GAGs sulfatés en tant que composants de la MEC ou d'un PG transmembranaire peuvent agir comme des co-récepteurs régulant la fonction du ligand et notamment les chimiokines via différents mécanismes. (*Proudfoot et al., 2017*)

### 3.1. Protection de la protéolyse et stabilité de la fonction des chimiokines

Dans le cadre de la régulation de la réponse inflammatoire, les chimiokines peuvent subir un phénomène de protéolyse. Ce processus peut avoir lieu au niveau de la partie N-terminale, C-terminale ou au centre de la chimiokine. Le clivage protéolytique peut soit inactiver la chimiokine comme c'est le cas pour SDF-1/CXCL12, intensifier ou réduire son activité comme

c'est le cas pour CXCL8 et CCL7 respectivement. La protéolyse permet également de modifier la chimiokine en sa forme soluble comme cela a été décrit pour CCL21, dont la forme soluble générée après protéolyse est dépourvue d'activité. (*Proudfoot et al., 2017*)

Les GAGs sont un facteur de protection contre cette protéolyse. Cette protection peut être due au blocage stérique du site actif de protéase par la chimiokine associée aux GAGs dans certains cas et/ou à l'oligomérisation stable de chimiokines. Ainsi, il a été montré que les GAGs protègent CXCL9, CXCL10 et CXCL11 contre le traitement protéolytique par CD26 (dipeptidylpeptidase IV). En effet, la chimiokine CXCL11 lié aux GAGs est protégée contre CD26 à cause de l'encombrement stérique des GAGs au niveau du domaine N-terminal de la chimiokine. En revanche dans le cas de CXCL12, il a été démontré que la protection du domaine N-terminal de la chimiokine vis-à-vis de CD26 dépend de l'oligomérisation de la chimiokine induite par les GAG. (*Metzemaekers et al., 2018*)

### **3.2. Oligomérisation**

De nombreuses études *in vitro* ont montré que les chimiokines s'oligomérisent sur les chaînes GAGs et que cette interaction stabilise leur structure notamment dans le cas des oligomères d'ordre supérieur comme RANTES/CCL5 mais permet également la stabilisation d'hétérodimère comme le cas des chimiokines CCL8 et CCL11 qui sont incapables de s'hétéro-oligomériser en absence des GAGs. (*Crown et al., 2006; Stone et al., 2017*)

L'affinité d'interaction des oligomères de chimiokines avec les GAGs peut définir la nature du gradient de concentration de chimiokine ainsi que sa durée de persistance. (*Ellyard et al., 2007; Majumdar et al., 2014; Proudfoot et al., 2017*)

### **3.3. Immobilisation et présentation des chimiokines au récepteur**

La notion d'un gradient de chimiokines immobilisées (gradient de phase solide) sur les cellules endothéliales et la MEC est de plus en plus soutenue. L'idée de ce mécanisme haptotactique a surgi après l'identification des HS comme composant des cellules endothéliales et de la MEC qui pourraient favoriser la création d'un gradient de chimiokines immobilisées. En effet, il a été montré que la migration directionnelle des neutrophiles dépend de l'immobilisation de l'IL-8/CXCL8 sur les HS. De même il a été montré dans un modèle *ex vivo* qu'un gradient de RANTES/CCL5 immobilisé sur les GAGs induit le recrutement des leucocytes. (*Majumdar et al., 2014; Sarris et al., 2012*)

L'immobilisation des chimiokines à la surface des cellules endothéliales par les GAGs maintient un gradient de concentration de chimiokines près du site d'expression et notamment au niveau des sites inflammatoires ce qui favorise une migration directionnelle des leucocytes et facilite la présentation de ces chimiokines à leurs récepteurs.

### **3.4. Régulation de la réponse fonctionnelle du récepteur de chimiokine**

Des études portant sur la liaison et l'activation des récepteurs de chimiokines ont rapporté que l'ajout des GAGs exogènes circulants inhibe la fonction des chimiokines y compris celle de RANTES/CCL5. Cet effet a été expliqué par des études de structure et de cristallographie qui montrent que les séquences d'interactions chimiokines-récepteur et chimiokine-GAGs se chevauchent. (*Kufareva et al., 2017 ; Proudfoot et al., 2003 ; Shaw et al., 2004*)

Les GAGs et les RCPGs peuvent donc travailler en synergie comme dans le cas du recrutement des leucocytes mais peuvent également avoir un effet opposé. Au cours de nombreuses situations pathologiques et notamment dans l'inflammation, les GAGs des protéoglycanes membranaires subissent un processus de clivage protéolytique (shedding) ce qui permet de les libérer sous leur forme soluble. L'ectodomaine des protéoglycanes ainsi relargué pourrait inhiber l'interaction chimiokine-RCPGs par effet compétitif. Cela pourrait atténuer voire inhiber l'inflammation. (*Proudfoot et al., 2017 ; Sarrazin et al., 2011*) C'est une des raisons pour lesquelles les GAGs représentent une cible thérapeutique prometteuse.

Les protéoglycanes membranaires à chaîne HS à leur tour peuvent remplir la fonction d'un co-récepteur fonctionnel notamment le syndécan-4 après liaison du FGF-2 à ce protéoglycane. (*Murakami et al., 2002*)

## **V. Fonctions des chimiokines et leurs récepteurs**

L'interaction de chimiokines avec leurs récepteurs est impliquée dans un large éventail de processus physiologiques et physiopathologiques notamment l'organogenèse, l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la prolifération tumorale et l'inflammation qu'elle soit aiguë ou chronique.

Certaines chimiokines sont considérées comme pro-inflammatoires et peuvent être induites pendant une réponse immunitaire pour attirer les cellules du système immunitaire vers un site d'infection, tandis que d'autres sont considérées homéostatiques et sont impliquées dans le

contrôle de la migration des cellules dans des conditions physiologiques normales. (*Cecchinato and Ugucioni, 2018; Zlotnik et al., 2011*)

## **1. Hématopoïèse**

L'hématopoïèse est un processus physiologique dynamique permettant le renouvellement des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui migrent vers la niche hématopoïétique de la moëlle osseuse où elles se différencient en différentes lignées hématopoïétiques. Le rôle des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'hématopoïèse englobe la régulation de la prolifération ainsi que la survie et la rétention des progéniteurs hématopoïétiques. La chimiokine SDF-1/CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont les plus connus pour leur rôle fondamental dans l'homéostasie hématopoïétique. L'analyse de la moëlle osseuse d'embryons de souris invalidées pour le gène SDF-1/CXCL12 montre une diminution drastique du nombre de CSH. De plus, la chimiokine MIP-1 $\alpha$ /CCL3 inhibe de façon réversible le cycle cellulaire des cellules progénitrices hématopoïétiques. Cet effet inhibiteur de MIP-1 $\alpha$ /CCL3 est bloqué par MIP-1 $\beta$ /CCL4. D'autres chimiokines telles que l'IL-8/CXCL8, PF-4/CXCL4 et MCP-1/CCL2 inhibent la formation des progéniteurs myéloïdes. (*Bonavita et al., 2018*)

## **2. Organogenèse**

Les chimiokines homéostatiques participent à l'organogenèse. En effet, l'axe SDF-1/CXCL12-CXCR4 est primordial dans la mise en place de la moëlle osseuse, le système nerveux central, le cœur, le pancréas chez le poisson zèbre. De plus, il a été rapporté que cet axe contribue également au développement du cartilage et du squelette, notamment en régulant la différenciation de la lignée ostéogénique. (*Katsumoto and Kume, 2013; Yellowley, 2013*)

D'autres chimiokines homéostatiques comme CCL21 sont impliquées dans la mise en place des organes lymphoïdes secondaires et dans l'homéostasie des monocytes circulants qui participent à la surveillance immunitaire. L'axe CCL21-CCR7 régit le recrutement des cellules T naïves dans les ganglions lymphatiques, et l'axe CXCL13-CXCR5 favorise le recrutement des cellules B dans les ganglions lymphatiques. (*Zlotnik et al., 2011*)

À cela s'ajoute l'effet de MCP-1/CCL2 dans la moëlle osseuse, qui gouverne la sortie des monocytes vers le sang en conditions inflammatoires ou non *via* son récepteur CCR2. (*Combadiere et al., 2008; Deshmane et al., 2009; Surmi and Hasty, 2010*)



### 3. Réparation tissulaire /cicatrisation

La réparation tissulaire est un phénomène physiologique complexe caractérisé par une phase inflammatoire précoce impliquant le recrutement des leucocytes. Ce recrutement est majoritairement dépendant de la production de facteurs chimioattractants comme les chimiokines et de molécules directement impliquées dans le remodelage et la reconstruction tissulaire comme le collagène.

Les chimiokines telles que MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 et RANTES/CCL5 en interagissant avec CCR1, 2, 3 et 5 sont impliquées dans le recrutement de monocytes et macrophages au niveau des plaies. De plus, il a été rapporté que la phase inflammatoire de la cicatrisation *in vivo* est caractérisée par une forte expression de MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 ainsi que MIP-1 $\beta$ /CCL4. Une amélioration de la réparation des lésions a été observée *in vitro* après stimulation des cellules endothéliales dermiques microvasculaires avec les chimiokines CCL1, CCL11, CCL27, CXCL8. (Bünemann *et al.*, 2018)

Diverses chimiokines sont impliquées dans l'inflammation et la cicatrisation post-fracture. MCP-1/CCL2 et SDF-1/CXCL12 ont été étudiées en détail pour leur rôle dans la réparation osseuse. La chimiokine SDF-1/CXCL12 exprimée dans les cellules de moëlle osseuse et de stroma périvasculaire, est indispensable au recrutement de cellules souches mésenchymateuses (CSM) et de progéniteurs d'ostéoclastes au niveau de la lésion osseuse. SDF-1/CXCL12 participe à la réparation osseuse lors d'une fracture. MCP-1/CCL2 favorise le recrutement des neutrophiles, qui est un stade précoce de la guérison de la fracture et dans l'infiltration des CSM pour la réparation ultérieure de la fracture. Les souris dont le gène codant pour MCP-1/CCL2 ou pour CCR2 a été invalidé présentent une moins bonne réparation de la fracture et un retard de guérison. (Edderkaoui, 2017)

### 4. Angiogenèse

La formation de nouveau vaisseaux sanguins est essentielle dans de nombreux processus physiologiques telle que la réparation tissulaire (cicatrisation) et pathologiques telles que l'inflammation chronique et la prolifération tumorale.

Les chimiokines CXC peuvent être classées en deux sous-groupes basés sur la présence du motif ELR (Glu-Leu-Arg) à l'extrémité N-terminale. Les chimiokines CXC qui possèdent la séquence ELR comme CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8 sont connues pour être pro-angiogéniques. Les chimiokines pro-angiogéniques en interagissant avec

leurs récepteurs endothéliaux entraînent une migration accrue et parfois, une prolifération et l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales. Les chimiokines peuvent agir en synergie avec d'autres facteurs angiogéniques pour favoriser l'angiogenèse. (*Strieter et al., 2005*) Certaines chimiokines, telles que SDF-1/CXCL12 et IL-8/CXCL8 induisent l'expression du VEGF, qui à son tour favorise la production de chimiokines angiogéniques ce qui génère une boucle de rétrocontrôle. (*Martin et al., 2009*) En outre, les chimiokines peuvent attirer des leucocytes produisant des facteurs angiogéniques, tels que des macrophages, dans un microenvironnement tumoral, accélérant ainsi l'angiogenèse. (*Chow and Luster, 2014*)

Les chimiokines sans motif ELR comme le cas de PF-4/CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL14, sont connues comme des inhibiteurs de l'angiogenèse. Les chimiokines anti-angiogéniques CXCL4 et CXCL10 peuvent inhiber l'angiogenèse dépendante du VEGF et supprimer l'effet du *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF). Ce type de chimiokines peut également inhiber la chimiotaxie et la prolifération des cellules endothéliales. (*Chow and Luster, 2014*)

## **5. Cancer et métastase**

Les chimiokines jouent également un rôle important dans la biologie des cellules non immunitaires et notamment les cellules tumorales. Elles jouent de multiples fonctions dans la croissance et la progression des tumeurs. Elles peuvent réguler directement la croissance tumorale en induisant la prolifération des cellules cancéreuses ou en inhibant leur apoptose. Il a été également montré, d'une part, que les cellules tumorales acquièrent la capacité de produire des chimiokines favorisant leur propre croissance et d'autre part elles peuvent exprimer des récepteurs de chimiokines leur permettant de recevoir un signal pour promouvoir leur propre prolifération. Par exemple, il a été rapporté que les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL8, MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5 étaient non seulement exprimées dans le mélanome, mais également impliquées dans la croissance et la progression tumorale. (*Chow and Luster, 2014*) Elles peuvent également réguler indirectement la croissance tumorale par leurs effets sur les cellules stromales mésenchymateuses localisées dans le micro-environnement tumoral en induisant la libération de facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques à partir de ces cellules. De plus, les chimiokines peuvent diriger la migration et l'invasion des cellules tumorales requises pour la formation de métastases.

CXCR4 et son ligand CXCL12 ont été impliqués dans le développement de métastases. Le blocage de l'axe PF-4/CXCR4-CXCL12 supprime les métastases du cancer du sein dans les poumons. L'implication des chimiokines dans la formation des métastases a également été montrée dans d'autres types de tumeurs tels que le cancer de la prostate (métastase osseuse) ou le cancer du poumon (métastases osseuses, hépatiques...). (*Chow and Luster, 2014*) Il a été montré que l'expression du récepteur CXCR4 est corrélée avec l'augmentation des métastases tumorales chez les patients cancéreux. L'infiltration des cellules tumorales dans les vaisseaux lymphatiques est indispensable pour le développement des métastases. Il est connu que l'axe CCL21-CCR7 est crucial pour ce processus d'infiltration par les cellules dendritiques et les lymphocytes T dans les vaisseaux et niches lymphatiques et il semble également impliqué dans ce processus d'infiltration des cellules tumorales. (*Zlotnik et al., 2011*)

Les cellules cancéreuses dans une tumeur dépendent des vaisseaux sanguins pour acquérir suffisamment d'oxygène et de nutriments et pour éliminer les déchets. L'angiogenèse a été décrite comme une étape limitante de la formation et de la progression tumorale. Les chimiokines pro-angiogéniques, décrites dans la partie précédente, tiennent une place importante dans ce processus. (*Chow and Luster, 2014; Strieter et al., 2005*)

Nous devons également retenir que dans ce contexte tumoral, les chimiokines sont potentiellement bi-fonctionnelles pendant le développement de la tumeur et peuvent présenter à la fois des capacités de promotion et de suppression tumorale. (*Chow and Luster, 2014*) Par conséquent, la contribution des chimiokines au développement d'une tumeur dépend de l'équilibre entre des facteurs favorisant la croissance et la survie de la tumeur et des facteurs limitant la prolifération cellulaire anarchique au sein d'un tissu. Ces facteurs pourront provenir de la tumeur, de son microenvironnement et de la circulation systémique.

## **6. Inflammation**

Au-delà de leur rôle central dans la coordination de la migration des cellules immunitaires vers le site de l'inflammation, les chimiokines jouent également un rôle important dans le développement des tissus lymphoïdes secondaires, dans la maturation des cellules immunitaires et dans la production de réponses immunitaires adaptatives. Une dérégulation de l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs est impliquée dans un large éventail de maladies humaines, y compris les maladies inflammatoires et auto-immunes. Cependant, l'implication

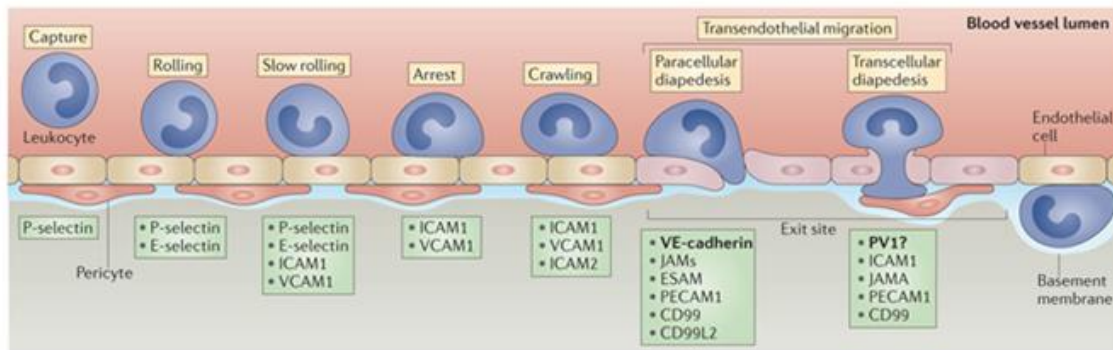
de ces chimiokines dans le développement de ces maladies n'a jamais pu être démontrée de manière directe. (*Chow and Luster, 2014; Griffith et al., 2014*)

Les chimiokines ont été détectées non seulement dans les fluides corporels mais aussi dans les coupes histologiques des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Les articulations des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde présentent des niveaux élevés de MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 et RANTES/CCL5 et un recrutement accru de monocytes et de cellules T dans les tissus synoviaux des articulations du genou. (*Kraan et al., 2001; Turner et al., 2014*) L'IL-8/CXCL8 peut être détectée dans le liquide synovial de patients atteints de diverses maladies rhumatismales inflammatoires. De plus, les patients atteints de colite ulcéreuse évolutive présentent des taux élevés d'IL-8/CXCL8 dans les muqueuses. (*Mahida et al., 1992; Turner et al., 2014*) La physiopathologie du psoriasis est également liée à l'inflammation médiée par les chimiokines et au recrutement lymphocytaire dans la peau, comme l'infiltration des lymphocytes T dépendante de CXCR3. (*Flier et al., 2001; Turner et al., 2014*) En outre, les chimiokines RANTES/CCL5 et MCP-1/CCL2 ont été mises en évidence dans le sérum des patients athérosclérotiques et *in situ* au niveau de la plaque d'athérome. (*Barlic and Murphy, 2007*)

#### D. Le recrutement des leucocytes par l'endothélium

Le recrutement des leucocytes est un processus crucial pour toute réponse immunitaire. Il est régulé par une action combinée entre les cellules endothéliales et les leucocytes, où les cellules endothéliales activées guident les leucocytes circulants vers des sites de transmigration. Les leucocytes quant à eux, après avoir adhéré à l'endothélium transmettent aux cellules endothéliales des signaux visant à l'ouverture d'une voie de transmigration aboutissant à leur infiltration vers les tissus lésés ou le site d'inflammation.

Aux sites d'inflammation ou de lésion vasculaire, des stimuli pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-1(IL-1) et l'interleukine-4 (IL-4) ou le LPS, induisent une augmentation de l'interaction entre la surface endothéliale vasculaire luminale et les leucocytes. Les leucocytes migrent vers les tissus endothéliaux vasculaires lésés grâce au gradient chimioattractant établi par de nombreuses chimiokines telles que MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 ou IL-8/CXCL8 présentes à la surface de l'endothélium et liées aux protéoglycanes à chaînes héparane sulfate. (*Hundelshausen et al., 2017; Lindahl et al., 2015; Shi and Pamer, 2011*) Les leucocytes circulants peuvent alors reconnaître l'endothélium vasculaire au niveau du site inflammatoire et interagir avec la paroi des vaisseaux sanguins par une série d'étapes : capture, roulement, arrêt leucocytaire ferme, locomotion vers les jonctions inter-endothéliales (*crawling*) et transmigration à travers les barrières des cellules endothéliales, des péricytes et de la membrane basale (**Figure 30**). (*Muller, 2013, 2016; Vestweber, 2015*)

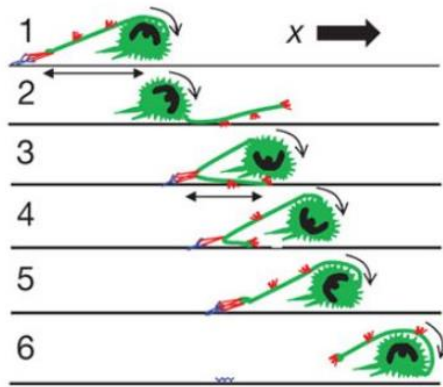


**Figure 30. Recrutement des leucocytes par l'endothélium.** L'endothélium activé par des facteurs pro-inflammatoires présente à sa surface luminale des niveaux élevés de molécules d'adhérence telles que sélectines, ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1. L'interaction des molécules d'adhérence avec leurs ligands exprimés par les leucocytes circulants engendre une cascade d'évènements qui définit le recrutement leucocytaire. Suite à sa capture, le leucocyte va rouler sur l'endothélium (*Rolling*), y adhérer (*Arrest* ou *firm adhesion*), migrer vers les sites de diapédèse (*Crawling*) et enfin transmigrer à travers l'endothélium pour rejoindre le tissu (*transendothelial migration*). (Vestweber, 2015)

Cette cascade d'évènements qui définit le recrutement leucocytaire, implique des étapes consécutives d'interactions adhésives entre les leucocytes et l'endothélium. Ces interactions comprennent des adhérences transitoires et réversibles de faible affinité médiée par les sélectines, et de forte affinité médiée par les intégrines, puis la migration des leucocytes à travers l'endothélium et au-delà. (Langer and Chavakis, 2009) Sur la base de ces interactions, on distingue trois étapes phares du recrutement des leucocytes, dites « étapes traditionnelles » qui sont : le roulement, l'adhérence ferme et la transmigration.

## I. Roulement des leucocytes

Cette étape représente le processus initial du recrutement actif des leucocytes. Dans un contexte inflammatoire, les sélectines endothéliales interviennent dans la capture des leucocytes circulants. Cette interaction transitoire, en combinaison avec le flux sanguin entraîne le phénomène de roulement des leucocytes sur la surface apicale (luminale) des cellules endothéliales. Au cours du roulement, de longues extensions membranaires se forment à l'arrière du leucocyte lesquelles se fixent sur l'endothélium et s'enroulent autour du leucocyte pour le ralentir (**figure. 31**). (Sundd et al., 2012; Vestweber, 2015)



**Figure 31. Représentation schématique du mécanisme du roulement leucocytaire.** (1, 2) *Le ligand de sélectine P-Selectin Glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1, en rouge) exprimé à la surface du leucocyte (vert) interagit transitoirement avec la P-sélectine endothéliale (bleue) et forme une longue extension membranaire qui lui sert d'attache. (3, 4 et 5) Cette attache s'enroule autour du leucocyte durant son mouvement de roulement et le ralentit jusqu'à son arrêt (6). (Sundd et al., 2012)

### 1. Rôle des sélectines

La famille des sélectines est constituée de la E-sélectine exprimée par les cellules endothéliales activées, la P-sélectine exprimée à la surface des plaquettes et l'endothélium et la L-sélectine exprimée constitutivement sur les leucocytes. L'inhibition des sélectines par les anticorps neutralisants a démontré l'importance de ces glycoprotéines dans le phénomène de roulement des leucocytes. Ainsi, l'injection des anticorps neutralisants anti-sélectines a inhibé le roulement des leucocytes *in vivo* dans un modèle de souris. De même, les souris dont le gène de la P-sélectine a été invalidé ne présentent aucune trace de roulement leucocytaire. (Langer and Chavakis, 2009)

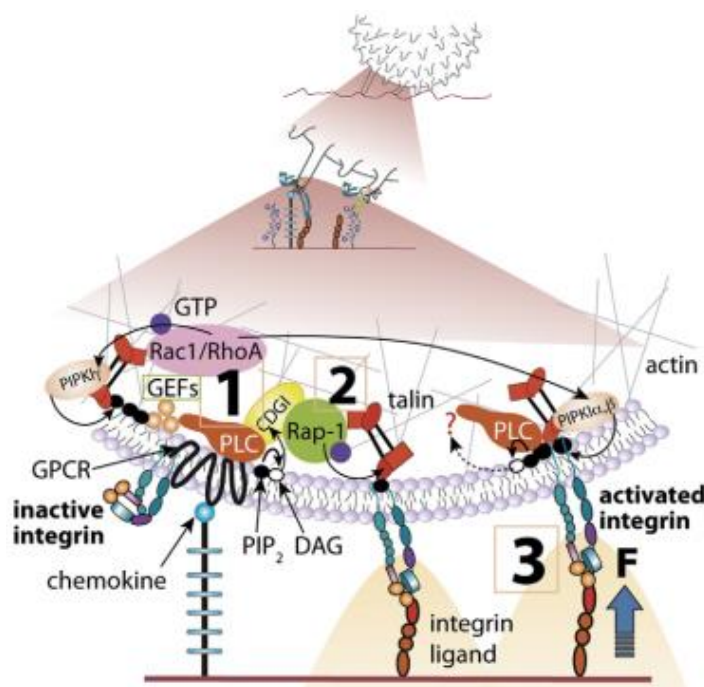
Les ligands de sélectines sont des glycoprotéines riches en résidus d'hydrates de carbone sialylés fucosylés de la famille de Lewis x (sialyl-Lewis<sup>x</sup>, sLe<sup>x</sup>). Le ligand le plus important est le *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1* (PSGL-1), qui est présent sous forme d'un homodimère à la membrane des leucocytes. Le PSGL-1 peut se lier à la fois à la P-sélectine et à la E-sélectine. Il a été montré que l'interaction de ces sélectines avec PSGL-1 exprimé à la surface des neutrophiles peut entraîner l'activation de l'intégrine  $\alpha\text{L}\beta\text{2/LFA-1}$ , favorisant ainsi la transition entre le roulement des neutrophiles et l'adhérence ferme des neutrophiles dépendants des intégrines. (Vestweber et al., 2014; Zarbock et al., 2007)

Cependant, il existe d'autres ligands des sélectines hormis PSGL-1. À titre d'exemple, le CD34 exprimé par les cellules endothéliales, sous sa forme glycosylée devient un partenaire

d'interaction pour la L-sélectine exprimée à la membrane des leucocytes. (Rosen, 2004; Zarbock et al., 2007)

## II. Arrêt et adhérence ferme des leucocytes

L'adhérence ferme des leucocytes est la conséquence de la signalisation issue de l'interaction des chimiokines immobilisées à la surface des cellules endothéliales avec leurs récepteurs présents à la surface des leucocytes. Au niveau des leucocytes, la transduction du signal engendrée par la liaison des chimiokines à leurs RCPGs entraîne l'activation des intégrines et aboutit à un arrêt stable et définitif du leucocyte (**Figure 32**).



**Figure 32. Modèle d'activation leucocytaire des intégrines suite à l'activation d'un RCPG par une chimiokine.** (1) Les chimiokines immobilisées sur les cellules endothéliales interagissent avec leurs RCPGs spécifiques exprimés par le leucocyte. L'activation rapide du RCPG induit une signalisation dépendante de la protéine G qui conduit à l'activation de la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le PIP2 en IP3 et DAG. Ce dernier, cible le CDGI et Rap-1. (2) Rap-1 favorise l'interaction du Talin avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine aboutissant à son changement de conformation permettant une activation intermédiaire. (3) L'interaction de l'intégrine avec son ligand (exemple ICAM-1) exerce une force (F) pour séparer les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de ses régions transmembranaires facilitant ainsi l'accès du ligand à son site de liaison au niveau des intégrines. Ceci favorise l'activation complète des intégrines. Cette interaction entre l'intégrine et le ligand peut être stabilisée par plusieurs mécanismes notamment par le PIP2 généré par la PIP2-kinase type  $I\gamma$  dépendante des Rho GTPases. (Alon and Ley, 2008)



## 1. Intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhérence constituées d'un complexe d'hétérodimères de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . En absence de stimulation, les intégrines sont sous leur conformation «courbée ou incurvée » inactive. L'interaction des chimiokines avec leurs RCPGs spécifiques à la surface des leucocytes permet l'activation des intégrines leucocytaires. Cette activation entraîne un changement de la conformation des intégrines « forme droite ou ouverte », ce qui favorise l'interaction des intégrines avec leurs ligands exprimés à la membrane des cellules endothéliales (**Figure 32**). (Campbell and Humphries, 2011)

Les intégrines les plus importantes pour le recrutement des leucocytes et notamment pour l'étape de l'adhérence ferme sont : les intégrines de la famille  $\beta 2$  tels que l'antigène associé à la fonction lymphocytaire 1 (LFA1/intégrine  $\alpha L\beta 2$ ) qui est exprimé par tous les leucocytes, et l'antigène Macrophage 1 (Mac-1 / $\alpha M\beta 2$ ) qui est exprimé par les cellules myéloïdes, ainsi que l'intégrine de la famille  $\beta 1$ , l'antigène très tardif 4 « *Very Late Antigen 4* » (VLA-4/ $\alpha 4\beta 1$ ), qui est exprimé par les lymphocytes effecteurs et les monocytes. (Langer and Chavakis, 2009) Les principales intégrines qui régulent l'adhérence des leucocytes induite par le SDF-1/CXCL12 sont LFA1/  $\alpha L\beta 2$ , Mac-1 / $\alpha M\beta 2$ , VLA-4/ $\alpha 4\beta 1$  et VLA-5/ $\alpha 5\beta 1$ . Il a été montré *in vivo* dans différents modèles animaux que l'adhérence ferme des neutrophiles s'effectue à l'aide de LFA-1/ $\alpha L\beta 2$  et de Mac-1/ $\alpha M\beta 2$  pour l'adhérence. (Campbell and Humphries, 2011; Van Buul and Hordijk, 2004; Vestweber, 2015)

De nombreuses études ont démontré le rôle important des intégrines exprimées par les leucocytes dans le contrôle de leur recrutement et notamment dans l'étape de l'adhérence. Ainsi, la pré-incubation des neutrophiles avec des anticorps neutralisants des  $\beta 2$ -intégrines réduit leur adhérence sur une barrière endothéliale. De même, les souris déficientes en  $\beta 2$ -intégrines présentent une diminution importante de l'adhérence ferme des leucocytes et une altération du recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires. (Langer and Chavakis, 2009; Wilson et al., 1993) Dans un modèle d'arthrite chez le rat, l'inhibition combinée de LFA-1/ $\alpha L\beta 2$  et de VLA-4/ $\alpha 4\beta 1$  avec des anticorps neutralisants a inhibé l'infiltration des monocytes au niveau des articulations. (Issekutz and Issekutz, 1995) Chez l'Homme, le déficit en adhérence leucocytaire I (LAD-I) est causé par la mutation du gène ITGB2 codant pour la  $\beta 2$ -intégrine, entraînant une altération du recrutement des leucocytes notamment des neutrophiles et par conséquent, ces patients présentent des infections bactériennes récidivantes mettant en jeu le pronostic vital. (Schmidt et al., 2013)

## 2. Les ligands des intégrines

Les intégrines peuvent interagir avec plusieurs ligands comprenant des protéines de la MEC, des glycoprotéines de surface cellulaire ainsi que des facteurs du complément et les composants solubles de la cascade hémostatique et fibrinolytique. Les principaux ligands d'intégrines impliqués dans l'adhérence des leucocytes appartiennent à la superfamille des immunoglobulines et comprennent les molécules d'adhérence intercellulaire (ICAM, *Inter Cellular Adhesion Molecule*) 1-5, la molécule d'adhérence cellulaire vasculaire-1 (VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), ainsi que les JAMs qui sont exprimées entre autres à la membrane des cellules endothéliales. (Campbell and Humphries, 2011; Langer and Chavakis, 2009) Les intégrines LFA-1/ $\alpha$ L $\beta$ 2 se lient aux ICAM-1 et ICAM-2 alors que VLA-4/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1 interagit avec VCAM-1 exprimé à la surface apicale de l'endothélium. Les intégrines VLA-4/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1 et VLA-5/ $\alpha$ 5 $\beta$ 1 sont capables d'interagir avec la fibronectine, une glycoprotéine matricielle. (Muller, 2013)

## 3. Interaction entre intégrines leucocytaires et ligands endothéliaux

L'interaction des intégrines avec leurs ligands induit de multiples cascades de signalisation intra-leucocytaires. La liaison entre les chimiokines et les RCPG aboutit à une transduction de signal intracellulaire qui entraîne l'activation d'intégrines dite « *inside-out* ». Le leucocyte traduit cette transduction de signal en polarisation cellulaire et en mouvement vers l'avant.

Ce mouvement est généralement la combinaison de la protrusion frontale et de la contractilité à la fois à l'avant et à l'arrière du leucocyte, ce qui permet le déplacement du leucocyte vers l'avant. Les intégrines LFA1/ $\alpha$ L $\beta$ 2 et VLA4/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1 sont nécessaires pour cette migration locomotive directionnelle des leucocytes vers les sites de transmigration. Chacun de son côté agit à travers des cascades de signalisation distinctes pour conduire à une chimiotaxie efficace. VLA-4/  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 utilise la paxilline pour réguler l'attachement et le détachement des leucocytes durant la migration directionnelle, la signalisation dépendante de LFA1/ $\alpha$ L $\beta$ 2 est médiée par l'activation de la voie RhoA/ROCK/MLCK qui régule la contraction des cellules et le détachement de la matrice. (Ley et al., 2007; Van Buul and Hordijk, 2004)

L'interaction des intégrines LFA1/ $\alpha$ L $\beta$ 2 et VLA4/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1 avec leurs ligands endothéliaux ICAM-1 et VCAM-1 sur la surface luminale induisent également une signalisation intracellulaire dans les cellules endothéliales aboutissant ainsi à la migration trans-endothéliale des leucocytes.

### III. Migration trans-endothéliale des leucocytes

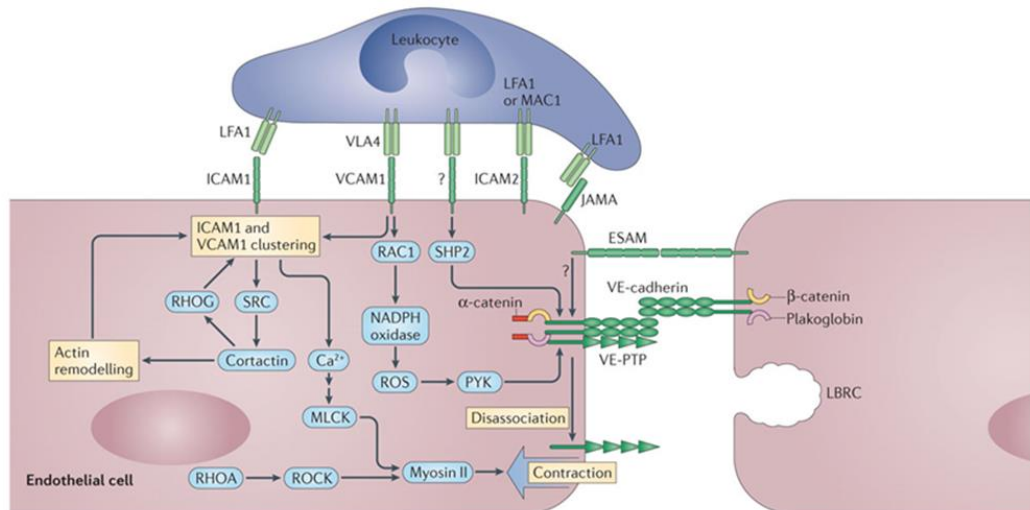
Les sites de la migration trans-endothéliale sont généralement les jonctions entre les cellules endothéliales adjacentes. Les jonctions inter-endothéliales sont transitoirement ouvertes suite à une transduction de signal au sein des cellules endothéliales déclenchée par les leucocytes. Alternativement, les leucocytes peuvent parfois transmigration par voie transcellulaire en passant directement à travers le corps de la cellule endothéliale. Le choix de la voie dépend du type cellulaire transmigration, du site de la migration trans-endothéliale et de l'intégrité des jonctions inter-endothéliales de la barrière. Ainsi, les lymphocytes T sont plus susceptibles de prendre une voie transcellulaire lorsque les jonctions sont renforcées notamment au niveau de la barrière hémato-encéphalique. (Cerutti and Ridley, 2017)

La migration trans-endothéliale implique ICAM-1 et VCAM-1 sur la surface luminale, *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) et JAMs sur la membrane basolatérale de l'endothélium. L'expression et la régulation de ces molécules dépendent de la contrainte de cisaillement du flux sanguin, des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, du réseau vasculaire. (Cerutti and Ridley, 2017)

#### 1. Rôle des molécules d'adhérences ICAM-1 et VCAM-1

Le regroupement de ICAM-1 et VCAM-1 sur les cellules endothéliales transmet un certain nombre de signaux dans la cellule endothéliale, dont certains semblent être nécessaires pour la migration trans-endothéliale des leucocytes. (Muller, 2013, 2016)

L'interaction de ICAM-1 endothéliale avec LFA-1/ $\alpha$ L $\beta$ 2 leucocytaire induit une activation des kinases Src et Pyk2 qui phosphorylent la VE-cadhérine sur les sites de liaison entre la p120 et la  $\beta$ -caténine, les résidus de tyrosine 658 et 731, respectivement. Ceci inhibe la liaison de la p120 et de la  $\beta$ -caténine à la VE-cadhérine. Puisque l'interaction de ces protéines avec la VE-cadhérine est essentielle pour retenir la VE-cadhérine à la jonction adhérente, cela déstabilise les jonctions inter-endothéliales permettant la migration trans-endothéliale des leucocytes. (Allingham et al., 2007) Suite à son interaction avec LFA-1/ $\alpha$ L $\beta$ 2, ICAM-1 active également RhoA, qui active ROCK. Cette dernière à son tour phosphoryle et inactive la protéine phosphatase 1c (PP1c), la principale phosphatase inactivant MLCK, ce qui contribue à la contraction de l'actine-myosine (**Figure 33**). (Cerutti and Ridley, 2017; Muller, 2013, 2016)



**Figure 33. Signalisation intra-endothélicale intégrines-dépendante.** L'interaction des intégrines des leucocytes LFA1/ $\alpha$ L $\beta$ 2 et VLA4/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1 avec leurs ligands endothéliaux ICAM-1 et VCAM-1 respectivement forment des regroupements des ICAM-1 et VCAM-1 soutenue par l'actine qui peut renforcer l'adhérence du leucocyte sur la cellule endothéliale. Ces regroupements de ICAM-1 et VCAM-1 déclenchent une augmentation transitoire du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire qui stimule les contractions induites par le filament d'actine-myosine, favorisant ainsi l'ouverture des jonctions inter-endothéliales. Parallèlement, VCAM-1 stimule une voie de signalisation par la production de ROS qui entraîne la dissociation de la VE-PTP de la VE-cadhérine, réduisant ainsi sa fonction adhésive. (Vestweber, 2015) ROS : espèces réactives de l'oxygène ; VE-PTP : protéine tyrosine phosphatase vasculaire endothéliale.

Parallèlement, l'interaction de VCAM-1 exprimée à la surface des cellules endothéliales avec VL-4/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1 leucocytaire favorise à leur tour la transmigration *via* une signalisation PKC $\alpha$  et ERK1/2 endothéliale aboutissant à l'activation de la phosphatase PTP1B. (Abdala-Valencia et al., 2011; Berdnikovs et al., 2012) La PTP1B peut dissocier le complexe de VE-cadhérine en déphosphorylant la  $\beta$ -caténine sur son résidu Y654. (Adam, 2015) Il a été également montré que VCAM-1 active également Rac 1 et stimule une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (de l'anglais *Reactive oxygen species* ROS) dans les cellules endothéliales qui conduit à un relâchement des jonctions adhérentes dépendant de la kinase Pyk2. (Vestweber, 2015)

Au cours de la migration trans-endothéliale des leucocytes, le regroupement membranaire des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 contribuent au changement morphologique des cellules endothéliales ce qui permet une contraction au niveau des jonctions.

## 2. Rôle de la VE-cadhérine

L'une des étapes centrales de la migration trans-endothéliale des leucocytes consiste à franchir la barrière endothéliale. La VE-cadhérine est d'une importance majeure pour la stabilité des

jonctions endothéliales. Elle forme une structure très cohésive empêchant l'infiltration des leucocytes. Ceci a été bien prouvé dans des études montrant que l'inhibition de la VE-cadhérine augmente le taux de la migration trans-endothéliale des leucocytes *in vitro* et *in vivo*. (Carmeliet *et al.*, 1999; Corada *et al.*, 1999; Zanetta *et al.*, 2005)

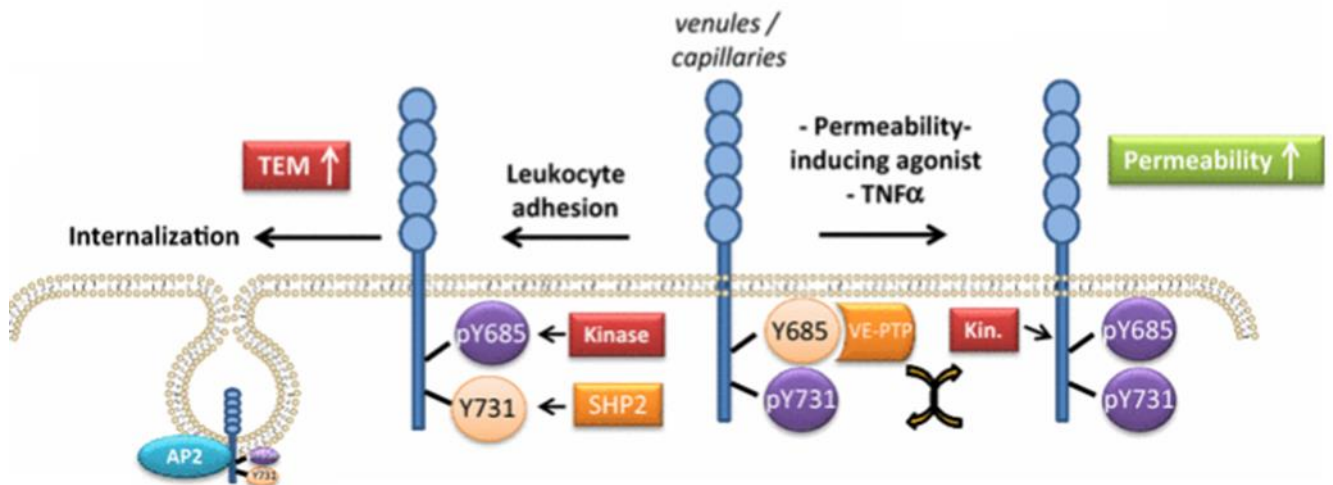
*In vitro*, en utilisant une protéine de fusion VE-cadhérine-GFP, il a été montré que la VE-cadhérine est expulsée transitoirement des jonctions des cellules endothéliales lors de la transmigration des monocytes ou des lymphocytes T. (Shaw *et al.*, 2001; Van Buul and Hordijk, 2004) D'autre part, la mutation de la VE-cadhérine au niveau des domaines d'interaction avec la p120 ou la  $\beta$ -caténine empêche l'expulsion de la VE-cadhérine des jonctions inter-endothéliales et bloque la transmigration. (Oas *et al.*, 2013)

En conditions physiologiques, la VE-cadhérine est maintenue dans un état hypo-phosphorylé dans le complexe jonctionnel grâce à l'action de la phosphatase VE-PTP qui s'associe à la VE-cadhérine *via* la plakoglobine. En conditions inflammatoires, l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales activées dissocie la VE-PTP de la VE-cadhérine. Cette dissociation a pour conséquence qu'il n'y a plus de déphosphorylation par la VE-PTP. La VE-cadhérine est donc maintenue phosphorylée facilitant ainsi la migration trans-endothéliale des leucocytes. (Muller, 2013) La dissociation entre la VE-PTP et la VE-cadhérine est nécessaire pour l'ouverture des jonctions endothéliales *in vivo*; une stabilisation sélective et inductible de l'interaction entre la VE-cadhérine et la VE-PTP inhibe la migration trans-endothéliale des leucocytes. (Broermann *et al.*, 2011) Ceci implique que la phosphorylation des tyrosines du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine et/ou de ses partenaires notamment la  $\beta$ -caténine et la plakoglobine, est nécessaire pour la régulation positive de cette voie de migration trans-endothéliale leucocytaire. (Vestweber, 2015)

La surexpression des formes mutées de VE-cadhérine qui portent des mutations ponctuelles empêchant la phosphorylation de certains résidus tyrosines tels que Y645, Y658, Y685 et Y731, inhibe la transmigration des leucocytes *in vitro* à travers les cellules endothéliales. Toutes les études ont mis en évidence l'implication du résidu Y731 par contre elles n'ont pas identifié les mêmes résidus tyrosine de VE-cadhérine comme étant impliqués. (Adam, 2015; Langer and Chavakis, 2009)

Il a été montré en utilisant des cellules endothéliales surexprimant la forme mutée Y731F-VE-cadhérine que la déphosphorylation du résidu Y731 de la VE-cadhérine est nécessaire pour une

migration trans-endothéliale efficace, indépendamment de la stimulation induite par l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$ . (Wessel *et al.*, 2014) De plus, une VE-cadhérine phosphorylée sur la tyrosine 685 et déphosphorylée sur la tyrosine 731 est internalisée par le complexe AP-2 permettant la migration trans-endothéliale du leucocyte (**Figure 34**). (Hordijk, 2016; Wessel *et al.*, 2014)



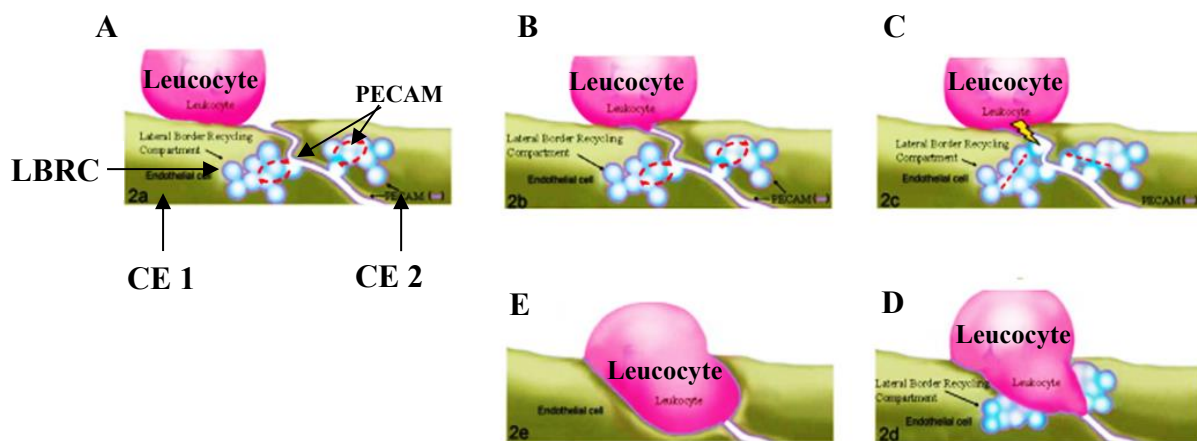
**Figure 34. La phosphorylation et l'internalisation de la VE-cadhérine dans le contrôle de la migration trans-endothéliale.** À l'état basal, la tyrosine 731 (Y731) est phosphorylée et la tyrosine 685 (Y685) est liée à la phosphatase VE-PTP et par conséquent Y685 est déphosphorylée. Cette combinaison de phosphorylation empêche la migration trans-endothéliale. Les stimuli inducteurs de la perméabilité telle que le TNF- $\alpha$  induisent une dissociation de VE-PTP permettant la phosphorylation de la Y685. L'adhérence des leucocytes induit une déphosphorylation de la Y731 par SHP2, concomitante à une phosphorylation accrue du résidu Y685. La VE-cadhérine phosphorylée sur sa Y685 et déphosphorylée sur sa Y731 est ensuite internalisée par le complexe AP2-adaptine, entraînant une disjonction des cellules endothéliales et favorisant la migration trans-endothéliale des leucocytes. (Hordijk, 2016) TEM : migration trans-endothéliale, pY685 : résidu tyrosine 685-VE-cadhérine phosphorylé, pY731 : résidu tyrosine 731-VE-cadhérine phosphorylé, VE-PTP : VE-cadhérine protéine tyrosine phosphatase, kin : kinases SHP2 : src homology 2 phosphatase, AP2 : complexe AP2.

Pour la migration trans-endothéliale paracellulaire, deux événements de signalisation surviennent une fois que le leucocyte est arrêté puis adhéré à l'endothélium : 1) L'internalisation locale de la VE-cadhérine. 2) La mobilisation de protéines membranaires incluant PECAM-1 d'un compartiment de recyclage de bordure latérale (LBRC, *Lateral Border Recycling Compartment*) au site de la migration trans-endothéliale. (Muller, 2013, 2016)

### 3. Compartiment de recyclage de la bordure latérale

Un compartiment multivésiculaire localisé à l'intérieur des cellules endothéliales et directement lié à la membrane plasmique, appelé compartiment de recyclage de la bordure latérale (LBRC),

peut favoriser la migration trans-endothéliale des leucocytes (**Figure 35**). Le déplacement de ce compartiment à la surface cellulaire au fur et à mesure de la migration trans-endothéliale facilite le passage des leucocytes transmigraant à travers les jonctions. Il a été également montré que le relâchement des jonctions endothéliales adhérentes par une brève chélation du calcium conduit à une sortie diffuse du LBRC le long de la bordure de la cellule endothéliale (*Muller, 2016; Vestweber, 2015*) Ce compartiment peut contenir PECAM-1, CD99 et JAM-A mais pas la VE-cadhérine.



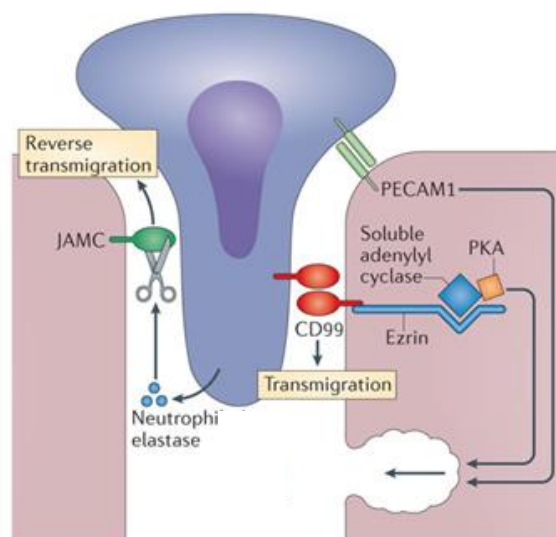
**Figure 35. Rôle du compartiment de recyclage de la bordure latérale dans la migration trans-endothéliale** La capture du leucocyte déclenche la mobilisation des vésicules du LBRC vers les jonctions inter-endothéliales augmentant ainsi la surface de la membrane au niveau de ces sites. Cet effet est lancé par PECAM1 qui est localisée au niveau des jonctions inter-endothéliales et dans les LBRC. **(A)** Migration des leucocytes vers les jonctions, à ce même endroit un recyclage consécutif du LBRC a lieu. **(B)** Les PECAM endothéliales et leucocytaires interagissent entre elles. **(C)** cette interaction déclenche un signal (éclair jaune) qui dirige les vésicules de LBRC vers les sites de transmigration du leucocyte. **(D)** les vésicules LBRC entourent le leucocyte entre deux cellules endothéliales adjacentes. **(E)** Le recyclage de LBRC continue au fur et à mesure du cheminement du leucocyte à travers la bordure entre les cellules endothéliales. (*Muller, 2013*) CE : cellule endothéliale.

Le trafic de vésicules LBRC vers les jonctions inter-endothéliales est initialement déclenché par les leucocytes à travers une interaction homophile entre PECAM endothéliale et PECAM leucocytaire. Cette molécule d'adhérence est toujours accessible par un recyclage effectué entre les jonctions et le plasmalemme sous-jonctionnel au niveau de la zone active de la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Muller, 2013*) Des anticorps spécifiques neutralisants anti-PECAM-1 bloquent la diapédèse des monocytes et des neutrophiles à différents stades de la migration trans-endothéliale, en fonction du domaine protéique avec lequel ils interagissent. Les anticorps qui se lient au premier domaine amino-terminal de PECAM-1 bloquent les monocytes *in vitro* à une position apicale au niveau des jonctions endothéliales, alors que les

anticorps qui se lient au sixième domaine immunoglobuline de PECAM-1 induisent l'accumulation des leucocytes entre les cellules endothéliales et la membrane basale. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* chez la souris. (Muller, 2016)

Suite à l'initiation de la migration trans-endothéliale, une deuxième vague de trafic de vésicules est déclenchée par CD99. Ce mécanisme repose sur un complexe associé à CD99 contenant de l'eitrine, une protéine qui se lie à l'actine du cytosquelette, une adénylyl cyclase soluble et une PKA (Figure 36). (Watson et al., 2015)

De manière similaire à PECAM1, CD99 a été mis en évidence à la fois sur les monocytes et sur les cellules endothéliales. L'interaction homophile entre les deux molécules CD99, l'une sur un leucocyte et l'autre sur une cellule endothéliale a été démontrée comme étant nécessaire à la transmigration. L'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-CD99 humain *in vitro* bloque sélectivement la migration des monocytes au travers d'une monocouche de cellules endothéliales HUVEC. (Muller, 2016; Schenkel et al., 2002) D'autre part, l'injection d'anticorps anti- CD99 chez la souris inhibe l'infiltration des lymphocytes T dans la peau inflammée et le recrutement des neutrophiles dans le péritoine inflammé chez la souris. (Bixel et al., 2007; Muller, 2016)



**Figure 36. Transmigration et transmigration inverse.** L'Interaction homophile entre CD99 endothéliale et leucocytaire déclenche un signal *via* l'adénylyl cyclase soluble et la PKA et l'eitrine. Le passage des leucocytes à travers les jonctions inter-endothéliales est rendu irréversible par la JAM-C. Les neutrophiles secrètent de l'élastase qui clive JAM-C favorisant ainsi sa transmigration inverse. (Vestweber, 2015) JAM-C : molécule d'adhérence jonctionnelle-C, PKA : protéine kinase A.



Le processus de la migration trans-endothéliale des leucocytes est rendu irréversible par la molécule d'adhérence jonctionnelle C (JAM-C). En effet, il a été montré que la perte de l'expression ou de la fonction de JAM-C favorise la transmigration inverse du côté abluminal vers le côté luminal de l'endothélium. Ainsi, en cas de lésion d'ischémie-reperfusion, les leucotriènes (LTB 4), médiateurs lipidiques impliqués dans la régulation de la réponse inflammatoire, déclenchent la sécrétion de l'élastase par les neutrophiles, ce qui provoque la dégradation de JAM-C et favorise la transmigration inverse. (*Vestweber, 2015*)

La migration trans-endothéliale des leucocytes est un phénomène bien complexe, impliquant une multitude de protéines (**Tableau 1**). La majorité des protéines effectrices endothéliales interviennent dès la première étape du recrutement des leucocytes ce qui suggère que leur régulation pourrait être initiée dès l'immobilisation des chimiokines telles que RANTES/CCL5 sur leurs récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales.

Adhesion receptor	Gene family	Leukocyte ligand(s)	Endothelial ligand(s)	Functions
E-selectin	Selectin	PSGL1, CD44 and ESL1	None	Capturing and rolling of leukocytes, and triggering integrin activation
P-selectin	Selectin	PSGL1	None	Capturing and rolling of leukocytes, and triggering integrin activation
ICAM1	Immunoglobulin superfamily	LFA1 and MAC1	None	Rolling, adhesion and crawling of leukocytes, and triggering VE-cadherin phosphorylation
VCAM1	Immunoglobulin superfamily	VLA4	None	Rolling, adhesion and crawling of leukocytes, and triggering VE-cadherin phosphorylation
ICAM2	Immunoglobulin superfamily	LFA1 and MAC1	None	Leukocyte crawling and initiation of diapedesis
JAMA	Immunoglobulin superfamily	LFA1	JAMA	Leukocyte diapedesis
JAMB	Immunoglobulin superfamily	VLA4 in combination with JAMC	JAMC and JAMB	Unknown
JAMC	Immunoglobulin superfamily	MAC1	JAMB and JAMC	Prevents reverse transmigration of leukocytes
ESAM	Immunoglobulin superfamily	Unknown	ESAM	Leukocyte diapedesis and supporting the induction of increased permeability
PECAM1	Immunoglobulin superfamily	PECAM1	PECAM1	Triggering LBRC recycling in endothelial cells; supporting disconnection of leukocytes from endothelial cells and passage through the basement membrane
CD99	Unique	CD99	CD99	Triggering LBRC recycling in endothelial cells; supporting disconnection of leukocytes from endothelial cells and passage through the basement membrane
CD99L2	Unique	Possibly CD99L2	CD99L2	Supporting disconnection from endothelial cells and passage through the basement membrane
VE-cadherin	Cadherin	None	VE-cadherin	Endothelial cell junctional barrier and prevention of leukocyte diapedesis
PVR	Immunoglobulin superfamily	DNAM1	Unknown	Leukocyte diapedesis; functions sequentially between PECAM1 and CD99
CD47	Immunoglobulin superfamily	SIRP $\gamma$	Unknown	Leukocyte diapedesis and promotion of VE-cadherin tyrosine phosphorylation
VAP1	Monoamine oxidase	SIGLEC10	None	Monoamine oxidase ectoenzyme; mediation of adhesion and binding to SIGLEC10
MCAM (also known as CD146)	Immunoglobulin superfamily	MCAM	MCAM	Adhesion and lymphocyte recruitment into inflamed CNS
Endoglin	Unique (similar to $\beta$ -glycan)	Integrin $\alpha 5\beta 1$	None	Adhesion of leukocytes
Nepmucin	Immunoglobulin superfamily	L-selectin	Nepmucin	Capturing and diapedesis of leukocytes; expression on HEVs

**Tableau 1.** Les différentes protéines membranaires endothéliales étudiées pour leur implication dans la migration trans-endothéliale. (Vestweber, 2015)

## E. Rôle physiologique de RANTES et thérapies

### I. Expression cellulaire de RANTES/CCL5

La CC chimiokine RANTES/CCL5 est une petite protéine de 7,8 kDa qui joue un rôle important dans de multiples processus physiologiques et physiopathologiques notamment dans le recrutement des leucocytes. RANTES/CCL5 intervient dans la chimiotaxie et la migration des cellules, y compris les cellules immunitaires telles que les leucocytes (lymphocytes T mémoires, les éosinophiles, les basophiles, les mastocytes et les monocytes), les cellules dendritiques et les cellules tumorales. (*Appay and Rowland-Jones, 2001; Appay et al., 1999; Khalid et al., 2015; Soria et al., 2012; Velasco-Velázquez et al., 2014*)

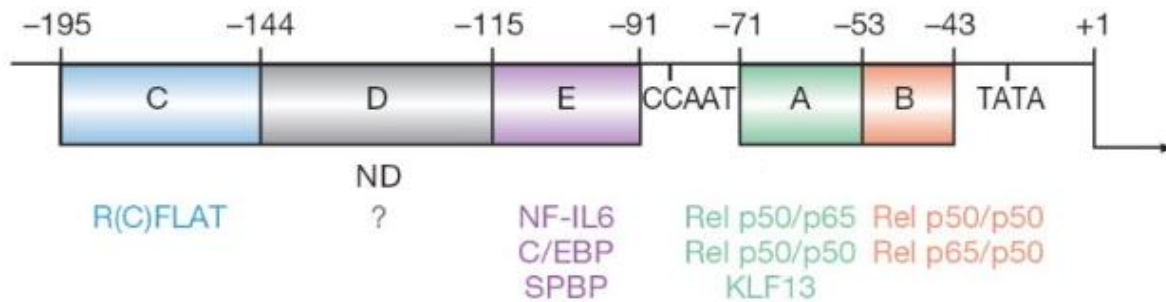
L'expression de RANTES/CCL5 varie selon le type cellulaire. Cette chimiokine pro-inflammatoire est exprimée dans les heures suivant la stimulation des cellules endothéliales, des cellules épithéliales, des fibroblastes, des cellules musculaires lisses ou des monocytes. En revanche, les lymphocytes T naïfs expriment tardivement RANTES/CCL5, 3 à 5 jours après leur activation, alors que les lymphocytes T mémoire CD8<sup>+</sup> l'expriment de manière constitutive. Ce profil d'expression inhabituel lui confère un rôle important dans le maintien de l'inflammation et facilite ainsi l'expansion de l'infiltration des leucocytes dans l'espace et dans le temps. (*Krensky and Ahn, 2007; Marçais et al., 2006; Walzer et al., 2003*)

Les lymphocytes T expriment la chimiokine RANTES/CCL5 suite à leur activation avec l'interleukine-2 (IL-2). (*Krensky and Ahn, 2007*) tandis que l'expression de RANTES/CCL5 par les fibroblastes péritonéaux est due à un effet synergique entre l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), le TNF- $\alpha$  et/ou l'IL-1 $\beta$ . (*Kawka et al., 2014*) Quant aux cellules endothéliales, l'expression de RANTES dépend du TNF- $\alpha$  et de l'INF- $\gamma$ . (*Hirano et al., 2003; Marfaing-Koka et al., 1995; Øynebråten et al., 2015*)

### II. Régulation transcriptionnelle de RANTES/CCL5

L'expression de RANTES/CCL5 peut être régulée par différents facteurs de transcriptions (**Figure 37**). Par exemple dans les macrophages, l'expression génique de RANTES/CCL5 est principalement régulée par les hétérodimères p50/p65 se liant à une séquence consensus *NF $\kappa$ B response element* (NRE) sensible à NF $\kappa$ B, présente dans le promoteur du gène codant pour RANTES/CCL5. (*Yeligar et al., 2009*) Les facteurs de transcription les plus connus qui régulent

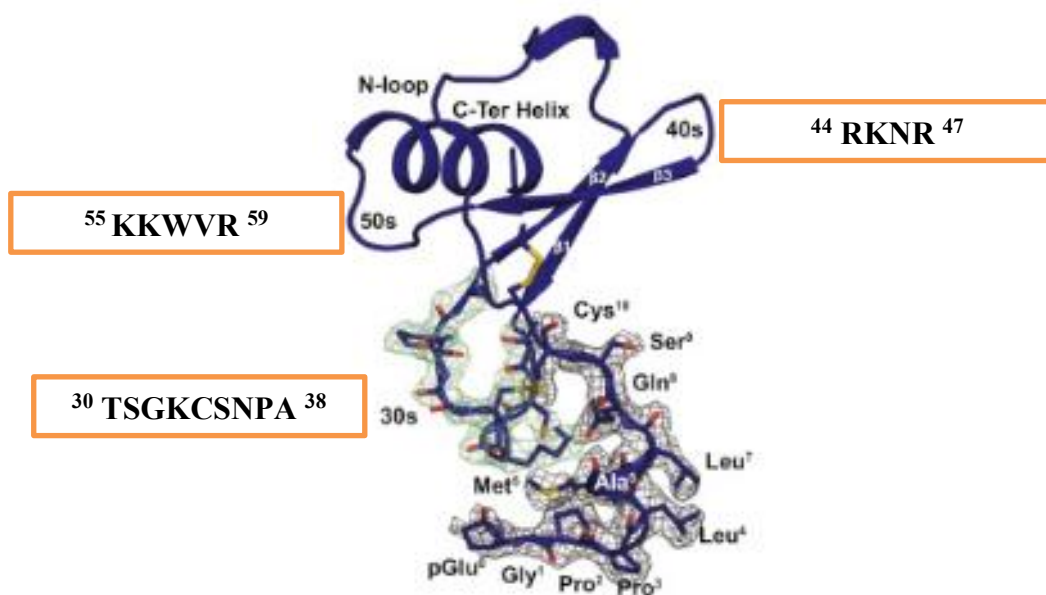
la transcription de RANTES/CCL5 dans les lymphocytes T sont : *Nuclear Factor of Activated T cells 1* (NFAT1), *Nuclear Factor of Interleukin 6* (NF-IL6) et *Kruppel-like factor 13* (KLF13). Dans les cellules musculaires lisses, l'expression de RANTES/CCL5 dépend de Y-box1. (Krensky and Ahn, 2007; Velasco-Velázquez et al., 2014)



**Figure 37. Promoteur de RANTES/CCL5 et séquences d'interaction entre des séquences consensus du promoteur et des facteurs de transcription régulant l'expression de RANTES/CCL5.** Plusieurs facteurs de transcription peuvent interagir avec le promoteur de RANTES/CCL5 notamment NF-IL6, RFLAT-1, NFAT-1, NFκB et KLF13. Les régions en différentes couleurs ont été nommées de A à E au fur à mesure de leur découverte. (Krensky and Ahn, 2007)

### III. Structure

RANTES/CCL5 est une protéine de 68 acides aminés (AA). Les 20 premiers AA de sa structure monomérique constituent un domaine N-terminal flexible, un court brin  $\beta$  ( $\beta_0$ ) et la boucle N qui est impliquée dans l'interaction avec les récepteurs protéiques. Cette dernière est suivie d'une hélice  $3_{10}$  (AA 21-23). À cela s'ajoutent trois brins  $\beta$  antiparallèles  $\beta_1$ -3 (AA 24-55) et une hélice  $\alpha$  COOH-terminale (AA 55-68). Ces régions sont reliées entre elles par des boucles 30s ( $^{30}$  TSGKCSNPA  $^{38}$ ), 40s ( $^{44}$  RKNR  $^{47}$ ) et 50s ( $^{55}$  KKWVR  $^{59}$ ) (**Figure 38**). La structure tridimensionnelle de la protéine mature sécrétée est stabilisée par deux ponts disulfures formés entre les cystéines en position 10 et 11 avec les cystéines en position 34 et 50. (Kramp et al., 2013; Liang et al., 2016; Vangelista et al., 2008)



**Figure 38. Structure de RANTES.** La chimiokine RANTES/CCL5 sous forme de monomère comporte un domaine N-terminal contenant un court feuillet  $\beta_0$  (non illustré), la boucle N (N-loop) qui est impliquée dans l'interaction avec les récepteurs protéiques (RCPGs), la boucle 30s (<sup>30</sup> TSGKCSNPA <sup>38</sup>), qui relie les brins  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , la boucle 40s (<sup>44</sup> RKNR <sup>47</sup>) qui interagit avec les glycosaminoglycannes, reliant  $\beta_2$  avec  $\beta_3$  et une boucle 50s (<sup>55</sup> KKWVR <sup>59</sup>) qui relie le feuillet  $\beta_3$  à l'hélice  $\alpha$  dans la partie C-terminale. *Modifié à partir (Zheng et al., 2017)*

#### IV. Interaction de RANTES/CCL5 avec ses récepteurs

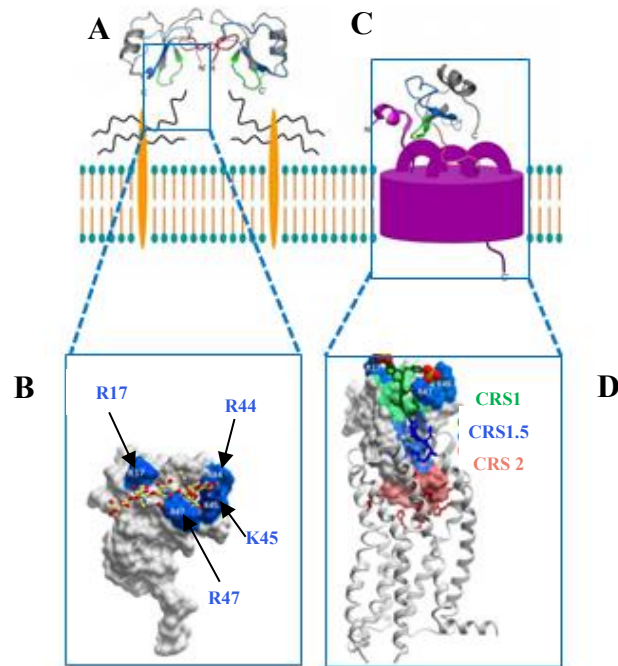
RANTES/CCL5 interagit avec des RCPGs classiques (CCR1, CCR3, CCR5 et RPG75), des récepteurs atypiques aCKR1 (DARC), aCKR2 (D6) et CCRL2) exprimés de manière variable par différents types cellulaires. (*Velasco-Velázquez et al., 2014*)

De nombreuses études de mutagenèse de RANTES/CCL5 et d'autres chimiokines ont montré que les résidus de la boucle N sont importants pour la liaison et l'activation de leurs récepteurs. Par exemple, l'arginine en position 17 (R17) est impliquée dans l'interaction de RANTES/CCL5 avec CCR1, la phénylalanine 12 (F12) dans son interaction avec CCR3. L'interaction de RANTES/CCL5 avec CCR5, dépend de l'isoleucine 15 (I15) de la boucle N et de la proline 2 (P2) du domaine N-terminal. (*Pakianathan et al., 1997; Vangelista et al., 2008*)

RANTES/CCL5, par le biais de sa boucle N et sa boucle 40s, interagit avec le premier site de reconnaissance des chimiokines (CRS1) au niveau de la boucle externe ECL2 de CCR5. À



l'aide de sa boucle 30s, RANTES/CCL5 interagit avec la troisième boucle externe ECL3 de CCR5 au niveau du site intermédiaire (CRS 1.5). L'extrémité N-terminale flexible de la chimiokine RANTES/CCL5 interagit avec le deuxième site de reconnaissance (CRS2) au niveau du TM4 du CCR5. Comme expliqué précédemment, ce sont les AA R44, K45, R47 et R17 de RANTES/CCL5 qui permettent son interaction avec les GAGs (**Figure 39**). (*Zheng et al., 2017*)



**Figure 39. Représentation schématique des modèles d'interaction d'un dimère de RANTES/CCL5 avec un RCPG et des protéoglycanes membranaires.** (A) chaque monomère interagit avec les GAGs (noir) des protéoglycanes membranaires essentiellement *via* la boucle 40s (vert). (B) Modèle d'interaction de RANTES/CCL5 avec des GAGs (un hexasaccharide de chondroïtine sulfate). (C) RANTES/CCL5 interagit avec CCR5 (Violet) *via* la boucle N (N loop) et la boucle 40s (vert) et N-boucle/β1 (bleu) quant à son extrémité N-terminale (rouge) est intégrée dans l'hélice transmembranaire de CCR5. (D) Structure de CCR5 liée à un variant de RANTES/CCL5 avec une extrémité N-terminale modifiée (PDB ID 5UIW). Les sites de reconnaissance des chimiokines 1, 1.5 et 2 (CRS1, CRS1.5 et CRS2) sont présentés en vert, bleu et saumon respectivement. Dans le CRS1, les résidus qui contribuent à la liaison aux GAGs sont surlignés en bleu foncé (résidus R44, non visibles), K45 et R47 du motif BBXB en boucle R17 et 40s). Les tyrosines sulfatées sont mises en évidence sous la forme de sphères orange et jaune qui interagissent avec l'amas de boucle 40 et R17. *Modifié à partir (Proudfoot et al., 2017; Vangelista et al., 2008)* CRS : site de reconnaissance de chimiokine, R :arginine, K :lysine.

À faible concentration, RANTES/CCL5 circulant est monomérique ou dimérique dans le sérum. En revanche à forte concentration, RANTES/CCL5 forme des oligomères d'ordre supérieur (polymère). Il a été montré que les cellules endothéliales sécrètent RANTES/CCL5 et que cette chimiokine se lie à la surface de ces cellules en formant des filaments bien ordonnés

qui s'allongent avec le temps. Cette structure a été mise en évidence par microscopie confocale. (*Øynebråten et al., 2015*)

Les AA glutamines E26 et E66 sont impliqués dans cette oligomérisation. En effet, RANTES/CCL5 muté sur l'un de ces deux résidus est incapable de s'oligomériser. L'interaction de RANTES/CCL5 avec les GAGs est également importante pour son oligomérisation. (*Martin et al., 2001; Proudfoot et al., 2003, 2017*)

Des études structurales ont montré que l'oligomérisation des chimiokines et notamment celle de RANTES/CCL5, peut moduler l'affinité entre les chimiokines et leurs séquences d'interaction au niveau des GAGs. RANTES/CCL5 sous sa forme dimérique interagit avec les GAGs essentiellement *via* le motif BBXB en boucle 40s (<sup>44</sup>RKNR<sup>47</sup>) mais peut interagir également *via* la boucle 30s et son extrémité N-terminale. (*Proudfoot et al., 2001, 2017; Shaw et al., 2004*) La même forme de RANTES/CCL5 est capable d'interagir avec un hexasaccharide CS par le biais de la boucle 40s et la partie N-terminale du dimère. (*Deshauer et al., 2015*) Cependant, dans le cas de RANTES/CCL5 sous sa forme d'oligomère, c'est le motif <sup>55</sup>KKWVR<sup>59</sup> de la boucle 50s qui joue un rôle prédominant dans l'interaction de RANTES/CCL5 avec un hexasaccharide d'héparine, tandis que le motif de la boucle 40s est inaccessible. (*Liang et al., 2016*)

## **V. Les co-récepteurs protéoglycaniques de RANTES/CCL5**

### **1. Sélectivité de RANTES/CCL5 pour les GAGs**

De par sa composition (5 lysines et 5 arginines), RANTES/CCL5 est fortement chargée positivement. La charge positive de RANTES/CCL5 contribue à renforcer son interaction avec des GAGs chargés négativement. RANTES/CCL5 est très sélective vis-à-vis des familles de GAGs, couramment présents sur les surfaces cellulaires : l'affinité varie avec l'ordre de classement suivant : 1. héparine (Hp), 2. héparane sulfate (HS) et chondroïtine sulfate- (CS) C, 3. CS-B et 4) CS-A. L'affinité pour différents GAGs est très variable, RANTES lie l'héparine avec une affinité environ 1000 fois supérieure à celle de la CS-A. (*Martin et al., 2001*)

### **2. Les syndecanes protéoglycanes à chaîne héparane sulfate**

Les protéoglycanes (PG) sont constitués d'une protéine centrale sur laquelle sont greffées des chaînes de GAGs HS, CS, dermatane sulfate (DS) et/ou kératane sulfate (KS). (*Couchman,*

2010) Il existe 4 classes de PG : 1) matricielles (extracellulaires) comme le versicane, 2) membranaires comme les syndécanes, 3) intracellulaires comme la serglycine ou 4) circulants (solubles) comme l'endocane. (Iozzo and Schaefer, 2015)

### 2.1. L'expression des syndécanes

Les syndécanes (SDC) sont des protéoglycanes transmembranaires à chaînes HS. Il existe quatre SDCs chez les vertébrés, les SDC-1, -2 et -3 (tissu-spécifique) et le SDC-4 (ubiquitaire) exprimé à la membrane plasmique. Le SDC-1 est largement exprimé dans les cellules épithéliales et plasmatiques ; il est connu pour son implication dans le développement du myélome. (Khotskaya et al., 2009) Le SDC-2 est principalement exprimé par les fibroblastes, les cellules neuronales, et endothéliales ; il est impliqué dans l'angiogenèse *via* ses interactions avec le VEGF, l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) et le FGF-2. (Chen, 2004) Quant au SDC-3, il est fortement exprimé dans les cellules progénitrices mésenchymateuses et squelettiques ; ce syndécane est impliqué dans la formation osseuse endochondrale et régule la prolifération des cellules squelettiques. (Pacifci et al., 2005)

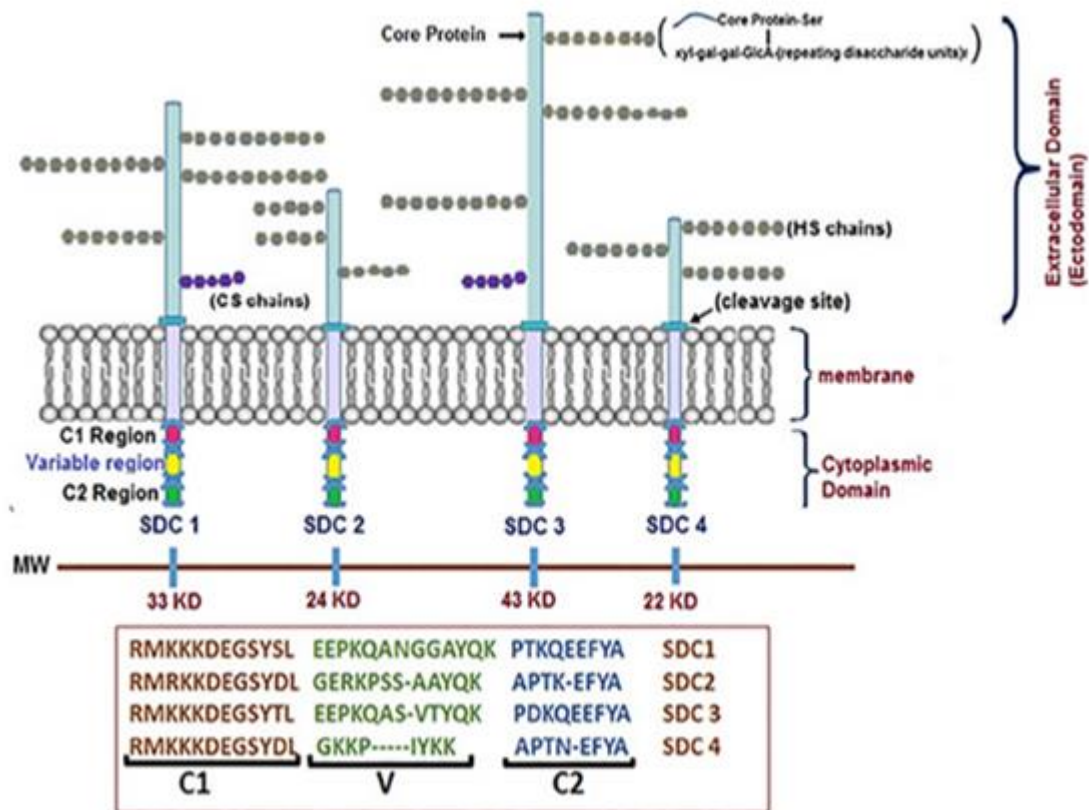
### 2.2. Structure des syndécanes

Chaque syndécane possède un domaine cytoplasmique court, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire qui varie selon chaque type de SDCs avec des sites de fixation de trois à cinq chaînes HS ou des chaînes CS (**Figure 40**). (Afratis et al., 2017; Couchman et al., 2015)

La présence de chaînes HS permet des interactions avec les *heparin binding proteins*, telles que le FGF, le VEGF, le TGF- $\beta$ , et le *Platelet-driven Growth Factor* (PDGF). En outre, les HS facilitent les interactions avec diverses protéines de la MEC dont la fibronectine et les protéines plasmatiques telles que l'antithrombine-1. (Binch et al., 2016; Couchman, 2010)

Les quatre isoformes du SDC comportent une protéine centrale d'environ 20-25 kDa qui constitue le domaine transmembranaire (**Figure 40**). Ce dernier contient un motif de dimérisation (GxxxG) qui intervient à la fois dans l'homo- et l'hétéro-dimérisation. (Kwon et al., 2016) Certaines protéines sont capables d'interagir directement avec la protéine centrale des SDCs tel que le TGF - $\beta$ , et les intégrines afin d'améliorer l'adhérence cellulaire. (Afratis et al., 2017)





**Figure 40. Structure des syndécanes.** Les quatre syndécanes (SDC-1, SDC-2, SDC-3, SDC-4) sont constitués d'un domaine extracellulaire (bleu) qui porte des chaînes GAGs (HS, en gris et/ou CS en violet), un domaine transmembranaire (bleu violet) et un domaine intracellulaire (multicolore) avec 3 régions C1 (rouge), V (jaune) et C2 (verte) (Agere et al., 2017) HS : héparane sulfate, CS : chondroïtine sulfate.

Deux régions hautement conservées (C1 et C2) séparées par une région variable (V) caractérisent le domaine intracellulaire des syndécanes. La région V détermine une signalisation distincte à chaque SDC (**Figure 40**). Les 4 membres de la famille des SDC possèdent à leur extrémité C-terminale une séquence EFYA, qui leur permet d'interagir avec les protéines à domaine PDZ. Ce type de protéines est connu pour leur contribution à l'ancrage des protéines transmembranaires au cytosquelette, et au maintien de l'ensemble des grands complexes de signalisation. (Iozzo and Schaefer, 2015)

Une expression dérégulée des SDC est souvent observée dans de nombreuses pathologies notamment le cancer, l'infection au VIH et dans les maladies inflammatoires. L'implication des SDCs dans la progression de ces pathologies est liée à ses interactions avec une large gamme de ligands qui lui confère une liste étendue d'activités. Les SDCs contrôlent les interactions

cellule-cellule, cellule-pathogène (comme le VIH) et cellule-MEC. De plus, ils sont impliqués dans la réorganisation du cytosquelette et favorisent la migration cellulaire. Les SDCs possèdent également une fonction de co-récepteur. Ainsi, les SDCs peuvent interagir directement avec les chimiokines pour améliorer l'interaction de ces dernières à leurs récepteurs protéiques et la transmission du signal en aval. (Agere et al., 2017; Cheng et al., 2016) Il a été précédemment montré par notre équipe de recherche que RANTES/CCL5 interagit avec le SDC-1 et le SDC-4 et que ce dernier est un co-récepteur fonctionnel de RANTES. (Maillard et al., 2014; Suffee et al., 2012)

### **3. Le syndécan-4**

Chez l'Homme, le gène codant pour le SDC-4 est localisé sur la région q13 du chromosome 20. L'invalidation génétique du SDC-4 chez les souris n'est pas létale. Cependant, les souris déficientes en SDC-4 ont une réparation tissulaire altérée liée à une dérégulation de l'angiogenèse. (Couchman et al., 2015)

Le SDC-4 est fortement impliqué dans les pathologies vasculaires. Il a été montré qu'en conditions inflammatoires, que ce soit sous l'effet de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$  ou du LPS, le SDC-4 est surexprimé en raison d'une régulation de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B. (Couchman, 2010; Strand et al., 2013)

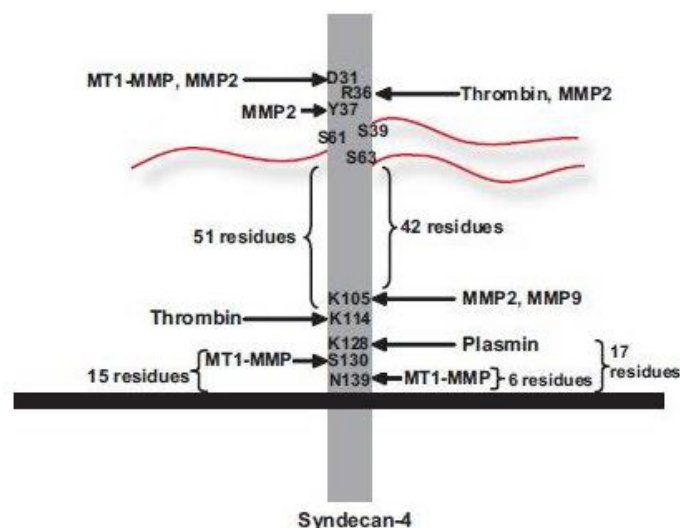
Il a été montré que le SDC-4 joue un rôle important dans l'inflammation. Les souris déficientes (SDC-4<sup>-/-</sup>) présentent un taux de mortalité élevée après injection intrapéritonéale de LPS à une dose de 10 mg/kg par rapport aux souris sauvages. (Ishiguro et al., 2001) Après induction d'un infarctus du myocarde, les souris dont le gène SDC-4 a été invalidé présentent une diminution de l'inflammation et une fibrose tissulaire au niveau du cœur. (Xie et al., 2012)

#### **3.1. Le domaine extracellulaire du SDC-4**

Le domaine extracellulaire du SDC-4 lui permet de remplir trois fonctions au niveau membranaire. Il permet de stabiliser les interactions ligand-récepteur. Il a été montré que le SDC-4 prolonge l'interaction du FGF-2 avec son récepteur FGFR ce qui permet d'amplifier la signalisation induite par la liaison de ce facteur de croissance à son récepteur. (Elfenbein and Simons, 2013) De plus, le SDC-4 en interagissant avec des chimiokines permet la formation d'un gradient de concentration de chimiokines favorisant leur présentation à leurs récepteurs couplés aux protéines G. (Alexopoulou et al., 2007)

Tout comme les autres isoformes, le SDC-4 subit un clivage protéolytique de son domaine extracellulaire, ce qui lui permet de jouer un rôle important dans la signalisation extracellulaire en agissant comme un effecteur autocrine ou paracrine. Grâce à ses chaînes GAGs intactes, le SDC-4 clivé préserve ses interactions avec ses ligands notamment les facteurs de croissance. (Couchman *et al.*, 2015; Strand *et al.*, 2013)

Il existe différents sites de clivage au sein du SDC-4 situés soit au niveau des quarante AA constituant la région juxta-membranaire soit en amont des résidus sérines servant à la fixation des chaînes HS. Différentes protéases notamment les métalloprotéases (MMP-2, MMP-9), ADAM-17, thrombine ou plasmine sont impliquées dans le clivage de l'ectodomaine du SDC-4 (**Figure 41**). (Couchman, 2010; Manon-Jensen *et al.*, 2013) Il a été montré que les protéinases ADAMTS-1 et ADAMTS-4 clivent le SDC-4 près de l'extrémité N-terminale du premier site de fixation de la chaîne HS. (Agere *et al.*, 2017)



**Figure 41. Clivage protéolytique de l'ectodomaine du SDC-4.** Un ensemble d'enzymes matricielles telles que les métalloprotéases MMP-2, -7, -9, la thrombine ou la plasmine sont capables de cliver le SDC-4 et libérer son ectodomaine en préservant les chaînes GAGs intactes. (Manon-Jensen *et al.*, 2013) MMP : métalloprotéases matricielles.

Le clivage protéolytique aboutissant à la libération du domaine extracellulaire se fait de manière constitutive et peut s'accélérer en conditions inflammatoires. Le SDC-4 soluble peut agir comme un inhibiteur compétitif du SDC-4 membranaire. En effet, le SDC-4 soluble ou membranaire interagit de la même manière avec les mêmes ligands. Le SDC-4 membranaire pourrait favoriser la prolifération et l'angiogenèse, tandis que sa forme soluble régulerait négativement le processus angiogénique et prolifératif. (Alexopoulou et al., 2007; Binch et al., 2016)

Le domaine extracellulaire, **libéré**, du SDC-4 est impliqué dans le processus de cicatrisation en agissant en synergie avec la Ténascine-C, une protéine matricielle, afin d'entraîner une contraction de la MEC. (Elfenbein and Simons, 2013) De plus, la surexpression du SDC-4 dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat a montré une augmentation de la forme clivée du SDC-4 par rapport au rat sauvage sain. Cette augmentation de forme soluble est accompagnée d'une néovascularisation *via* l'activation des cellules endothéliales et une diminution de l'inflammation traduite par une diminution des taux de MCP-1 et TGF- $\beta$  accompagnée d'une réduction de l'infiltration des cellules inflammatoires CD45<sup>+</sup> dans la zone péri-infarctus. (Xie et al., 2012) De plus, dans le cadre d'une étude de chimiotaxie *in vitro*, il a été montré que l'ectodomaine isolé et purifié des SDCs notamment celui du SDC-4 amplifie la migration de neutrophiles induite par MIP-2/CXCL2 d'une façon GAGs dépendante. Il est à noter que l'ectodomaine seul, en absence de chimiokine, n'a présenté aucun effet sur la chimiotaxie. (Park, 2018)

### **3.2. Le domaine transmembranaire du SDC-4**

Grâce à son domaine transmembranaire, le SDC-4 permet de faire le lien entre la MEC et le cytosquelette ainsi que les protéines de signalisation. Il a été montré que le SDC-4 est impliqué dans la formation et la stabilisation de contacts focaux qui représentent les points de contact et donc d'adhérence entre la membrane plasmique de la cellule et la MEC. La formation de ces contacts avec la MEC se fait, par le biais d'une signalisation dépendante de la PKC $\alpha$  et de RhoA, suite à l'interaction du domaine cytoplasmique du SDC-4 avec les protéines associées à l'actine. (Couchman et al., 2015)

Le SDC-4 s'oligomérisse grâce à son motif d'oligomérisation GGIVG, permettant l'initiation des voies de signalisation en aval. Le SDC-4 est localisé dans des zones définies de la membrane plasmique : les radeaux lipidiques. Les radeaux lipidiques représentent un microdomaine riche

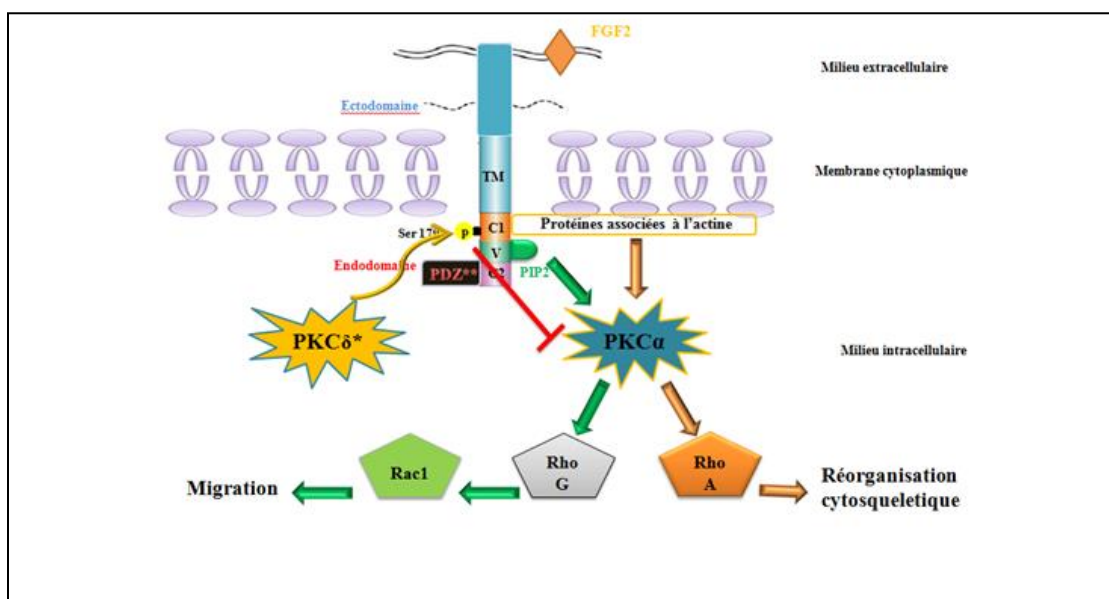
en cholestérol et en sphingolipide, permettant une bonne interaction avec les protéines adaptatrices et les effecteurs de signalisation intracellulaire. (*Elfenbein and Simons, 2013; Kwon et al., 2016*)

### 3.3. Le domaine intracellulaire du SDC-4

Le domaine intracellulaire du SDC-4 lui confère la capacité d'interagir avec de nombreux partenaires. La région C1 du SDC-4 permet la fixation au cytosquelette de la cellule *via* les microfilaments d'actine. Par ailleurs, la région C2 permet son interaction avec des protéines à domaine PDZ telles que la synectine, la synbindine et la synténine. La région variable du SDC-4 interagit avec le PIP2 et le domaine catalytique de la PKC $\alpha$ . (*Koo et al., 2006; Lambaerts et al., 2009*) Ces différentes interactions permettent d'initier un large éventail de processus de signalisation aboutissant à de différents effets biologiques.

Le SDC-4 régule la migration cellulaire par le biais de son domaine intracellulaire. À l'état basal, Le SDC-4 inhibe la migration cellulaire en recrutant RhoGDI *via* son domaine cytoplasmique. RhoGDI se fixe sur les Rho GTPases et inhibe leur activation. En revanche, l'interaction du SDC-4 avec la fibronectine, induit l'activation des Rho GTPases dépendantes de la PKC $\alpha$  et favorise le processus migratoire. (*Elfenbein and Simons, 2013*)

Il a été montré que l'interaction du SDC-4 avec le FGF-2, active une voie de signalisation propre au SDC-4 et indépendamment du FGFR. La fixation du FGF-2 va entraîner la déphosphorylation de la sérine 179 (S179 chez l'homme, S183 chez le rat) du SDC-4 par la phosphatase PP1 ou PP2A, permettant le recrutement du PIP2 au niveau du domaine V et facilitant l'oligomérisation du SDC-4. L'oligomérisation de plusieurs SDC-4 induite par le PIP2 va entraîner une activation de la PKC $\alpha$  puis un réarrangement de l'actine du cytosquelette nécessaire à la migration des cellules endothéliales. De plus, l'activation de la PKC $\alpha$  va entraîner une cascade de signalisation qui conduit à l'activation de RhoA/RhoG puis de Rac1. (*Elfenbein and Simons, 2013; Horowitz and Simons, 1998; Horowitz et al., 2002*) La PKC $\delta$  quant à elle, phosphoryle la S179 qui en activant la PKC $\alpha$ , participe à l'arrêt de la signalisation du SDC-4 (**Figure 42**). (*Bass and Humphries, 2002; Murakami et al., 2002*)



**Figure 42. Implication du domaine intracellulaire du SDC-4 dans la signalisation du FGF2.** L'interaction du FGF2 avec le SDC-4 induit la déphosphorylation sur la S179 de la région C1 du SDC-4 aboutissant au recrutement du PIP2 et à une oligomérisation du SDC-4 ce qui active la PKC $\alpha$ . À son tour la PKC $\alpha$  active des voies Rho GTPases et induit différents effets biologiques dont la réorganisation du cytosquelette et la migration cellulaire. La phosphorylation de la S179 *via* la PKC $\delta$  met un terme à cette signalisation. (Horowitz *et al.*, 2002; Maillard *et al.*, 2014; Murakami *et al.*, 2002)

La redistribution du SDC-4 au niveau des radeaux lipidiques membranaires génère un moyen potentiel pour contrôler l'initiation et la durée de la signalisation induite par la liaison du FGF-2 au SDC-4. En effet, ce complexe est internalisé de manière Rac-dépendante et pourrait être ensuite recyclé *via* un mécanisme médié par la synténine, dont la localisation membranaire est médiée par la liaison du PIP2 à son domaine PDZ. (Lambaerts *et al.*, 2009; Zimmermann *et al.*, 2005) De plus, il a été montré que le SDC-4 internalise le FGFR1 afin de réguler la durée et l'intensité de l'activation de la voie ERK1/2 impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire. D'autre part, le SDC-4 a également été impliqué dans la régulation de l'internalisation des intégrines  $\beta 1$  dépendantes de la cavéoline et de la dynamine dans les fibroblastes. (Bass *et al.*, 2011)

## VI. Rôle physiopathologique de RANTES/CCL5

RANTES/CCL5 est impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies, telles que des pathologies virales comme l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), cancéreuses et métastatiques, ou inflammatoires comme l'athérosclérose. (Marques *et al.*,

2013) Il a longtemps été pensé que le rôle de RANTES/CCL5 dans ces pathologies est de favoriser le recrutement cellulaire.

### 1. Infection par VIH

RANTES/CCL5 est impliquée dans de nombreuses infections notamment par le VIH. Les sites d'interactions du VIH sur le récepteur CCR5 sont les mêmes utilisés par RANTES/CCL5, ce qui fait de ce dernier un inhibiteur compétitif naturel contre cette infection virale. L'axe RANTES-CCR5 constitue donc une cible thérapeutique potentielle du VIH. Il a été rapporté que les cellules n'exprimant pas CCR5 sont naturellement résistantes à la transmission du VIH. Ainsi, les porteurs homozygotes du gène CCR5 delta32 (CCR5 $\Delta$ 32), un polymorphisme génétique conduisant à une perte de fonction et d'expression membranaire de CCR5, sont résistants naturellement à ce type d'infection virale. (*O'Brien and Moore, 2000*) Par conséquent, plusieurs antagonistes de CCR5 sont apparus afin d'inhiber la signalisation des différents ligands et notamment la signalisation induite par RANTES/CCL5 dépendante de CCR5. (*Mahla, 2015*) RANTES/CCL5 et ses dérivés comme des mutants de RANTES/CCL5 représentent une alternative protéique importante aux antagonistes chimiques de CCR5 d'un point de vue thérapeutique. Les dérivés de RANTES/CCL5, issus des modifications au niveau de l'extrémité N-terminale, ont été proposés comme inhibiteurs de l'infection par le VIH. Les deux variants : AOP-RANTES (Aminoxyptentane à l'extrémité N-terminale) et PSC-RANTES (n-nonanoyl)-Ser(1)-[L-thiopropyl(2), L-cyclohexylglycyl(3)], présentent une très forte affinité pour CCR5 et favorisent son internalisation empêchant ainsi le VIH d'interagir avec la cellule hôte. (*Lobritz et al., 2013; Vangelista et al., 2008*) Un autre variant, C1C5-RANTES (double mutant sérine en cystéine en position 1 et 5) permet également l'internalisation de CCR5 mais contrairement à AOP-RANTES, ce variant ne permet pas l'activation du récepteur. Par conséquent, C1C5-RANTES est un candidat thérapeutique prometteur. (*Vangelista et al., 2008*) Une étude récente a révélé le développement de nouveaux dérivés de RANTES/CCL5 humain anti-VIH-1 en utilisant des lactobacilles, dont un des dérivés est antagoniste de CCR5. Ce dernier a été testé sur l'infection par des souches primaires du VIH (VIH-1 R5) de macrophages humains, avec une concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) de l'ordre du picomolaire reflétant l'efficacité de ce nouveau variant de RANTES/CCL5. (*Secchi et al., 2018*)

Les peptides dérivés de RANTES/CCL5 représentent une alternative à l'utilisation d'une protéine « entière » dérivée de RANTES/CCL5. Ainsi, un peptide dérivé de RANTES/CCL5 possédant uniquement la région boucle N /  $\beta$ 1-brin (AA 11-29) est suffisant pour obtenir une

activité antagoniste sur le VIH de manière antagoniste c'est-à-dire qu'il se lie à CCR5 sans activer la signalisation dépendante du récepteur. (*Vangelista et al., 2008*)

L'implication de RANTES/CCL5 dans le contrôle de cette infection virale peut dépendre de sa concentration, de son mode de présentation (monomère ou oligomère) ainsi que de la nature de ses interactions. Ainsi, une faible concentration de RANTES/CCL5 (< les 100 nM) inhibe l'infection au VIH. (*Vangelista et al., 2008*)

En revanche, RANTES/CCL5 favorise cette infection à forte concentration (> 1 µM) et de manière dépendante de son oligomérisation. (*Vangelista et al., 2008*) Il a été montré que l'infection virale médiée par RANTES/CCL5 est plus importante lors de son interaction avec les chaînes GAGs exprimées par les cellules hôtes, en plus de son interaction avec leur récepteur CCR5. Par exemple, l'interaction de RANTES/CCL5 avec les chaînes HS, exprimées à la surface des lymphocytes T et des monocytes, active une voie de signalisation ERK1/2 et Pyk et amplifie davantage l'infection virale induite par CCR5. De plus, il a été montré que le clivage enzymatique des HS à la surface des macrophages, diminue l'interaction entre le VIH et le macrophage et par conséquent empêche l'infection qui en résulte. (*Agere et al., 2017; Roscic-Mrkic et al., 2003*)

## **2. RANTES CCL5 et l'angiogenèse**

Dans un modèle d'inflammation induite par une implantation d'éponge de polyester-polyuréthane chez la souris, il a été montré que RANTES/CCL5 est exprimé dès le premier jour de l'implantation. (*Barcelos et al., 2009*) Afin d'étudier l'effet de RANTES/CCL5 dans l'angiogenèse dans ce modèle de souris, une injection locale de RANTES/CCL5 exogène, au niveau de l'implantation de l'éponge a été effectuée. De façon surprenante, les souris ont présenté moins de vascularisations au niveau de l'implantation après l'injection. L'effet anti-angiogénique de RANTES/CCL5 a été confirmé par l'administration du Met-RANTES, un variant de RANTES caractérisé par une interaction altérée avec les RCPGs, qui a montré un effet pro-angiogénique. (*Barcelos et al., 2009*) Plusieurs études ont contredit cette dernière étude et ont montré que cette chimiokine avait un effet pro-angiogénique. (*Liu et al., 2014; Maillard et al., 2014; Suffee et al., 2012, 2017*) Notre équipe de recherche a montré que RANTES/CCL5 induit l'angiogenèse *in vitro* dans un modèle de cellules endothéliales HUVECs et *in vivo* chez le rat ayant subi une implantation sous-cutanée de disques de nitrocellulose enrobés dans une solution de RANTES/CCL5. (*Suffee et al., 2012*) Pour aller plus loin, l'utilisation des stratégies



d'inhibition des RCPGs (CCR1 et CCR5) et des protéoglycanes (SDC-1, SDC-4) ainsi que les mutants de RANTES/CCL5 E66A-RANTES incapable de s'oligomériser et <sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>-RANTES présentant une interaction altérée avec les GAGs, a montré que l'effet pro-angiogénique de RANTES nécessite son oligomérisation et son interaction aux GAGs. (*Suffee et al., 2012*) Une deuxième étude a montré que l'effet pro-angiogénique de RANTES/CCL5 dépend d'une signalisation intracellulaire, induite par la liaison de RANTES/CCL5 au SDC-4, *via* le domaine cytoplasmique du SDC-4 activant la PKC $\alpha$ . (*Maillard et al., 2014*)

L'effet pro-angiogénique de RANTES/CCL5 pourrait être bénéfique dans le cadre du traitement de l'ischémie. En effet, notre équipe a pu améliorer la régénération musculaire et la revascularisation après l'injection locale de microparticules à base de polysaccharides biodégradables et biocompatibles chargés par RANTES/CCL5 chez des souris présentant une ischémie de la patte. RANTES/CCL5 favorise la migration des cellules progénitrices endothéliales humaines (EPC) et la formation du réseau vasculaire par l'intermédiaire de CCR5 et du SDC-4 exprimés à la surface des cellules progénitrices endothéliales. L'oligomérisation du SDC-4 dans ce contexte et la liaison aux GAGs sont essentiels pour son effet biologique. (*Suffee et al., 2017*) Ces résultats portant sur les effets pro-angiogénique de RANTES/CCL5 sont soutenus par des études montrant que RANTES/CCL5 favorise l'angiogenèse tumorale dépendante du VEGF *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de chondrosarcome *via* une voie PI3K/AkT. (*Liu et al., 2014, 2015*) Cet effet pro-angiogénique est une étape critique dans la croissance tumorale et le développement des métastases.

### **3. Cancer et métastase**

RANTES/CCL5 peut être exprimée par les cellules tumorales mais aussi par les cellules du microenvironnement tumoral comme les cellules endothéliales, les fibroblastes, les macrophages. Les cellules cancéreuses malignes qui expriment les récepteurs de RANTES/CCL5 sont capables de répondre à son gradient chimioattractant sur les sites des métastases. (*Zlotnik et al., 2011*) RANTES/CCL5 favorise les métastases en augmentant la motilité et l'extravasation des cellules cancéreuses afin de faciliter leur mouvement. De plus, RANTES/CCL5 recrute des précurseurs de monocytes et de macrophages qui sécrètent des facteurs pro-angiogéniques. RANTES/CCL5 peut induire également la sécrétion de métalloprotéases matricielles notamment la MMP-9 qui dégrade les protéines de la MEC favorisant ainsi la propagation des cellules tumorales dans l'organisme. (*Aldinucci and Colombatti, 2014; Cooper et al., 2018; Marques et al., 2013*)

RANTES/CCL5 favorise la diffusion des cancers du sein, colorectaux, gastriques et prostatiques. De plus, elle accentue le caractère invasif des cellules tumorales impliquées dans l'ostéosarcome ou le cancer de la prostate. (*Tamamis and Floudas, 2014*) Le taux d'expression élevé de RANTES/CCL5 a été associé au stade avancé de nombreux cancers dont le cancer du sein, le cancer du côlon et le cancer du pancréas. (*Khalid et al., 2015*)

La progression du cancer du côlon est corrélée avec l'augmentation de l'infiltration des monocytes induite par RANTES/CCL5 dans le micro-environnement tumoral. (*Marques et al., 2013*) Dans un modèle de métastases sous-cutanées hépatique et pulmonaire, l'administration intra-péritonéale d'un anticorps neutralisant de RANTES/CCL5 a réduit la diffusion des métastases hépatiques et pulmonaires. (*Cambien et al., 2011*)

Il est connu que les tissus et cellules du cancer pancréatique expriment RANTES/CCL5 et son récepteur CCR5. D'autre part, le ciblage sélectif de la signalisation de l'axe RANTES-CCR5 a réduit la croissance tumorale dans l'adénocarcinome pancréatique par la perturbation du recrutement des cellules T régulatrices dans les tumeurs. (*Tan et al., 2009*) L'inhibition de l'axe RANTES-CCR5 avec le maraviroc (antagoniste de CCR5) réduit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques. (*Singh et al., 2018*)

Des travaux antérieurs de notre équipe de recherche ont montré l'implication de RANTES/CCL5 dans le carcinome hépatocellulaire. RANTES/CCL5 en interagissant avec le SDC-1 et le SDC-4 et en activant les voies de signalisation ERK et JNK/SAPK, induit la migration et l'invasion *in vitro* de trois différentes lignées d'hépatomes humains (Huh7, HepG2, Hep3B). (*Charni et al., 2009; Sutton et al., 2007*)

Une étude récente portant sur le carcinome hépatocellulaire médié par une inflammation chronique du foie, a montré que la chimiokine RANTES/CCL5 est fortement exprimée à la fois dans un modèle expérimental de cancer hépatique (souris NEMO  $\Delta^{\text{hepa}}$ ) et chez les patients atteints de maladie chronique de foie, allant de la fibrose à la cirrhose. L'augmentation d'expression de RANTES/CCL5 était corrélée avec la progression de la maladie. De plus, les souris NEMO $\Delta^{\text{hepa}}$  invalidées pour le gène codant pour RANTES/CCL5, présentent des tumeurs plus petites et moins métastatiques par rapport aux souris NEMO $\Delta^{\text{hepa}}$  sauvages. De même, l'inhibition pharmacologique de RANTES/CCL5 avec l'évasine-4, une protéine de liaison avec une grande affinité pour les CC chimiokine, a réduit la taille des tumeurs en raison de la

diminution de l'infiltration précoce des leucocytes au niveau du foie des souris NEMO <sup>Δhepa</sup> sauvages. (Mohs et al., 2017)

#### 4. Inflammation vasculaire

RANTES/CCL5 est initialement connue pour son rôle inflammatoire. Cette chimiokine représente un des régulateurs fondamentaux du mouvement leucocytaire dans la circulation sanguine et joue un rôle essentiel dans le recrutement des monocytes au niveau des sites inflammatoires. (Proudfoot et al., 2017) Ainsi, l'invalidation génétique de RANTES/CCL5 chez la souris a montré une altération de l'activation et du recrutement des lymphocytes T et des monocytes traduisant ainsi une réponse immunitaire défectueuse. (Makino et al., 2002)

RANTES/CCL5 joue un rôle important dans l'inflammation vasculaire durant l'athérosclérose. Cette pathologie vasculaire conduit à l'obstruction des artères par la formation progressive de la plaque d'athérome. RANTES/CCL5 est impliquée dans la phase inflammatoire précoce qui précède la formation de la plaque d'athérome mais elle peut être actrice dans les phases évolutives de l'athérosclérose notamment le développement de la plaque d'athérome, sa vulnérabilité et sa rupture. (Li et al., 2012; Malaud et al., 2014)

En effet, RANTES/CCL5 a été détectée dans le sérum des patients athérosclérotiques et *in situ* au niveau de la plaque d'athérome. (Barlic and Murphy, 2007) RANTES/CCL5 a également été détectée chez les patients ayant subi un infarctus de myocarde qui est une conséquence de l'athérosclérose. (Montecucco et al., 2010) Peu importe le stade dans lequel cette chimiokine pro-inflammatoire va intervenir, elle favorise le recrutement monocyttaire et lymphocytaire *via* ses récepteurs et notamment CCR1 et CCR5 et son interaction avec les GAGs. (Marques et al., 2013)

Les souris déficientes en Apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) représentent un des modèles expérimentaux de l'athérosclérose. RANTES/CCL5 est présente à la surface luminale des artères carotides des souris ApoE<sup>-/-</sup> avec des lésions athérosclérotiques précoces (Hundelshausen et al., 2001) Il a également été montré dans le même modèle expérimental que l'injection intraveineuse de plaquettes, activées au préalable *in vitro* par la thrombine, a augmenté d'une façon très considérable le dépôt de RANTES/CCL5 sur la surface luminale de l'artère carotide lésée ce qui a augmenté le recrutement des monocytes. Dans la même étude, il a été rapporté que la pré-incubation des monocytes avec un anticorps neutralisant anti-RANTES/CCL5 inhibe leur adhérence. (Jin et al., 2018) De plus, l'inhibition du Y-box1,

facteur de transcription de RANTES/CCL5, chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> a réduit l'infiltration des monocytes après une lésion artérielle au niveau des carotides. (Krohn et al., 2007; Zerneck et al., 2008)

Suite au transfert de moelle osseuse issue de souris dont le gène codant RANTES/CCL5 est invalidé (RANTES<sup>-/-</sup>), les souris ApoE<sup>-/-</sup> préalablement irradiées ont présenté une diminution des lésions athérosclérotiques probablement due à la faible infiltration monocyttaire observée au niveau de la plaque d'athérome. (Koenen et al., 2009) RANTES/CCL5 peut se lier à l'endothélium microvasculaire et déclencher l'arrêt des monocytes sous flux laminaire. Par ailleurs, dans un modèle d'artères carotides de souris ApoE<sup>-/-</sup> perfusées *ex vivo*, le prétraitement des monocytes avec son variant Met-RANTES, antagoniste sélectif de ses récepteurs (CCR1 et CCR5), réduit l'arrêt sur la surface luminale de la carotide. (Shi and Pamer, 2011)

Les tests de migration trans-endothéliale *in vitro* ont montré que CCR1 exprimé par les monocytes joue principalement un rôle dans leur arrêt en présence de contraintes de cisaillement tandis que CCR5 contribue à l'infiltration des monocytes. (Kramp et al., 2013)

Les études sur le rôle de RANTES/CCL5 dans le recrutement des monocytes ont principalement mis en avant le rôle des interactions entre RANTES/CCL5 et ses récepteurs exprimés par les monocytes. Cependant le rôle fonctionnel des récepteurs de RANTES/CCL5 exprimés par l'endothélium vasculaire n'est pas connu.

## **VII. RANTES/CCL5 cible thérapeutique anti-inflammatoire**

Le dogme général des stratégies thérapeutiques anti-inflammatoires ciblant les chimiokines se focalise sur l'interaction des chimiokines avec leurs récepteurs RCPGs et avec les GAGs. RANTES/CCL5 ne déroge pas à cette règle. Les applications thérapeutiques à finalité inhibitrice de l'interaction RANTES/CCL5 avec ses récepteurs, adoptent différentes stratégies soit par des dérivés de RANTES/CCL5 ou alors avec des mimétiques de GAGs.

L'utilisation de Met-RANTES, variant antagoniste des deux RCPG (CCR1, CCR5) largement connu dans l'inhibition de l'infection au VIH, a révélé une diminution du recrutement de leucocytes dans un modèle d'encéphalite sévère. (Vilela et al., 2009) De plus, un traitement précoce, avant une greffe, avec ce variant, a réduit le recrutement leucocytaire (essentiellement

des monocytes et macrophages) et protège les allogreffes rénales en diminuant le risque du rejet. (Mohs et al., 2017; Song et al., 2002)

Le mutant <sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>-RANTES déficient en sa séquence d'interaction avec les GAGs, agit comme anti-inflammatoire en réduisant l'infiltration des leucocytes au niveau des lésions hépatiques, de la fibrose et de l'athérosclérose. (Kufareva et al., 2017; Proudfoot et al., 2017)

L'oligomérisation de RANTES/CCL5 est également un des axes de la stratégie thérapeutique ciblant RANTES. <sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>-RANTES est non seulement incapable de se lier aux GAGs mais connu également pour son incapacité à s'oligomériser au-delà d'un dimère. Ce variant bloque les effets pro-inflammatoires de RANTES/CCL5 et forme un hétéro-complexe non fonctionnel avec RANTES/CCL5 natif. (Johnson et al., 2004; Marques et al., 2013; Severin et al., 2012) Cependant, les autres variants de RANTES/CCL5 tels que E66A ou E26A déficients en capacité d'oligomérisation n'ont pas encore été testés dans un contexte de recrutement leucocytaire.

L'idée que les GAGs solubles soient capables d'inhiber la signalisation de chimiokines dépendante des RCPGs a ouvert les horizons pour une autre stratégie thérapeutique basée sur des mimétiques de GAGs. Il a été montré que des mimétiques de GAGs dérivés de l'héparine pouvaient diminuer le recrutement leucocytaire induit par RANTES/CCL5. Cependant ce résultat n'était satisfaisant que lorsque la taille minimale de ces dérivés était un tétrasaccharide et utilisé avec une concentration en mimétiques de GAGs 15 fois plus élevée que celle de la chimiokine. (Proudfoot et al., 2017; Severin et al., 2012) L'utilisation des dérivés de GAGs mérite donc davantage de recherches pour définir les conditions d'utilisation thérapeutiques optimales.

# **OBJECTIF**

## A. Synthèse

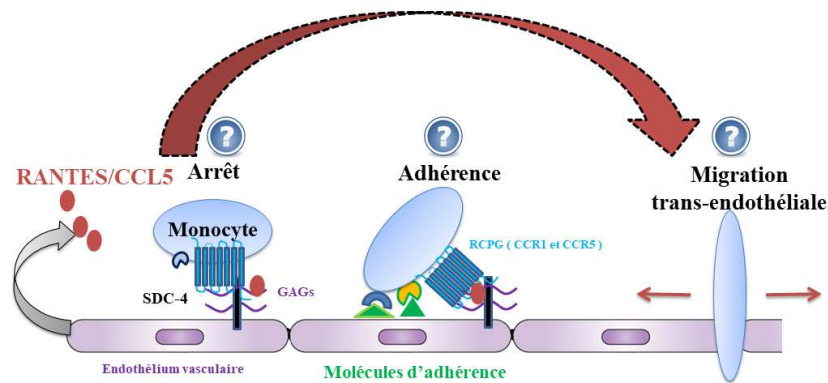
L'inflammation au niveau de l'endothélium vasculaire est associée au recrutement des leucocytes qui se résume en trois étapes majeures : l'arrêt, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Shi and Pamer, 2011*)

Des études antérieures ont montré que l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium est associée à une expression accrue des molécules d'adhérence et à une déstabilisation des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales adjacentes, permettant ainsi la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Vestweber et al., 2009*) Ce processus implique en partie une régulation de la phosphorylation des protéines du complexe jonctionnel notamment les tyrosines Y685- et Y731-VE-cadhérine (*Wessel et al., 2014*) et la Y654- $\beta$ -caténine (*Ilan et al., 2003*) ainsi que la réorganisation du cytosquelette régulée par les petites protéines Rho GTPases. (*Rho et al., 2017*)

Le recrutement des leucocytes implique différents types d'interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes sous l'action des médiateurs inflammatoires tels que les chimiokines. RANTES/CCL5 est une chimiokine pour un grand nombre de leucocytes, tels que les monocytes. (*Mause et al., 2005*) Les activités biologiques de RANTES/CCL5 dépendent de son oligomérisation, des interactions avec les RCPGs (CCR1, CCR3 et CCR5) et avec les chaînes GAGs portées notamment par des protéoglycanes membranaires à chaînes héparane sulfate tel que le SDC-4 exprimé entre autres à la surface des cellules endothéliales. (*Suffee et al., 2012*) RANTES/CCL5 participe également au recrutement des monocytes au niveau des sites inflammatoires par le biais de ses interactions avec CCR1 ou CCR5 exprimés à la surface des monocytes. (*Kramp et al., 2013*)

## B. Hypothèse et objectif

Nous avons émis l'hypothèse que RANTES/CCL5, au-delà de son effet sur les leucocytes, pourrait agir sur les cellules endothéliales en modifiant leur capacité à interagir avec les monocytes afin de promouvoir leur recrutement (**Figure 43**).



**Figure 43. Hypothèse 1 : l'interaction entre RANTES/CCL5 les RCPGs et les GAGs exprimés sur les cellules endothéliales pourrait induire le recrutement des monocytes**

RANTES/CCL5 pourrait réguler les niveaux d'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 et E-sélectine à la surface des cellules endothéliales, moduler l'activité de deux protéines appartenant au complexe jonctionnel des jonctions adhérentes, la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine, et/ou réguler les voies de signalisation dépendantes de la  $PKC\alpha$ ,  $PKC\delta$  et des Rho GTPases impliquées dans le recrutement monocytaire.

**L'objectif de ma thèse a été de déterminer l'implication et le mécanisme d'action de RANTES/CCL5 sur le recrutement des monocytes vers la barrière endothéliale, étape clé de l'inflammation.**

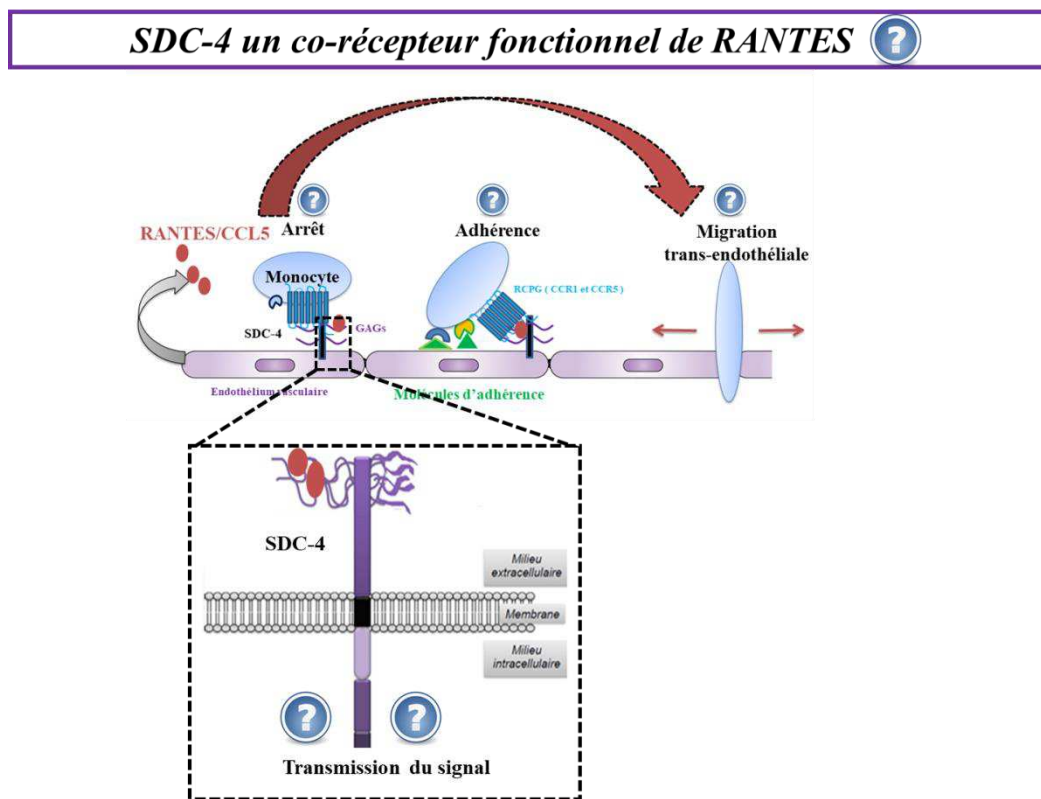
La première partie de mes résultats présente l'effet de l'interaction de RANTES/CCL5 avec les RCPGs (CCR1 et CCR5) et les GAGs dans le recrutement des monocytes. Dans cette partie, j'ai évalué les modifications cellulaires et moléculaires des cellules endothéliales induites par la chimiokine RANTES/CCL5 au cours de l'arrêt, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des monocytes ; les modifications étudiées ont été :

- 1) L'expression de molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 et E-sélectine.
- 2) L'état de la phosphorylation des protéines du complexe jonctionnel des jonctions adhérentes, la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine
- 3) Les voies de signalisation intracellulaire PKCs et Rho GTPases impliquées dans le recrutement des monocytes étudiées par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ciblant  $PKC\alpha$ ,  $PKC\delta$ , Rac1, RhoA ou Cdc42.



Cette première partie de mes résultats est présentée sous forme d'article (article soumis) dans un chapitre intitulé « *Involvement of RANTES-CCL5-GAGs interaction in monocyte recruitment* ».

Pour aller plus loin dans les connaissances sur le fonctionnement du SDC-4 en tant que co-récepteur de RANTES/CCL5, fonction importante montrée précédemment par notre équipe dans un contexte angiogénique (Maillard et al., 2014), nous avons cherché à comprendre si le domaine intracellulaire du SDC-4 était impliqué dans le recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5 (Figure 44). Pour ce faire, nous avons utilisé des mutants intracellulaires du SDC-4 construits et validés au sein de notre équipe de recherche. (Maillard et al., 2014) Cette deuxième partie de mes résultats est présentée sous forme d'article (article en cours de rédaction) dans un chapitre intitulé « *Intracellular domain of SDC-4 in RANTES-induced monocyte recruitment* ».



**Figure 44. Hypothèse 2 : le SDC-4 pourrait être un co-récepteur fonctionnel de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocytaire.**

Le recrutement des leucocytes, des monocytes entre autres, au niveau des sites inflammatoires constitue une étape clé de la réponse immunitaire. Cibler ce processus est une solution

prometteuse pour bloquer l'infiltration monocyttaire accrue comme dans le cas de l'athérosclérose. À terme, cette étude fondamentale pourra aider à comprendre le rôle exercé par une chimiokine sur les cellules endothéliales plus précisément l'implication de la signalisation intra-endothéliale issue de l'interaction de la chimiokine RANTES avec les GAGs à la surface des cellules endothéliales dans le cadre du recrutement des monocytes.

# RÉSULTATS

## **A. Involvement of RANTES-CCL5-GAGs interaction in monocyte recruitment**

### **I. Article 1**

## **RANTES-induced disruption of PKC $\alpha$ /PKC $\delta$ balance in endothelial cells regulates VE-cadherin and $\beta$ -catenin phosphorylation to promote monocyte transmigration**

Mamoune Hadjer<sup>1</sup>, Maillard Loïc<sup>1</sup>, Hlawaty Hanna<sup>1</sup>, Haddad Oualid<sup>1</sup>, Blanchard Emmanuelle<sup>2,3</sup>, Guittat Lionel<sup>4</sup>, Oudar Olivier<sup>1</sup>, Charnaux Nathalie<sup>1,5</sup> and Sutton Angela<sup>1,5</sup>

1: Inserm U1148 LVTS, UFR SMBH, Université Paris 13, COMUE Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France

2: Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique, Université de Tours and CHRU de Tours, France

3: INSERM U1259, Université de Tours and CHRU de Tours, France

4: Inserm U978, UFR SMBH, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France

5: AP-HP, Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Bondy, France

Running title: RANTES-induced junction disruption and diapedesis

Keywords: RANTES, endothelial cells, adherent junctions, PKC, monocyte

Word count: 6713

Abbreviations:

CPD: Cell Proliferation Dye eFluor, GAG: Glycosaminoglycan, HUVEC: Human Umbilical Vein-Endothelial Cell, ICAM-1: Intracellular Adhesion Molecule-1, IL: Interleukine, MCP-1/CCL2: Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2, MM6: Mono Mac 6, PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PFA: paraformaldehyde, PKC: Protein Kinase C, PMA: phorbol myristate acetate, GPCRs: G Protein-Coupled Receptors, Rho: Ras homolog family, TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VE-cadherin: Vascular Endothelial cell cadherin

## **ABSTRACT**

Vascular inflammation is marked by leukocyte recruitment and infiltration, requiring interplay between inflammatory mediators such as chemokines, leukocytes and endothelial cells. In inflammatory context, leukocytes roll on endothelial cells, adhere firmly and transmigrate. This process involves signalling in leukocytes and endothelial cells depending on chemokines. However, it has been largely studied in leukocytes, fewer in endothelial cells. In this study, we evaluated endothelial cell responses to the chemokine RANTES/CCL5 promoting monocyte recruitment. Our results demonstrated that RANTES stimulation of endothelial cells strongly increases monocyte arrest, adhesion and transmigration, by activating PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  and Rho GTPase signaling pathways. RANTES decreased Y731-VE-cadherin phosphorylation whereas it increased Y685-VE-cadherin and Y654- $\beta$ -catenin phosphorylation leading to monocyte transmigration across endothelial barrier. In conclusion, these results highlight the major role played by the chemokine RANTES/CCL5 in the regulation of adherens junctions between endothelial cells promoting monocyte transmigration, suggesting that they may represent new targets for innovative therapeutic strategies.

## INTRODUCTION

Vascular inflammatory response is marked by leukocyte recruitment which follows a general paradigm involving three successive steps: rolling, arrest followed by adhesion to endothelial cells and leukocyte transmigration through the endothelial barrier.<sup>1</sup> Many cells can be recruited such as T cells, basophils<sup>2</sup>, eosinophils<sup>3</sup>, NK cells, dendritic cells<sup>4</sup> and monocytes.<sup>5</sup> In a pro-inflammatory microenvironment in the presence of cytokines such as Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1) and interleukin-4 (IL-4), circulating monocytes migrate to the inflamed vascular endothelial tissues according to a chemotactic gradient. This gradient is established by many chemokines such as Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1/CCL2) and Regulated on Activation, Normal Cell T Expressed and Secreted (RANTES/CCL5). These pro-inflammatory chemokines promote leukocyte accumulation and activation on the inflammatory sites.<sup>2,5,6</sup>

TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells have been described to express the CC chemokine RANTES,<sup>7</sup> known as a monocyte recruiter.<sup>5,6</sup> RANTES biological activities depend on 1) its oligomerisation, 2) its interactions with specific transmembrane G Proteins-Coupled Receptors (GPCRs) such as CCR1, CCR3 and CCR5<sup>8</sup> and with sulfated glycosaminoglycan chains (GAGs). “BBXB” pattern in RANTES sequence, containing basic amino acids such as Lysine and Arginine, interacts directly with GAGs.<sup>9</sup> We previously showed that GAG mimetics, RANTES GAG-deficient mutants, such as RANTES-R47E (<sup>44</sup>EKNR<sup>47</sup>) and RANTES-3Ala (<sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>), or RANTES oligomerization-deficient mutant, RANTES-E66A, modulate RANTES-induced activities *in vitro*<sup>10</sup> and *in vivo*<sup>11</sup>. In an *ex vivo* model, RANTES immobilization on GAGs is capable to induce leukocyte activation and then their adhesion.<sup>12</sup> Leukocyte rolling is mediated by adhesion molecules such as L selectin<sup>13</sup> and E selectin.<sup>14</sup> These molecules are expressed respectively on leukocytes and endothelial cells to promote interactions with their cognate ligand. Thus, the rolling of leukocytes might be activated by chemokines exposed on the endothelial cell membrane leading to an integrin expression<sup>15</sup> and to interaction with their ligands such as inter Cellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)<sup>16</sup> or Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)<sup>17</sup> expressed on endothelial cell membrane. These interactions induce diverse signaling pathways in leukocytes including small Rho GTPase transduction leading to leukocyte spreading. In addition, leukocyte integrin interactions with adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 on endothelial cells increase intracellular transient calcium flow. This signal involves PKC $\alpha$ -induced Rho GTPase (such as Rho, Rac1

and Cdc42) activation necessary to efficient leukocyte transmigration.<sup>18</sup> Indeed, Sandoval and *al.* showed that  $Ca^{2+}$  signaling and PKC $\alpha$  disturb adherent junctions.<sup>19</sup>

Leukocyte transmigration across endothelial barrier is a cell-cell junction process, involving Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM 1),<sup>20</sup> Vascular Endothelial cadherin (VE-cadherin)<sup>21</sup> and  $\beta$ -catenin.<sup>22</sup> Previous studies have shown that the adhesion of leukocyte on the vascular endothelium destabilizes adherent junctions.<sup>21,23</sup> Real time leukocyte transmigration study proved that this process occurred through *de novo* formation of transient gaps in VE-cadherin junctional distribution.<sup>24</sup> In addition, a stable cadherin / catenin complex allows the stabilization of endothelial adherent junctions.<sup>25</sup> VE-cadherin complex alteration could be caused by the phosphorylation<sup>22,26</sup> of its partners regulated by the PKC $\alpha$ . We have previously showed that RANTES induced PKC $\alpha$  activation in overexpressing syndecan-4 endothelial cells.<sup>10</sup> Different phosphorylation sites have been identified on VE-cadherin and  $\beta$ -catenin. The interaction of cadherin with its cytoplasmic partners is modified after Y685- and Y731-VE-cadherin phosphorylation.<sup>23</sup> It has been demonstrated that Y654- $\beta$ -catenin phosphorylation can also be implicated in junction stabilization.<sup>22,27</sup>

Leukocyte recruitment on the endothelium barrier involves signaling in leukocytes and endothelial cells depending on chemokines. The effect of chemokines on leukocytes to induce their recruitment has been largely investigated conversely to their effect on endothelial cells. To decipher the mechanism involved in RANTES effect on endothelial cells leading to monocyte recruitment on the inflamed site, we focused on the RANTES-induced modulation in endothelial cells of i/ membrane adhesion proteins (E-selectin, PECAM-1, ICAM-1 and VCAM-1) expression, ii/ activation of intracellular signaling pathways (PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  and Rho GTPases), iii/ phosphorylation of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, N° CRL-1730, ATCC) were cultured as described.<sup>11</sup> Mono-Mac 6 cell line, a gift from H.W. Löms Ziegler-Heitbrock (Institute for Immunology, University of Munich, Germany), was cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal calf serum (Lonza, Levallois-Perret, France) and 1 % penicillin-streptomycin (Lonza).

### Cytokine and chemokines

HUVEC were activated with 1 ng/mL recombinant Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Life Technologies) for 16 h at 37°C. HUVEC were stimulated with 3 nmol/L RANTES, RANTES GAG-deficient mutants RANTES-3Ala (<sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>) or RANTES oligomerization-deficient mutant RANTES-E66A which are a gift from L. Martin (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France) Recombinant human Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) was purchased from R&D systems (Villejust, France).

### Pharmacological Inhibitors

Gö6976, a PKC $\alpha/\beta$ 1 inhibitor, Rottlerin, a PKC $\delta$  inhibitor and C3 exoenzyme, a RhoA inhibitor were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). NSC, a Rac1 inhibitor, and ML141, a Cdc42 inhibitor, were from Calbiochem (Millipore S.A.S, Guyancourt, France). HUVEC were pre-incubated 2 h at 37°C with 1  $\mu$ M of each pharmacological inhibitor. Then, HUVEC were incubated with both 3 nmol/L RANTES and pharmacological inhibitor for 5, 10 or 30 minutes.

### Glycosaminoglycans chain degradation

Glycosaminoglycans (GAGs) expressed by TNF- $\alpha$ -activated HUVEC were cleaved by Heparinase I (20 mU) from *Flavobacterium heparinum* (reference H2519), Heparinase III (10 mU) from *Flavobacterium heparinum* (reference H8891), and chondroitinase ABC (33 mU) from *Proteus vulgaris*, all obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) for 2 h at 37°C.

To verify the effectiveness of the enzymatic GAG degradation, GAG chains expressed by HUVEC were detected with an antibody anti-heparan sulfate chains (Mouse IgM, Clone F58-10E4, AMS Biotechnology, Abingdon, UK) by flow cytometry.



### **CCR1 and CCR5 inhibition**

CCR1 and CCR5 expressed by HUVEC were neutralized with 10 µg/mL of neutralizing antibodies, mouse anti-CCR1 or anti-CCR5 or a specific IgG2b isotype. Alternatively, HUVEC were transfected with either CCR1 dsRNA (5'gggAUAgAgAgggAAUgUAAUggTg-3') or CCR5 dsRNA (5'-ggUggAACAAgAUggAUUAUCAAgT-3') purchased from Origene or scramble negative control (snc) dsRNA purchased from Eurogentec. For transfection, cell pellet of 10<sup>6</sup> HUVEC was incubated with 100 nM of siRNA in 100 µl Amaxa cell line nucleofector solution V (Lonza, Switzerland). HUVEC were transfected using V-001 protocol of AMAXA nucleofector device II (Lonza). Transfected cells were cultured at 5.10<sup>4</sup> cells/mL in ECBM2 supplemented with 12 % fetal calf serum. The cell transfection efficiency was verified with mouse monoclonal (mAbs) anti- CCR1 or CCR5 antibodies by flow cytometry.

### **RANTES quantification by ELISA**

HUVEC were activated or not by 1 ng/mL TNF-α for 16 h and stimulated or not by 3 nmol/L RANTES for 2 h. RANTES concentration in HUVEC supernatant medium was measured by ELISA using a Quantikine RANTES ELISA kit (R&D Systems, Villejust, France).

### **Monocyte arrest under flow condition**

3.10<sup>5</sup> HUVEC were seeded in a µ-slide flow chamber of 2.5 cm<sup>2</sup> (µ-slide I 0.4 Luer, Biovalley, Marne la Vallée, France) for 24h to obtain a cell monolayer. HUVEC were then stained with 10 µM Orange Cell Tracker (5-(and-6)-(((4-chloromethyl) benzoyl) amino) tetramethylrhodamine) (CMTMR, Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) for 20 min at 37°C. After 16 h of activation by TNF-α (1 ng/mL), HUVEC were stimulated or not for 2 h with 3 nmol/L RANTES or its mutants. In parallel, MM6 monocytes pre-stained with 1 ng/mL 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Roth Lauterbourg, France) were added under flow condition at 0.67 dyn/cm<sup>2</sup> with a peristaltic pump (Miniplus 2, Gilson, Villiers-le-Bel, France) for 10 minutes. Cells were then fixed with 1% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich) at 4°C for 20 min, and the number of monocytes arrested on HUVEC cell monolayer was quantified under fluorescence microscopy (Zeiss, AXIOPHOT). Otherwise, HUVEC activated with TNF-α and stimulated with RANTES were preincubated for 2 h at 37°C with:

- 1 µM of pharmacological inhibitor specific of PKCα, PKCδ, Rac1 or RhoA.
- a GAG-degrading enzymes mix containing Heparinase I (20 mU), Heparinase III (10 mU), and chondroitinase ABC (33 mU);
- IgG2b control isotype or with neutralizing anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies.

### **Monocyte adhesion in static condition**

To obtain a cell monolayer,  $2 \cdot 10^5$  HUVEC were seeded per well in an eight-well Labtek for 24 h. HUVEC cell monolayer was stained with 10  $\mu$ M CMTMR for 20 min and then activated with 1 ng/mL TNF- $\alpha$  for 16 h. HUVEC were then stimulated or not with 3 nmol/L RANTES or their mutants 3Ala-RANTES or E66A-RANTES for 2 h at 37°C.

Pre-stained MM6 with 1 ng/mL DAPI were added for 30 minutes. Cells were then fixed with 1% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) for 30 min at 4°C. The number of monocytes adhered on HUVEC cell monolayer was quantified under fluorescence microscopy (Zeiss, AXIOPHOT). In parallel, HUVEC activated with TNF- $\alpha$  and stimulated with RANTES were pre-incubated or not with signaling pharmacological inhibitors, GAGs cleaving enzymes or anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies.

### **Monocyte transmigration in transwell chamber**

Transwell chambers (Beckton Dickinson Le Pont de Claix, France) were pre-coated with 100  $\mu$ g/mL fibronectine (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France).  $2 \cdot 10^5$  HUVEC were cultured in the upper part of the chamber. Following incubation at 37°C for 24 h, HUVEC were activated with TNF- $\alpha$  for 16 h and then stimulated or not with 3 nmol/L RANTES or its mutants. Otherwise, HUVEC activated with TNF- $\alpha$  and stimulated with RANTES were pre-incubated or not with signaling pharmacological inhibitor, GAG cleaving enzymes or anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies.

Pre-stained MM6 monocytes with 5  $\mu$ M *Cell Proliferation Dye eFluor 670* (CPD, eBioscience S.A.S, Paris, France), harvested in RPMI-0.1% BSA were added in the upper part. In the lower part, the chemoattractant was 3 nmol/L MCP-1/CCL2 in RPMI-0.1% BSA buffer. Monocytes that have migrated during 2 h towards the lower chamber were then quantified by flow cytometry in FL-4, with an excitation wavelength of 647 nm and an emission wavelength of 670 nm.

### **Flow cytometry analysis of adhesion molecules expression**

Membrane expression of adhesion molecules, PECAM-1, E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1, was analyzed by flow cytometry on non-permeabilized TNF- $\alpha$ -activated HUVEC, stimulated or not with RANTES. After cell washing and fixation with 1% PFA for 30 min at 4°C, HUVEC were incubated for 2 h with 1  $\mu$ g/mL of mouse monoclonal anti-human ICAM-1 (IgG1, clone P2A4), anti-human PECAM-1 (IgG1, clone JC70), anti-human E-selectin (IgG2a, clone CTB202) or rat IgG1 (M/K-2) anti-human VCAM-1 (rat IgG1, clone M/K2, Santa Cruz Biotechnology Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) or with 1  $\mu$ g/ml of their specific isotypes (BD Biosciences Pharmingen). Revelation was performed by membrane incubation

for 30 min at 4°C with 10 µg/mL secondary antibodies Alexa Fluor 647-goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 647-goat anti-rat IgG antibodies (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Brébières, France).

### **Flow cytometry binding analysis**

HUVEC were preincubated or not with 3 nmol/L RANTES, 3Ala-RANTES or E66A-RANTES for 1h room temperature. After washing, cells were fixed with 1% PFA for 30 min at 4°C, then incubated for 2 h at 4°C with 2 µg/mL rabbit IgG pAbs anti-RANTES antibodies (Peprotech, France) or their specific rabbit IgG isotype (R&D Systems, Villejust, France). After washing, cells were labeled with 10 µg/mL Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Brébières, France).

### **VE-cadherin and $\beta$ -catenin tyrosine phosphorylation assay**

10<sup>6</sup> HUVEC were cultured for 24 h and pre-incubated or not with pharmacological inhibitor for 2 h then stimulated or not with RANTES for 5, 10 or 30 min at 37°C. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1 µM orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich). Proteins were extracted with a lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40 and 1% protease inhibitor cocktail (Roche, France). Lysates were obtained by centrifugation at 13,000 × g for 20 min at 4°C and protein lysate concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France). 30 µg proteins were loaded on SDS-PAGE and revealed with 1 µg/mL rabbit IgG polyclonal antibodies (pAbs) anti-pY685-VE-cadherin or anti-total VE cadherin (Abcam, Paris, France), rabbit IgG pAbs anti-pY731 VE-cadherin (Sigma-Aldrich), purified mouse mAbs anti  $\beta$ -catenin (IgG1, clone 14/ $\beta$ -Catenin, Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, France), rabbit IgG pAbs anti-pY654  $\beta$ -Catenine (ECM Bioscience, Euromedex, Souffelweyersheim, France) antibodies. Revelation was performed using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG (DAKO, Denmark) 0.2 µg/mL and 0, 16 µg/mL respectively and electrochemiluminescence. Quantification of phosphorylation was performed by using the Scion program after autoradiography scanning.

### **PKC $\alpha$ and PKC $\delta$ membrane translocation assay**

3.10<sup>6</sup> HUVEC were incubated at 37°C for 15 min with 0.5 µM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) used as a positive control or with 3 nmol/L RANTES for 5, 10 or 30 min. In parallel, HUVEC were pre-treated or not with 1µM PKC $\alpha$  or PKC $\delta$  inhibitor for 2 h at 37°C. Cell fractionation of 6.10<sup>6</sup> HUVEC was performed using Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells from Pierce according to manufacturer's protocol as

previously described.<sup>10</sup> 10 µg proteins were loaded on SDS-PAGE and revealed using 1 µg/mL specific mouse anti-human PKC $\alpha$  antibody (IgG2b, BD Biosciences Pharmingen), 2 µg/mL anti-human PKC $\delta$  pAbs (C17), mouse anti-human integrin  $\beta$ 1 (IgG1) and rabbit pAb anti-actin (all from Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Revelation was performed using horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG purchased from DAKO (Agilent, Les Ulis, France) at respectively 0.2 µg/mL and 0.16 µg/mL and electrochemiluminescence (ECL). Quantification was performed by using the Scion program after autoradiography scanning.

### **Transmission electron microscopy**

For ultrastructural analysis, samples were immersed in a fixative solution of 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 48 h, washed in PBS, postfixed by incubation for 1 h with 2% osmium tetroxide and dehydrated in a graded series of ethanol solutions. Samples were embedded in Epon resin, which was allowed to polymerize for 48 h at 60°C. Ultrathin sections were cut, stained with 2.5 % uranyl acetate, 1 % lead citrate, and deposited on formvar/carbon-coated nickel grids or on gold grids for examination under a transmission electron microscope (TEM) at 100 kV (JEOL 1011, Tokyo, Japan).

### **Statistical analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SEM. The percentage of inhibition was (D1-D2)/D1. The D1 value is the difference between the number of monocytes, arrested, adhered or having transmigrated through HUVECs stimulated with RANTES and the number of monocytes, arrested, adhered or transmigrated through unstimulated HUVEC. The D2 value is the difference between the number of monocytes arrested, adhered or having transmigrated through HUVEC stimulated with RANTES and preincubated with GAG cleavage enzymes, pharmacological inhibitors or antibodies and the number of monocytes arrested, adhered or transmigrated through preincubated HUVEC with enzymes that cleave GAGs, pharmacological inhibitors or antibodies. The percentage of inhibition was:  $((D1 - D2) / D1) \times 100$ .

The relative RANTES-induced monocyte arrest, adhesion or transendothelial migration was calculated by considering the effect of RANTES (D1 value) as 100%.

Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA) test performed with the Statview software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A p value  $< 0.05$  was used as the criterion of statistical significance.

## RESULTS

### RANTES increases monocyte recruitment on TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells

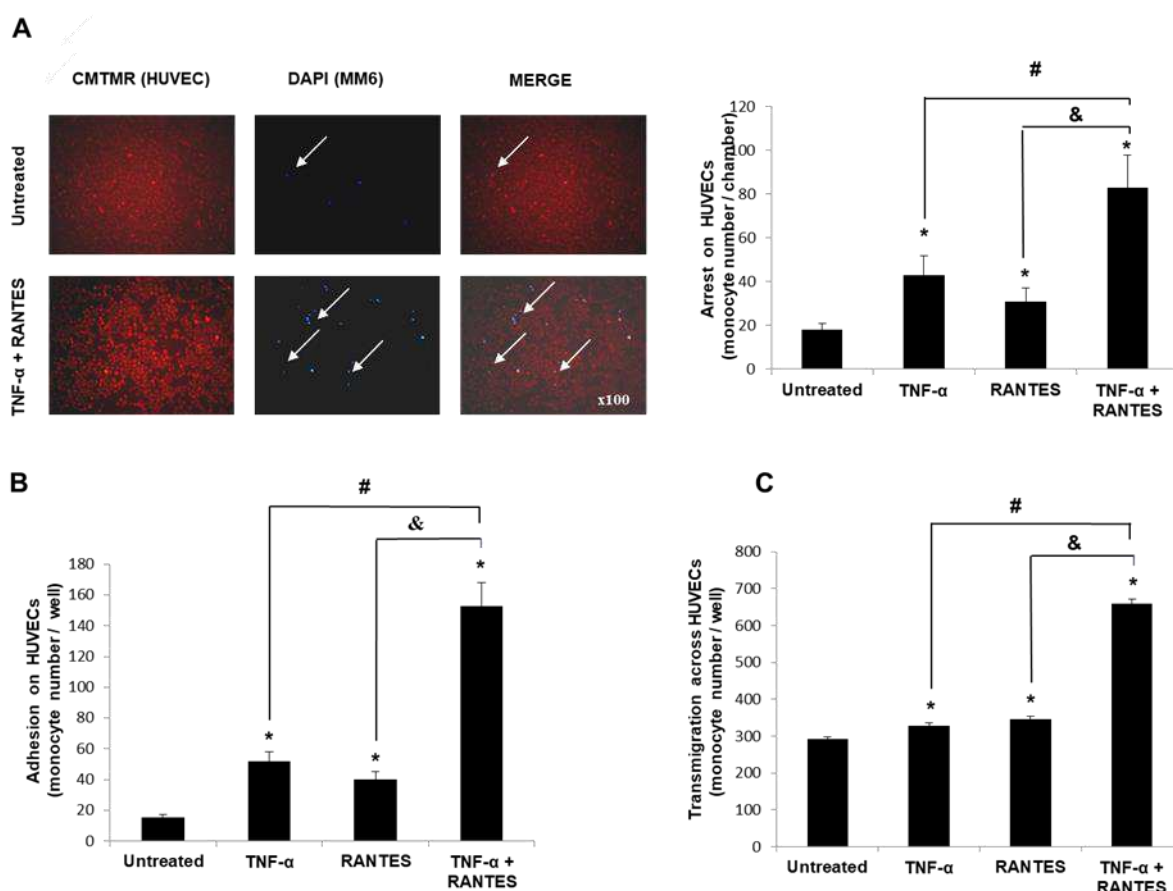
The aim of our study was to evaluate the effect of the chemokine RANTES on endothelial HUVEC to promote monocyte arrest, adherence, and trans-endothelial migration. Monocyte arrest under flow (Figure 1A), adhesion in static conditions (Figure 1B) and trans-endothelial migration (Figure 1C) were assessed on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC. As it was previously described that TNF- $\alpha$  induced RANTES expression in several cellular models,<sup>7</sup> we measured RANTES concentration in the HUVEC supernatant medium to evaluate the respective part of exogenous added RANTES or TNF- $\alpha$ -induced RANTES expression (Table1). Our results showed that TNF- $\alpha$  preincubation had no effect on RANTES secretion in our model of HUVEC. Indeed, exogenous added RANTES increased RANTES concentration in HUVEC cell medium by almost 1.5-fold after HUVEC preincubation or not with TNF- $\alpha$ .

HUVECs cells preincubation		
TNF $\alpha$	RANTES	RANTES concentration in HUVECs medium (pg/ mL)
-	-	3,53 $\pm$ 0,003
-	+	5,51 $\pm$ 0,260 *
+	-	3,53 $\pm$ 0,023
+	+	5,25 $\pm$ 0,003 * #

**Table 1. RANTES concentration in HUVEC conditioned medium.** HUVEC were activated or not by 1 ng/mL TNF- $\alpha$  for 16 h and stimulated or not by 3 nmol/L RANTES for 2 h. RANTES concentration in HUVEC supernatant medium was measured by ELISA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM (pg/mL) of three independent experiments. \*p<0.05, *versus* cells preincubated without TNF- $\alpha$  and without RANTES. # p<0.05 cells preincubated with TNF- $\alpha$  and with RANTES *versus* cells preincubated with TNF- $\alpha$  and without RANTES.

RANTES effect on monocyte diapedesis was evaluated in terms of monocyte arrest, adhesion and transmigration (Figure 1). HUVEC preincubation with TNF- $\alpha$  alone or RANTES alone significantly increased monocyte arrest by 139  $\pm$  21% or by 72  $\pm$  19% respectively *versus* untreated cells (43  $\pm$  9 or 31  $\pm$  6 monocytes/chamber respectively *versus* 18  $\pm$  3 monocytes/chamber, p<0.05, =3). The successive preincubation of HUVEC with TNF- $\alpha$  and RANTES led to a significant and important increase of monocyte arrest by 361  $\pm$  18% *versus* untreated cells (83  $\pm$  15 *versus* 18  $\pm$  3 monocytes/chamber, p<0.05). Thus, RANTES is almost

3.6-fold more efficient to induce monocyte arrest on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC as compared to inactivated cells (Figure 1A).



**Figure 1. RANTES/CCL5 induces monocyte recruitment on TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells.** HUVEC were activated or not by 1 ng/mL TNF- $\alpha$  and stimulated or not by 3 nmol/L RANTES. Monocyte arrest on HUVEC monolayer was analyzed under flow. *Left upper panel:* microphotographies of monocytes prestained with DAPI (bleu) arrested on HUVEC monolayer stained with CMTMR (Red). *Right upper panel:* quantitative data represent mean  $\pm$  SEM of monocyte number arrested/chamber (A). Monocyte adhesion was investigated in static condition (B) and transmigration in the transwell chamber (C). Quantitative results of monocyte adhesion and transmigration are expressed as mean  $\pm$  SEM of monocyte number/well of four independent experiments. \* $p$ <0.05, *versus* untreated cells. #  $p$ <0.05 with RANTES *versus* without RANTES, &  $p$ <0.05, with TNF- $\alpha$  *versus* without TNF- $\alpha$ .

Monocyte adhesion was quantified in static conditions (Figure 1B). Preincubating HUVEC with TNF- $\alpha$  alone or RANTES alone significantly increased monocyte adhesion by  $247 \pm 12\%$  or  $167 \pm 13\%$  respectively *versus* untreated cells ( $52 \pm 6$  or  $40 \pm 5$  monocytes/well respectively *versus*  $15 \pm 2$  monocytes/well,  $p$ <0.05). The successive preincubation of HUVEC with TNF- $\alpha$  and RANTES induced a significant huge increase of monocyte adhesion by  $1020 \pm 10\%$  *versus* untreated cells ( $153 \pm 15$  monocytes/chamber *versus*  $15 \pm 2$  monocytes/chamber,  $p$ <0.05).

Therefore, RANTES is 10-fold more efficient to induce monocyte adhesion on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC as compared to inactivated cells (Figure 1B).

The number of monocytes that have transmigrated was quantified by flow cytometry (Figure 1C). TNF- $\alpha$  or RANTES alone increased slightly but significantly monocyte transmigration at a similar extent ( $328 \pm 8$  or  $347 \pm 8$  monocytes/well respectively *versus*  $292 \pm 7$  monocytes/well for untreated cells,  $p < 0.05$ ) whereas RANTES increased monocyte transmigration across TNF- $\alpha$ -activated HUVEC by  $126 \pm 2$  % *versus* untreated cells ( $660 \pm 11$  *versus*  $292 \pm 7$  monocytes/well for untreated cells,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) (Figure 1C).

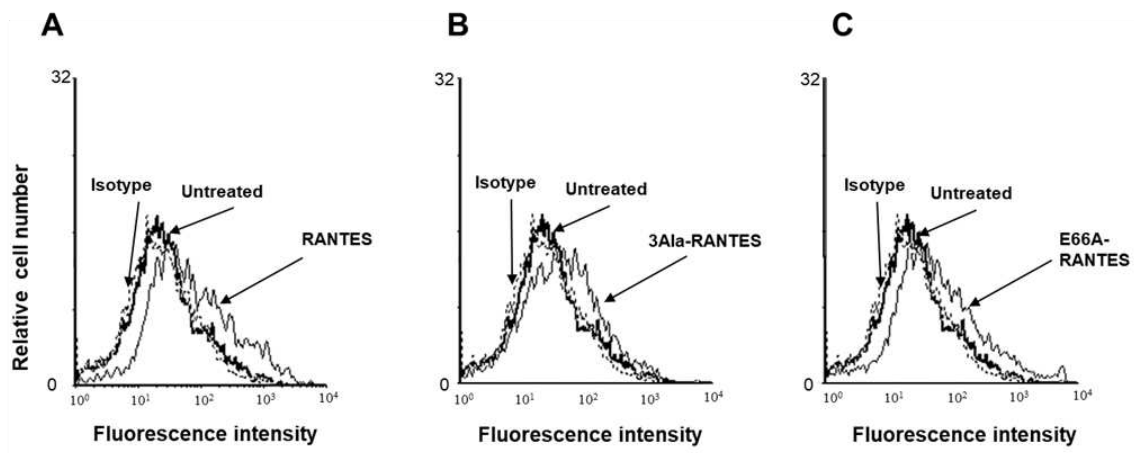
Altogether, our results showed that incubation of HUVEC cells with TNF- $\alpha$  alone or RANTES alone increased slightly monocyte arrest, adhesion and transmigration whereas the stimulation of TNF- $\alpha$ -activated HUVEC cells with RANTES greatly increased these effects.

### **RANTES-induced monocyte recruitment depends on RANTES oligomerization, binding to glycosaminoglycans and G protein-coupled receptors expressed by endothelial cells**

To evaluate the role of RANTES oligomerization and its binding to receptors expressed at the membrane of HUVEC in monocyte recruitment, E66A-RANTES, an oligomerization deficient mutant, and 3Ala-RANTES, a GAG-binding deficient mutant, were used. First, we determined whether E66A-RANTES and 3Ala-RANTES bind to HUVEC cells as well as native RANTES by flow cytometry (Figure 2).

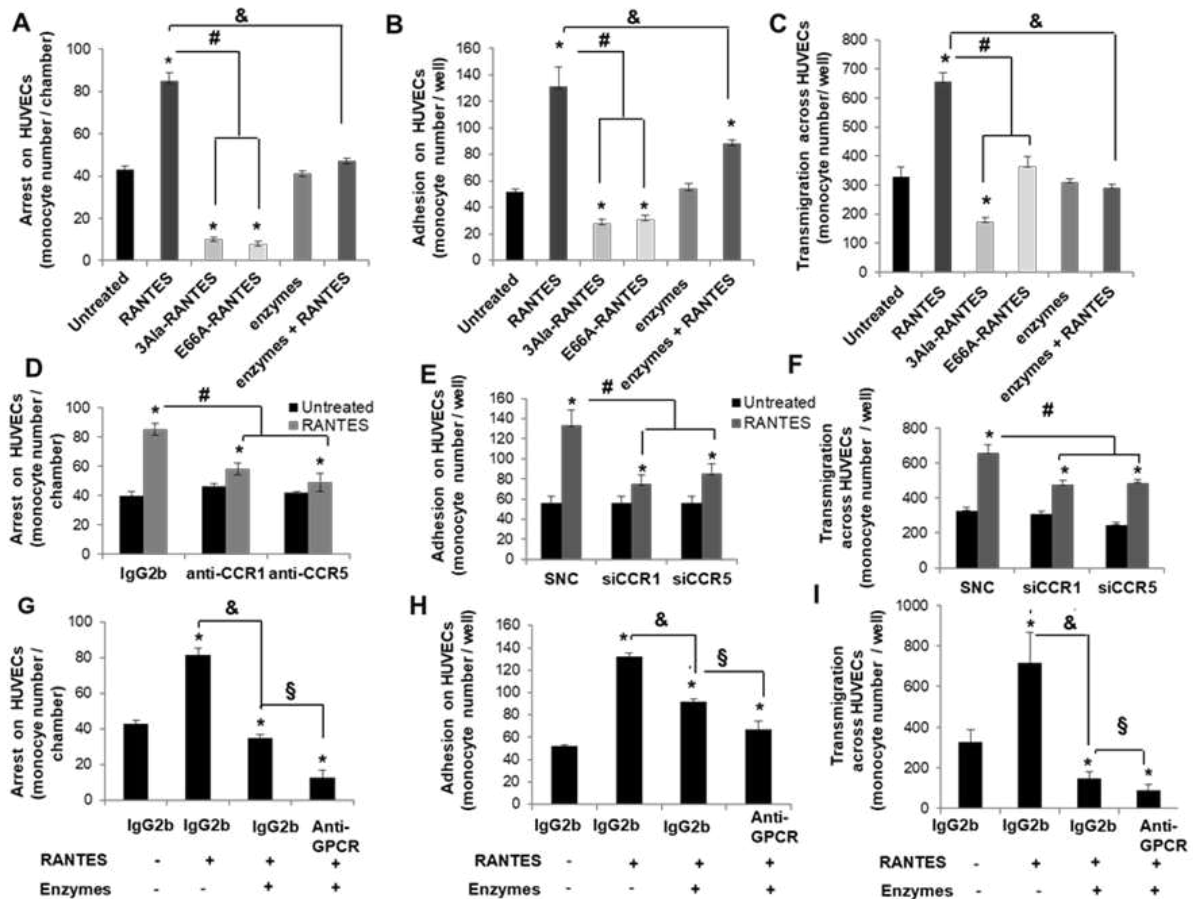
Our results showed that E66A-RANTES binds to HUVEC cell membrane similarly to native RANTES (Figure 2A and 2C) while 3Ala-RANTES binds to HUVEC cell membrane in a lesser extent (Figure 2B).





**Figure 2. RANTES binds to HUVEC.** HUVEC were preincubated or not with RANTES (A), 3Ala-RANTES (B) or E66A-RANTES (C) for 1h at room temperature. RANTES binding was analyzed by flow cytometry using anti-RANTES polyclonal antibodies or specific isotypes revealed by secondary antibodies coupled to Alexa-Fluor 488.

Furthermore, monocyte arrest assay showed that HUVEC cell stimulation with 3Ala-RANTES or with E66A-RANTES did not increase monocyte arrest conversely to stimulation with native RANTES ( $10 \pm 1$  or  $8 \pm 1$  monocytes/chamber respectively *versus*  $85 \pm 4$  monocytes/chamber,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) (Figure 3A). Moreover, HUVEC stimulation with these RANTES mutants reduced monocytes arrest significantly by  $77 \pm 10\%$  or by  $88 \pm 13\%$  respectively as compared to untreated cells ( $10 \pm 1$  or  $8 \pm 1$  monocytes/chamber respectively *versus*  $43 \pm 2$  monocytes/chamber,  $p < 0.05$ ) (Figure 3A). In addition, they decreased significantly monocyte adhesion by almost  $40 \pm 6\%$  in comparison with untreated HUVEC ( $28 \pm 3$  or  $31 \pm 3$  monocytes/well respectively *versus*  $52 \pm 2$  monocytes/well,  $p < 0.05$ ) (Figure 3B). Concerning monocyte transmigration, HUVEC stimulation with 3Ala-RANTES diminished significantly the number of transmigrated monocytes by  $47 \pm 8\%$  as compared to untreated condition ( $174 \pm 14$  monocytes/well *versus*  $328 \pm 34$  monocytes/well,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ), suggesting a blockade of basal monocyte transmigration process. By contrast, RANTES effect on monocyte transmigration was abolished after HUVEC preincubation with E66A-RANTES as compared to HUVEC stimulated with native RANTES (Figure 3C).



**Figure 3. RANTES/CCL5 oligomerization and its binding to GAGs and GPCRs expressed on endothelial cell membrane are required to induce monocyte recruitment.** Monocyte arrest on HUVEC was performed under flow (A, D, G). Adhesion was studied in static condition (B, E, H) and monocyte transmigration across the monolayer of HUVEC was investigated with Transwell chamber (C, F, I). HUVEC were pre-incubated (enzymes) or not with a mix of enzymes (heparitinase I (20 mU/ml), heparitinase III (10 mU/ml), chondroitinases ABC (33 mU/ml)) and further stimulated or not (untreated) by native RANTES/CCL5 (3 nmol/L, RANTES), 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nmol/L, 3Ala-RANTES) or E66A-RANTES/CCL5 (3 nmol/L, E66A-RANTES) (A, B, C). HUVEC were preincubated with 10 µg isotype mouse IgG2b (IgG2b) or neutralizing specific antibody anti-CCR1 or anti-CCR5 and stimulated (RANTES) or not (untreated) by RANTES/CCL5 (3 nmol/L) (D) HUVEC transfected with control siRNA or human CCR1 siRNA (siCCR1) or human CCR5 siRNA (siCCR5) (100 nM) were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM) (E, F). HUVEC were either preincubated with 10 µg isotype mouse IgG2b (IgG2b) or neutralizing specific antibody anti-CCR1 and anti-CCR5 or pretreated or not with a mix of enzymes (heparitinase I (20 mU/ml), heparitinase III (10 mU/ml), chondroitinases ABC (33 mU/ml)) then further stimulated or not by RANTES/CCL5 (3 nmol/L) (G, H, I). Results are indicated as cell number/well for monocyte adhesion and transmigration and as cell number/chamber for arrest. Results are expressed as mean ± SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , versus unstimulated cell by RANTES. #  $p < 0.05$ , versus RANTES, &  $p < 0.05$  with enzymes versus without enzymes and §  $p < 0.05$  anti-GPCR versus IgG2b.

RANTES-induced monocyte arrest was abolished after HUVEC preincubation with GAG degrading enzymes ( $47 \pm 2$  for HUVEC preincubated with GAG degrading enzymes and stimulated with RANTES *versus*  $85 \pm 4$  monocytes/chamber for HUVEC stimulated with RANTES,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 3A). Similarly, RANTES-induced monocyte transmigration was abolished after HUVEC preincubation with GAG degrading enzymes ( $290 \pm 13$  monocytes/well for HUVEC preincubated with GAG degrading enzymes and stimulated with RANTES *versus*  $656 \pm 31$  monocytes/well for HUVEC stimulated with RANTES,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 3C) respectively as compared to untreated cells. Stimulation of HUVEC with RANTES significantly enhanced monocyte adhesion by  $152 \pm 11\%$  as compared to untreated cells ( $131 \pm 15$  *versus*  $52 \pm 2$  monocytes/well,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 3B). After HUVEC preincubation with GAG degrading enzymes and stimulation with RANTES, monocyte adhesion increased significantly by  $69 \pm 4\%$  as compared to untreated condition ( $88 \pm 3$  *versus*  $52 \pm 2$  monocytes/well,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 3B). RANTES-induced monocyte adhesion depends on RANTES binding to GAG, as a  $59 \pm 1\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) inhibition of monocyte adhesion was evidenced after GAG enzymatic cleavage (Figure 3B). It is to note that HUVEC preincubation with GAG cleaving enzymes alone did not affect any diapedesis step. We conclude that the interaction of RANTES with GAG chains expressed at the HUVEC membrane and RANTES oligomerization play a key role in monocyte recruitment.

RANTES bind also to G protein-coupled receptors, CCR1 and CCR5 at the HUVEC membrane<sup>11</sup>. The role of CCR1 and CCR5 in RANTES-induced monocyte recruitment was then investigated (Figure 3D, 3E, 3F). HUVEC were preincubated with neutralizing anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies or their isotype control, then stimulated or not with RANTES (Figure 3D). Additionally, HUVEC were transfected with CCR1 siRNA or CCR5 siRNA or the scramble siRNA control and stimulated or not with RANTES (Figures 3E and 3F). In absence of RANTES stimulation, no significant difference in monocytes arrest, adhesion or transmigration was observed after CCR1 or CCR5 inhibition (Figure 3D, 3E, 3F black histograms). After CCR1 or CCR5 neutralization with specific antibodies on HUVEC surface, RANTES-induced monocyte arrest decreased by  $68 \pm 2$  or  $57 \pm 3\%$  respectively as compared to the isotype (IgG2b) condition ( $58 \pm 4$  or  $49 \pm 6$  arrested monocytes/chamber respectively *versus*  $85 \pm 4$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (Figure 3D, grey histograms). It is to note that anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies did not affect monocyte arrest in untreated cells (Figure 3D, black histograms). RNA interference targeting either CCR1 or CCR5 decreased significantly RANTES-induced monocyte adhesion by  $56 \pm 7\%$  or  $64 \pm 8\%$  respectively ( $75 \pm 9$  or  $85 \pm 10$

monocytes/well respectively *versus*  $133 \pm 16$  monocytes/well for cells transfected with scramble negative control) (Figure 3E, grey histograms). Our results suggest that CCR1 and CCR5 expressed on HUVEC membrane are required for RANTES-induced monocyte arrest.

In absence of HUVEC stimulation with RANTES, basal monocyte transmigration was unchanged after HUVEC pretreatment with CCR1 siRNA or CCR5 siRNA. RANTES stimulation of HUVEC transfected with scramble siRNA increased significantly monocyte transmigration by 2-fold. Moreover, RANTES-induced monocyte transmigration was significantly decreased by  $46 \pm 6\%$  or by  $39 \pm 3\%$  after HUVEC incubation with CCR1 siRNA or CCR5 siRNA respectively ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3F). Suggesting a major role of CCR1 and CCR5 in RANTES-induced monocyte transmigration.

Altogether, our results demonstrated that RANTES effect on endothelial cells promoting monocyte arrest, adhesion and transmigration is mediated by its binding to CCR1 and CCR5 expressed on the membrane of HUVEC.

To determine if RANTES-induced monocyte arrest, adhesion and transmigration result from synergic effect of RANTES binding to GAG and to GPCR, HUVEC were preincubated or not with GAG cleaving enzymes, then with both anti-CCR1 and anti-CCR5 neutralizing antibodies or their specific isotype, and stimulated or not by RANTES (Figure 3G, 3H, 3I). It is to note that monocyte arrest, adhesion and transmigration were unaffected by HUVEC preincubation with isotypes and GAG cleaving enzymes. HUVEC preincubation with both GAGs cleaving enzymes and anti-GPCRs antibodies decreased RANTES-induced monocyte arrest by  $63 \pm 16\%$  as compared to cells incubated with enzymes ( $13 \pm 4$  *versus*  $35 \pm 2$  arrested monocytes/chamber,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3G). Thus, we demonstrate that RANTES-induced monocyte arrest depends on RANTES interaction with GAGs, CCR1 and CCR5 expressed at the HUVEC membrane.

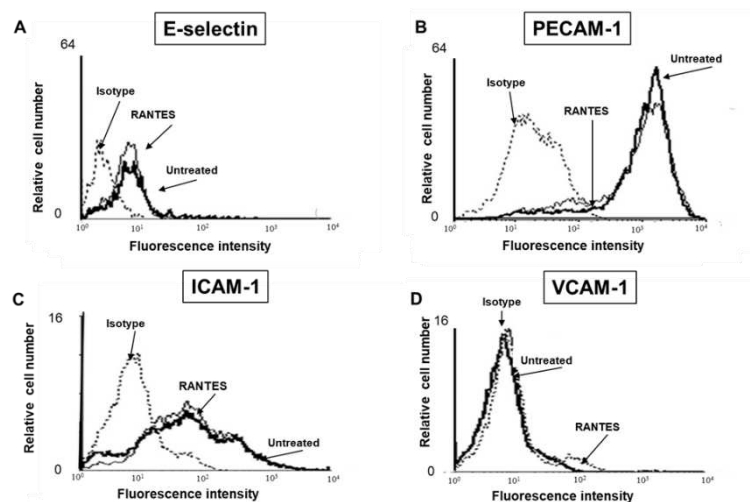
Moreover, blocking CCR1 and CCR5 in addition to GAGs cleavage reduced further RANTES-induced monocyte adhesion by  $27 \pm 7\%$  ( $67 \pm 7$  monocytes/well adhered on HUVEC preincubated with both enzymes and antibodies *versus*  $92 \pm 7$  monocytes/well adhered on HUVEC preincubated with enzymes and IgG2b,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3H). Therefore, RANTES-induced monocyte adhesion involved GAGs, and GPCR, mainly CCR1, expressed at HUVEC membrane.

HUVEC preincubation with both enzymes and antibodies further reduced by  $40 \pm 4\%$  RANTES-induced transmigration ( $89 \pm 30$  transmigrated monocytes across HUVEC

preincubated with enzymes and antibodies *versus*  $149 \pm 30$  transmigrated monocytes across HUVEC preincubated with enzymes and IgG2b,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 3I). These results suggest that RANTES-induced monocyte transmigration need both GAGs and CCR1 expressed at the membrane of endothelial cells. However, the reduction of monocyte transmigration after GAG cleavage of HUVEC and neutralization of GPCR under the level of HUVEC unstimulated with RANTES suggests that other inflammatory mediators such as cytokines and chemokines may contribute to monocyte transmigration.

### No effect of RANTES on adhesion molecules expression by endothelial cells

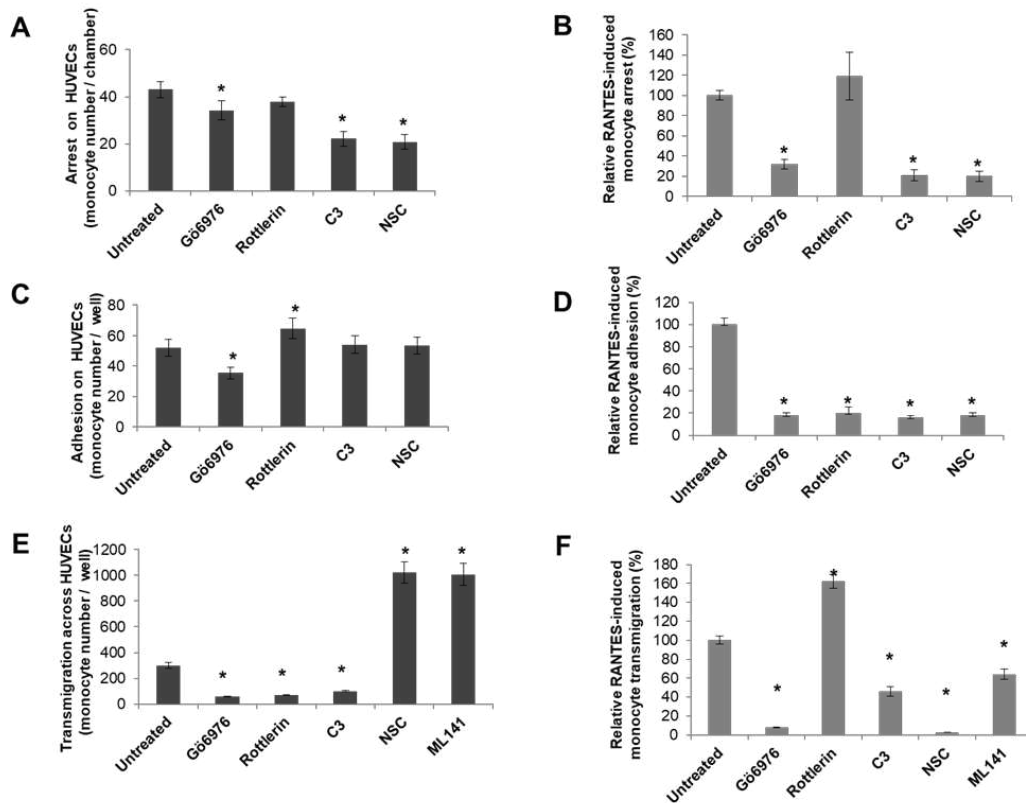
The effect of RANTES on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC promoting monocyte arrest and adhesion may result from an increase of adhesion molecules expressed at the membrane of endothelial cells. Therefore, we measured by flow cytometry the protein levels of E-selectin (Figure 4a), PECAM-1 (Figure 4B), ICAM-1 (Figure 4C) and VCAM-1 (Figure 4D) expressed at HUVEC cell surface. HUVEC expressed E-selectin, ICAM-1 and PECAM-1 (Figure 4A, 4B, 4C). No expression of VCAM-1 is observed at HUVEC cell surface (Figure 4D). After HUVEC stimulation with RANTES, no modification of E-selectin, ICAM-1 and PECAM-1 or VCAM-1 at protein levels at the cell surface of HUVEC has been evidenced (Figure 4A, 4B, 4C).



**Figure 4. RANTES/CCL5-induced variation of adhesion molecule expression at the membrane of endothelial cells.** Membrane expression of adhesion molecules E-selectin (A), PECAM-1 (B), ICAM-1 (C) or VCAM-1 (D), was analyzed by flow cytometry on non-permeabilized TNF- $\alpha$ -activated HUVEC, stimulated or not with RANTES.

## Involvement of RANTES-induced PKCs and Rho GTPases in monocyte recruitment

To assess signaling pathways involved in monocyte recruitment, TNF- $\alpha$ -activated HUVEC were incubated with pharmacological inhibitors of PKC $\alpha$  (Gö6976), PKC $\delta$  (rottlerin), RhoA (C3 exoenzyme, C3), Rac1 (NSC) or Cdc42 (ML141) and then stimulated or not by RANTES (Figure 5).



**Figure 5. Involvement of PKCs and Rho GTPases in RANTES-induced monocyte arrest, adhesion and transmigration.** Monocyte arrest (A, B), adhesion (B, C) and transmigration (E, F) were investigated using HUVEC pretreated or not (Untreated) by pharmacological inhibitors: Gö6976 (PKC $\alpha$ ), Rottlerin (PKC $\delta$ ), C3 exoenzyme (RhoA), NSC (Rac1) or ML141 (Cdc42) (A, B, C) or HUVEC pretreated with inhibitors and stimulated with RANTES (B, D, F). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , versus untreated cells. RANTES-induced arrest, adhesion and transmigration in absence of inhibitor was set to 100 % (B, D, F).

In the absence of RANTES stimulation, inhibition of PKC $\alpha$  decreased slightly but significantly the monocyte arrest by  $21 \pm 8\%$  ( $34 \pm 4$  monocytes/chamber for HUVEC pretreated with Gö6976 *versus*  $43 \pm 3$  monocytes/chamber for untreated cells,  $p < 0.05$ ). Interestingly, the inhibition of RhoA with C3 exotransferase (C3) or Rac1 with NSC significantly decreased the number of monocytes arrested by  $48 \pm 7\%$  or  $52 \pm 7\%$  respectively as compared to untreated cells ( $22 \pm 3$  or  $21 \pm 3$  monocytes/chamber respectively *versus*  $43 \pm 3$  monocytes/chamber,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 5A). In contrast, inhibition of PKC $\delta$  by Rottlerin has no effect on monocyte arrest (Figure 5A). The RANTES-induced monocyte arrest decreased significantly by  $68 \pm 5\%$  after PKC $\alpha$  inhibition with Gö6976, by  $80 \pm 5\%$  after RhoA inhibition with C3 or Rac1 inhibition with NSC. However, inhibition of PKC $\delta$  with rottlerin had no effect on RANTES-induced monocyte arrest (Figure 5B). Our results suggest that RANTES-induced monocyte arrest is mainly mediated by PKC $\alpha$  (inhibited by Gö6976), RhoA (inhibited by C3) or Rac1 (inhibited by NSC) pathways within HUVEC.

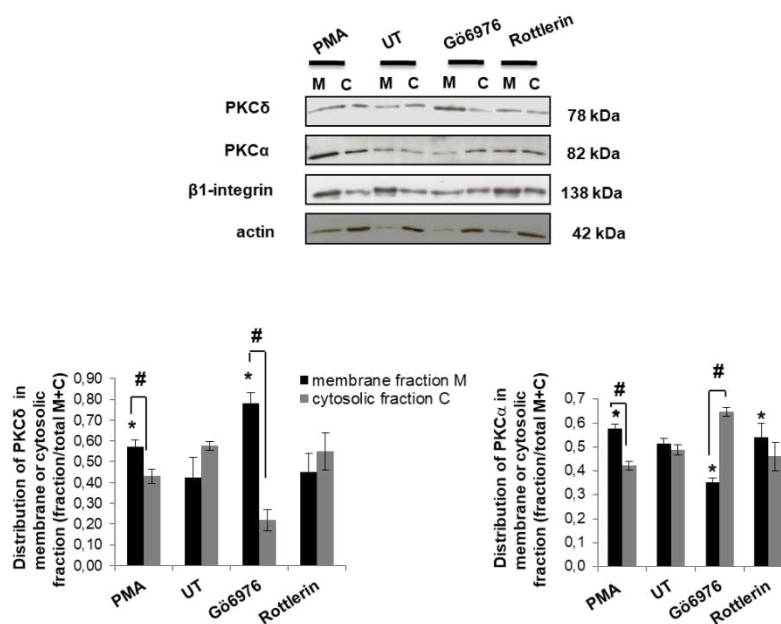
In parallel, we investigated the involvement of these RANTES-induced signaling factors in monocyte adhesion to the HUVEC monolayer (Figure 5C). In the absence of RANTES stimulation, the treatment of HUVEC with a PKC $\alpha$  inhibitor (Gö6976) significantly decreased the number of monocytes adhered by  $32 \pm 7\%$  ( $35 \pm 4$  *versus*  $52 \pm 6$  monocytes/well for untreated cells,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). By contrast, PKC $\delta$  inhibition with Rottlerin increased slightly but significantly by  $24 \pm 9\%$  monocyte adhesion ( $65 \pm 7$  *versus*  $52 \pm 6$  monocytes/well for untreated cells,  $p < 0.05$ ) and no effect was observed after inhibition of RhoA with C3 or Rac1 inhibition with NSC (Figure 5C).

The RANTES-induced monocyte adhesion strongly depends on PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , RhoA and Rac1 as it is reduced by  $82 \pm 2\%$  after inhibition with Gö6976; by  $80 \pm 6\%$  after inhibition with rottlerin; by  $84 \pm 2\%$  after inhibition with C3; by  $82 \pm 2\%$  after inhibition with NSC (Figure 6D). Our results emphasize that RANTES-induced monocyte adhesion requires the activation of PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , RhoA, and Rac1 signaling pathways.

Monocyte transmigration across HUVEC unstimulated with RANTES was significantly decreased by  $81 \pm 5\%$  after Gö6976 treatment ( $56 \pm 3$  *versus*  $300 \pm 21$  monocytes/well); by  $77 \pm 5\%$  after rottlerin treatment ( $69 \pm 3$  *versus*  $300 \pm 21$  monocytes/well) or by  $67 \pm 7\%$  after C3 treatment ( $99 \pm 7$  *versus*  $300 \pm 21$  monocytes/well). We observed a 2.5-fold increase of monocytes transmigrated across the HUVEC pre-treated with NSC or with ML141 ( $1022 \pm 80$  or  $1007 \pm 85$  monocytes/well respectively *versus*  $300 \pm 21$ ) ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 5E).

Then, we assessed the signaling pathways involved in RANTES-induced monocyte transmigration (Figure 5F). Surprisingly, inhibition of PKC $\delta$  with rottlerin enhanced significantly the effect of RANTES on monocyte transmigration by  $62 \pm 7\%$ . Inhibition of RhoA or Cdc42 strongly reduced RANTES-induced monocyte transmigration by  $54 \pm 5\%$  or  $36 \pm 5\%$ . PKC $\alpha$  inhibition with Gö6976 or Rac1 inhibition with NSC abolished RANTES-induced monocyte transmigration. Altogether, our results suggest that RANTES-induced monocyte transmigration involves PKC $\delta$ , PKC $\alpha$  and Rho GTPase (RhoA and Rac1) signaling pathways.

The specificity of pharmacological inhibitors is controversial. Thus, we verified the specificity of rottlerin and Gö6976 to inhibit respectively PKC $\delta$  and PKC $\alpha$  membrane translocation, reflecting their activation, by western blot (Figure 6). As a positive control, treatment of HUVEC with PMA induced membrane translocation of PKC $\delta$  and PKC $\alpha$  respectively as compared to untreated condition (UT).



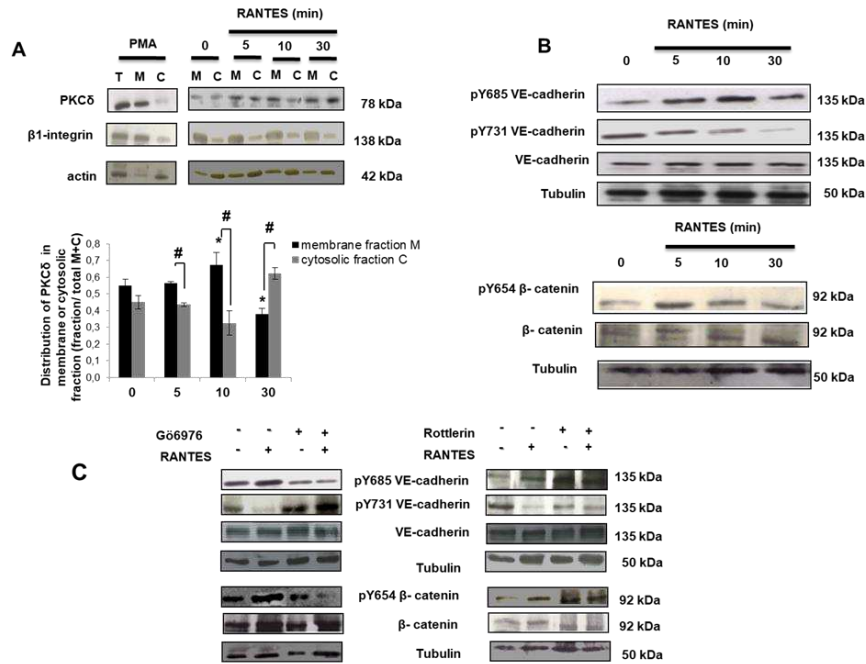
**Figure 6. PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance and RANTES-induced PKC $\delta$  activation.** HUVEC were pretreated or not with 0.5  $\mu$ M PMA, 1  $\mu$ M Rottlerin, a PKC $\delta$  inhibitor, or 1  $\mu$ M Gö6976, a PKC $\alpha$  inhibitor. Cells were fractioned into membrane and cytosolic fractions. Protein levels of PKC $\delta$ , PKC $\alpha$ ,  $\beta$ 1-integrin, a membrane marker, and actin, a cytosolic marker, were assessed by Western-Blot. Quantitative data represent the mean  $\pm$  SEM of PKC $\alpha$  or PKC $\delta$  divided into membrane or cytosolic fraction/membrane+cytosolic fractions of three independent experiments, \*  $p < 0.05$  versus cells unstimulated by RANTES and not incubated with pharmacological inhibitors, # versus membrane fraction in cells incubated with pharmacological inhibitors.



The PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance in HUVEC was then further investigated. In absence of RANTES, HUVEC incubation with Gö6976 decreased membrane translocation of PKC $\alpha$  by  $43 \pm 2\%$  ( $35 \pm 2\%$  *versus*  $61 \pm 2\%$ , Figure 6,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ), but led to a 2-fold increase of PKC $\delta$  membrane translocation ( $80 \pm 5\%$  *versus*  $40 \pm 5\%$ , Figure 6,  $p < 0.05$ ) as compared to untreated cells. Moreover, rottlerin did not affect the PKC $\delta$  or PKC $\alpha$  membrane and cytosolic rate. Our results showed that HUVEC treatment with Gö6976 inhibited membrane translocation of PKC $\alpha$  and increased membrane translocation of PKC $\delta$ . Altogether, our results suggest that PKC $\alpha$  downregulates PKC $\delta$  in absence of RANTES stimulation. The effect of RANTES on PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  cell distribution was further investigated.

### **RANTES-induced membrane translocation of PKC $\delta$**

We previously described the RANTES-induced membrane translocation of PKC $\alpha$  in HUVEC.<sup>10</sup> The subcellular localization of PKC $\delta$  was assessed by western blot on lysates of subfractioned HUVEC after RANTES stimulation for 5, 10 or 30 minutes (Figure 7A). In untreated condition (0) PKC $\delta$  was present similarly in both membrane and cytosolic fraction. RANTES induced membrane translocation of PKC $\delta$  at 5 minutes as compared to untreated HUVEC. Interestingly, PKC $\delta$  was predominantly in the membrane fraction after 10 minutes of RANTES stimulation ( $67 \pm 7\%$  *versus*  $55 \pm 4\%$ , Figure 7A,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). Surprisingly, at 30 minutes of RANTES stimulation, the cytosolic PKC $\delta$  became the main form ( $62 \pm 3\%$  *versus*  $45 \pm 4\%$ , Figure 7A,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) in comparison with untreated condition. Our results showed that RANTES regulated the membrane translocation of PKC $\delta$  and therefore its activation. HUVEC present a PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance, as PKC $\alpha$  inhibits PKC $\delta$ . RANTES exerts an independent effect on PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  cell localization and disrupts the PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance. We then wanted to study the role of PKC $\delta$  and PKC $\alpha$  induced by RANTES in the regulation of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin phosphorylation.



**Figure 7. RANTES-induced PKC $\alpha$ / PKC $\delta$  balance disruption modulates  $\beta$ -catenin and VE-cadherin phosphorylation.** **A.** PKC $\delta$  translocation into membrane fraction was determined by immunoblotting of fractionated cells after RANTES stimulation. Membrane and cytosolic fractions were extracted from HUVEC stimulated or not (0) by RANTES/CCL5 (3 nM) for 5, 10 or 30 min as indicated. PMA (0.5  $\mu$ M for 15 min) was used as a positive control (*upper panel*). Ratio of cytosolic and membrane fraction distribution are expressed as mean  $\pm$  SEM (*lower panel*). **B.** HUVEC were stimulated by RANTES (3 nmol/L) for 0, 5, 10 or 30 minutes as indicated. The protein levels of p-Y685-VE-cadherin, pY731-VE-cadherin (*upper panel*), pY645- $\beta$ -catenin (*lower panel*), VE-cadherin, Tubulin were assessed by Western-Blot. **C.** HUVEC were pretreated or not with 1  $\mu$ M Gö6976, a PKC $\alpha$  inhibitor (*left panel*) or Rottlerin, a PKC $\delta$  inhibitor (*right panel*), and stimulated or not by 3 nmol/L RANTES for 10 min). The protein levels of pY685-VE-cadherin, pY731-VE-cadherin, pY645- $\beta$ -catenin, VE-cadherin and  $\beta$ -catenin were determined in whole cell lysates by immunoblotting.

### VE-cadherin and $\beta$ -catenin phosphorylation is regulated by RANTES-induced PKC $\alpha$ / PKC $\delta$ balance

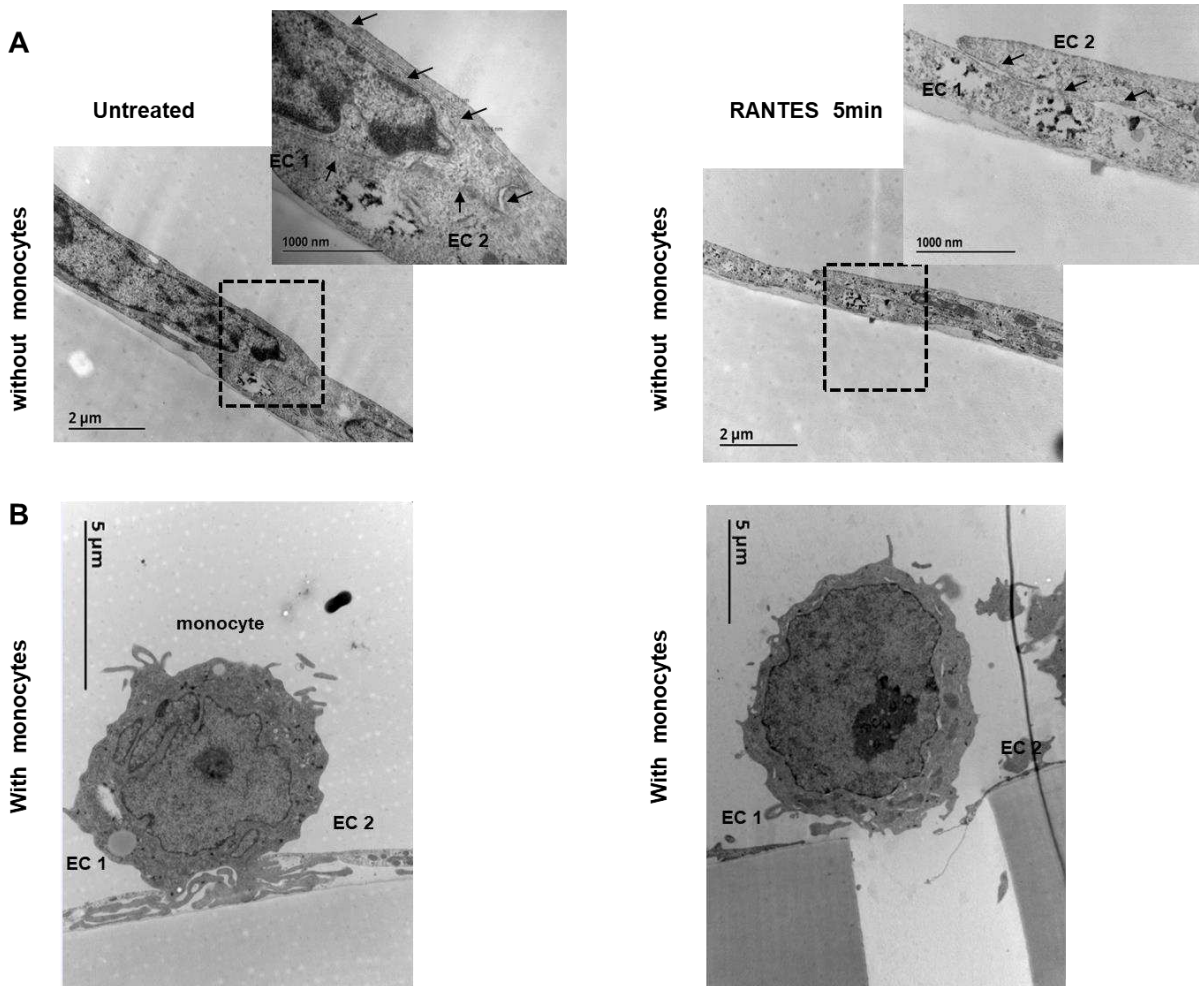
It is known that trans-endothelial migration requires a meticulous regulation of the phosphorylation of adherent junction proteins and in particular VE-cadherin on its tyrosines 685 and 731 as well as Y654  $\beta$ -catenin.

Stimulation of HUVEC with RANTES increased the phosphorylation of Y685 VE-cadherin from 5 to 30 minutes reaching a peak at 10 minutes. By contrast, RANTES induced a time-dependent decrease of Y731 VE-cadherin phosphorylation (Figure 7B, upper panel). Moreover, RANTES induced the phosphorylation of Y654- $\beta$ -catenin reaching a peak after 5 minutes of HUVEC stimulation with the chemokine RANTES, decreasing after (Figure 7B, lower panel).

We investigated the effect of PKC $\alpha$  or PKC $\delta$  inhibition in the regulation of Y685 and Y731 VE-cadherin as well as Y654  $\beta$ -catenin phosphorylation. Whole lysates of HUVEC incubated with either Gö6976 or rottlerin and stimulated or not with RANTES, were analyzed by western-blot (Figure 7C). PKC $\alpha$  inhibition by Gö6976 reduced Y685 VE-cadherin and Y654  $\beta$ -catenin phosphorylation but increased Y731 VE-cadherin phosphorylation (Figure 7C, left panel). This effect is reinforced after RANTES-induced stimulation of HUVEC, demonstrating the involvement of PKC $\alpha$  in RANTES-induced modifications of Y685 VE-cadherin and  $\beta$ -catenin phosphorylation. PKC $\delta$  inhibition by rottlerin increased Y685 VE-cadherin and Y654  $\beta$ -catenin phosphorylation (Figure 7C, right panel). This effect was not modifying after RANTES stimulation. In contrast, PKC $\delta$  inhibition by rottlerin decreased Y731 VE-cadherin phosphorylation. This inhibitory effect was enhanced after RANTES stimulation of HUVEC cells preincubated with rottlerin (Figure 7B, right panel). Taken together, our results highlight the major role of RANTES-induced PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance in the regulation of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin phosphorylation.

#### **RANTES promotes endothelial adherens junction disruption**

The morphological changes of endothelial cells induced by RANTES were assessed by transmission electron microscopy (TEM). The gap at cell-cell junctions was observed by TEM after RANTES stimulation of endothelial cells deposited as a monolayer in a Transwell chamber. The stimulation of endothelial cells with RANTES for 5 minutes led to an increased distance of gaps between endothelial cells (Figure 8, upper panel, arrows). The same experiment was performed after addition of monocytes above endothelial cells. Trans-endothelial migration of monocytes through a pore of the Transwell chamber was also observed (Figure 8, lower panel, arrows). No cytoplasmic extension of endothelial cells around the monocytes could be observed.



**Figure 8. RANTES-induced adherens junction destabilization.** After HUVEC seeding as a monolayer in a Transwell chamber and cell activation with  $\text{TNF-}\alpha$ , HUVEC were stimulated with 3 nM RANTES for 5 min or untreated, then fixed with 4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde, dehydrated, embedded in Epon resin. Ultrathin sections were cut, stained with 2.5 % uranyl acetate, 1 % lead citrate, and deposited on formvar/carbon-coated nickel grids or on gold grids for examination under a transmission electron microscope at 100 kV. EC1 and EC2 represent two adjacent endothelial cells (*upper panels*). In parallel, monocytes were added to the endothelial cells (*lower panels*). Scale bars are indicated on the images.

## DISCUSSION

The mechanism of the vascular endothelial hyperpermeability induced by proinflammatory factors such as cytokines and chemokines has been investigated since many years. The escalation of the inflammatory response relies on activation of endothelial cells leading to higher expression of cell adhesion molecules and proinflammatory factors, generating a vicious circle enhancing immune cell recruitment.<sup>28</sup>

In our study, RANTES addition to TNF- $\alpha$  activated-HUVEC markedly increases monocyte recruitment even if RANTES expression is not increased by TNF- $\alpha$  in our experimental model. However, it has been described in other studies that TNF- $\alpha$ -activated HUVEC upregulate others chemokines such as MCP1 and IL-8.<sup>29,30</sup> Moreover, other chemokines could interact with RANTES such as CXCL4<sup>31</sup>, or Defensin Human Neutrophil Peptide 1 (HNP1)<sup>32</sup>, forming a heterocomplex, which amplifies RANTES effect to promote monocyte recruitment.

The role of GPCR in RANTES-induced monocyte arrest and adhesion is controversial as we observed that CCR1 as well as CCR5 expressed at endothelial cell membrane play a major role in these two biological effects whereas CCR1 has been evoked as the GPCR mainly involved in adhesion on endothelial cells.<sup>33</sup> The role of CCR5 in RANTES-induced monocyte transmigration is consistent as previous studies reported that CCR5 mediated transmigration<sup>33,34</sup> whereas our results indicated that both CCR1 and CCR5 are implicated in this effect.

The involvement of RANTES binding to GAGs in monocyte recruitment has been characterized by using 3Ala-RANTES mutant that binds lower to HUVEC than native RANTES (Figure 2), because of a lower binding of 3Ala-RANTES to GAGs and to CCR1 due to sequence overlap.<sup>9,35</sup> This result is in agreement with the anti-inflammatory effect of 3Ala-RANTES *in vitro* and *in vivo*.<sup>36,37</sup> Moreover, 3Ala-RANTES was able to sequester the native protein in inactive dimer unable to recruit cells *in vivo*.<sup>36-38</sup> Indeed, RANTES has minimal quaternary structure required for *in vivo* activity.<sup>35</sup> In contrast, E66A-RANTES mutant binds to endothelial cells similarly to native RANTES (Figure 2), indicating that RANTES oligomerization is not required to binding on endothelial cell membrane. Surprisingly, both mutants abolished TNF- $\alpha$ -induced monocyte recruitment, suggesting that they may interact with other proinflammatory factors which contribute to monocyte recruitment.

Activation of endothelial cells contributes actively to leukocyte migration through endothelium barrier by promoting an “outside-in” signal transduction in endothelial cells<sup>1</sup>, and by inducing endothelial cell cytoskeletal changes.<sup>18</sup> Endothelial permeability is increased by the loss of adherens junction interaction between adjoining endothelial cells.<sup>18,39</sup> Endothelial cell

signaling induced by leukocytes stimulates endothelial cell retraction during localized dissociation of the endothelial cell lateral junctions at the site of leukocyte migration.<sup>24,40</sup> PECAM-1 is recruited to the endothelial cell surface at sites of monocyte transmigration<sup>41</sup> and PECAM-1 localization in endothelial cells is modulated by cytokines. Endothelial cell promotion of leukocyte recruitment require ICAM-1 and VCAM-1<sup>16,17,20</sup>, activating an endothelial cell calcium flux and PKC or Rac1.<sup>42</sup> ICAM-1 expression is constitutive on many cell types but can be increased on endothelium by inflammatory mediators.<sup>29</sup> However, our results indicate that RANTES does not modify the expression of any of these adhesion molecules. Such an absence of effect on adhesion molecules expressed by TNF- $\alpha$ -activated endothelial cells has been described for IL8.<sup>43</sup> ICAM-1 induces endothelial cell signals that are required for lymphocyte migration, such as PKC-induced phosphorylation of p60Src and cortactin.<sup>44</sup> The activation of PKC has been shown in other signaling systems to stimulate focal adhesions or leukocyte migration.<sup>42</sup> On non-activated HUVEC, PECAM-1 can be phosphorylated by PKC and linked to the cytoskeletal-associated proteins  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin through its immunoreceptor tyrosine-based activation motif.<sup>45</sup> Otherwise, vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) is a major component of adherens junctions, which mediates the cell-cell contact with the partners, such as  $\beta$ -catenin and p120.  $\beta$ -catenin stabilizes VE-cadherin and promotes its interaction with the actin cytoskeleton.<sup>46</sup> VE-cadherin phosphorylation on serine and tyrosine residues has been shown to provoke its internalization both *in vitro* and *in vivo*, leading to increase in vascular permeability.<sup>47</sup> Our results clearly demonstrated that RANTES induced a PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance that modulates phosphorylation of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin. Such a role of proinflammatory factors on adherens junctions between endothelial cells has been previously described for the IL8/CXCR2 axis that promotes the phosphorylation and internalization of VE-cadherin, on HUVEC, leading to increased endothelial permeability.<sup>47</sup> In addition, IL2 induces destabilization of adherens junctions through an increase in VE-cadherin phosphorylation concomitant with a decrease in SHP2 phosphatase protein levels.<sup>39</sup> PKC $\alpha$  increased endothelial permeability through the destabilization of adherens junctions while PKC $\delta$  promoted endothelial barrier integrity.<sup>19</sup> Furthermore, it has been previously demonstrated *in vivo* using PKC $\delta$  knockout mice and *in vitro* using rottlerin that PKC $\delta$  inhibits neutrophils recruitment.<sup>48</sup> Hence, endothelial PKC $\alpha$  signaling enhanced RANTES-induced monocyte recruitment by increasing phosphorylation of Y685-VE-cadherin and Y654- $\beta$ -catenin whereas it decreased phosphorylation of Y731-VE-cadherin. PKC $\delta$  inhibited monocyte transmigration by decreasing phosphorylation of Y685-VE-cadherin and of Y654- $\beta$ -catenin and increasing phosphorylation of Y731-VE-cadherin. Y685F or Y731F VE-cadherin

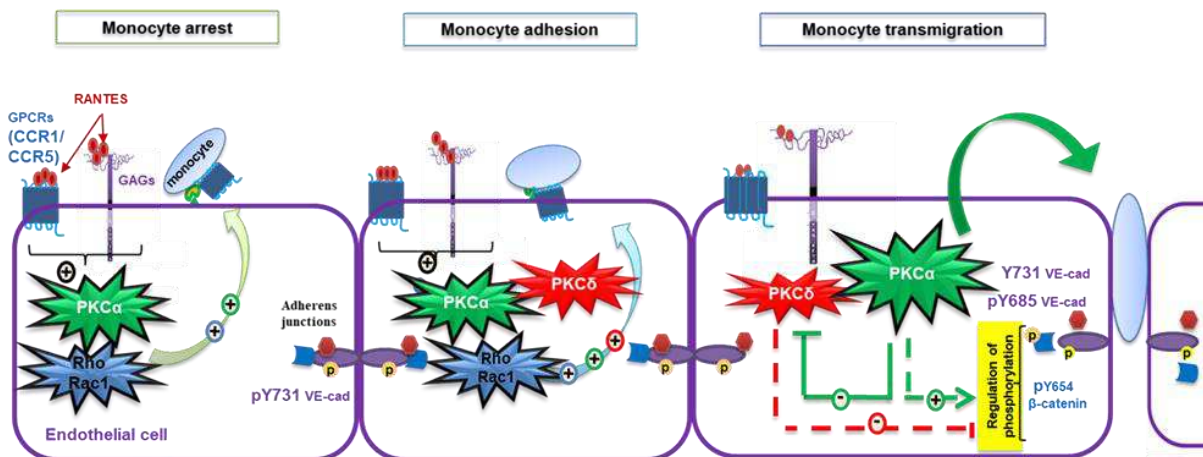
phosphorylation have been described to be involved in endothelial permeability and transendothelial migration of leukocytes *in vivo* using knock-in mice models.<sup>23</sup> Previous studies have indicated that p120-catenin regulates VE-cadherin lysosomal degradation by inhibiting endocytosis of the cell surface pool via interaction with the cytoplasmic tail of VE-cadherin proteins.<sup>49</sup> This study shows for the first time that endothelial PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  play an opposite role in RANTES-induced monocyte recruitment. However, the role of PKC $\delta$  remains controversial as PKC $\delta$  inhibition decreased neutrophil transmigration induced by interleukine 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) or by N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), but increased IL8-induced transmigration.<sup>50</sup>

The GTPases Rac1, RhoA and Cdc42 act in concert to control cytoskeleton dynamics. The stability of the endothelial junctions requires a very clear balance between the Rho and Rac/Cdc42 activities which act in an antagonistic way.<sup>18</sup> Rho via ROCK pathway enhanced endothelial junctions disruption and thus leukocyte transmigration.<sup>18,51</sup> Our results are consistent with the general concept that RhoA activation is required for leukocyte adhesion and opening of endothelial junctions.<sup>52</sup>

It is well documented that Rac1 has a controversial role in barrier fonction. On one hand, Rac1 improves the endothelial barrier integrity and therefore inhibits diapedesis<sup>53</sup> and on the other hand, Rac1 disrupts endothelial integrity leading to permeability and leukocyte transmigration.<sup>54,55</sup> We have previously demonstrated that RANTES activate Rac1.<sup>10</sup> In unstimulated endothelial cells, we observed that Rac1 inhibits monocyte transmigration whereas Rac1 inhibition abolishes RANTES effect in transmigration suggesting that RANTES-induced monocyte transmigration is mediated by Rac1 pathway in our model. This finding can be explained by the fact that basal levels of Rac1 activity are endothelium-protective whereas sustained Rac1 activation can lead to endothelial dysfunction.<sup>56</sup> Similar results were observed for leukocyte transmigration.<sup>57</sup> Monocyte transmigration was increased after Cdc42 inhibition suggesting that Cdc42 promotes endothelial integrity. This effect may be related on Cdc42 effect on junction stability and restoration.<sup>58</sup> However, the Rac1 inhibitor used in our study, ML141, is selective for other Rho GTPase including Rac1.<sup>59</sup> Experiments with dominant negative plasmids decreasing RhoA, Rac1 and Cdc42 protein levels confirm our results obtained with pharmacological inhibitors (data not shown). Conversely, Cdc42 did not affect basal transmigration and slightly increased RANTES-induced transmigration, suggesting a little role of Cdc42 in endothelium integrity in our model.

In summary, the current findings indicated that endothelial cells treated with RANTES induce monocyte arrest, adhesion and transmigration via PKCs and Rho GTPase signaling. RANTES

induces the membrane translocation of PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  and therefore their activations. RANTES decreased Y731-VE-cadherin phosphorylation whereas it increased Y685-VE-cadherin and Y654- $\beta$ -catenin phosphorylation via PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  cross-regulation leading to monocyte transmigration across endothelial barrier (Figure 9). Characterization of RANTES-induced endothelial cell response contributing to monocyte recruitment may allow the development of new anti-inflammatory therapeutic strategies targeting endothelial cells.



**Figure 9. Schematic representation of RANTES effect on endothelial cells promoting monocyte arrest, adhesion and transmigration.** RANTES stimulation of endothelial cells strongly increases monocyte arrest, adhesion and transmigration, by activating PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  and Rho GTPases signaling pathways. RANTES decreased Y731-VE-cadherin phosphorylation whereas it increased Y685-VE-cadherin and Y654- $\beta$ -catenin phosphorylation leading to monocyte transmigration across endothelial barrier. In conclusion, these results highlight the major role played by the chemokine RANTES/CCL5 in the regulation of adherens junctions between endothelial cells promoting monocyte transmigration.



## **CONFLICT OF INTERESTS**

The authors declare no conflict of interest

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

H. Mamoune and L. Maillard were supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, France. This project was supported by a grant from Institut Fédératif de Recherche Biomédicale from Paris 13 University, France. We thank Juliette Rousseau, Julien Burlaud-Gaillard and the IBiSA Electron Microscopy Facility of the University of Tours for technical support.

## References

- 1 Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 2007; **7**: 678–689.
- 2 Conti P, Pang X, Boucher W, Letourneau R, Reale M, Barbacane RC *et al.* Impact of Rantes and MCP-1 chemokines on in vivo basophilic cell recruitment in rat skin injection model and their role in modifying the protein and mRNA levels for histidine decarboxylase. *Blood* 1997; **89**: 4120–4127.
- 3 Teran LM, Noso N, Carroll M, Davies DE, Holgate S, Schröder JM. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *The Journal of Immunology* 1996; **157**: 1806–1812.
- 4 Dieu M-C, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J-M, Oldham E, Ait-Yahia S *et al.* Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites. *Journal of Experimental Medicine* 1998; **188**: 373–386.
- 5 Mause SF, von Hundelshausen P, Zerneck A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; **25**: 1512–1518.
- 6 Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ *et al.* RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* 1997; **185**: 1371–1380.
- 7 Hirano F, Komura K, Fukawa E, Makino I. Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced RANTES chemokine expression via activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase: roles of TNF- $\alpha$  in alcoholic liver diseases. *Journal of hepatology* 2003; **38**: 483–489.
- 8 Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; **95**: 3032–3043.
- 9 Proudfoot AE, Fritchley S, Borlat F, Shaw JP, Vilbois F, Zwahlen C *et al.* The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 10620–10626.

- 10 Maillard L, Saito N, Hlawaty H, Friand V, Suffee N, Chmielewsky F *et al.* RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biology Open* 2014 ;**3**(10):995-1004.
- 11 Suffee N, Hlawaty H, Meddahi-Pelle A, Maillard L, Louedec L, Haddad O *et al.* RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* 2012; **15**: 727–744.
- 12 Gilat D, Hershkovich R, Mekori YA, Vlodayvsky I, Lider O. Regulation of adhesion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *The Journal of Immunology* 1994; **153**: 4899–4906.
- 13 Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *Journal of Experimental Medicine* 1995; **181**: 2259–2264.
- 14 Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA *et al.* Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *Journal of Experimental Medicine* 1996; **183**: 2329–2336.
- 15 Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher EC. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* 2002; **186**: 37–46.
- 16 Soriano SG, Lipton SA, Wang YF, Xiaio M, Springer TA, Gutierrez-Ramos J-C *et al.* Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *Annals of neurology* 1996; **39**: 618–624.
- 17 Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995; **128**: 1243–1253.
- 18 Rho S-S, Ando K, Fukuhara S. Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions. *Journal of Nippon Medical School* 2017; **84**: 148–159.
- 19 Sandoval R, Malik AB, Minshall RD, Kouklis P, Ellis CA, Tiruppathi C. Ca<sup>2+</sup> signaling and PKC $\alpha$  activate increased endothelial permeability by disassembly of VE—cadherin junctions. *The Journal of Physiology* 2001; **533**: 433–445.

- 20 Muller WA. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology* 1995; **57**: 523–528.
- 21 Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends in cell biology* 2009; **19**: 8–15.
- 22 Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *The EMBO journal* 2012; **31**: 2714–2736.
- 23 Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M *et al.* Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nature immunology* 2014; **15**: 223.
- 24 Shaw SK, Bamba PS, Perkins BN, Luscinskas FW. Real-Time Imaging of Vascular Endothelial-Cadherin During Leukocyte Transmigration Across Endothelium. *The Journal of Immunology* 2001; **167**: 2323–2330.
- 25 Broman MT, Kouklis P, Gao X, Ramchandran R, Neamu RF, Minshall RD *et al.* Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing  $\alpha$ -catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circulation research* 2006; **98**: 73–80.
- 26 Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and  $\beta$ -catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003; **285**: L434–L442.
- 27 Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B *et al.* The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *The Journal of cell biology* 1995; **129**: 203–217.
- 28 Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: Leucocyte–endothelial cell crosstalk at the blood–brain barrier: A prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2011; **37**: 24–39.

- 29 HILLYER P, Mordelet E, Flynn G, Male D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clinical & Experimental Immunology* 2003; **134**: 431–441.
- 30 Makó V, Czúcz J, Weiszhar Z, Herczenik E, Matkó J, Prohászka Z *et al.* Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS. *Cytometry A* 2010; **77**: 962–970.
- 31 Hundelshausen P von, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AEI *et al.* Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 2005; **105**: 924–930.
- 32 Alard J-E, Ortega-Gomez A, Wichapong K, Bongiovanni D, Horckmans M, Megens RT *et al.* Recruitment of classical monocytes can be inhibited by disturbing heteromers of neutrophil HNP1 and platelet CCL5. *Science translational medicine* 2015; **7**: 317ra196–317ra196.
- 33 Kramp BK, Megens RTA, Sarabi A, Winkler S, Projahn D, Weber C *et al.* Exchange of extracellular domains of CCR1 and CCR5 reveals confined functions in CCL5-mediated cell recruitment: *Thrombosis and Haemostasis* 2013; **110**: 795–806.
- 34 Baltus T, Weber KS, Johnson Z, Proudfoot AE, Weber C. Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium. *Blood* 2003; **102**: 1985–1988.
- 35 Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I *et al.* Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; **100**: 1885–1890.
- 36 Nellen A, Heinrichs D, Berres M-L, Sahin H, Schmitz P, Proudfoot AE *et al.* Interference with Oligomerization and Glycosaminoglycan Binding of the Chemokine CCL5 Improves Experimental Liver Injury. *PLOS ONE* 2012; **7**: e36614.
- 37 Braunersreuther V, Pellieux C, Pelli G, Burger F, Steffens S, Montessuit C *et al.* Chemokine CCL5/RANTES inhibition reduces myocardial reperfusion injury in atherosclerotic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2010; **48**: 789–798.

- 38 Johnson Z, Kosco-Vilbois MH, Herren S, Cirillo R, Muzio V, Zaratin P *et al.* Interference with Heparin Binding and Oligomerization Creates a Novel Anti-Inflammatory Strategy Targeting the Chemokine System. *The Journal of Immunology* 2004; **173**: 5776–5785.
- 39 Wylezinski LS, Hawiger J. Interleukin 2 Activates Brain Microvascular Endothelial Cells Resulting in Destabilization of Adherens Junctions. *J Biol Chem* 2016; **291**: 22913–22923.
- 40 Muller WA. Migration of Leukocytes across Endothelial Junctions: Some Concepts and Controversies. *Microcirculation* 2001; **8**: 181–193.
- 41 Mamdouh Z, Chen X, Pierini LM, Maxfield FR, Muller WA. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 2003; **421**: 748–753.
- 42 Cook-Mills Joan M., Deem Tracy L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; **77**: 487–495.
- 43 Zhang H, Issekutz AC. Down-modulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor: reversal by the anti-angiogenic agent SU6668. *The American journal of pathology* 2002; **160**: 2219–2230.
- 44 Etienne-Manneville S, Manneville J-B, Adamson P, Wilbourn B, Greenwood J, Couraud P-O. ICAM-1-Coupled Cytoskeletal Rearrangements and Transendothelial Lymphocyte Migration Involve Intracellular Calcium Signaling in Brain Endothelial Cell Lines. *The Journal of Immunology* 2000; **165**: 3375–3383.
- 45 Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri JA. Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31), a Scaffolding Molecule for Selected Catenin Family Members Whose Binding Is Mediated by Different Tyrosine and Serine/Threonine Phosphorylation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 21435–21443.
- 46 Choi H-J, Huber AH, Weis WI. Thermodynamics of  $\beta$ -Catenin-Ligand Interactions: THE ROLES OF THE N- AND C-TERMINAL TAILS IN MODULATING BINDING AFFINITY. *Journal of Biological Chemistry* 2006; **281**: 1027–1038.
- 47 Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: A wacky comradeship. *Cell Adhesion & Migration* 2013; **7**: 465–471.

- 48 Ahn JJ, Jung JP, Park SE, Lee M, Kwon B, Cho HR. Involvement of Protein Kinase C- $\delta$  in Vascular Permeability in Acute Lung Injury. *Immune Network* 2015; **15**: 206–211.
- 49 Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E *et al.* p120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin. *MBoC* 2005; **16**: 5141–5151.
- 50 Mondrinos MJ, Zhang T, Sun S, Kennedy PA, King DJ, Wolfson MR *et al.* Pulmonary Endothelial Protein Kinase C-Delta (PKC $\delta$ ) Regulates Neutrophil Migration in Acute Lung Inflammation. *The American Journal of Pathology* 2014; **184**: 200–213.
- 51 Saito H, Minamiya Y, Saito S, Ogawa J. Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. *Journal of leukocyte biology* 2002; **72**: 829–836.
- 52 Heemskerk N, van Rijssel J, van Buul JD. Rho-GTPase signaling in leukocyte extravasation: An endothelial point of view. *Cell Adhesion & Migration* 2014; **8**: 67–75.
- 53 Birukova AA, Malyukova I, Poroyko V, Birukov KG. Paxillin- $\beta$ -catenin interactions are involved in Rac/Cdc42-mediated endothelial barrier-protective response to oxidized phospholipids. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2007; **293**: L199–L211.
- 54 Cain RJ, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. The PI3K p110 $\alpha$  isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *The Journal of Cell Biology* 2010; **188**: 863–876.
- 55 Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* 2006; **8**: 1223.
- 56 Hordijk PL. Regulation of NADPH Oxidases: The Role of Rac Proteins. *Circulation Research* 2006; **98**: 453–462.
- 57 Clissi B, D'Ambrosio D, Geginat J, Colantonio L, Morrot A, Freshney NW *et al.* Chemokines Fail to Up-Regulate 1 Integrin-Dependent Adhesion in Human Th2 T Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 2000; **164**: 3292–3300.
- 58 Spindler V, Schlegel N, Waschke J. Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc Res* 2010; **87**: 243–253.

59 Surviladze Z, Waller A, Strouse JJ, Bologna C, Ursu O, Salas V *et al.* A Potent and Selective Inhibitor of Cdc42 GTPase. In: *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. National Center for Biotechnology Information (US): Bethesda (MD), 2010<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK51965/> (accessed 25 Mar2018).



## 1. Supplementary data

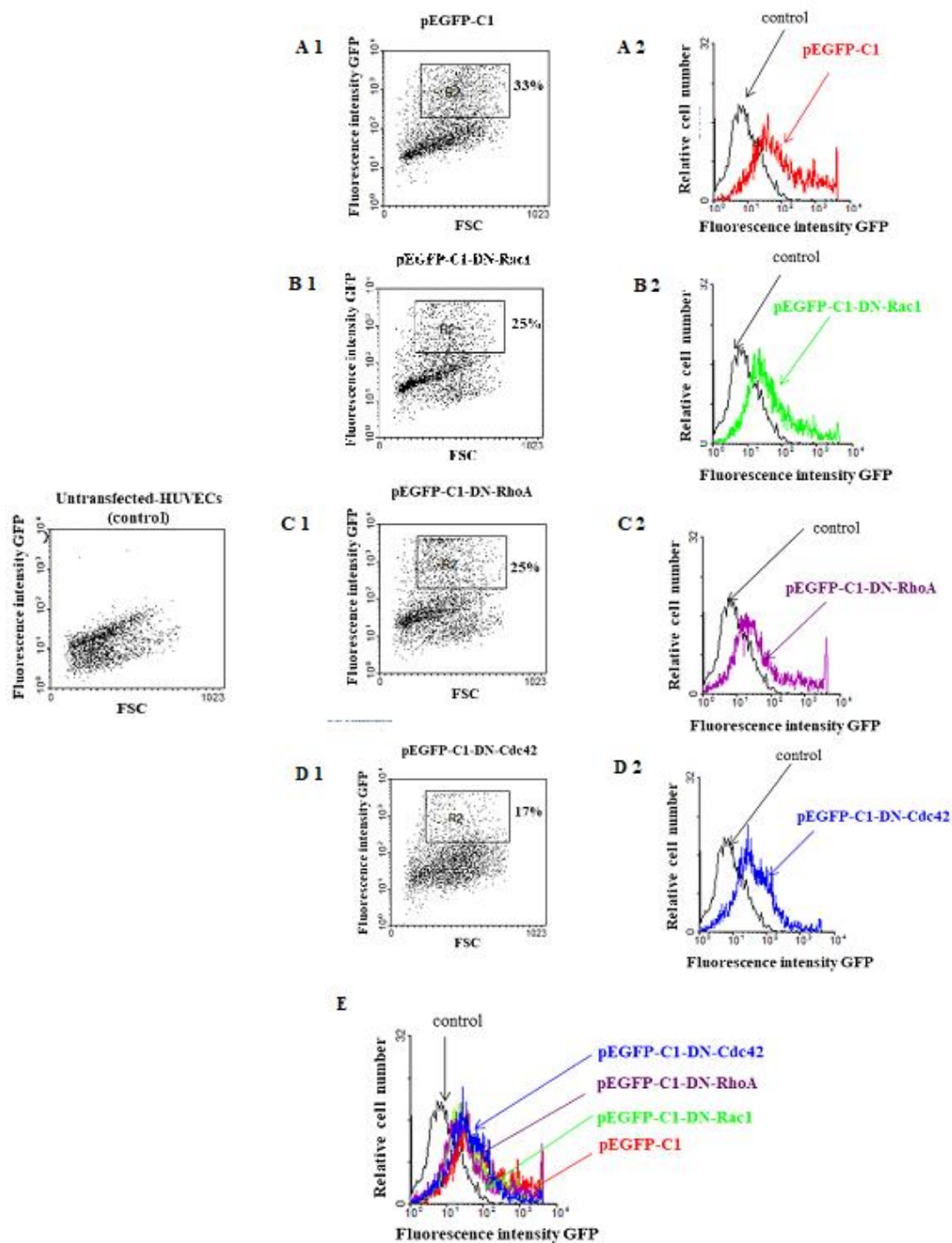
### 1.1. Involvement of Rho GTPases in RANTES-induced monocyte transendothelial migration

We have previously shown the involvement of Rho GTPases in monocyte recruitment using pharmacological inhibitors (**Article 1 Figure 5 E and F**). To confirm the potential role of Rac1, RhoA and Cdc42 in regulating RANTES-induced monocyte transmigration, we also used Green Fluorescent Protein tagged Rac1, Cdc42 or RhoA dominant negative plasmids.

In Rac1 dominant negative construct (pEGFP-C1-DN-Rac1), the amino acid residue threonine located in position 17, in GTP interaction domain, was substituted by an asparagine (T17N). This mutation in the GTP binding domain blocks Rac1 in its inactive form. In Cdc42 dominant negative construct (pEGFP-C1-DN-Cdc42), in addition to the T17N mutation that prevents activation of Cdc42, this dominant negative is also mutated at the <sup>183</sup>KKSRR<sup>187</sup> motif involved in membrane targeting. The amino acid residues lysine (K) and arginine (R) of this motif were substituted by alanine (<sup>183</sup>AASAA<sup>187</sup>). In RhoA dominant negative construct (pEGFP-C1-DN-RhoA), the amino acid residue T19, was substituted by an asparagine (T19N) leading to its inactivation.

#### 1.1.1. Expression of Rho GTPases dominant negative GFP-constructs in HUVECs

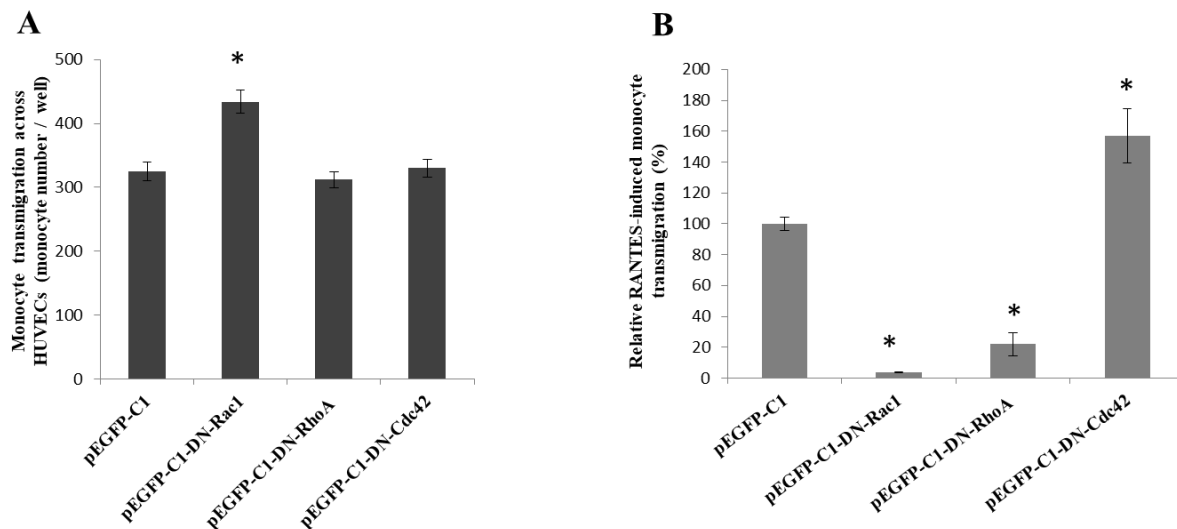
HUVEC were transiently transfected with the plasmid control (pEGFP-C1) encoding for GFP alone or with one of each Rho GTPase dominant negative. For each plasmid, the transfection efficiency assessed by GFP fluorescence intensity by flow cytometry, ranges from 20 to 33% (Figure S1 A1, B1,C1, D1) and was similar between the different dominant negative (Figure S1 E).



**Figure S1. Rho GTPases dominant negative transfection efficiency.** HUVEC cells were transfected with the plasmid control (pEGFP-C1) (A), pEGFP-C1-DN-Rac1 (B), pEGFP-C1-DN-RhoA (C), or pEGFP-C1-DN-Cdc42 (D). The transfection efficiency was assessed by flow cytometry by measuring GFP fluorescence intensity. The percentage of transfected cells (%) = (GFP<sup>+</sup> cells number / total of cells number) x 100 (A1, B1, C1, D1). GFP fluorescence intensity of transfected cells was compared to control (untransfected-cells, black histogram) (A2, B2, C2, D2) or with pEGFP-C1 (E).

### 1.1.2. Rho GTPases are involved in RANTES-induced monocyte transendothelial migration

Monocyte transmigration was investigated across HUVECs transfected by the plasmid control (pEGFP-C1), pEGFP-C1-DN-Rac1, pEGFP-C1-DN-RhoA, or pEGFP-C1-DN-Cdc42. Then transfected HUVECs were activated with TNF- $\alpha$  and stimulated or not (untreated, Figure S2 A) by RANTES/CCL5 (Figure S2 B).



**Figure S2. Rho GTPases pathways involvement in RANTES-induced monocyte transmigration.** Monocyte transmigration was assessed using HUVECs transfected by the plasmid control (pEGFP-C1), pEGFP-C1-DN-Rac1, pEGFP-C1-DN-RhoA, or pEGFP-C1-DN-Cdc42. Transfected HUVECs were activated with TNF- $\alpha$  and then stimulated or not (A, untreated) by RANTES/CCL5(B). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ , versus pEGFP-C1-transfected cells. RANTES-induced transmigration in pEGFP-C1-transfected cells was set to 100 % (B).

In the absence of RANTES stimulation, monocyte transmigration across HUVEC transfected with pEGFP-C1-DN-Rac1 was significantly increased by  $34 \pm 4\%$  as compared to pEGFP-C1-transfected cells ( $434 \pm 18$  versus  $325 \pm 13$  transmigrated monocytes/well, \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , **Figure S2A**). By contrast, HUVECs transfection by pEGFP-C1-DN-RhoA or pEGFP-C1-DN-Cdc42 had no effect on monocyte transmigration (**Figure S2 A**).

In the presence of RANTES, monocyte transmigration through transfected-HUVECs with pEGFP-C1-DN-Rac1 was abolished (**Figure S2 B**). Interestingly, RANTES-induced monocyte transmigration through pEGFP-C1-DN-RhoA-HUVECs transfected cells, was strongly decreased by  $78 \pm 9\%$  (\* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , **Figure S2 B**). By contrast, HUVEC transfection with

pEGFP-C1-DN-Cdc42 increased RANTES-induced monocyte transmigration by  $57 \pm 10\%$  ( $*p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure S2 B).

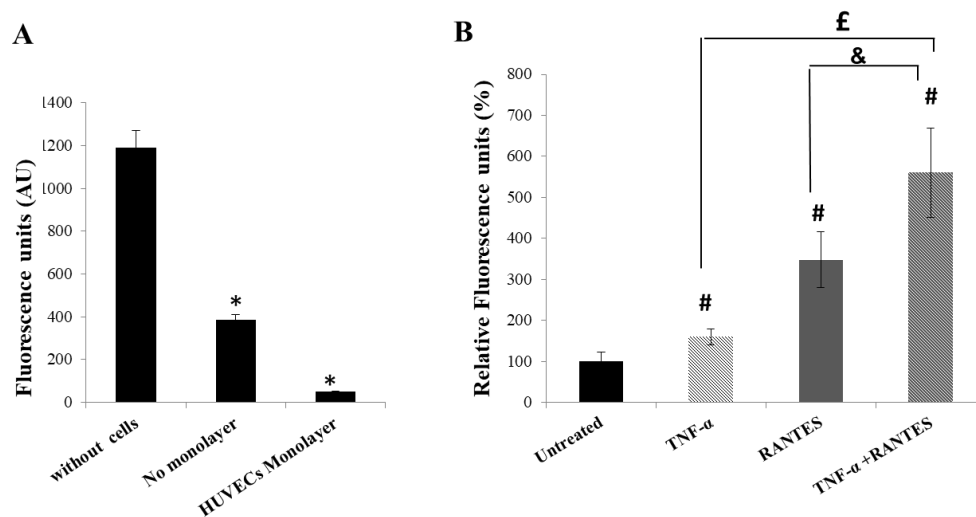
Altogether, our results suggest that RANTES-induced monocyte transmigration involves and Rac1, RhoA and Cdc42 pathways. This finding confirms monocyte transmigration assay with pharmacological inhibitor.

## 2. Complementary data

We have previously shown that RANTES induced phosphorylation of Y685-VE-cadherin (article 1 Figure 7A). This tyrosine phosphorylation is involved in vascular permeability. (Wessel *et al.*, 2014) The continuity is focalized on RANTES effect in vascular permeability using FITC-Dextran permeability *in vitro* test.

### 2.1. HUVECs monolayer integrity reduced permeability to FITC-dextran

To determine the experimental conditions for observing permeability process through a monolayer of HUVEC, we first defined different parameters such as cell monolayer necessary to have a functional system and to avoid any experimental bias. (Figure C1).



**Figure C1. RANTES promotes permeability through HUVEC monolayer.** FITC-Dextran permeability test was assessed using no confluent HUVEC (No monolayer), HUVEC monolayer or through empty fibronectin-coated transwell (without cells) (A) RANTES effect in FITC-Dextran permeability were evaluated on HUVEC monolayer activated or not by TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) and stimulated or not by RANTES (3 nmol/L) (B). Quantitative data represent means  $\pm$  SEM of fluorescence intensity measured by spectrofluorimetry of three independent experiments.\*  $p<0.05$ , versus without cells (A). Fluorescence intensity of HUVEC monolayer condition which represents untreated condition (without TNF- $\alpha$  and without RANTES) was set to 100 % (B). #  $p<0.05$ , versus untreated, £  $p<0.05$ , versus TNF- $\alpha$ , &  $p<0.05$ , versus RANTES (B).

First, we checked the monolayer integrity by evaluating permeability to FITC-Dextran. Permeability system transwell were coated with fibronectin (100ng/mL), then 0, 100 000 or 200 000 HUVECs were seeded which represent respectively no cell condition, no monolayer condition or HUVEC monolayer conditions (Figure C1 A). Permeability to FITC-Dextran significantly decreased by  $67 \pm 6\%$  through no confluent HUVECs (no monolayer) as compared

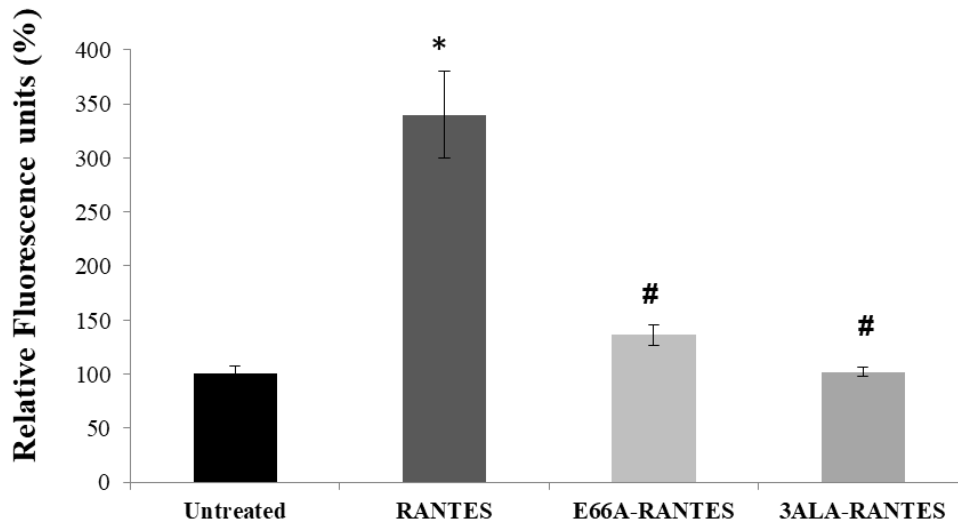
to condition without cells ( $387 \pm 24$  AU *versus*  $1190 \pm 80$  AU,  $*p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure C1 A). Interestingly, permeability to FITC-Dextran was abolished through confluent HUVEC (HUVECs monolayer) (Figure C1 A).

Then, HUVECs preincubated with TNF- $\alpha$  alone or RANTES alone significantly increased permeability by  $59 \pm 4\%$  or by  $248 \pm 45\%$  respectively as compared to relative untreated HUVEC monolayer ( $\#p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure C1 B).

The successive preincubation of HUVEC with TNF- $\alpha$  and RANTES led to a significant and strong increase of FITC-Dextran by 4-fold as compared to untreated cells. Thus, RANTES is 37% more efficient to induce permeability on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC cells as compared to unactivated cells (Figure C1 B). Altogether, our finding showed that incubation of HUVEC with TNF- $\alpha$  alone or RANTES alone increased permeability whereas the stimulation of TNF- $\alpha$ -activated HUVEC with RANTES strongly increased this effect.

## **2.2. RANTES oligomerization and its binding to GAGs are required to promote vascular permeability**

Furthermore, we want to check if RANTES oligomerization and its binding to membrane endothelial GAGs are necessary for RANTES-induced permeability. We have previously showed that the oligomerization deficient mutant E66A-RANTES and the GAG-binding deficient mutant 3Ala-RANTES bind to HUVEC as well as native RANTES using flow cytometry (Article 1, Figure 2). To evaluate HUVEC barrier permeability, FITC-Dextran permeability assay was assessed on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC stimulated or not by RANTES, E66A-RANTES or 3Ala-RANTES (Figure C2).



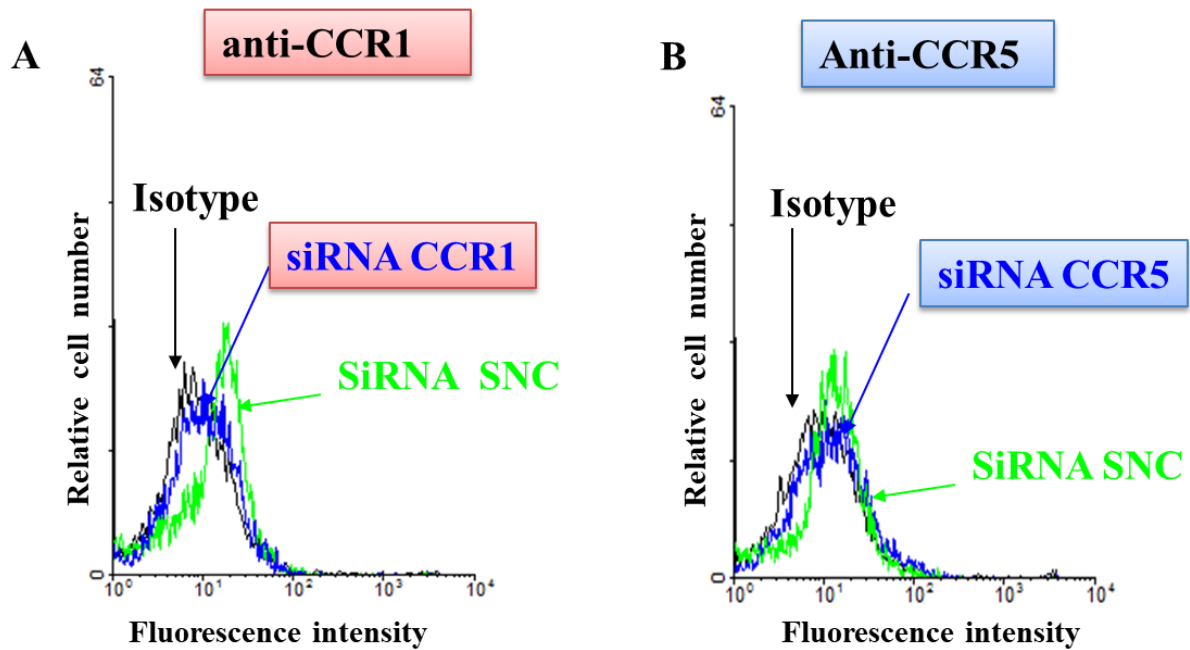
**Figure C2. RANTES-induced vascular permeability requires at least oligomerization or GAGs binding.** FITC-Dextran permeability test was assessed using HUVEC monolayer activated with TNF- $\alpha$  and then stimulated or not by RANTES, or by its oligomerization deficient mutant (E66A-RANTES) or by its GAG-binding deficient mutant (3Ala-RANTES). Results are expressed as means  $\pm$  SEM of fluorescence intensity measured by spectrofluorimetry of three independent experiments.\*  $p < 0.05$ , versus Untreated), #  $p < 0.05$ , versus RANTES.

Our results showed that HUVEC stimulation with E66A-RANTES diminished HUVEC permeability to FITC-dextran significantly by  $60 \pm 10\%$  and abolished it after HUVEC stimulation with 3Ala-RANTES (# $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure C2).

Our data highlight the major role of the interaction of RANTES with GAG chains expressed at the HUVEC membrane and RANTES oligomerization in vascular permeability

### 2.3. RANTES binding with CCR1 is implicated in RANTES-induced permeability

RANTES binds also to G protein-coupled receptors, CCR1 and CCR5 at the HUVEC membrane. (Suffee *et al.*, 2012) The role of CCR1 and CCR5 in RANTES-induced monocyte recruitment was previously studied (Article 1, Figure 3D, 3E, 3F). We showed that RANTES-induced trans-endothelial of monocyte requires binding to CCR1, but not to CCR5 (article 1, Figure 3F). Then, we evaluated the role of RANTES-binding with CCR1 and CCR5 in RANTES-induced permeability. CCR1 or CCR5 inhibition in HUVEC transfected with siRNA was checked systematically for each experience by flow cytometry (Figure C3).

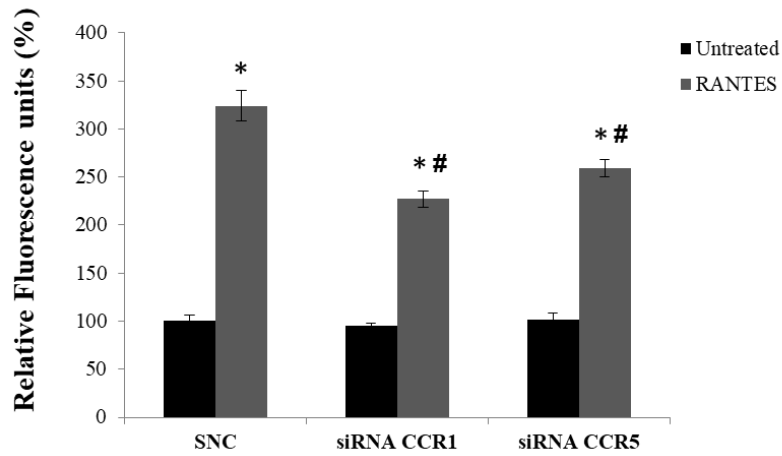


**Figure C3. Inhibition of CCR1 and CCR5 expressed on HUVEC membrane cell by specific RNA interference.** HUVEC were transfected with the scramble siRNA (SNC), CCR1 siRNA (A) or CCR5 siRNA (B). Membrane expression of CCR1 or CCR5 was measured on non-permeabilized HUVEC.

Then, FITC-Dextran permeability was assessed through transfected HUVEC with CCR1 siRNA or CCR5 siRNA or the scramble negative control (SNC) and stimulated or not with RANTES (Figures C4). It is interesting to note that in absence of RANTES stimulation, no significant difference in permeability was observed after CCR1 or CCR5 inhibition as compared to siRNA control (SNC).

RANTES-induced permeability was decreased slightly but significantly by  $30 \pm 5\%$  or by  $20 \pm 6\%$  after HUVEC transfection with CCR1 siRNA or with CCR5 siRNA respectively ( $227 \pm 8$  or  $259 \pm 9$  versus  $324 \pm 16\%$  # $p < 0.05$ ,  $n=3$ , grey histograms, Figure C4).





**Figure C4. RANTES binding with its GPCR promotes RANTES-induced permeability.** FITC-Dextran permeability assay was investigated using transfected HUVECs with CCR1 siRNA or CCR5 siRNA or the scramble siRNA control (SNC), activated with TNF- $\alpha$  and then stimulated or not with RANTES. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of fluorescence intensity measured by spectrofluorimetry of three independent experiments. \*  $p < 0.05$ , versus Untreated. #  $p < 0.05$ , versus RANTES.

### 3. Bilan

L'objectif de cette première partie a été de déterminer si l'effet de RANTES/CCL5 exercé sur les cellules endothéliales modifie leur capacité à interagir avec les monocytes et d'évaluer la conséquence de cette modification sur leur recrutement monocyttaire ainsi que les mécanismes mis en jeu.

Nous avons montré que la stimulation des cellules endothéliales avec RANTES/CCL5 augmente fortement l'arrêt, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des monocytes, en interagissant avec CCR1, CCR5 et les chaînes GAGs exprimés à la surface des cellules endothéliales. L'effet de RANTES/CCL5 exercé sur les cellules endothéliales induisant le recrutement des monocytes est médié par l'activation des voies de signalisation intra-endothéliales dépendantes des PKCs ( $\alpha$  et  $\delta$ ) et des Rho GTPases (Rac1, RhoA et Cdc42). De plus, RANTES/CCL5 diminue la phosphorylation de Y731-VE-cadhérine alors qu'elle augmente la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine et la Y654- $\beta$ -caténine favorisant ainsi la migration trans-endothéliale des monocytes.

En conclusion, notre approche permet de compléter les connaissances actuelles sur le recrutement monocyttaire visant à étudier la réponse de ces derniers à RANTES/CCL5, en nous plaçant du côté de la barrière endothéliale. Ainsi il sera important d'évaluer la réponse leucocytaire et la réponse endothéliale lorsqu'une stratégie ciblant la chimiokine sera envisagée.

Ces travaux ont fait l'objet :

- D'une communication orale lors de la 14<sup>e</sup> édition du congrès de la Société Francophone d'Athérosclérose (NFSA, Biarritz, 20 au 22 juin 2018) :  
*La balance PKC $\alpha$  / PKC $\delta$  induite par RANTES régule la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine impliquée dans la transmigration des monocytes.* Mamoune H., Maillard L., Haddad O., Hlawaty H., Oudar O., Charnaux N. et Sutton A.
- D'une communication orale lors de la 12<sup>e</sup> édition du congrès de la Société Francophone d'Athérosclérose (NFSA, Biarritz, 16 au 18 juin 2016) :  
*L'implication de la phosphorylation de la VE-cadhérine dans la transmigration monocyttaire induite par RANTES/CCL5.* Mamoune H., Maillard L., Haddad O., Hlawaty H., Oudar O., Charnaux N. et Sutton A.
- D'une communication affichée lors de la 20<sup>e</sup> édition du congrès *The International Vascular Biology Meeting 2018* (IVBM2018) (Helsinki, Finlande 3-7 juin 2018) :

***PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  RANTES-induced regulates of VE-cadherin and  $\beta$ -catenin phosphorylation in monocyte transmigration. Mamoune H., Maillard L., Haddad O., Hlawaty H., Oudar O., Charnaux N. et Sutton A.***

- D'une communication affichée lors de la journée doctorale Gallilée (campus de Villetaneuse, 15 septembre 2017) :

***Regulation of VE- cadherin and  $\beta$ -catenin phosphorylation through PKC $\alpha$ /PKC $\delta$  balance induced by RANTES modulates monocyte transmigration. Mamoune H., Maillard L., Haddad O., Hlawaty H., Oudar O., Charnaux N. et Sutton A.***

## **B. Intracellular domain of SDC-4 in RANTES-induced monocyte recruitment**

### **I. Article 2 (being written)**

#### **Intracellular domain of syndecan-4 orchestrates RANTES-induced signaling pathways in endothelial cells to promote monocyte recruitment**

Mamoune Hadjer<sup>1\*</sup>, Maillard Loïc<sup>1\*</sup>, Hlawaty Hanna<sup>1</sup>, Haddad Oualid<sup>1</sup>, Guyot Erwan<sup>1,2</sup>, Laguillier Christelle<sup>1,2</sup>, Naoaiki Saito<sup>3</sup>, Bryckaert Marijke<sup>4</sup>, Oudar Olivier<sup>1</sup>, Charnaux Nathalie<sup>1,2</sup> and Sutton Angela<sup>1,2,3</sup>

\* The authors contributed equally to this work.

§ Corresponding author: [angela.sutton@aphp.fr](mailto:angela.sutton@aphp.fr)

1: Inserm U1148 LVTS, UFR SMBH, Université Paris 13, COMUE Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France

2: AP-HP, Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, Bondy, France

3: Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan

4: Inserm U1176, Le Kremlin-Bicêtre, France

Running title: RANTES/syndecan-4 axis and monocyte recruitment

Keywords : syndecan-4, signaling, endothelial, monocyte, RANTES/CCL5

Word count:

Abbreviations:

CMTMR: 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine, CPD: Cell Proliferation Dye eFluor, ECM: extracellular matrix, FGF: fibroblast growth factor, GAG:

glycosaminoglycan, GPCR: G Protein-Coupled Receptors, HUVEC: Human Umbilical Vein-Endothelial Cell, ICAM-1: Intracellular Adhesion Molecule-1, IL: Interleukine, MCP-1/CCL2: Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2, MM6: Mono Mac 6, PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, PFA: paraformaldehyde, PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PKC: Protein Kinase C, PMA: phorbol myristate acetate, RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted, RhoG: Ras homolog family member G, SDC: syndecan, TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1, VE-cadherin: Vascular Endothelial cell cadherin, VEGF: vascular endothelial growth factor

## ABSTRACT

Leukocytes recruitment is essential for an efficient immune response. Endothelial cells and leukocytes interact together in response to inflammatory mediators such as cytokines and chemokines. The CC-chemokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)/CCL5, is well described as a monocyte's recruiter. The biological activities of RANTES depend on its interaction with G-specific proteins coupled to a transmembrane receptors (GPCR) such as CCR1 and CCR5 and with glycosaminoglycan chains (GAGs) carried by membrane proteoglycans such as syndecan-4. The aim of this study was to evaluate syndecan-4 involvement as a functional coreceptor of RANTES by using syndecan-4 intracellular domain mutants. Our results showed that intracellular variants of syndecan-4 modify RANTES-induced monocyte recruitment (arrest, adhesion, transendothelial migration) on endothelial cells. The mutant S179A-SDC-4, associated with a constitutive activation of protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ), leads to a higher rate of RANTES-induced monocytes recruitment. Intracellular domain of SDC-4 is involved in RANTES monocyte arrest and adhesion by its PDZ proteins interaction-domain. SDC-4 increased transendothelial migration of monocytes with its intracellular domain binding PIP2 or PDZ proteins. The transendothelial migration of monocytes induced by the RANTES-SDC-4 axis might be mediated by the transient regulation of Y731-VE-cadherin phosphorylation. Since RANTES is involved in various physiopathological processes, the development of a new therapeutic strategy may rely on the mechanism by which RANTES exerts its biological activities, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan receptor.

## INTRODUCTION

Chemokines expressed on vascular endothelium may trigger leukocyte recruitment. The leukocyte recruitment paradigm encompasses leukocyte arrest, adhesion and transendothelial migration. The CC-chemokine *Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES)/CCL5 is involved in the recruitment of leukocytes. RANTES can bind to the cell membrane through its specific G Protein-Coupled Receptors (GPCR) CCR1, CCR3 and CCR5 and also to glycosaminoglycans (GAG). GAG are long, linear, and heterogenous sulfated polysaccharides. RANTES exhibits selectivity in glycosaminoglycan binding with the highest affinity (nanomolar range) for heparin (Proudfoot et al., 2001). We have previously demonstrated that RANTES associates with its GPCRs but also with heparan sulfate proteoglycan belonging to the syndecan family, syndecan-1 (SDC-1) and syndecan-4 (SDC-4) on various cell types (Slimani et al., 2003a, 2003b; Sutton et al., 2007; Charni et al., 2009). RANTES interacts with GAG through its <sup>44</sup>RKNR<sup>47</sup> motif, modulating RANTES biological functions. Indeed, we previously published that soluble heparin, GAG mimetics or GAG-binding deficient mutants of RANTES (R47E-RANTES and <sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>-RANTES) modulate the biological activities of the chemokine as shown *in vitro* (Charni et al., 2009; Sutton et al., 2007) or *in vivo* (Suffee et al., 2012).

Proteoglycans expressed on endothelium luminal side are involved in chemokine-induced leukocyte recruitment by forming a complex between the endothelial cell (due to the binding of chemokine to proteoglycan) and the leucocyte (due to the binding of chemokine to GPCR). (Götte et al., 2002)

Syndecan-4 (SDC-4) is one of a family of four transmembrane heparan sulfate proteoglycans, whose extracellular domains interact with various soluble factors in the blood circulation and insoluble factors in the extracellular matrix (ECM) such as growth factors or component of ECM (fibronectin, laminin). Syndecans have been thought to act as co-receptors for various heparin-binding growth factors such as fibroblast growth factors (FGFs), vascular endothelial growth factors (VEGFs) and fibronectin-binding integrins. (Beauvais and Rapraeger, 2004; Kwon et al., 2012) A conserved cytoplasmic domain on syndecans supports a key role for cell surface ligand binding and cytoplasmic signaling. Common to all syndecans, three regions of cytoplasmic domain have been identified. The first (C1) is the membrane-proximal region that binds neurofibromin, Src kinase, ezrin, and cortactin. (Hsueh et al., 2001; Kinnunen et al., 1998; Granés et al., 2003). The second (C2) is a C-terminal region that contains EFYA motif which

interact with post-synaptic density 95, discs-large and ZO-1 (PDZ) proteins such as syntenin, synectin and CASK.(Elfenbein and Simons, 2013; Lambaerts et al., 2009) The variable (V) domain is located between the two conserved domains and its sequence is unique to each syndecan family member. The V domain of SDC-4 binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) and also to protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ),  $\alpha$ -actinin, and syndesmos. (Horowitz and Simons, 1998a; Denhez et al., 2002; Greene et al., 2003; Baciú et al., 2000; Lim et al., 2003). These interactions are responsible for the previously demonstrated SDC-4 role in cytoskeleton regulation that includes formation of focal adhesions, of dynamic stress fibers, and cell protrusions (Kwon et al., 2012). SDC-4 null mice are viable and fertile but exhibit defective skin wound healing reflecting impaired cell migration and angiogenesis (Echtermeyer et al., 2001; Okina et al., 2012).

As previously described, RANTES/CCL5-effect on endothelial cells promoting monocytes recruitment (arrest, adhesion and transendothelial migration) involves RANTES/CCL5 GAG-binding. (H. Mamoune et al. *unpublished data*). Therefore, our hypothesis is that the interaction of RANTES/CCL5 with SDC-4 triggers the transduction of signals leading to monocytes recruitment. The aim of this study is to investigate involvement of intracellular domain of SDC-4 in RANTES-effect on endothelial cells to promote monocyte recruitment.



## MATERIALS AND METHODS

### Antibodies and reagents

RANTES/CCL5 and RANTES/CCL5 GAG-deficient mutant (R47E and <sup>44</sup>AANA<sup>47</sup> (3Ala)) and MCP-1 were synthesized by L. Martin and C. Vita (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France) as previously described (Charni et al., 2009; Suffee et al., 2012) and used at 3 nmol/L. Fibronectin (100 µg/ml) was from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). DAPI (1 µg/ml, 4',6'-diamidino-2-phénylindole, a nucleus marker) was from Roth (Lauterbourg, France). The cytosolic marker CMTMR (10 µM, 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine) was from Invitrogen (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). CPD (5 µM, Cell Proliferation Dye eFluor 670, a cytosolic marker) was from eBioscience (eBioscience S.A.S, Paris, France). PKC $\alpha/\beta$ 1 inhibitor Gö6976 (1 µM), PKC $\delta$  inhibitor Rottlerin (1 µM) and Rho A/Rho B/Rho C inhibitor C3 exoenzyme (10 ng/ml) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Rac1 inhibitor NSC (1 µM) was from Millipore (Millipore S.A.S, Guyancourt, France). TNF- $\alpha$  (1 ng/ml, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) was from Gibco (Life Technologies).

Antibodies were used at a 1 µg/ml concentration: primary antibodies mouse IgG1 anti-human ICAM-1 (P2A4) was from Millipore, mouse IgG1 anti-human PECAM-1 (JC70), mouse IgG2a anti-human E-selectin (CTB202) and rat IgG1 (M/K-2) anti-human VCAM-1 were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France). Isotype controls, mouse IgG1, mouse IgG2a and rat IgG1 were from BD Biosciences Pharmingen. Secondary antibodies Alexa Fluor 647-goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 647-goat anti-rat IgG were from Invitrogen.

### cDNA constructs and siRNA

Syndecan-4 plasmids pGFP-N3 (N3), pGFP-N3-SDC-4 wild-type (SDC4WT), pGFP-N3-SDC-4-S179A (S179A-SDC4), pGFP-N3-SDC-4-L188QQ (L188QQ-SDC4), pGFP-N3-SDC-4-A198del (A198del-SDC4) were obtained as previously described (Maillard et al., 2014).

SDC-4 expressed by HUVEC were targeted by SDC-4 siRNA purchased from Eurogentec. We used scramble ds RNA (SNC, Eurogentec) as negative control.

### Cell culture, transfection and transduction

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, N° CRL-1730, ATCC) were cultured as previously described (Suffee et al., 2012). Mono-Mac 6 (MM6, Institute for Immunology,

University of Munich, Germany) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal calf serum (Lonza, Levallois-Perret, France) and 1 % penicillin-streptomycin (Lonza).

HUVEC were harvested and  $10^6$  cells were incubated with 5  $\mu$ g of plasmid or 300n M of siRNA in 100  $\mu$ l Amaxa cell line nucleofector solution V (Lonza). Cells were transfected using protocol V-001 of AMAXA nucleofector device II (Lonza). Transfected cells were cultured at  $10^6$  cells/mL in ECBM2 12 % serum. After 8 hours, dead cells were removed and fresh media was added. The cell transfection efficiency was verified by flow cytometry as previously described (Maillard et al., 2014).

### **Membrane molecules adhesion expression study**

Transfected cells were treated 24 hours after the transfection by TNF- $\alpha$  for 16 hours and then incubated or not with RANTES for 2 hours. Transfected cells were fixed and adhesion molecule expression at transfected endothelial cells membrane was assessed by the use of specific antibodies anti-ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 or E-selectin or with isotype controls revealed by Alexa Fluor 647-goat anti mouse IgG or Alexa Fluor 647-goat anti rat IgG as secondary antibodies. Adhesion molecule membrane expression of transfected (GFP positive) endothelial cells was analyzed by flow cytometry.

### **Monocyte arrest assay under flow condition**

HUVEC transfected cells were incubated at  $4 \cdot 10^5$  cells in  $\mu$ -slide flow chamber ( $\mu$ -slide I<sup>0.4</sup>Luer, Biovalley, Marne la Vallée, France) for 24 hours to obtain a monolayer. HUVEC were then stained with CMTMR. After 16 hours of TNF- $\alpha$  treatment, transfected cells were incubated or not with RANTES/CCL5 for 2 hours. Pre-stained MM6 with DAPI were added under flow condition at 0.67 dyn/cm<sup>2</sup> with peristaltic pump (Miniplus 2, Gilson, Villiers-le-Bel, France) for 10 minutes. Cells were then fixed and the number of monocytes arrested on HUVEC monolayer was quantified under fluorescence microscopy (Zeiss, AXIOPHOT).

### **Monocyte adhesion assay in static condition**

HUVEC transfected cells were incubated at  $3 \cdot 10^5$  cells in 8-well labtek for 24 hours to obtain a monolayer. HUVECs were then stained with CMTMR. After 16 hours of TNF- $\alpha$  treatment, transfected cells were incubated or not with RANTES for 2 hours. Pre-stained MM6 with DAPI were added for 30 minutes. Cells were then fixed, and the number of monocytes arrested on HUVEC monolayer was quantified under fluorescence microscopy (Zeiss, AXIOPHOT).

### **Monocyte transendothelial migration in transwell chamber**

Transwell chambers (Beckton Dickinson Le Pont de Claix, France) were pre-coated with 100 µg/mL fibronectine (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France).  $2.5 \times 10^5$  HUVEC transfected were cultured in the upper part of the chamber. Following incubation at 37°C for 24 h, HUVEC were activated with TNF- $\alpha$  for 16 h and then stimulated or not with 3 nmol/L RANTES.

Pre-stained MM6 monocytes with 5 µM *Cell Proliferation Dye* eFluor 670 (CPD, (eBioscience S.A.S, Paris, France), harvested in RPMI 0.1% BSA were added in the upper part. In the lower part, we used solution of RPMI 0.1% BSA supplemented with 3 nmol/L MCP-1 for 2 h. Monocytes that have migrated towards the lower chamber were then quantified by flow cytometry in FL-4,  $\lambda$  excitation = 647 nm,  $\lambda$  emission = 670 nm.

### **Live fluorescent microscopy**

HUVEC transfected cells were seeded on a glass bottom dish (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). Transfected cells were stimulated by TNF- $\alpha$  for 16 hours 24 hours after the transfection and then incubated or not with RANTES for 2 hours. Morphology of HUVEC was analyzed under flow condition at 0.67 dyn/cm<sup>2</sup> with peristaltic pump (Miniplus 2, Gilson, Villiers-le-Bel, France) for 10 minutes by confocal laser scanning fluorescence microscopy (model LSM 510 invert, Carl Zeiss, Jena, Germany). GFP-SDC-4 was monitored at 488-nm argon excitation using a 510 to 535 nm band pass barrier filter.

### **VE-cadherin tyrosine 731 phosphorylation assay**

$2 \times 10^6$  HUVEC transfected cells were cultured for 24 h and pre-incubated, stimulated or not with RANTES for various time (0, 5 or 10 min) at 37°C. Cells were washed by phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 1 µM orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France).

Proteins were extracted in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40 and 1% protease inhibitor cocktail (Roche, France). Lysates were obtained by centrifugation at  $13,000 \times g$  for 20 minutes at 4°C and protein lysate concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France). 30 µg proteins were loaded on SDS-PAGE and revealed using 1 µg/mL specific rabbit IgG polyclonal (pAbs) anti-pY731 VE-cadherin (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France), anti-total VE cadherin (Abcam, France). Revelation was performed using horseradish

peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG (DAKO, Denmark) 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0, 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively.

### **Statistical analysis**

Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA) test performed with the Statview software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A p value of  $< 0.05$  was used as the criterion of statistical significance.

## RESULTS

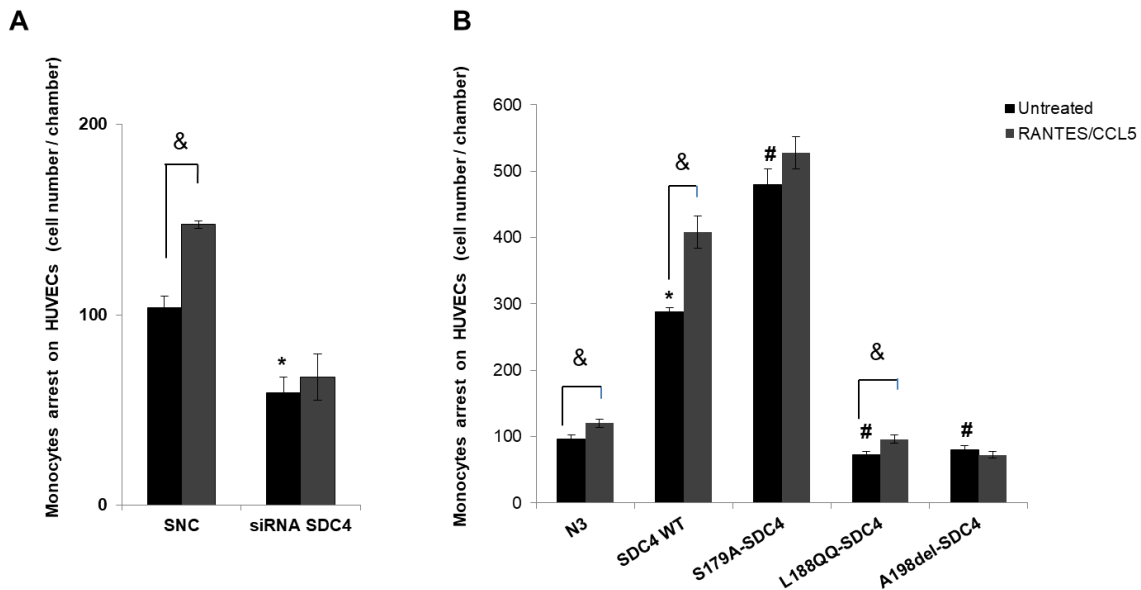
### SDC-4 intracellular domain involvement in monocyte arrest on endothelial cells monolayer

We first evaluated the involvement of SDC-4 in monocyte arrest (Figure 1A). Monocyte arrest assessed under laminar flow, on TNF- $\alpha$ -activated HUVEC and then stimulated or not with RANTES (Figure 1). Before activation, HUVEC were transfected with siRNA SDC-4 or scramble siRNA negative control (SNC). (Figure 1A) In the absence of RANTES stimulation, RNA interference targeting SDC-4 decreased significantly monocyte arrest by  $43 \pm 13$  % ( $59 \pm 8$  arrested monocyte/chamber for HUVEC transfected with siRNA-SDC-4 *versus*  $104 \pm 6$  arrested monocyte/chamber for HUVEC transfected with SNC control, \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 1A). In SNC conditions, RANTES stimulation increased significantly monocyte arrest by  $40 \pm 5$  % as compared to untreated condition ( $148 \pm 2$  arrested monocytes/chamber for RANTES-stimulated HUVEC transfected with SNC *versus*  $104 \pm 6$  arrested monocytes/chamber for untreated HUVEC transfected with SNC, & $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 1A) whereas siRNA inhibition of SDC-4 in HUVEC abolished RANTES effect on monocyte arrest. These data suggest that SDC-4 plays a major role in RANTES-induced monocyte arrest on endothelial cells under laminar flow condition (Figure 1A).

To determine if intracellular domain of SDC-4 mediated effect of RANTES-SDC-4 axis on monocyte arrest, HUVEC were transfected with GFP plasmid control (N3), wild-type SDC-4-GFP (SDC-4 WT) or SDC-4-GFP intracellular mutants S179A- (encoding for a SDC-4 mutant that activates constitutively PKC $\alpha$ ), L188QQ- (encoding for SDC-4 mutant defective in PIP2 binding) or A198del-SDC-4 (encoding for a SDC-4 mutant defective in PDZ protein binding) (Figure. 1B). Functionalization of SDC-4-GFP construct, transfection efficiency and membrane expression of wild-type SDC-4 (SDC4 WT), or the three intracellular domain mutated-SDC-4 were previously confirmed (Maillard et al., 2014).

In the absence of RANTES stimulation (*Untreated conditions, black histograms*, Figure 1B), the transfection of HUVEC with SDC-4 WT significantly increased monocyte arrest by 2-fold as compared to plasmid control N3 ( $288 \pm 6$  arrested monocytes/chamber for HUVEC transfected with SDC-4 WT *versus*  $96 \pm 6$  arrested monocytes/chamber for HUVEC transfected with N3 plasmid control, \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 1B). Interestingly, the number of arrested monocytes on the S179A-SDC-4-transfected endothelial cells (PKC $\alpha^+$ ) was significantly increased by  $67 \pm 10$  % as compared to SDC-4 WT-transfected cells ( $480 \pm 24$  *versus*  $288 \pm 6$

arrested monocyte /chamber, #p<0.05, n=3, Figure 1B). By contrast, monocyte arrest on the L188QQ- (PIP2<sup>-</sup>) or A198del-SDC-4 (PDZ<sup>-</sup>) transfected HUVEC cells significantly decreased by 75 ± 4 % or 72 ± 4 % respectively (72 ± 6 or 80 ± 6 arrested monocytes/well respectively *versus* 288 ± 6 monocytes/well for SDC-4 WT HUVEC transfected with SDC-4 WT, #p<0.05, n=3, Figure 1B).



**Figure 1. SDC-4 intracellular domain involvement in monocyte arrest on endothelial cell monolayer.** HUVEC transfected with SDC-4 siRNA (siRNA SDC-4) or scramble negative control (SNC) (A) or with plasmid GFP control (N3), SDC-4 Wild Type-GFP (SDC-4 WT) or mutated SDC-4 constructs (S179A-SDC-4(PKC $\alpha^+$ ), L188QQ-SDC-4(PIP2<sup>-</sup>), A198del-SDC-4(PDZ<sup>-</sup>)) (B). HUVEC were activated by TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) and stimulated by RANTES (3 nmol/L) (*grey histograms*) or not (*Untreated, black histograms*). Monocytes arrest on transfected HUVEC monolayer was performed under laminar flow condition. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of arrested monocytes / chamber of three independent experiments. \*p<0.05, *versus* untreated control (SNC in (A) or N3 in (B)). #p<0.05, SDC-4 mutants *versus* SDC-4 WT (*Untreated conditions*). &p<0.05 RANTES *versus* untreated (*grey histogram versus black histogram*).

The RANTES stimulation of HUVEC transfected with N3 plasmid increased monocyte arrest by 25 ± 5 % (120 ± 6 *versus* 96 ± 6 arrested monocyte/chamber for untreated cells, \*p<0.05, n=3, Figure 1B). Similarly, RANTES-stimulation of transfected-HUVEC with SDC-4 WT or L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>) significantly increased monocyte arrest by 30 ± 4 % (408 ± 24 arrested monocyte/chamber for SDC-4 WT transfected HUVEC and stimulated with RANTES *versus* 288 ± 6 arrested monocytes/chamber for SDC-4 WT transfected HUVEC, &p<0.05, n=3, Figure 1B) or by 33 ± 7 % (96 ± 6 arrested monocytes/chamber for L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>) transfected

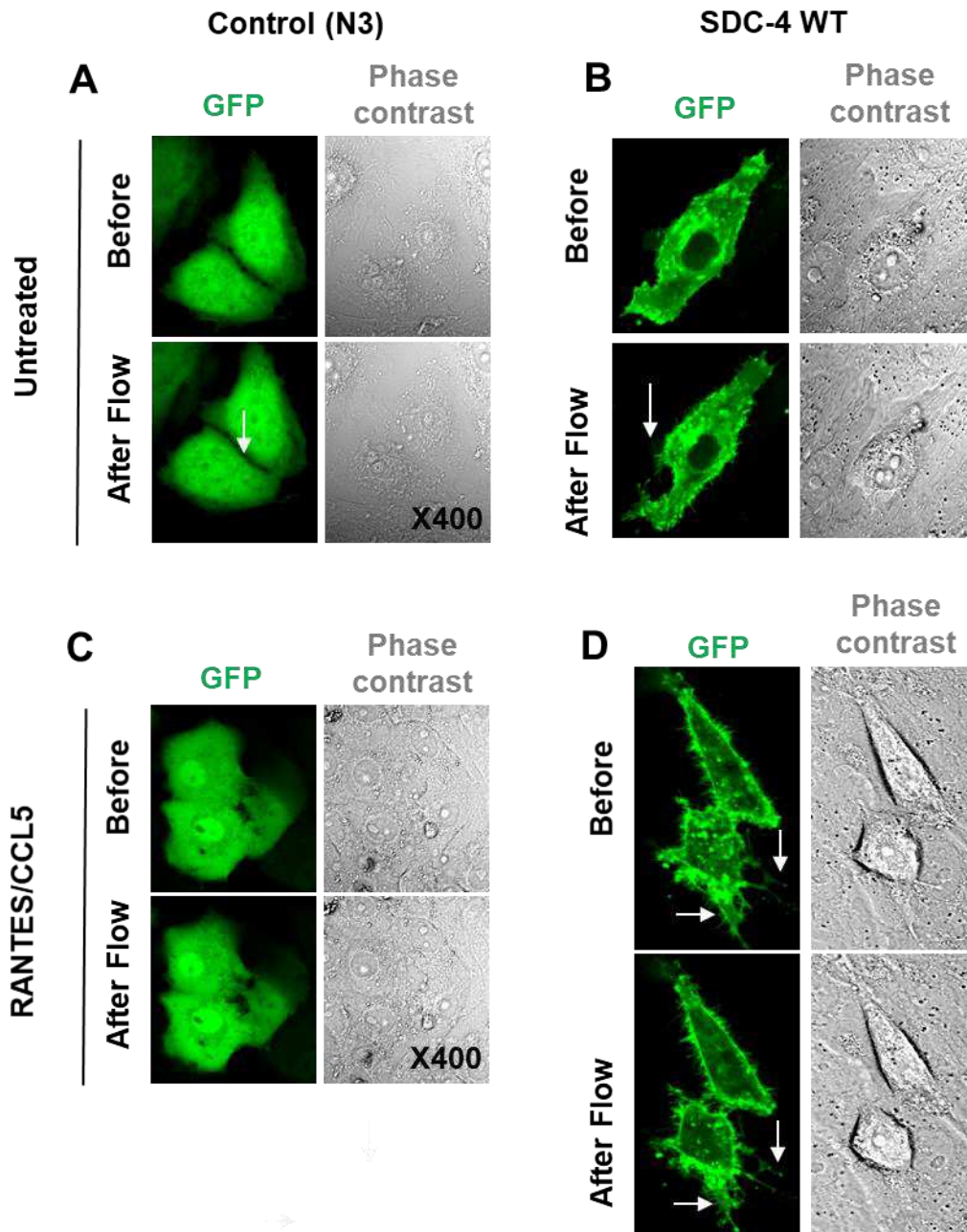
HUVEC and stimulated with RANTES *versus*  $72 \pm 6$  arrested monocytes/chamber for untreated L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>) transfected HUVEC, &p<0.05, n=3, Figure 1B) respectively.

Our results showed that monocyte arrest on HUVEC transfected with A198del-SDC-4 (PDZ<sup>-</sup>) was very reduced effect as compared with SDC-4 WT conditions. Whereas RANTES increased monocyte arrest on HUVECs transfected with SDC-4 WT or L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>), its effect was abolished in HUVEC overexpressing A198del-SDC-4 (PDZ<sup>-</sup>) (Figure. 1B).

Taken together, these data highlight the importance of SDC-4 intracellular domain in RANTES-induced monocyte arrest on endothelial cells barrier mainly by its interaction with PDZ domain proteins which seems also play a major role in this context.

### **SDC-4-induced endothelial cell-morphology change under laminar flow**

To explain the increase of monocyte arrest on HUVEC cell overexpressing SDC-4 WT, we analyzed their morphological change after and before laminar flow using live confocal microscopy (Figure 2). Transfected HUVEC were activated by TNF- $\alpha$  and then stimulated or not with RANTES. In untreated condition, laminar flow induced more filopodia formation in SDC-4-GFP transfected cells (SDC-4WT) than in cells transfected with N3-GFP plasmid control (N3) (Figure 2A, 2B). RANTES did not increased filopodia formation in N3 transfected HUVEC (Figure 2C *versus* 2A), whereas RANTES increased the filopodia formation in SDC-4 WT cells, both before and after laminar flow (Figure 2 D *versus* 2B). These data suggest that SDC-4 overexpression induced filopodia formation.

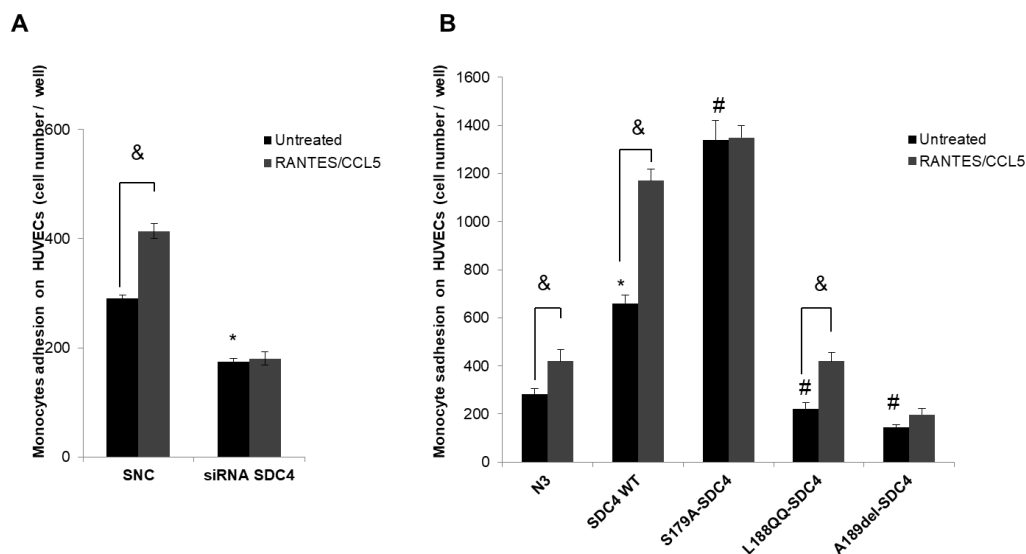


**Figure 2. SDC-4-induced endothelial cell-morphology change under laminar flow.** HUVEC were transfected with GFP plasmid (N3) (A, B) or SDC-4 WT-GFP (SDC-4 WT) (C, D) plasmid were activated by TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) and stimulated or not (*Untreated*, A, C) by RANTES (3 nmol/L) (B, D). HUVEC morphological change was investigated under laminar flow (10 minutes) by live confocal microscopy in GFP (green) and phase contrast signal. White arrows showed membrane extensions on HUVEC (filopodia).



### SDC-4 intracellular domain involvement in monocyte adhesion on endothelial cell monolayer

Monocyte arrest on the endothelium is followed by a firm adhesion. To investigate intracellular domain of SDC-4 role in this step of RANTES-induced monocyte recruitment, we first checked the involvement of SDC-4 in RANTES-induced monocyte adhesion by using siRNA SDC-4 (Figure 3A). The number of adhered monocytes on siRNA SDC-4 transfected-HUVEC significantly decreased by  $40 \pm 2\%$  ( $174 \pm 6$  adhered monocytes/well on HUVEC transfected with siRNA SDC-4 *versus*  $291 \pm 5$  adhered monocytes/well on HUVEC transfected with SNC,  $*p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3A). RANTES stimulation significantly increased monocyte adhesion by  $42 \pm 5\%$  ( $414 \pm 14$  adhered monocyte/well for SNC-transfected HUVEC and stimulated with RANTES *versus*  $291 \pm 5$  adhered monocytes/well for untreated SNC-transfected HUVEC,  $\&p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3A). RANTES-induced monocyte adhesion was abolished on HUVEC transfected with siRNA SDC-4. Therefore, our results suggest that SDC-4 is crucial in RANTES-induced monocyte adhesion on endothelial cells in static conditions (Figure 3A).



**Figure 3. SDC-4 endodomain involvement in monocyte adhesion on endothelial cell monolayer.** Monocyte adhesion on transfected HUVEC monolayer was performed in static condition. First, HUVEC transfected with siRNA SDC-4 or scramble negative control (SNC) (A) or with plasmid GFP control (N3), SDC-4 Wild Type-GFP (SDC-4 WT) or mutated SDC-4 constructs (S179A-SDC-4 (PKC $\alpha^+$ ), L188QQ-SDC-4 (PIP2 $^-$ ), A198del-SDC-4 (PDZ $^-$ )) (B). Transfected HUVECs were activated by TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) and stimulated by RANTES/CCL5 (3 nmol/L) (grey histograms) or not (Untreated, black histograms). Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of adhered monocytes/well of three independent experiments.  $*p < 0.05$ , *versus* untreated control (SNC in (A) or N3 in (B)).  $\#p < 0.05$ , SDC-4 mutants *versus* SDC-4 WT (Untreated conditions).  $\&p < 0.05$  RANTES *versus* untreated (grey histogram *versus* black histogram).

Furthermore, monocyte adhesion was assessed on HUVEC transfected with SDC-4 WT or its intracellular mutants S179A- SDC-4 (PKC $\alpha^+$ ), L188QQ- SDC-4 (PIP2 $^-$ ) or A198del-SDC-4 (PDZ $^-$ ) (Figure. 3B).

In the absence of RANTES stimulation (*Untreated conditions black histograms*, Figure 3B), the SDC-4 WT overexpression in HUVEC significantly increased monocyte adhesion by  $134 \pm 17$  % as compared to plasmid control N3 overexpression ( $660 \pm 36$  versus  $282 \pm 24$  adhered monocytes/well, \* $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3B). Similarly, HUVEC transfection with S179A-SDC-4 which activates constitutively PKC $\alpha$  significantly increased monocyte adhesion by  $103 \pm 12$  % as compared to SDC-4 WT-transfected HUVEC ( $1338 \pm 84$  versus  $660 \pm 36$  adhered monocytes/well, # $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3B). However, HUVEC overexpression of SDC-4 PIP2 $^-$  or PDZ-binding deficient mutant (L188QQ- or A198del-SDC-4 respectively) significantly decreased by  $66 \pm 7$  % or  $78 \pm 6$  % ( $222 \pm 24$  or  $144 \pm 12$  adhered monocytes/well respectively versus  $660 \pm 36$  adhered monocytes/well for SDC-4 WT condition, # $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3B). Altogether, our data suggest that SDC-4 expressed on endothelial cells induced basal monocyte adhesion via its intracellular domain interaction with PIP2, PDZ proteins or PKC $\alpha$ .

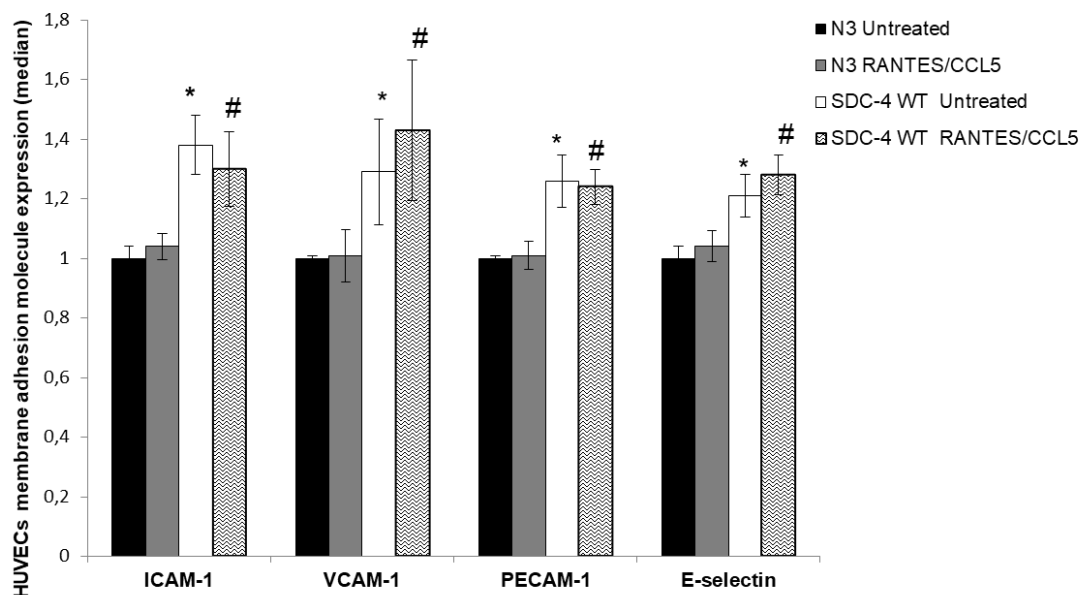
After RANTES stimulation, monocyte adhesion on HUVEC transfected with N3 plasmid was significantly increased by  $49 \pm 12$  % as compared to untreated condition ( $420 \pm 48$  versus  $282 \pm 24$  adhered monocytes/well for untreated cells, & $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3B). Additionally, RANTES stimulation of SDC-4 WT-transfected HUVEC significantly increased monocyte adhesion by  $77 \pm 6$  % ( $1170 \pm 48$  adhered monocytes/well for SDC-4 WT-transfected HUVEC stimulated with RANTES versus  $660 \pm 36$  adhered monocyte/well for untreated cells, & $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3B) or by  $89 \pm 13$  % when HUVEC were transfected with L188QQ-SDC-4 ( $240 \pm 24$  versus  $222 \pm 36$  adhered monocytes/well for untreated cells, & $p < 0.05$ ,  $n=3$ , Figure 3B). By contrast, RANTES-induced monocyte adhesion was abolished when HUVEC were transfected with A198del-SDC-4 (PDZ $^-$ ) and no additional increased of monocyte adhesion was observed on S179A-SDC-4 (PKC $\alpha^+$ ) transfected HUVEC (Figure 3B).

Our results emphasize that intracellular domain of SDC-4 is involved in RANTES-induced monocyte adhesion and suggest that SDC-4 intracellular domain is involved, mainly by its domain involved in interaction with PDZ proteins.

## SDC-4-induced variation of adhesion molecules expression at the membrane of endothelial cells

The increase of adhesion molecules such as endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), E-selectin, intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) or vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) is known to promote the recruitment of circulating cells such as monocytes. (Seneviratne et al., 2013).

As RANTES-induced monocyte adhesion depends on SDC-4, we measured by flow cytometry the HUVEC membrane expression level of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin in SDC-4 transfected cells stimulated or not (untreated) with RANTES (Figure 4).



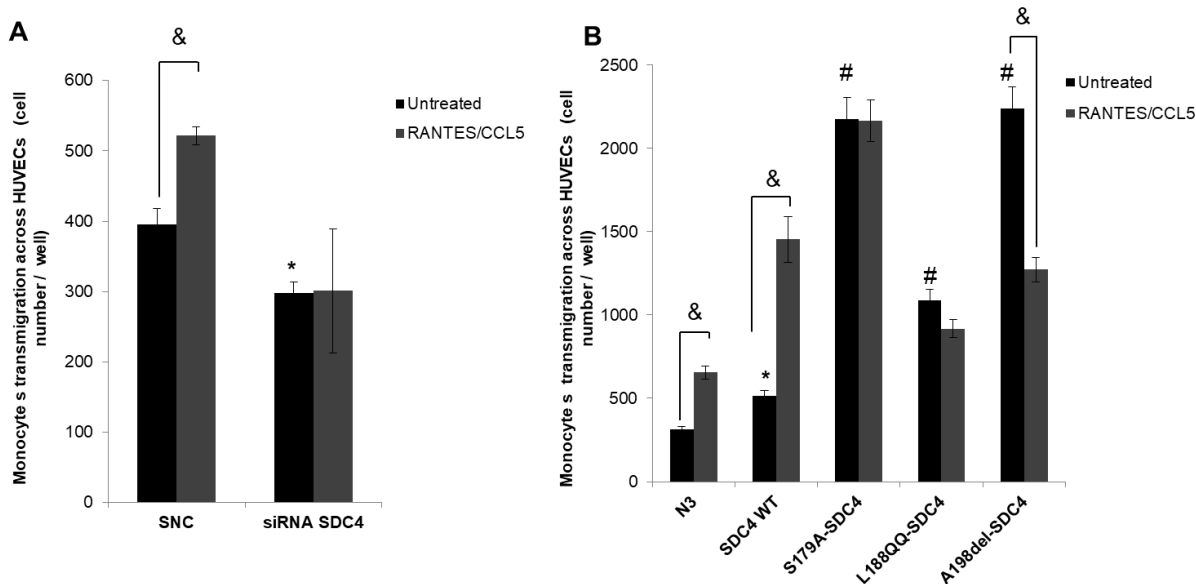
**Figure 4. SDC-4-induced variation of adhesion molecules expression at the membrane of endothelial cells.** HUVEC were transfected with GFP plasmid (N3, *black and grey histograms*) or SDC-4 WT-GFP (SDC-4 WT, *white and hachured histograms*) were activated by TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) and stimulated by RANTES (3 nmol/L (RANTES, *grey and hachured histograms*) or not (Untreated, *black and white histograms*)). Membrane expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 or E-selectin was analyzed by flow cytometry on non-permeabilized cells. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of median of four independent experiments. \* $p < 0.05$ , versus N3 untreated (*black histogram*). # $p < 0.05$  versus N3 RANTES (*grey histogram*).

As previously described, RANTES had no effect on membrane expression level of these adhesion molecules as compared to untreated cells both in HUVEC transfected with N3 or SDC-4 WT. (H. Mamoune et al. *unpublished data*) Without RANTES, the level of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin increased at the membrane of HUVEC overexpressing SDC-4. ICAM-1 expression level significantly increased by  $38 \pm 5 \%$  as compared to untreated N3-transfected HUVEC ( $1.38 \pm 0.09$  A.U. for untreated HUVEC transfected with SDC-4 WT *versus*  $1 \pm 0.04$  A.U. for untreated HUVEC transfected with N3 plasmid control, \* $p < 0.05$ ,  $n=4$ , Figure 4). VCAM-1 expression level significantly increased by  $29 \pm 9 \%$  ( $1.29 \pm 0.08$  A.U. for untreated HUVECs transfected with SDC-4 WT *versus*  $1 \pm 0.01$  A.U. for untreated HUVEC transfected with N3 plasmid control, \* $p < 0.05$ ,  $n=4$ , Figure 4). PECAM1 expression level significantly increased by  $26 \pm 5 \%$  ( $1.26 \pm 0.04$  A.U. for untreated HUVEC transfected with SDC-4 WT *versus*  $1 \pm 0.01$  A.U. for untreated HUVEC transfected with N3 plasmid control, \* $p < 0.05$ ,  $n=4$ , Figure 4). E-selectin expression level increased slightly but significantly by  $21 \pm 6 \%$  ( $1.21 \pm 0.05$  A.U. for untreated HUVEC transfected with SDC-4 WT *versus*  $1 \pm 0.04$  A.U. for untreated HUVEC transfected with N3 plasmid control, \* $p < 0.05$ ,  $n=4$ , Figure 4). After RANTES stimulation, no additional increase of expression level protein of these adhesion molecules was observed.

Altogether, our finding showed that the membrane expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin increased in HUVEC overexpressing SDC-4 activated with TNF- $\alpha$ . Moreover, no membrane expression level modification of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin was noticed after HUVEC transfection with SDC-4 WT, S179-SDC-4, L188QQ-SDC-4 or A198del-SDC-4 in the presence or absence of RANTES (data not shown). This result suggests that SDC-4 domains interacting with PKC $\alpha$ , PIP2 or PDZ proteins are not involved in SDC-4-induced increase of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin membrane expression in HUVEC. In addition, the chemokine RANTES did not influence the level of these adhesion molecules whatever the condition of transfection.

### **Intracellular domain of SDC-4-induced transendothelial migration of monocyte**

After monocyte arrest and adhesion steps, the monocyte transmigrates across the endothelium to reach the underlying tissue. SDC-4 involvement in RANTES-induced monocyte transendothelial migration was evidenced in HUVEC transfected with siRNA SDC-4 (Figure 5A) or with SDC-4 plasmids GFP constructs (Figure 5B). Transfected HUVEC were activated with TNF- $\alpha$  and stimulated or not with RANTES (Figure 5).



**Figure 5. SDC-4 endodomain induced transendothelial migration.** HUVECs transfected with SDC-4 siRNA (siRNA SDC-4) or scramble negative control (SNC) (**A**) or with plasmid GFP control (N3), SDC-4 Wild Type-GFP (SDC-4 WT) or mutated SDC-4 constructs (S179A-SDC-4(PKCa<sup>+</sup>), L188QQ-SDC-4(PIP2<sup>-</sup>), A198del-SDC-4(PDZ<sup>-</sup>)) (**B**). Transfected cells were cultivated in the upper chamber of transwell chamber, activated by 1 ng/mL TNF- $\alpha$  and stimulated (RANTES, *grey histograms*) or not (*Untreated, black histograms*) by 3 nmol/L RANTES. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of transmigrated MM6 monocyte across transfected HUVEC monolayer per well, of four independent experiments. \* $p < 0.05$ , RANTES/CCL5 versus untreated. \* $p < 0.05$ , versus untreated control (SNC in (**A**) or N3 in (**B**)). # $p < 0.05$ , SDC-4 mutants versus SDC-4 WT (*Untreated conditions*). & $p < 0.05$  RANTES versus untreated (*grey histogram versus black histogram*).

In the absence of RANTES stimulation, targeting SDC-4 by siRNA significantly decreased transendothelial migration of monocyte by  $25 \pm 4\%$  as compared to SNC control ( $298 \pm 17$  versus  $396 \pm 23$  transmigrated monocytes/well for SNC, \* $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 5A). After RANTES stimulation, monocyte transendothelial migration increased significantly by  $32 \pm 3\%$  as compared to untreated control cells ( $522 \pm 13$  transmigrated monocytes/well for RANTES-stimulated SNC transfected HUVEC versus  $396 \pm 23$  transmigrated monocytes/well for untreated-SNC transfected HUVEC, & $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , Figure 5A). RANTES-induced monocyte transendothelial migration was abolished when HUVEC did not produce SDC-4. Therefore, our results suggest that RANTES-induced transmigration of monocytes across endothelial cells is mediated by SDC-4 (Figure 5A).

Additionally, intracellular domain of SDC-4 implication in monocyte transendothelial migration has been evidenced (Figure 5B). In the absence of RANTES stimulation (*Untreated, black histograms*), monocyte transendothelial migration significantly increased by  $65 \pm 10\%$  ( $516 \pm 30$  transmigrated monocytes/chamber for HUVEC transfected with SDC-4 WT versus

312 ± 18 transmigrated monocytes/chamber for HUVEC transfected with N3 plasmid control, \*p<0.05, n=4, Figure 5B). Similarly, monocyte transmigration across HUVEC transfected with S179A-SDC-4 (PKCα<sup>+</sup>) or A198del-SDC4 (PDZ<sup>-</sup>) significantly increased by a 3-fold factor as compared to HUVEC transfected with SDC-4 WT (2179 ± 126 or 2241 ± 130 transmigrated monocytes/well respectively *versus* 516 ± 30 monocytes/well for SDC-4 WT transfected cells, #p<0.05, n=4, Figure 5B) and significantly increased by 111 ± 12 % when monocytes transmigrate through L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>) cells (1090 ± 63 monocytes/well respectively *versus* 516 ± 30 monocytes/well for SDC-4 WT, #p<0.05, n=4, Figure 5B). These results highlight SDC-4 intracellular domain involvement in monocyte transendothelial migration in a RANTES-independent manner. Our data suggest that SDC-4-induced monocyte transendothelial migration depends on PKCα activation. Furthermore, deficiency in PIP2 or PDZ protein interaction promotes SDC-4-induced monocyte transendothelial migration.

In parallel, RANTES stimulation of N3-transfected HUVEC significantly increased monocyte transendothelial migration by 110 ± 6 % in comparison with untreated cells (655 ± 38 *versus* 312 ± 18 transmigrated monocytes/well for untreated N3 cells, &p<0.05, n=4, Figure 5B). In addition, monocyte transendothelial migration significantly increased by 182 ± 27 % after RANTES stimulation of SDC-4 WT transfected cells as compared to untreated cells (1453 ± 139 *versus* 516 ± 18 transmigrated monocytes/well for untreated SDC-4 WT cells, &p<0.05, n=4, Figure 5B) whereas RANTES effect was abolished when HUVEC were transfected with L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>) or A198del-SDC-4 (PDZ<sup>-</sup>) transfected endothelial cells (Figure 5B). RANTES did not induce any additional increase on monocyte transendothelial migration when HUVEC were transfected with S179A-SDC-4 (Figure 5B).

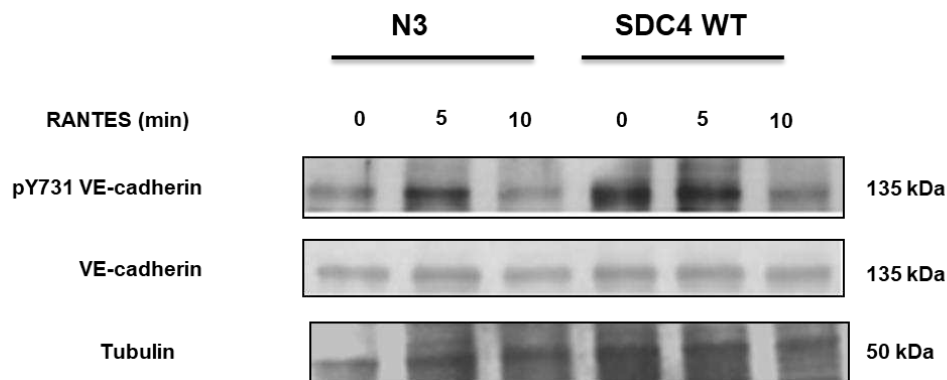
Taken together, these data confirmed the involvement of SDC-4 in RANTES-induced monocyte transendothelial migration. Our results suggest that SDC-4 regulated monocyte transendothelial migration in part by the interaction of its intracellular domain binding with PIP2 or PDZ proteins.

#### **Y731-VE-cadherin phosphorylation is regulated by SDC-4.**

Transendothelial migration requires a meticulous regulation of the phosphorylation of adherens junction proteins and in particular Y731-VE-cadherin. (Wessel et al., 2014)

To assess the role of RANTES–SDC-4 axis in the regulation of Y731-VE-cadherin involved in monocyte transendothelial migration, HUVEC were transfected with N3 or SDC-4 WT plasmid and then were stimulated or not with RANTES for various time (0, 5 or 10 minutes). The

phosphorylation of Y731-VE-cadherin in whole cell lysates was determined by Western blotting (Figure 6).



**Figure 6. Tyrosine 731 VE-cadherin phosphorylation is regulated by SDC-4.** HUVEC were transfected with GFP plasmid (N3) or SDC-4 WT-GFP (SDC-4 WT) and then were stimulated by 3 nmol/L RANTES for various time (0, 5 or 10 minutes) as indicated. The phosphorylation of Y731-VE-cadherin in whole cell lysates was determined by immunoblotting using their phospho-specific antibodies. Total level of VE-cadherin was determined by immunoblotting.

In absence of stimulation, HUVEC transfected with N3 plasmid control presented a basal Y731-VE-cadherin phosphorylation that increased in HUVEC overexpressing SDC-4.

After 5 min of RANTES stimulation, Y731-VE-cadherin increased in HUVEC transfected with plasmid control or SDC-4 WT as compared to untreated cells (RANTES 0 min).

However, 10 min after RANTES/CCL5 stimulation, Y731-VE-cadherin phosphorylation decreased in both HUVEC transfected with N3 or SDC-4 WT (Figure 6).

Altogether, our results suggest that monocyte transendothelial migration induced by RANTES-SDC-4 axis is mediated by transitory regulation of Y731-VE-cadherin phosphorylation. By contrast, this VE-cadherin phosphorylation is not involved in monocyte transmigration across HUVEC overexpressing SDC-4 in absence of RANTES stimulation.

## DISCUSSION

We have previously demonstrated the proangiogenic role of the chemokine RANTES by the use of *in vitro* and *in vivo* experimental approaches (Suffee et al., 2012) and that SDC-4 modulates RANTES signaling through its intracellular domain and the activation of PKC $\alpha$  (Maillard et al., 2014).

*In vitro* and *in vivo* studies have established that leukocyte arrest during rolling is rapidly triggered by chemokines and is mediated by the binding of leukocyte integrins to immunoglobulin superfamily members, such as ICAM-1 and VCAM-1 expressed by endothelial cells. During inflammation, endothelial cells are activated by inflammatory cytokines to express adhesion molecules and synthesize chemokines that are presented on their luminal surface by interacting with membrane proteoglycans (Ley et al., 2007). RANTES is one of these chemokines and it was previously published that RANTES participates to monocyte recruitment through its receptors CCR1 and CCR5 (Weber et al., 2001). In our static and dynamic models, RANTES induced monocyte arrest on endothelial cells. Moreover, the binding of RANTES to glycosaminoglycan chains and the oligomerization are a prerequisite for its effect on monocyte recruitment. (H. MAMOUNE *unpublished data*)

These findings raise the hypothesis that SDC-4 is involved in RANTES signaling, leading to monocyte recruitment by endothelial cells. For that purpose, syndecan-4 constructs were established in order to modify the intracellular syndecan-4 domain. A Ser-to-Ala mutation in the C1 SDC-4 intracellular domain was introduced at position 179 (S183 in rat) and has been expected to favor PKC $\alpha$  activation (Horowitz and Simons, 1998b; Murakami et al., 2002). In the second construct, the three consecutive residues Y188KK in the V domain were mutated to LQQ. This mutant has been described to have a reduced affinity to PIP<sub>2</sub>, leading to an inhibition of its PIP<sub>2</sub>-mediated PKC $\alpha$  activation. (Horowitz et al., 2002) The third construct has a deletion of A198 that abolished PDZ-dependent binding of syndecan-4. (Horowitz et al., 2002) Functionalization of SDC-4-GFP constructs, transfection efficiency and membrane expression of SDC-4 wild-type (SDC4WT) and mutated in intracellular domain (S179A, L188QQ and A198del) were previously confirmed (Maillard et al., 2014). Regarding the role of the SDC-4 constructs expressed by endothelial cells on monocyte arrest upon RANTES stimulation, our results are quite interesting because they correlated with our previous published data concerning the involvement of SDC-4 intracellular domain in RANTES-induced angiogenesis (Maillard et al., 2014). Indeed, increasing wild-type SDC-4 expression at their surface largely raises the level of monocyte arrest as compared to untransfected cells or to cells transfected with



L188QQ-SDC-4 (PIP2<sup>-</sup>) or A198del-SDC-4 (PDZ<sup>-</sup>). These data highlight that the intracellular domain of SDC-4, expressed at the membrane of endothelial cells, is involved in monocyte arrest on an endothelial cell monolayer.

Vascular endothelial cells are polarized according to the blood flow direction. A modification of the flow could activate the vascular endothelial cells through their mechanosensors as the cytoskeleton. (Seneviratne et al., 2013) SDC-4 is connected with cytoskeleton through cytoskeleton associated proteins such as  $\alpha$ -actinin or integrin  $\alpha 5\beta 1$  in focal adhesion contacts (Greene et al., 2003; Okina et al., 2012). Moreover, SDC-4 has been described to be involved in activation of Rac1 induced by FGF-2 or RANTES (Elfenbein et al., 2009; Horowitz et al., 2002; Maillard et al., 2014) and in activation of Cdc42 induced by FGF-2 (Tkachenko, 2004). Rac1 and Cdc42 are involved in lamellipodia and filopodia formation (Nobes and Hall, 1995) and we hypothesize that Rac1 activation due to the SDC-4 intracellular domain induced the formation of filopodia that may interact with monocyte and promotes monocyte arrest on endothelial cells. Endothelial cell morphology under laminar flow indicates that overexpression of wild-type SDC-4 in endothelial cells increased RANTES-induced filopodia formation. In contrast, no filopodia formation was observed in L188QQ-SDC-4 or A198del-SDC-4 transfected cells or in cells transfected with wild-type SDC-4 and stimulated with GAG-deficient RANTES. Moreover, no filopodia formation was observed in co-transfected cells with SDC-4 wild-type and Rac1 or Cdc42 dominant negative form (data not shown). These data suggest that intracellular domain of SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced filopodia formation through GAG binding which could immobilize monocyte and explain the effect of SDC-4 in monocyte recruitment.

Among syndecans, syndecan-1 has been demonstrated to play a role in leukocyte-endothelial interactions. Indeed, in SDC-1 knock-out mice, the lack of syndecan-1 leads to enhanced leukocyte-endothelial cell interactions, increased angiogenesis and increased inflammatory responses (Götte et al., 2005). The authors suggested that SDC-1 acts as a negative regulator of polymorphonuclear leukocytes and monocytes adhesion to endothelial cells. Although somewhat quite in contrast with the study mentioned above, our data highlights the fact that SDC-4 plays a role in leukocyte-endothelial interactions, strikingly through its intracellular domain. We hypothesize that the altered ability of SDC-4 to activate PKC $\alpha$  and potentially downstream effectors such as members of the Rho family of small GTPases may disturb the leukocyte-endothelial interaction. Moreover, it has been shown that T-cell activation and chemotaxis induced by RANTES requires Rho GTPase activity (Clissi et al., 2000).

We suggest that SDC-4 modulation of RANTES-induced monocyte arrest could be a consequence of SDC-4-dependant intracellular signaling pathways. Decrease of RANTES-induced monocyte adhesion on HUVEC deficient in PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , RhoA, RhoG or Rac1 (H. Mamoune et al. *unpublished data*) raises the hypothesis that RANTES-induced monocyte adhesion is dependent of intracellular signaling pathways activated by SDC-4. PECAM-1 is a mecanosensor, that induced expression of adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 or VCAM-1. The increase of these adhesion molecules membrane expression will increase the recruitment of circulating cells (monocytes, dendritic cells, T lymphocytes). (Seneviratne et al., 2013) Indeed, PKC $\alpha$  has been shown to participate to the activation of endothelial cells by enhancing transcription of genes encoding for adhesion molecules such as ICAM-1 or VCAM-1. (Ishizuka et al., 1998) Cells transfected with wild-type SDC-4 showed an increase of membrane expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin adhesion molecule in comparison to N3-transfected HUVEC cells. Together, our data suggest that RANTES-induced monocyte arrest on endothelial cells is dependent on SDC-4 intracellular signaling pathway activation and adhesion molecule membrane expression through SDC-4 intracellular domain. Monocyte recruitment is a process with successive steps. After monocyte arrest and adhesion on endothelium, the monocyte transmigrates across the endothelial cell monolayer to reach the tissue. PECAM-1 and VE-cadherin are two adhesion molecules involved in the transendothelial migration step. PECAM-1 molecules interact together between endothelial cell and monocyte (Woodfin et al., 2007) and the phosphorylation state of VE-cadherin regulates the tight junction opening between adjacent endothelial cells (Wessel et al., 2014). We have previously shown that RANTES promotes leukocyte transendothelial migration through its GAG-binding motif (H. MAMOUNE and al. *unpublished data*). We investigated the role of SDC-4 in monocyte transendothelial migration using a transwell chamber model. Transfected endothelial cells with SDC-4 wild-type increased monocyte transendothelial migration. In addition, SDC-4 inhibition abolished RANTES-induced monocyte transendothelial migration.

The PDZ protein binding domain of SDC-4 exerts a key role in the regulation of its functions. Thanks to PDZ proteins, SDC-4 is able to bind the PP1/2A phosphatase that dephosphorylates S179-SDC-4 after FGF-2 or RANTES stimulation of HUVEC leading to SDC-4 activation. (Horowitz et al., 2002; Maillard et al., 2014) The impairment of PDZ protein binding domain of SDC-4 may prevent PP1/2A phosphatase binding, maintaining SDC-4 in a phosphorylated state which does not allow PKC $\alpha$  activation in HUVEC, and therefore leads to inhibition of monocyte arrest and adhesion on HUVEC monolayer.

An interaction between SDC-4 and syntenin-1 in this intracellular PDZ protein binding domain of SDC-4 negatively regulates SDC-4 function via oligomerization and/or SDC-4 interaction, impacting cytoskeletal organization and cell migration.(Choi et al., 2016) Interestingly, monocyte transendothelial migration is induced similarly in HUVEC transfected with either S179A-SDC-4 or A198del-SDC-4. This result suggests that the impairment of interaction between SDC-4 and syntenin-1 contributes to PKC $\alpha$  activation, as it was observed after transfection with S179A-SDC-4 that activates constitutively PKC $\alpha$  (Figure 5). The mechanisms associated with the opposite effect of RANTES leading to reduced monocyte transmigration across HUVEC transfected with A198del-SDC-4 require further investigations.

In summary, our data demonstrate that SDC-4 is a functional co-receptor of the chemokine RANTES and that the interaction of both partners increases monocyte recruitment. Regarding the multiple role of RANTES in various pathologies, including cancer, viral diseases and inflammation, deciphering the mechanism by which RANTES exerts its biological activities is a preliminary step to develop new therapeutic strategy, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan co-receptor.

## REFERENCES

- Baciu, P.C., Saoncella, S., Lee, S.H., Denhez, F., Leuthardt, D., and Goetinck, P.F. (2000). Syndesmos, a protein that interacts with the cytoplasmic domain of syndecan-4, mediates cell spreading and actin cytoskeletal organization. *J Cell Sci* *113*, 315–324.
- Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2004). Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* *12*.
- Charni, F., Friand, V., Haddad, O., Hlawaty, H., Martin, L., Vassy, R., Oudar, O., Gattegno, L., Charnaux, N., and Sutton, A. (2009). Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1790*, 1314–1326.
- Choi, Y., Yun, J.-H., Yoo, J., Lee, I., Kim, H., Son, H.-N., Kim, I.-S., Yoon, H.S., Zimmermann, P., Couchman, J.R., et al. (2016). New structural insight of C-terminal region of Syntenin-1, enhancing the molecular dimerization and inhibitory function related on Syndecan-4 signaling. *Sci. Rep.* *6*.
- Clissi, B., D'Ambrosio, D., Geginat, J., Colantonio, L., Morrot, A., Freshney, N.W., Downward, J., Sinigaglia, F., and Pardi, R. (2000). Chemokines Fail to Up-Regulate 1 Integrin-Dependent Adhesion in Human Th2 T Lymphocytes. *J. Immunol.* *164*, 3292–3300.
- Denhez, F., Wilcox-Adelman, S.A., Baciu, P.C., Saoncella, S., Lee, S., French, B., Neveu, W., and Goetinck, P.F. (2002). Syndesmos, a Syndecan-4 Cytoplasmic Domain Interactor, Binds to the Focal Adhesion Adaptor Proteins Paxillin and Hic-5. *J. Biol. Chem.* *277*, 12270–12274.
- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M., and Goetinck, P.F. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J. Clin. Invest.* *107*, R9–R14.
- Elfenbein, A., and Simons, M. (2013). Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell Sci.* *126*, 3799–3804.
- Elfenbein, A., Rhodes, J.M., Meller, J., Schwartz, M.A., Matsuda, M., and Simons, M. (2009). Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4–synectin–RhoGDI1 complex and is reversed by PKC $\alpha$  in a Rac1 activation pathway. *J. Cell Biol.* *186*, 75–83.

- Götte, M., Jousen, A.M., Klein, C., Andre, P., Wagner, D.D., Hinkes, M.T., Kirchhof, B., Adamis, A.P., and Bernfield, M. (2002). Role of syndecan-1 in leukocyte–endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *43*, 1135–1141.
- Götte, M., Bernfield, M., and Jousen, A.M. (2005). Increased Leukocyte-Endothelial Interactions in Syndecan-1–Deficient Mice Involve Heparan Sulfate–Dependent and –Independent Steps. *Curr. Eye Res.* *30*, 417–422.
- Granés, F., Berndt, C., Roy, C., Mangeat, P., Reina, M., and Vilaró, S. (2003). Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. *FEBS Lett.* *547*, 212–216.
- Greene, D.K., Tumova, S., Couchman, J.R., and Woods, A. (2003a). Syndecan-4 Associates with  $\alpha$ -Actinin. *J. Biol. Chem.* *278*, 7617–7623.
- Horowitz, A., and Simons, M. (1998a). Regulation of Syndecan-4 Phosphorylation *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* *273*, 10914–10918.
- Horowitz, A., and Simons, M. (1998b). Phosphorylation of the Cytoplasmic Tail of Syndecan-4 Regulates Activation of Protein Kinase C<sub>β</sub>. *J. Biol. Chem.* *273*, 10919–10924.
- Horowitz, A., Tkachenko, E., and Simons, M. (2002). Fibroblast growth factor–specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J. Cell Biol.* *157*, 715–725.
- Hsueh, Y.-P., Roberts, A.M., Volta, M., Sheng, M., and Roberts, R.G. (2001). Bipartite Interaction between Neurofibromatosis Type I Protein (Neurofibromin) and Syndecan Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycans. *J. Neurosci.* *21*, 3764–3770.
- Ishizuka, Kawakami, Hidaka, Matsuki, Takamizawa, Suzuki, Kurita, and Nakamura (1998). Stimulation with thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* *112*, 464–470.
- Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H.B., and Rauvala, H. (1998). Cortactin-Src Kinase Signaling Pathway Is Involved in N-syndecan-dependent Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* *273*, 10702–10708.
- Kwon, M.-J., Jang, B., Yi, J.Y., Han, I.-O., and Oh, E.S. (2012a). Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEBS Lett.* *586*, 2207–2211.

- Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S.A., and Zimmermann, P. (2009). The signalling mechanisms of syndecan heparan sulphate proteoglycans. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 662–669.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 678–689.
- Lim, S.-T., Longley, R.L., Couchman, J.R., and Woods, A. (2003). Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of PKC $\alpha$  increases focal adhesion localization of PKC. *J. Biol. Chem.* *278*, 39033–39040.
- Maillard, L., Saito, N., Hlawaty, H., Friand, V., Suffee, N., Chmilewsky, F., Haddad, O., Laguillier, C., Guyot, E., Ueyama, T., et al. (2014). RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biol. Open.* *3*, 103–111.
- Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J.A., and Simons, M. (2002). Protein kinase C (PKC)  $\delta$  regulates PKC $\alpha$  activity in a syndecan-4-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *277*, 20367–20371.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* *81*, 53–62.
- Okina, E., Grossi, A., Gopal, S., Multhaupt, H. a. B., and Couchman, J.R. (2012). Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 2161–2174.
- Proudfoot, A.E.I., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., and Wells, T.N.C. (2001). The BBXB Motif of RANTES Is the Principal Site for Heparin Binding and Controls Receptor Selectivity. *J. Biol. Chem.* *276*, 10620–10626.
- Seneviratne, A., Hulsmans, M., Holvoet, P., and Monaco, C. (2013). Biomechanical factors and macrophages in plaque stability. *Cardiovasc. Res.* *99*, 284–293.
- Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C., and Gattegno, L. (2003a). Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* *1617*, 80–88.

Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C., and Gattegno, L. (2003b). Binding of the CC-chemokine RANTES to syndecan-1 and syndecan-4 expressed on HeLa cells. *Glycobiology* *13*, 623–634.

Suffee, N., Hlawaty, H., Meddahi-Pelle, A., Maillard, L., Louedec, L., Haddad, O., Martin, L., Laguillier, C., Richard, B., Oudar, O., et al. (2012). RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* *15*, 727–744.

Sutton, A., Friand, V., Papy-Garcia, D., Dagouassat, M., Martin, L., Vassy, R., Haddad, O., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Saffar, L., et al. (2007). Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 2948–2958.

Tkachenko, E. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* *117*, 3189–3199.

Weber, C., Weber, K.S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., and Nelson, P.J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO<sup>+</sup> T cells. *Blood* *97*, 1144–1146.

Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., Linnepe, R., Ipe, U., Stadtmann, A., Zarbock, A., et al. (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat. Immunol.* *15*, 223–230.

Woodfin, A., Voisin, M.-B., and Nourshargh, S. (2007). PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 2514–2523.

## II. Bilan

L'objectif de cette deuxième partie du projet était d'étudier l'implication du domaine intracellulaire du SDC-4, exprimé sur la membrane plasmique des cellules endothéliales, dans le recrutement de monocytes induit *via* l'effet de la chimiokine RANTES/CCL5 exercé sur les cellules endothéliales.

Nous avons montré en utilisant des siRNA du SDC-4 que l'arrêt, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des monocytes induits par RANTES/CCL5 sont dépendants du SDC-4. L'utilisation des variants intracellulaire du SDC-4 a montré que l'interaction entre le PIP2 ou les protéines à domaine PDZ et le domaine intracellulaire du SDC-4 favorise la migration trans-endothéliale des monocytes, induite par RANTES/CCL5. Cependant, seule l'interaction entre le domaine intracellulaire du SDC-4 et les protéines à domaine PDZ favorise l'arrêt et l'adhérence des monocytes induits par RANTES/CCL5. En effet, l'inhibition de l'interaction entre le SDC-4 et le PIP2 n'affecte ni l'arrêt ni l'adhérence des monocytes induits par RANTES/CCL5. L'interaction entre le SDC-4 et le PIP2 est importante pour l'activation de la PKC $\alpha$ . En présence du mutant S179A-SDC-4 (PKC $\alpha$ <sup>+</sup>), qui active d'une façon constitutive la PKC $\alpha$ , aucune variation du recrutement monocyttaire n'a été observée après la stimulation des cellules endothéliales avec RANTES/CCL5.

Dans cette étude, nos résultats suggèrent également que la migration trans-endothéliale des monocytes induits par l'axe RANTES-SDC-4 est médiée par la régulation transitoire de la phosphorylation de la Y731-VE-cadhérine.

Nous avons conclu que le SDC-4 joue un rôle de co-récepteur fonctionnel de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocyttaire en interagissant *via* son domaine intracellulaire avec différents messagers (PIP2, protéines PDZ) intracellulaires qui régulent cette activité.

Ces résultats ont fait l'objet d'une communication orale lors du séminaire des doctorants LVTS U1148 (Hôpital Bichat, 28 avril 2018). ***Rôle du syndécan-4 dans la transmigration monocyttaire et la perméabilité endothéliale induites par RANTES/CCL5.*** Mamoune H.



**DISCUSSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le recrutement des leucocytes est un processus clé pour toute réponse immunitaire. L'arrêt, l'adhérence du leucocyte et sa migration à travers la barrière endothéliale constituent les trois étapes majeures de ce processus. Ces étapes successives sont régulées par une action combinée entre les cellules endothéliales et les leucocytes, en réponse à des médiateurs inflammatoires comme les cytokines (TNF $\alpha$ , IL1, IL10...) et les chimiokines (RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2, IL-8...). L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de la chimiokine RANTES/CCL5 sur les cellules endothéliales activées avec le TNF- $\alpha$  afin d'induire le recrutement des monocytes. L'intérêt scientifique pour le rôle des cellules endothéliales dans ce processus est récent. En effet, la majorité des études antérieures publiées portent sur l'effet des chimiokines sur les leucocytes pour induire leur recrutement.

Nos résultats montrent que le recrutement monocyttaire induit par RANTES/CCL5 dépend de son oligomérisation, de son interaction avec les RCPGs (CCR1, CCR5) et de son interaction avec les chaînes GAGs portées notamment par des protéoglycanes membranaires à chaînes HS tels que le SDC-4 exprimé entre autres à la surface des cellules endothéliales. Le domaine intracellulaire du SDC-4 est également impliqué dans cet effet de RANTES/CCL5 *via* ses interactions avec le PIP2 et les protéines à domaine PDZ.

D'autre part, RANTES/CCL5 régule la phosphorylation des protéines de jonctions VE-cadhérine (Y731 et Y685) et  $\beta$ -caténine (Y654) en impliquant la PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$ . Ces deux dernières présentent deux fonctions opposées dans la migration trans-endothéliale des monocytes. Nous avons également montré l'implication des Rho GTPase (Rac1, Cdc42, RhoA) dans le recrutement monocyttaire induit par RANTES/CCL5.

## **Rôles respectifs du TNF $\alpha$ et de RANTES/CCL5 dans le recrutement des monocytes**

Afin de valider notre modèle expérimental et éviter tout artefact, nous avons étudié l'effet de RANTES/CCL5 sur les cellules endothéliales HUVECs non activées ou activées par le TNF- $\alpha$  (**Article 1 Figure 1 p. 143**). Nos résultats ont montré que la stimulation des cellules endothéliales avec RANTES/CCL5 induit l'arrêt, l'adhérence des monocytes et leur migration trans-endothéliale même en absence de l'activation des cellules endothéliales avec le TNF- $\alpha$ . Ceci prouve que RANTES/CCL5 exerce un effet propre sur le recrutement des monocytes.

Afin d'étudier le recrutement des monocytes induit par RANTES/CCL5 en condition inflammatoire, nous avons conservé l'étape de l'activation des cellules endothéliales avec le TNF- $\alpha$ . Nos résultats ont montré que dans cette condition, les taux de l'arrêt, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des monocytes augmentent d'une façon significative par rapport aux autres conditions (TNF- $\alpha$  seul ou RANTES/CCL5 seul). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules endothéliales activées avec le TNF- $\alpha$  par rapport à celles stimulées uniquement avec RANTES/CCL5 en absence de toute activation préalable.

La potentialisation du recrutement des monocytes par le TNF- $\alpha$  pourrait être due à une synergie fonctionnelle entre la chimiokine RANTES/CCL5 et la ou les chimiokine (s) exprimée (s) par les HUVECs en réponse au TNF- $\alpha$  telles que les chimiokines IL-8 et MCP-1/CCL2. (HILLYER *et al.*, 2003; Makó *et al.*, 2010) Les HUVECs expriment l'IL-8 et le MCP-1/CCL2 en absence d'activation des cellules endothéliales pouvant expliquer notre observation du recrutement des monocytes en condition non traitée. En effet, l'expression de ces deux chimiokines augmente fortement après l'activation des HUVECs avec le TNF- $\alpha$ . (HILLYER *et al.*, 2003) Parmi ces deux chimiokines, seul le MCP-1/CCL2 est connu pour former un hétérodimère avec RANTES/CCL5. Hundelshausen *et al.* ont étudié la conséquence fonctionnelle de la formation de cet hétérodimère RANTES/MCP-1 en montrant que ce dernier potentialise l'arrêt des monocytes sur des cellules endothéliales aortiques activées avec IL-1 $\beta$  par rapport à l'effet de RANTES/CCL5 ou MCP-1/CCL2 seul. (Hundelshausen *et al.*, 2017) D'autre part, il a été montré que la neutralisation de MCP-1 exprimé par les cellules mésangiales murines (péricytes vasculaire localisées dans le glomérule), activées avec le TNF- $\alpha$ , abolit la migration directionnelle des monocytes induite par MCP-1 *in vitro*. (Pai *et al.*, 1996) Fait intéressant, les deux types cellulaires, HUVEC et monocytes mono mac 6 (MM6) utilisés dans notre étude, expriment fortement CCR2 (récepteur de MCP-1/CCL2) de manière constitutive ; ce qui renforce l'hypothèse que RANTES/CCL5 pourrait agir en synergie avec MCP1/CCL2 exprimée par les HUVECs activées avec le TNF- $\alpha$  pour favoriser le recrutement des monocytes. Afin d'éclaircir ce point, il sera judicieux : 1) d'évaluer le taux d'expression de MCP-1 dans les HUVECs activées avec le TNF- $\alpha$  par qRT-PCR, 2) de quantifier MCP-1/CCL2 dans le surnageant cellulaire par la technique d'ELISA, 3) d'étudier l'interaction de MCP-1/CCL2 avec CCR2 à la surface des HUVECs en absence et en présence de RANTES/CCL5 en utilisant les techniques de cytométrie en flux ou de résonance plasmonique de surface (SPR).

## Rôle des RCPG

L'interaction de la chimiokine RANTES/CCL5 avec ses RCPGs joue un rôle important dans ses fonctions biologiques telles que l'angiogenèse. (Suffee et al., 2012) A ce jour, les études portant sur le recrutement des leucocytes et notamment des lymphocytes T et des monocytes s'intéressent particulièrement à l'implication de CCR1 et de CCR5 leucocytaires dans les étapes du recrutement des leucocytes. Weber et al. ont montré que RANTES/CCL5 interagit avec ces deux RCPGs mais ces récepteurs n'agissent pas sur les mêmes étapes du recrutement des leucocytes : CCR1 induit l'arrêt des leucocytes sur la barrière endothéliale alors que CCR5 induit l'adhérence et la migration trans-endothéliale. (Weber et al., 2001) Ainsi, la pré-incubation de lymphocytes T Th<sub>1</sub>-like/CD45RO<sup>+</sup> ou de monocytes humains avec BX471, un antagoniste de CCR1, ou avec un anticorps anti-CCR1 neutralisant réduit le taux de l'arrêt des leucocytes sur une monocouche de cellules endothéliales microvasculaires humaines activées avec l'IL-1 $\beta$  et stimulées avec RANTES/CCL5. En revanche, la pré-incubation de ces leucocytes avec TAK-779, un antagoniste de CCR5, ou avec un anticorps anti-CCR5 neutralisant diminue le taux de l'adhérence et de la migration trans-endothéliale. (Weber et al., 2001; Baltus et al., 2003) Cependant, Kramp et al ont montré que les lymphocytes T murins surexprimant CCR1 ou CCR5 et stimulés avec RANTES/CCL5 présentent un taux élevé d'arrêt sur une monocouche de cellules endothéliales vasculaires murines activées avec le TNF- $\alpha$ . Cette expérience n'a pas confirmé les travaux de Weber et al montrant la spécialisation de CCR1 ou de CCR5 dans une phase spécifique du recrutement leucocytaire. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces deux études n'ont employé ni les mêmes modèles cellulaires ni la même méthodologie : Weber et al. ont utilisé des antagonistes de RCPGs alors que Kramp et al. ont eu recours à des récepteurs RCPGs chimères. (Kramp et al., 2013) Alors que ces travaux évaluaient l'implication, dans le recrutement leucocytaire (lymphocytes T ou monocytes), de CCR1 ou CCR5 exprimés par ces leucocytes, nous nous sommes focalisées sur l'analyse de l'implication de CCR1 et CCR5 exprimés par les cellules endothéliales stimulées par RANTES/CCL5 dans le but de déterminer : 1) s'ils jouent un rôle dans le recrutement leucocytaire (les monocytes dans nos expériences), 2) dans quelle phase (arrêt, adhérence, migration trans-endothéliale) du recrutement monocytaire ils interviennent. Nos résultats ont montré que le traitement des cellules endothéliales avec la chimiokine RANTES/CCL5 favorise l'arrêt et l'adhérence des monocytes en se liant aux CCR1 et CCR5 exprimés par les HUVECs. En revanche, la migration trans-endothéliale des monocytes induite par RANTES/CCL5 nécessite à la fois CCR1 et CCR5 dans notre modèle cellulaire. (Article 1 Figure 3 D, E et F p. 146).

Cependant, l'activité biologique de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocytaire ne doit pas uniquement dépendre de ses interactions avec les RCPGs puisque nous avons montré que l'abolition du recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5 après neutralisation des récepteurs CCR1 ou CCR5 endothéliaux, par des anticorps neutralisants ou par des ARN interférents, n'était pas complète.

Sachant que l'activité pro-inflammatoire de RANTES/CCL5 dépend également de son interaction avec les GAGs, nous avons émis l'hypothèse que la voie induisant le recrutement monocytaire indépendamment de CCR1 ou CCR5 est une voie couplée à l'oligomérisation de RANTES/CCL5 et/ou de son interaction avec les GAGs.

### **Rôle de l'oligomérisation de RANTES/CCL5 dans le recrutement des monocytes**

Nous avons montré que la stimulation des HUVECs avec le variant dimère de RANTES/CCL5 (E66A-RANTES), incapable de s'oligomériser, diminue d'une façon drastique les trois étapes du recrutement des monocytes (**Article 1 Figure 3 A, B et C p. 146**). Ainsi, l'oligomérisation de RANTES/CCL5 est nécessaire pour le rôle de cette chimiokine dans l'arrêt, l'adhérence et de la migration trans-endothéliale des monocytes. Nos résultats sont en accord avec l'étude *in vivo* de *Proudfoot et al.* qui a montré que l'administration d'un variant monomérique de RANTES/CCL5 ou dimérique n'affecte pas le recrutement des leucocytes au niveau de la cavité péritonéale chez la souris contrairement à l'administration d'un variant tétramérique. (*Proudfoot et al., 2003*) Ainsi, RANTES/CCL5 a une structure quaternaire minimale requise pour son activité *in vivo*.

Cependant, une étude *in vitro* portant sur la conséquence fonctionnelle de l'oligomérisation de RANTES/CCL5 dans le recrutement des lymphocytes T et des monocytes par les cellules endothéliales microvasculaires humaines activées avec de l'IL-1 $\beta$  a montré que l'oligomérisation de RANTES/CCL5 favorise uniquement l'étape de l'arrêt et qu'elle n'est impliquée ni dans l'adhérence ni dans la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Baltus et al., 2003*) Néanmoins, cette conclusion est basée sur l'utilisation de systèmes expérimentaux différents des nôtres. L'adhérence des leucocytes a été étudiée dans un système acellulaire (sur ICAM-1 purifiée immobilisée sur des billes de sépharose). En outre, l'effet de RANTES/CCL5 ou de ses mutants a été étudié sur les leucocytes contrairement à notre modèle expérimental où nous étudions le recrutement des leucocytes comme étant une conséquence de l'effet de RANTES/CCL5 sur les cellules endothéliales. En ce qui concerne la migration trans-endothéliale, les auteurs ont utilisé le système standard de co-culture en chambre de Boyden

(Transwell). Au cours de cette étude, les auteurs ont placé RANTES/CCL5 ou l'un de ses mutants incapables de s'oligomériser dans la chambre inférieure ce qui permet d'étudier uniquement leur pouvoir chimiotactique mais ne prend pas en compte la liaison des chimiokines sur les GAGs à la surface des cellules endothéliales. (*Baltus et al., 2003*)

Ainsi, le recrutement leucocytaire par la barrière endothéliale dépend de l'interaction des RCPGs avec RANTES/CCL5 et de l'interaction des GAGs avec RANTES/CCL5 sous forme d'oligomère. Cependant, l'oligomérisation de RANTES/CCL5 n'est pas requise pour sa liaison avec les récepteurs RCPG comme l'indiquent plusieurs études *in vitro*. (*Kramp et al., 2013; Proudfoot et al., 2003*) L'oligomérisation est nécessaire pour l'interaction aux chaînes GAGs. (*Shaw et al., 2004; Hoogewerf et al., 1997*) En effet, il a été montré, dans une étude *in vitro*, que le variant monomérique de RANTES/CCL5, Nme 7T-RANTES, est incapable d'interagir avec les GAGs. (*Hoogewerf et al., 1997*) Il conserve en revanche sa liaison avec CCR1 et CCR5 exprimés à la surface des cellules épithéliales *in vitro* mais n'induit pas le recrutement leucocytaire *in vivo* au niveau de la cavité péritonéale chez la souris. (*Proudfoot et al., 2003*) Ainsi, l'oligomérisation de RANTES/CCL5 et sa liaison aux chaînes GAGs sont couplés d'un point de vue fonctionnel. (*Shaw et al., 2004; Hoogewerf et al., 1997; Proudfoot et al., 2003; Wang et al., 2013*)

### **Rôle de l'interaction entre RANTES/CCL5 et les GAGs**

Nous avons étudié le rôle de l'interaction de RANTES/CCL5 avec les chaînes GAGs avec deux méthodologies différentes : l'une utilisant un mutant de RANTES/CCL5, le 3Ala-RANTES incapable d'interagir avec les GAGs, pour stimuler les HUVECs activées par le TNF- $\alpha$ , l'autre méthodologie consistant à prétraiter le même modèle cellulaire avec un mélange d'enzymes bactériennes (Heparinase I, Heparinase III et chondroïtinase ABC) qui clivent les chaînes GAGs exprimés à la surface des HUVECs.

Le mutant 3Ala-RANTES a été obtenu par mutagenèse dirigée ou par synthèse organique en substituant sur le motif BBXB (<sup>44</sup>RKNR<sup>47</sup>) de RANTES/CCL5, motif d'acides aminés basiques jouant un rôle majeur dans l'interaction de RANTES/CCL5 avec les GAGs, des résidus acides aminés neutres générant un variant <sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>-RANTES (3Ala-RANTES). (*Proudfoot et al., 2001; Martin et al., 2001*) Ce mutant perd 80 % de son affinité pour les GAGs et interagit 80 fois moins avec le récepteur CCR1 par rapport à RANTES natif. (*Proudfoot et al., 2001*)

Après avoir montré que le mutant 3Ala-RANTES interagit moins que RANTES/CCL5 natif avec la surface des HUVECs (**Article 1 Figure 2 p. 145**), nous avons mis en évidence que la

stimulation des HUVECs avec le variant 3Ala-RANTES (au lieu de RANTES/CCL5 natif) diminue drastiquement l'arrêt, l'adhérence et la migration trans-endothéliale des monocytes. (**Article 1 Figure 3 A, B et C p. 146**) De plus, l'utilisation du mélange enzymatique clivant les chaînes des GAGs à la surface des cellules endothéliales abolit l'effet de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocyttaire (**Article 1 Figure 3 A, B et C p. 146**).

Ces expériences ont confirmé que l'interaction de RANTES/CCL5 avec les GAGs à la surface des cellules endothéliales est primordiale dans le recrutement monocyttaire. En effet, ces résultats sont en accord avec plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrant que le mutant 3Ala-RANTES, avec son incapacité d'interagir avec les GAGs, a un effet inhibiteur du recrutement des leucocytes et par conséquent les auteurs de plusieurs études le considèrent comme étant anti-inflammatoire. (*Braunersreuther et al., 2010; Johnson et al., 2004; Baltus et al., 2003; Proudfoot et al., 2003; Nellen et al., 2012*)

Un résultat intéressant montre que le variant 3Ala-RANTES abolit le recrutement monocyttaire par les cellules endothéliales activées par le TNF- $\alpha$ . Selon *Johnson et al.*, RANTES/CCL5 et le mutant 3Ala-RANTES sont capables de former un hétéro-complexe pouvant rendre RANTES/CCL5 inactif. En effet, ces auteurs ont montré que le recrutement des leucocytes sur les vaisseaux mésentériques de rat se fait comme attendu en présence de RANTES/CCL5 mais ne se produit pas lorsque, les souris ont reçu au préalable une injection intra-péritonéale de 3Ala-RANTES. (*Johnson et al. 2004*) Nous émettons l'hypothèse que 3Ala-RANTES pourrait, de la même manière, former des hétérodimères avec d'autres chimiokines dont les chimiokines exprimées par les HUVECs après leur activation avec le TNF- $\alpha$  telles que le MCP-1 ou l'IL-8 comme suggéré précédemment. À ce jour il a été uniquement montré que 3Ala-RANTES, contrairement à RANTES natif, est incapable de former un hétérocomplexe avec CXCL4. (*Hundelshausen et al., 2017*) Cependant, les interactions de ce variant avec les autres chimiokines n'ont jamais été étudiées, cela nécessite des études plus approfondies.

Pour comprendre au mieux cet effet inhibiteur de 3Ala-RANTES en absence de RANTES natif, il semble donc nécessaire d'étudier l'interaction entre 3Ala-RANTES et le MCP-1 ou l'IL-8, les deux chimiokines qui peuvent être exprimés par les HUVECs en réponse de TNF- $\alpha$  et d'étudier ensuite la conséquence fonctionnelle des hétérodimères formés dans le recrutement des monocytes. Il sera intéressant de vérifier la capacité inhibitrice de 3Ala-RANTES dans notre système de recrutement monocyttaire en incubant les cellules endothéliales avec RANTES/CCL5 et son variant simultanément.

Le fait que l'activité biologique de RANTES/CCL5 dans le recrutement des monocytes dépend à la fois de son oligomérisation, de son interaction avec les RCPG (CCR1 et CCR5) et avec les GAGs, nous avons suggéré que CCR1, CCR5 et les GAGs travaillent en concert. Nos résultats appuient cette hypothèse (**Article 1 Figure 3 G, H et I p. 146**). Ainsi, la neutralisation de CCR1 et de CCR5 et le clivage des GAGs, exprimés par les cellules endothéliales, abolissent le recrutement des monocytes induit par l'effet de RANTES/CCL5 exercé sur les cellules endothéliales.

RANTES/CCL5 interagit avec son co-récepteur protéoglycanique : le SDC-4 exprimé à la surface des cellules endothéliales y compris les HUVECs. (*Suffee et al., 2012; Maillard et al., 2014*) Nous avons suggéré que le recrutement des monocytes induit par RANTES/CCL5 pourrait être en partie dépendant du SDC-4. Pour aller loin, les cellules endothéliales ont été transfectées avec un plasmide codant pour le SDC-4 sauvage avant leur activation par le TNF- $\alpha$  et leur stimulation avec RANTES/CCL5. Nos résultats ont montré que la surexpression du SDC-4 dans les cellules endothéliales accroît le recrutement des monocytes induit par RANTES/CCL5 (**Article 2 Figure 1, 3, 5**) et que l'inhibition du SDC-4 dans le même modèle cellulaire par ARN interférent abolit l'effet de RANTES/CCL5 dans les trois étapes du recrutement des monocytes. Nous étions surpris par le fait que l'inhibition du SDC-4 en absence de RANTES/CCL5 diminue faiblement le recrutement des monocytes par rapport à l'augmentation importante du recrutement monocyttaire observée après la surexpression du SDC-4 dans les cellules endothéliales. Cela peut être expliqué par la différence de l'efficacité de transfection (plasmide *versus* siRNA). En effet, nous avons compté 30 % de cellules transfectées avec le plasmide codant pour le SDC-4 et seulement 10 % de cellules endothéliales transfectées avec le siRNA ciblant le SDC-4. Dans la continuité de ce travail, il serait judicieux de valider nos résultats en utilisant une transfection cellulaire de façon stable à l'aide d'un lentivirus.

### **Mécanisme moléculaire du recrutement des monocytes : une vue d'ensemble**

Le recrutement des monocytes par l'endothélium vasculaire *via* RANTES/CCL5 pourrait dépendre de plusieurs événements moléculaires affectant les cellules endothéliales telles que la régulation de l'expression des molécules d'adhérences (ICAM-1, VCAM-1, PCAM-1, E-sélectine), la modulation de l'état de phosphorylation des protéines de jonctions endothéliales (VE-cadhérine,  $\beta$ -caténine) probablement par l'induction des voies de signalisation intracellulaire (PKCs, Rho GTPases). (*Vestweber, 2015; Ley et al., 2007*)



### a- Molécules d'adhérence

L'endothélium activé, par des médiateurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , exprime à sa surface luminale des molécules d'adhérence telles que ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine. (Vestweber, 2015; Ley et al., 2007; Sawa et al., 2007; Zhang and Issekutz, 2002; Makó et al., 2010)

Au cours de notre travail, nous avons montré que RANTES/CCL5 ne modifie l'expression d'aucune de ces molécules d'adhérence sur les cellules HUVECs activées par le TNF- $\alpha$ . (**Article 1 Figure 4 p. 149**). L'absence d'effet de RANTES/CCL5 sur la régulation de l'expression de molécules d'adhérence induite sur les cellules endothéliales a été confirmée en utilisant des cellules transfectées par le SDC-4. Après transfection, l'expression des quatre molécules d'adhérence VCAM-1, ICAM-1, PCAM-1 et E-sélectine augmentent ; l'ajout de RANTES ne modifie pas l'expression membranaire de ces molécules (**Article 2 Figure 4 p. 149**).

Cela peut être expliqué par le fait que la durée de stimulation des HUVECs avec RANTES/CCL5 de 2 heures n'est pas suffisante pour induire l'expression protéique membranaire de ICAM-1, de VCAM-1 ni d'E-sélectine. En effet, plusieurs études *in vitro* ont montré que l'expression de la E-sélectine s'effectue en moyenne après 3 heures de traitement de différents types de cellules endothéliales notamment les HUVECs avec des cytokines pro-inflammatoire (TNF- $\alpha$  ou IL-1 $\beta$ ), l'expression membranaire de VCAM-1 a lieu après 4 heures et celle de ICAM-1 après 6 heures de stimulation dans ce même modèle. (HILLYER et al., 2003; Scholz et al., 1996) De plus, la durée de traitement cellulaire la plus courante dans l'étude des molécules d'adhérence est de 24 heures. (HILLYER et al., 2003; Zhang and Issekutz, 2002; Sawa et al., 2007; Øynebråten et al., 2015; van Buul et al., 2010; Makó et al., 2010)

Ainsi, l'augmentation de la durée de stimulation des cellules endothéliales pourrait augmenter l'expression des molécules d'adhérence. Cependant, cela ne répond pas à notre problématique portant sur le mécanisme du recrutement monocytaire induit par la stimulation des HUVECS avec RANTES/CCL5 pendant 2 heures. Il est clair que cet effet de RANTES/CCL5 dans notre modèle expérimental n'est pas dépendant de l'augmentation de l'expression membranaire des molécules d'adhérence. Pour favoriser le recrutement des monocytes, RANTES/CCL5 pourrait agir sur un événement plus rapide (de l'ordre de quelques minutes) par rapport à l'expression protéique tel que la redistribution des molécules d'adhérence au niveau de la membrane

plasmique des cellules endothéliales. De plus, il a été montré que les molécules d'adhérence principalement ICAM-1 et VCAM-1 exprimées à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales HUVEC activées avec le TNF- $\alpha$  forment des plates-formes d'adhérence (*endothelial adhesive platform*, EAD) à la surface des cellules endothéliales pour interagir avec les leucocytes ; ce groupement de molécules d'adhérence se fait d'une manière indépendante de leur interaction avec les intégrines leucocytaires. (*van Buul et al., 2010; Barreiro et al., 2004*) Récemment, *Van Buul et al.* ont montré que ce regroupement de ICAM-1 et VCAM-1 au niveau des sites de contact entre cellule endothéliale et leucocyte est également indépendant de TNF- $\alpha$ . (*van Buul et al., 2010*) Dans le but d'aller plus loin, une expérience d'immunofluorescence pourrait être envisageable pour étudier le changement de distribution membranaire des molécules d'adhérence exprimées par les HUVECs après une courte stimulation avec RANTES/CCL5.

D'autre part, il a été montré que les cellules endothéliales EAhy926 confluentes présentent un complexe ICAM-1/SHP-2/VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine alors que les cellules non confluentes, ne formant pas une monocouche cellulaire, présentent un taux très faible de ce complexe. (*Yan et al., 2017*) La formation de ce complexe pourrait ne pas être favorable au recrutement leucocytaire. La phosphorylation du résidu tyrosine 518 au niveau du domaine intracellulaire de ICAM-1 joue un rôle important dans l'interaction entre ICAM-1 et la VE-cadhérine et par conséquent dans le recrutement des leucocytes. (*Yan et al., 2017*) Il serait intéressant d'étudier la régulation de l'état de phosphorylation du résidu Y518-ICAM-1 induite par RANTES/CCL5 dans la continuité de notre étude de recrutement des monocytes.

#### **b- La régulation de l'état de phosphorylation de VE-cadhérine et $\beta$ -caténine induite par RANTES/CCL5**

Nous avons montré que RANTES/CCL5 augmente la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur son résidu Y654 et la VE-cadhérine sur son résidu Y685 mais diminue la phosphorylation de Y731 de la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales (**Article 1 Figure 7 p. 154**).

La VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine sont deux molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales au niveau des jonctions adhérentes entre deux cellules endothéliales adjacentes. (*Dejana et al., 2009; Dejana and Orsenigo, 2013; Komarova et al., 2017*) L'état de phosphorylation des protéines de jonctions adhérentes notamment la VE-cadhérine et ses partenaires tels que la  $\beta$ -caténine joue un rôle majeur dans la régulation de la migration trans-endothéliale. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés *in vitro* et *in vivo*. Nos

résultats sont en accord avec la littérature montrant que la migration trans-endothéliale des leucocytes dépend de la phosphorylation de Y654 sur la  $\beta$ -caténine et de la phosphorylation de Y731, Y685 ou Y658 sur la VE-cadhérine (*Wessel et al., 2014; Potter et al., 2005; Allingham et al., 2007*) Bien que la combinaison de la phosphorylation des différents résidus tyrosines de la VE-cadhérine pertinents pour la régulation des jonctions endothéliales au cours du recrutement leucocytaire soit encore l'objet de controverses, l'implication du résidu Y731-VE-cadhérine dans la migration trans-endothéliale des leucocytes n'a jamais été remise en question. Les résultats obtenus *in vitro* ont été renforcés par une étude faite chez des souris exprimant les mutants Y685F- ou Y731F-VE-cadhérine. Ces deux mutants n'étant pas phosphorylables ont permis de prouver que la migration trans-endothéliale des leucocytes nécessite la déphosphorylation de la Y731-VE-cadhérine afin de maintenir son taux de phosphorylation basale et que l'augmentation de la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine est indispensable pour la perméabilité vasculaire. (*Wessel et al., 2014*)

De plus, l'adhérence des leucocytes à l'endothélium vasculaire déstabilise les jonctions adhérentes, essentiellement le complexe VE-cadhérine- $\beta$ -caténine, par la phosphorylation de ces deux protéines. (*Shaw et al., 2001; Del Maschio et al., 1996; Wessel et al., 2014*) Dans notre étude, nous montrons que RANTES/CCL5 agit au niveau des cellules endothéliales au cours de la migration trans-endothéliale des monocytes, en régulant l'état de phosphorylation de leurs jonctions adhérentes. Il sera intéressant dans la continuité de ce travail d'étudier la migration trans-endothéliale des monocytes induite par RANTES/CCL5 à travers des cellules endothéliales transfectées avec des mutants phospho-mimétiques ou des mutants non phosphorylables des résidus Y654- $\beta$ -caténine et des résidus Y685- et Y731-VE-cadhérine pour vérifier le rôle direct de l'état de phosphorylation de ces tyrosines dans le recrutement monocyttaire induit par RANTES/CCL5.

Pour résumer, le recrutement des monocytes et notamment leur migration trans-endothéliale à travers une monocouche de cellules HUVECs stimulées avec RANTES/CCL5, semble être dépendant de la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine et de la Y654- $\beta$ -caténine ainsi que de la déphosphorylation de la Y731-VE-cadhérine.

L'action de RANTES/CCL5 étant liée au SDC-4 dans différents processus physiologiques comme la migration ou l'invasion cellulaire dans un contexte angiogénique. (*Maillard et al., 2014*) Nous avons évalué la phosphorylation de ces différents sites après transfection des cellules endothéliales avec le SDC-4 sauvage.

D'une façon surprenante et inattendue, la surexpression du SDC-4 en absence de RANTES/CCL5 augmente la phosphorylation de la Y731-VE-cadhérine au lieu de la diminuer comme le fait RANTES/CCL5 (**Article 2 Figure 6 p. 199**). Cette augmentation n'a pas de conséquences sur la migration trans-endothéliale comme on aurait pu le penser puisque en présence de cellules endothéliales HUVECs transfectées avec le plasmide SDC-4 sauvage la migration trans-endothéliale des monocytes augmente de 50% par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide contrôle en absence de RANTES/CCL5 (**Article 2 Figure 5 p. 197**). Par conséquent, nous montrons clairement avec notre système que la migration des monocytes à travers la monocouche de cellules endothéliales surexprimant le SDC-4 ne dépend pas de la déphosphorylation de la Y731-VE-cadhérine. Nous avons montré que le SDC-4 induit une augmentation de l'expression de PECAM-1. Or, PECAM-1 se trouve dans des vésicules du compartiment de recyclage des bords latéraux (LBRC), il existe un trafic constitutif de PECAM-1 entre LBRC et les jonctions inter-endothéliales. Ainsi PECAM-1 est recruté à la fois au niveau des sites paracellulaires et transcellulaires. (*Mamdouh et al., 2003; 2008*) PECAM-1 est un agent clé de la migration trans-endothéliale des leucocytes médiée par les LBRC. Ce compartiment ne contient pas de la VE-cadhérine. (*Muller 2013, 2016*) En effet, il a été montré en utilisant une protéine de fusion VE-cadhérine-GFP qu'elle peut être déplacée physiquement des jonctions pour former un espace transitoire permettant le passage des leucocytes entre deux cellules endothéliales. (*Shaw et al., 2001*)

Nous pouvons suggérer que RANTES/CCL5 augmente la migration trans-endothéliale *via* une voie paracellulaire en modulant l'intégrité du complexe jonctionnel endothélial alors que le SDC-4 qui agirait *via* PECAM-1, augmentant la migration trans-endothéliale des leucocytes par une voie paracellulaire médiée par les LBRC. Cependant, même si notre système expérimental ne permet pas de le confirmer, la migration trans-endothéliale par voie transcellulaire n'est pas exclue. (*Mamdouh et al., 2009*)

Dans les cellules endothéliales stimulées par RANTES/CCL5 ; ce qui active la PKC $\alpha$ , nous observons une augmentation de la phosphorylation de la Y654- $\beta$ -caténine, une augmentation de la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine et une diminution de la phosphorylation de la Y731-VE-cadhérine par rapport aux cellules non stimulées (**Article 1 Figure 7 p. 154**). Le résidu tyrosine 685 phosphorylée de la VE-cadhérine et le résidu tyrosine 731 déphosphorylée de cette même molécule reflètent un état d'ouverture des jonctions inter-endothéliales permettant le passage de leucocytes entre deux cellules endothéliales adjacentes. (*Sidibé and Imhof, 2014*)

### c- Place de la PKC $\alpha$ et la PKC $\delta$ dans le recrutement monocytaire

Il est admis que les PKCs jouent un rôle important dans la régulation des fonctions de la barrière endothéliale et par conséquent dans le recrutement des leucocytes. Parmi les isoformes de PKCs, la PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$  sont largement étudiées dans la migration trans-endothéliale et la perméabilité endothéliale. (Sandoval et al., 2001; Harrington et al., 2005; Ahn et al., 2015; Avelaira et al., 2010; Romanova et al., 1998) L'activation des PKCs peut dépendre de leur translocation du cytoplasme vers la membrane plasmique. (Denning, 2012; Denys et al., 2005; Zeng et al., 2012) Par conséquent, nous avons évalué la translocation de la PKC $\alpha$  et de la PKC $\delta$  dans les cellules HUVECs soumises à RANTES/CCL5.

Dans un premier temps, notre équipe de recherche a montré que la stimulation des cellules HUVECs avec RANTES/CCL5 induit la translocation membranaire de la PKC $\alpha$ . (Maillard et al., 2014) De plus, l'utilisation de son inhibiteur pharmacologique, Gö6976, nous a permis de mettre en évidence que l'activation de la PKC $\alpha$  endothéliale permet le bon déroulement des trois étapes du recrutement des monocytes induites par RANTES/CCL5 y compris la migration trans-endothéliale des monocytes (**Article 1 Figure 5 p. 150**). Cependant, l'activation constitutive de la PKC $\alpha$  dans des cellules endothéliales (obtenue par transfection d'un mutant SDC-4) stimulées par RANTES/CCL5 n'entraîne pas une augmentation du recrutement des monocytes par rapport à l'activation constitutive de PKC $\alpha$  en absence de RANTES/CCL5 (**Article 2 Figures 1, 3 et 5**). Ainsi, le recrutement monocytaire peut se faire indépendamment de RANTES/CCL5 : dans ces cellules, en absence de RANTES/CCL5 l'activation de la PKC $\alpha$  étant déjà optimale, son activation induite par RANTES/CCL5 n'a aucun effet. Cette hypothèse a été confirmée par des résultats antérieurs obtenus dans notre équipe de recherche, montrant que dans les cellules endothéliales transfectées avec le variant S179A-SDC-4 entraînant une activation constitutive de la PKC $\alpha$ , la translocation membranaire de la PKC $\alpha$  est identique que les cellules soient ou non stimulées par RANTES/CCL5. De plus, l'utilisation de ce mutant souligne l'implication potentielle du domaine intracellulaire du SDC-4 dans la régulation de la PKC $\alpha$ .

Nous avons confirmé ce point en montrant que la PKC $\alpha$  peut stimuler l'arrêt et l'adhérence des monocytes de manière dépendante du PIP2 recruté au niveau de la région V du domaine intracellulaire du SDC-4 des cellules endothéliales HUVECs activées avec le TNF- $\alpha$  et non stimulées par RANTES/CCL5 (**Article 2**). Un mécanisme d'activation de la PKC $\alpha$  par le domaine PIP2 du SDC-4 que nous nommerons SDC-4/PIP2, a été proposé, dans un autre modèle cellulaire que les cellules endothéliales, par Horowitz et al. Après avoir traité des

fibroblastes murins avec le FGF2, les auteurs ont montré que l'interaction de ce dernier avec le SDC-4 induit la déphosphorylation de la S183-SDC-4 (S179 chez l'Homme). Les phosphatases impliquées dans la régulation de l'état de phosphorylation de cette sérine sont PP1 ou PP2A, lesquelles peuvent être activées par le FGF2. Ces phosphatases interagiraient indirectement avec le domaine intracellulaire du SDC-4 *via* une protéine adaptatrice à domaine PDZ non identifiée à ce jour. La déphosphorylation du SDC-4 induit son activation et entraîne un changement de conformation du motif Y188KK dans la région V du SDC-4 ce qui augmente son affinité pour le PIP2. L'interaction entre le SDC-4 et le PIP2 favorise l'oligomérisation du SDC-4 et induit l'activation de la PKC $\alpha$ . (*Horowitz and Simons, 1998; Horowitz et al., 2002*)

La PKC $\alpha$  peut également interagir d'une façon directe avec la région V du SDC-4 *via* son domaine catalytique. (*Oh et al. 1998; 1997a; 1997b; Lim et al. 2003*)

Nous avons étudié le rôle des interactions du domaine intracellulaire du SDC-4 avec PIP2 ou les protéines à domaines PDZ dans le recrutement leucocytaire induit par RANTES/CCL5. Nous avons observé qu'en absence de RANTES/CCL5, la transfection des cellules endothéliales avec le plasmide codant pour le SDC-4 sauvage ou le mutant S179A-SDC-4 qui active d'une façon constitutive la PKC $\alpha$ , augmente l'arrêt (**Article 2 Figure 1 p. 190**), l'adhérence (**Article 2 Figure 3 p. 193**) et la migration trans-endothéliale (**Article 2 Figure 5 p. 197**) des monocytes. Cependant, l'utilisation des mutants SDC-4/PIP2<sup>-/-</sup>, incapable d'interagir avec le PIP2, ou le mutant SDC-4/PDZ<sup>-/-</sup>, incapable d'interagir avec les protéines à domaine PDZ, diminue l'arrêt et l'adhérence des monocytes. Ces résultats confirment que le recrutement monocyttaire peut se dérouler indépendamment de la chimiokine RANTES/CCL5 sur les cellules endothéliales activées avec le TNF- $\alpha$  en utilisant un axe dépendant du complexe PKC $\alpha$ /SDC-4/PIP2.

Cependant, selon nos travaux, l'interaction entre le PIP2 et le SDC-4, en présence de RANTES/CCL5, n'affecte ni l'arrêt ni l'adhérence des monocytes alors que nous avons montré l'implication de la PKC $\alpha$  dans ces deux effets biologiques dans les cellules endothéliales exprimant le SDC-4 endogène, activées avec le TNF- $\alpha$  et stimulées par RANTES/CCL5 (**Article 1 Figure 5 p. 150**). Ainsi, l'activité de la PKC $\alpha$  endothéliale impliquée dans l'arrêt et l'adhérence des monocytes, serait indépendante de l'interaction SDC4/PIP2 et donc indépendante de la régulation de l'état de phosphorylation du résidu S179 du SDC-4. Cela suggère qu'il existe d'autre (s) voie (s) d'activation de la PKC $\alpha$ .

Des expériences préliminaires réalisées au sein de notre laboratoire dont les résultats ne sont pas publiés suggèrent que la translocation membranaire de la PKC $\alpha$  dépend également de CCR1 ou CCR5. En effet, par microscopie confocale, nous avons mis en évidence dans des cellules endothéliales exprimant le SDC4 endogène ou surexprimant le SDC-4 exogène, que l'inhibition des RCPGs par ARN interférent réduit la translocation membranaire de la PKC $\alpha$  induite par RANTES/CCL5.

Ce résultat est en accord avec différentes études montrant que les RCPGs activés par leur ligand activent la PLC qui hydrolyse le PIP2 en IP3 et DAG conduisant à la libération du Ca<sup>2+</sup> à partir des réserves du réticulum endoplasmique activant ainsi la PKC $\alpha$ . (*Patel et al., 2013*) RANTES/CCL5 en interagissant avec ses RCPGs est capable de mobiliser le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. (*Ignatov et al., 2006; Kramp et al., 2013*)

Cependant, tandis que la voie d'activation classique de la PKC $\alpha$  est dépendante du Ca<sup>2+</sup>, une voie indépendante du calcium mérite d'être envisagée, comme cela a été suggéré par différents auteurs dans d'autres types cellulaires. (*Horowitz et al., 2002; Murakami et al., 2002; Horowitz and Simons, 1998*)

Pour ensuite connaître le rôle de l'interaction entre les protéines à domaine PDZ et le motif EFYA du domaine intracellulaire du SDC-4 dans le recrutement des monocytes induit par RANTES/CCL5, nous avons évalué le recrutement monocyttaire induit par l'axe RANTES-SDC-4 en inhibant cette interaction en utilisant le mutant SDC-4/PDZ<sup>-/-</sup>. Alors que nous observons un recrutement leucocytaire par les cellules endothéliales transfectées par un plasmide codant le SDC-4 sauvage, en présence du mutant SDC-4/PDZ<sup>-/-</sup> ce sont toutes les phases : arrêt, adhérence et migration trans-endothéliale, induits par RANTES/CCL5, qui sont abolies.

Il est à noter qu'en absence de RANTES/CCL5, l'inhibition de l'interaction entre le SDC-4 et les protéines à domaine PDZ ne bloque pas la migration trans-endothéliale mais au contraire l'augmente ; cette migration trans-endothéliale équivaut à la migration trans-endothéliale observée après activation constitutive de la PKC $\alpha$  en l'absence de RANTES/CCL5 (**Article 2 Figure 5 p. 197**).

Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'augmentation accrue de la migration trans-endothéliale des monocytes dans cette condition :

1) L'interaction du domaine intracellulaire du SDC-4 avec une protéine PDZ inhibe le recrutement monocyttaire dépendant de la PKC $\alpha$ . Par conséquent l'inhibition de l'interaction entre le SDC-4 et cette protéine PDZ pourrait induire une activation optimale de la PKC $\alpha$ . La synténine est une des protéines PDZ interagissant avec le SDC-4. (*Grootjans et al., 2000; Zimmermann et al., 2001; Choi et al., 2016*) En effet, il a été montré que la transfection d'un plasmide codant pour la synténine dans des fibroblastes embryonnaires de rats non stimulés, inhibe l'interaction du SDC-4 avec la PKC $\alpha$  de manière compétitive et diminue la formation des contacts focaux. Ainsi la synténine inhibe la signalisation du SDC-4. (*Choi et al. 2016*) L'inhibition de la fonction du SDC-4 par la synténine a été également observée dans un contexte tumoral. *In vitro* après transfection de mélanocytes épidermiques humains et de cellules de mélanomes avec deux plasmides codant pour le SDC-4 et/ou la synténine -1, le SDC-4 seul (en absence de la synténine) réduit la migration cellulaire dans les deux types cellulaires alors que la co-transfection SDC-4/synténine-1 l'augmente. Dans la même étude, l'injection intraveineuse des cellules cancéreuses du mélanome murin B16F10 exprimant d'une manière stable le SDC-4 ou le SDC-4 et la synténine-1 a montré que le SDC-4 réduit les métastases pulmonaires induites par la migration des cellules cancéreuses injectées vers la surface pulmonaire alors que l'injection des B16F10 exprimant la synténine-1 en plus du SDC-4 augmente le potentiel métastatique chez ces souris. Ainsi la synténine-1 inhibe la fonction du SDC-4. (*Choi et al., 2016*) L'inhibition de l'interaction entre la synténine et le SDC-4 favoriserait la voie de signalisation de la PKC $\alpha$  dépendante du SDC-4 et entraînant une augmentation de la migration trans-endothéliale.

Néanmoins, cette interaction du SDC-4 avec la synténine est sujette à controverse. Il a été montré que la phosphorylation du domaine intracellulaire du SDC-4 sur la S183 (S179 chez l'Homme) induit un changement de conformation qui entraîne la dissociation de la synténine du domaine C2 du SDC-4. (*Koo et al., 2006*) D'autres études ont montré que la synténine peut interagir avec le SDC-4 en absence de stimulation. (*Choi et al., 2016*) Or, le SDC-4, en absence de stimulation, est censé être phosphorylé sur la S183. L'étude de l'interaction entre le SDC-4 et la synténine en présence et en absence de RANTES/CCL5 semble nécessaire pour éclaircir ce point.

2) L'activation de la PKC $\alpha$  se fait indépendamment de la déphosphorylation de la S179 du SDC-4. En effet, les cellules portant le SDC-4/PDZ<sup>-/-</sup> expriment la PKC $\alpha$  de manière constitutive à la membrane et donc une PKC $\alpha$  active constitutivement ; cependant son niveau d'expression est inférieur chez le mutant SDC4/PDZ<sup>-/-</sup> par rapport au SDC-4 sauvage après



stimulation avec RANTES/CCL5. (Maillard et al. 2014) Cette différence peut provenir d'une différence de l'état de phosphorylation du mutant SDC-4/ PDZ<sup>-/-</sup> par rapport au SDC-4 sauvage.

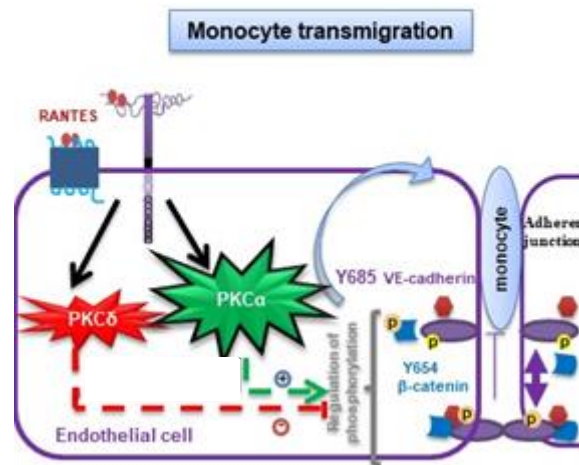
Dans un second temps, nous avons montré que RANTES/CCL5 induit également la translocation membranaire de la PKC $\delta$ . Dans le même modèle cellulaire, la PKC $\delta$  favorise l'adhérence des monocytes sur les cellules HUVECs stimulées par RANTES/CCL5 mais inhibe leur migration trans-endothéliale (**Article 1 Figure 5 p. 150**). Ce résultat est en accord avec Mondrinos et al. montrant *in vitro* que les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines traitées avec un inhibiteur de la PKC $\delta$  présentent une diminution de la migration trans-endothéliale des neutrophiles induite par IL-1 $\beta$  ou par la N-Formylméthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP). Cependant, cette inhibition de la PKC $\delta$  n'a pas d'effet sur la migration trans-endothéliale des neutrophiles induite par IL-8. (Mondrinos et al., 2014) La fonction de la PKC $\delta$  semble dépendre du stimulus.

La PKC $\delta$  bloquerait la migration trans-endothéliale *via* l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de Woo et al. qui lors de l'inhibition de la PKC $\delta$  avec la Rottlerin ou par des oligonucléotides antisens, ont mis en évidence une inhibition de l'expression de VCAM-1 dans les cellules A549 de l'épithélium pulmonaire humain activées par le TNF- $\alpha$  et par conséquent une réduction de l'adhérence des neutrophiles. (Woo et al., 2005) Ainsi, en augmentant les propriétés adhésives des cellules endothéliales, la PKC $\delta$  bloque la migration trans-endothéliale des monocytes car ces derniers sont trop fortement liés à la barrière endothéliale. De nombreuses études *in vitro* soutiennent le fait que le rôle protecteur de la barrière endothéliale, vis-à-vis des médiateurs inflammatoires, est médiée par la PKC $\delta$  dans différents types cellulaires comme les HUVECs et les cellules endothéliales microvasculaires humaine ou murine activées avec le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , la thrombine ou le LPS. (Harrington et al., 2003, 2005; Carpenter et Alexander, 2008; Ahn et al., 2015) De plus, Ahn et al. ont également montré *in vivo* que les souris dont le gène PKC $\delta$  a été invalidé présentent un taux réduit du recrutement de neutrophiles au niveau des lésions pulmonaires induit par le LPS. (Ahn et al., 2015)

Cependant, l'activation de la PKC $\delta$  dans des cellules endothéliales humaines du poumon traitées avec la thrombine diminue leur résistance électrique trans-endothéliale, reflétant ainsi la perte de l'intégrité de la barrière endothéliale. Dans la même étude, la réduction du taux de la PKC $\delta$  par un ARN interférent dans le même modèle cellulaire diminue la perméabilité endothéliale *in vitro*. (Xie et al., 2016)

Nous avons montré que la PKC $\delta$  régule négativement la migration trans-endothéliale des monocytes (**Article 1 Figure 5 p. 150**) *via* une régulation inverse de la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine par rapport à celle effectuée par la PKC $\alpha$  (**Article 1 Figure 7 p. 154**). Nous avons également montré que la PKC $\delta$  diminue la phosphorylation du résidu Y685-VE-cadhérine et du résidu Y654- $\beta$ -caténine alors qu'elle augmente la phosphorylation de la Y731-VE-cadhérine.

Par conséquent, nos résultats montrent pour la première fois que les PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  endothéliales jouent un rôle inverse dans la migration trans-endothéliale induite par RANTES/CCL5 qui semble être dépendante de la régulation de la phosphorylation des protéines de jonctions adhérentes étudiées : la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine. Nous avons suggéré qu'il existe une boucle de régulation entre ces deux PKCs (**Figure 45**).



**Figure 45. Balance entre PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  dans la migration trans-endothéliale induite par RANTES/CCL5.** Dans les cellules endothéliales stimulées par RANTES/CCL5 la PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$  sont activées. La PKC $\alpha$  induit de la phosphorylation de la Y654- $\beta$ -caténine, une augmentation de la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine et une diminution de la phosphorylation de la Y731-VE-cadhérine et in fine induit la migration trans-endothéliale. La PKC $\delta$  a un rôle opposé à celui de la PKC $\alpha$  dans la phosphorylation et dans la migration trans-endothéliale.

Pour déterminer le lien entre les deux PKCs, nous avons évalué la conséquence de l'inhibition de la PKC $\alpha$  ou de la PKC $\delta$  sur l'activation de chacune de ces deux PKCs.

L'inhibition de la PKC $\delta$  n'a pas d'effet sur l'activation de la PKC $\alpha$  alors que l'inhibition de la PKC $\alpha$  aboutit à une forte translocation de la PKC $\delta$  du cytosol vers la membrane plasmique dans

les cellules endothéliales ni activées avec le TNF- $\alpha$  ni stimulées avec RANTES/CCL5. Ceci suggère que la PKC $\alpha$  inhibe l'activation de la PKC $\delta$ . Ces résultats sont en accord avec une étude antérieure qui a montré que la transfection des cellules du cancer du sein MCF-7 avec un plasmide codant pour la PKC $\alpha$  augmente son activation mais diminue l'expression et l'activation de la PKC $\delta$ . (*Ways et al., 1995*)

En revanche, nos résultats sont en contradiction avec l'étude *in vitro* de *Murakami et al.* qui montre que c'est la PKC $\delta$  qui régule de façon négative l'activation de la PKC $\alpha$  dépendante du SDC-4. Dans cette étude, la PKC $\delta$  réduit l'activation de la PKC $\alpha$  induite par l'axe SDC-4-FGF2 dans les cellules endothéliales murine *Rat Fat Pad Endothelial Cell* (RFPEC) caractérisée par un glycocalyx robuste (*Murakami et al., 2002; Bass and Humphries, 2002*) Le renforcement du glycocalyx c'est-à-dire l'ensemble de protéoglycanes, des glycolipides et glycoprotéines pourrait dans cette lignée cellulaire influencer cette régulation entre la PKC $\alpha$  et PKC $\delta$  mais cette hypothèse reste à valider. Afin de comprendre au mieux cette balance entre la PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$ , il est nécessaire de valider ces résultats obtenus par l'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques avec des ARN interférents ou des dominants négatifs ciblant la PKC $\alpha$  ou la PKC $\delta$ .

Ainsi, nous avons montré que la PKC $\delta$  et la PKC $\alpha$  ne régulent pas l'intégrité de la barrière endothéliale de la même manière. Cette activité de la PKC $\delta$  qui favorise la fonction de la barrière endothéliale et par conséquent inhibe le recrutement des leucocytes et cette activité opposée de la PKC $\alpha$  qui augmente la migration trans-endothéliale des leucocytes a été retrouvée dans différents types de cellules endothéliales notamment les HUVECs et les cellules endothéliales microvasculaires humaines ou murines. (*Sandoval et al., 2001; St Amant et al., 2012; Harrington et al., 2003*)

Par ailleurs, dans notre modèle expérimental *in vitro*, nous avons montré que la migration trans-endothéliale des monocytes peut être régulée par une balance de l'activité de voies de signalisation dont dépendent la PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$  en présence de RANTES/CCL5. Sachant que l'activation de la PKC $\alpha$  induite par l'interaction du FGF2 avec le SDC-4 induit en aval de la voie de signalisation l'activation des Rho GTPases, notamment, RhoG et Rac1, dans un contexte angiogénique, nous avons vérifié l'implication des Rho GTPases dans le recrutement monocyttaire. (*Elfenbein et al., 2009*)

#### **d- Rôle des Rho GTPases**

Afin de vérifier l'implication des RhoGTPases dans notre modèle expérimental (cellules HUVECs activées par le TNF- $\alpha$  stimulées ou non avec RANTES/CCL5) d'interaction monocytaire avec les cellules endothéliales, nous avons transfecté les cellules HUVECs avec soit un plasmide codant uniquement pour le SDC-4 sauvage soit avec des plasmides codant le SDC-4 sauvage et le dominant négatif de Rac1 (SDC4-Rac1<sup>-</sup>) ou de Cdc42 (SDC4-Cdc42<sup>-</sup>). L'activation de Rac1 dans les cellules HUVECs activées par le TNF- $\alpha$  a déjà été démontrée. (Marinković *et al.*, 2014; 2015)

D'une façon très intéressante, sous flux laminaire, nous avons observé des changements morphologiques seulement sur les cellules endothéliales transfectées par uniquement le SDC-4 sauvage ; des protubérances membranaires sous forme de filopodes sont visibles à la surface de ces cellules. Nous avons remarqué que dans les cellules endothéliales ces protubérances ne se forment pas après la co-transfection du plasmide codant pour le SDC-4 sauvage avec le dominant négatif de Rac1 ou de Cdc42 (Article 2-résultats non montrés). Cette observation suggère que le SDC-4 induit le recrutement des monocytes par la formation des filopodes endothéliaux médié par Rac1 et/ou Cdc42. Ces filopodes captureraient les monocytes et pourraient servir comme des structures d'ancrage afin d'augmenter leur adhérence sur l'endothélium. Cette hypothèse portant sur la formation, sur les cellules endothéliales, de structures d'ancrage permettant de recruter les leucocytes circulants a été largement discutée et acceptée dans la littérature ; elle a été confirmée tout récemment par les travaux de Kroon *et al.* qui ont montré, en microscopie confocale, des filopodes formés par les HUVECs, activées avec le TNF- $\alpha$ , qui entourent les neutrophiles adhérents. (Kroon *et al.*, 2018)

Cependant, le rôle de la Rho GTPase Rac1 dans la fonction endothéliale apparaît très contradictoire. D'une part, il a été montré que Rac1 favoriserait et améliorerait l'intégrité de la barrière endothéliale, et par conséquent régulerait de façon négative la migration trans-endothéliale des leucocytes et la perméabilité vasculaire. (Birukova *et al.*, 2007; Duluc and Wojciak-Stothard, 2014; Tian *et al.*, 2015) il a été montré que Rac1 induirait la perméabilité vasculaire et la migration trans-endothéliale leucocytaire au détriment de l'intégrité de l'endothélium. (Cain *et al.*, 2010; Gavard and Gutkind, 2006)

Nous avons également observé cette divergence de Rac1 qui, dans notre modèle expérimental, dépend de la stimulation des cellules endothéliales avec RANTES/CCL5. Les cellules endothéliales ont été prétraitées avec NSC, inhibiteur pharmacologique de Rac1 ou transfectées

avec le plasmide dominant négatif de Rac1 (DN-Rac1), activées avec le TNF- $\alpha$  et stimulées ou non avec RANTES/CCL5. En absence de RANTES, la voie de signalisation de Rac1 endothéliale inhibe la migration trans-endothéliale des monocytes à travers les cellules endothéliales (prétraitées avec l'inhibiteur NSC ou transfectées avec le DN-Rac1) activées avec le TNF- $\alpha$ . Cependant, en présence de RANTES/CCL5, cette voie permet d'induire la migration trans-endothéliale des monocytes à travers le même modèle de cellules endothéliales activées par le TNF- $\alpha$ . Ce résultat suggère que la migration trans-endothéliale des monocytes, dépendante de RANTES/CCL5, est induite par la voie Rac1.

Ainsi, le processus d'activation de Rac1 dans les cellules HUVECs semble un point clef dans l'orientation du rôle que jouera Rac1 dans le recrutement leucocytaire. En effet, il a été montré *in vitro* dans les cellules endothéliales HUVECs stimulées avec le VEGF que la voie de signalisation Rac1 joue un rôle majeur dans l'endocytose de la VE-cadhérine dépendante de la  $\beta$ -arrestine favorisant la perméabilité endothéliale. (Gavard and Gutkind, 2006) D'autre part, l'activation de Rac1 endothéliale par l'interaction de VCAM-1 avec les intégrines leucocytaires active la NADPH oxydase et produit des espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent contribuer à la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosines du complexe VE-cadhérine/caténines notamment les résidus Y654- $\beta$ -caténine, Y658- et Y731-VE-cadhérine, aboutissant à une désorganisation des jonctions adhérentes.(van Wetering et al., 2003; Wetering et al., 2002; Cook-Mills et al., 2004; Buul et al., 2005; Monaghan-Benson and Burridge, 2009) Pour aller plus loin, il pourrait être intéressant de comparer, dans notre modèle expérimental en présence ou en l'absence de VCAM-1, la production des espèces réactives de l'oxygène et la place de la NADPH oxydase comme décrit par Taishan Hu et al.(Hu et al., 2005)

Nos résultats obtenus après l'inhibition de Cdc42 avec le ML141, un inhibiteur pharmacologique de Cdc42, ont également mis en évidence que le Cdc42, tout comme Rac1, joue un rôle divergent dans la migration trans-endothéliale des monocytes dépendant de la stimulation de RANTES/CCL5. En présence de RANTES/CCL5, le prétraitement des cellules endothéliales avec l'inhibiteur de Cdc42 inhibe la migration trans-endothéliale. À l'inverse, en absence de RANTES/CCL5, l'inhibition de Cdc42 favorise la migration endothéliale à travers les cellules endothéliales activées par le TNF- $\alpha$ . La spécificité de l'inhibiteur pharmacologique de Cdc42 pouvant être remise en question, nous avons validé ces résultats en transfectant les cellules endothéliales avec un dominant négatif de Cdc42 (**Article 1 Figure S2-résultat supplémentaire p. 171**). Nos résultats confirment les connaissances précédentes ; le Cdc42 inhibe la migration trans-endothéliale induite par RANTES/CCL5. (Broman et al., 2006;

*Kouklis et al., 2003;2004; Spindler et al., 2010*) En effet, il a toujours été admis que le Cdc42 est une Rho GTPase protectrice maintenant la barrière endothéliale intacte, induisant sa stabilité et la restauration des jonctions inter-cellulaires. (*Broman et al., 2006; Kouklis et al., 2003; Kouklis et al. 2004; Spindler et al., 2010*) Les récents travaux de *Kroon et al.* montrant que l'activation du Cdc42, dépendante de ICAM-1, induit le recrutement des leucocytes par la formation de filopodes qui capturent les leucocytes et soutiennent la migration trans-endothéliale, mettent en avant l'importance du signal extracellulaire et des molécules membranaires transmettant le signal dans la cellule endothéliale. (*Kroon et al., 2018*)

Ainsi Cdc42 et Rac1 ont des fonctions opposées dans le recrutement monocyttaire induit par RANTES/CCL5. Les signaux en amont ou les interactions que pourront avoir ces Rho GTPases après leur recrutement vont orienter l'information qu'ils vont transmettre en aval. Nous avons vu qu'elle pouvait être la réponse de ces deux Rho GTPases après une stimulation des cellules endothéliales avec RANTES/CCL5 ; il serait intéressant d'aller plus loin et d'évaluer l'implication du SDC-4 et les interactions de SDC-4 et les Rho GTPases dans ce contexte. Nous savons que dans les cellules endothéliales murines, l'axe SDC-4-FGF2 induit l'activation du Cdc42 (*Tkachenko et al. 2004*) L'interaction du SDC-4 avec le FGF2 ou avec RANTES/CCL5 dans les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires murines ou HUVECs respectivement active Rac1. (*Elfenbein et al., 2009; Maillard et al., 2014*)

Nous avons ensuite évalué l'implication de la voie Rho GTPase, RhoA, en utilisant soit un inhibiteur bactérien ciblant RhoA, RhoB et RhoC (la C3 exoenzyme transférase) ou des cellules endothéliales transfectées avec un dominant négatif de RhoA. Dans les deux cas le blocage de RhoA inhibe la migration trans-endothéliale des monocytes induite par RANTES/CCL5. Ces observations sont cohérentes avec plusieurs études antérieures et en accord avec le fait que l'activation de RhoA est requise pour l'adhérence des leucocytes et la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Saito et al., 2002; Strey Anke et al., 2002; Mikelis et al., 2015; Heemskerk et al., 2016; Wójciak-Stothard et al.,1999*)

Ainsi, notre travail a bien montré une implication des trois GTPases Rac1, Cdc42 et RhoA dans le recrutement monocyttaire induit par RANTES/CCL5. Ces Rho GTPases ont un rôle bien spécifique dépendant des stimulations cellulaires.

Nous pouvons cependant noter que des études ont montré que le regroupement d'ICAM-1 et de VCAM-1 induit l'activation des Rho GTPase et la formation des filopodes. L'ensemble forme

des structures annulaires d'ancrage pour les monocytes à la surface des cellules endothéliales. (Barreiro et al., 2004; Shaw et al., 2004; Barreiro et al., 2002)

Récemment, il a été également montré que la formation des structures d'ancrage à la surface des cellules endothéliales a pour but de limiter la perméabilité (fuite) vasculaire durant la migration trans-endothéliale dans les cellules HUVECs. (Heemskerk et al., 2016; Phillipson et al., 2008; Zeng M. et al., 2002) Nous nous sommes intéressés à la perméabilité vasculaire induite par RANTES/CCL5 dans le même modèle cellulaire.

### **Perméabilité vasculaire et migration trans-endothéliale.**

Nous avons étudié la perméabilité vasculaire d'une part, *in vitro* en utilisant un test de perméabilité au Dextran-FITC et la migration trans-endothéliale d'autre part à travers les cellules endothéliales activées avec le TNF- $\alpha$  et stimulées avec RANTES/CCL5. Selon nos résultats, la perméabilité vasculaire est également augmentée en réponse à RANTES/CCL5. La perméabilité vasculaire induite par RANTES/CCL5 dépend de son oligomérisation et de son interaction à la fois avec ses récepteurs, CCR1 et CCR5, et avec les chaînes GAGs (**Article 1 résultats complémentaires Figure C1 (p. 173) et C2 (p. 175)**). Il nous faudra vérifier que la migration trans-endothéliale des leucocytes est associée à une perméabilité vasculaire minimale comme décrit dans la littérature. (Heemskerk et al., 2016; Phillipson et al., 2008; M. Zeng et al., 2002)

Par conséquent, pour compléter notre travail et vérifier qu'il existe bien une association entre la perméabilité vasculaire et la migration trans-endothéliale, nous envisageons d'incuber les cellules endothéliales avec les monocytes et/ou le Dextran-FITC et de mesurer en parallèle la perméabilité vasculaire et la migration trans-endothéliale des monocytes. Il sera judicieux de vérifier l'étanchéité de la monocouche de cellules endothéliale en mesurant la résistance électrique trans-endothéliale au préalable.

Bien que l'inflammation implique à la fois une augmentation de la migration trans-endothéliale et de la perméabilité vasculaire notamment dans les veinules post-capillaires, il est probable que ces deux phénomènes ne soient pas directement liés, qu'ils soient bien distincts. Certes, ces deux processus impliquent des voies de signalisation intracellulaire similaires telles que les Rho GTPases et la src kinase qui phosphorylent la VE-cadhérine permettant l'ouverture ou la fermeture des jonctions inter-endothéliales. (Rho et al., 2017; Komarova et al., 2017; Claesson-Welsh, 2015) Lorsque la perméabilité vasculaire a été mesurée simultanément avec les interactions leucocytes-cellules endothéliales, les sites de perméabilité vasculaire locaux étaient

distincts de ceux de l'adhérence ou de la migration trans-endothéliale des leucocytes. (*Baluk et al., 1998*) De plus, il a été montré *in vivo* que le moment de l'adhérence et de la migration trans-endothéliale des leucocytes n'était pas corrélé avec le changement de perméabilité vasculaire chez la souris dans un modèle d'inflammation aiguë. (*Kim et al., 2009*) Ainsi, la différence clé entre ces deux processus est une différence spatio-temporelle des signaux produits dans les cellules endothéliales. Afin de comprendre le mécanisme moléculaire précis de la perméabilité vasculaire induite par RANTES/CCL5, il serait intéressant de pouvoir évaluer, sur l'ensemble de la surface cellulaire, en continu les événements moléculaires marqueurs des différentes étapes du recrutement leucocytaire. Il faut cependant se rappeler, que RANTES/CCL5 interagit avec de nombreux récepteurs et co-récepteurs membranaires et par conséquent, transmet de multiples signaux intracellulaires. Pourquoi tous ces signaux sont-ils nécessaires ? Une meilleure connaissance de l'orientation de RANTES/CCL5 vers tel ou tel récepteur/co-récepteur et des interactions entre différentes voies de signalisation issues des interactions entre RANTES/CCL5 et ses récepteurs/co-récepteurs permettrait de répondre à cette question.

#### **Interaction de RANTES/CCL5 avec les co-récepteurs SDC-1 et CD44**

La chimiokine RANTES/CCL5 interagit, comme nous l'avons vu avec le SDC-4 mais également avec le SDC-1 et le CD44. Ces trois protéoglycanes sont exprimés à la membrane des HUVECs. De précédentes publications de notre équipe de recherche montrent que RANTES peut induire différents effets biologiques en interagissant avec ces co-récepteurs notamment lors de la migration et l'invasion de cellules humaines endothéliales ou d'hépatome. Cependant, l'ensemble de ces résultats montrent que l'effet de SDC-1 et de CD44 dans les effets induits par RANTES/CCL5 est minoritaire par rapport à celui du SDC-4. (*Suffee et al., 2012; Charni et al., 2009*)

Le SDC-1 entraîne une diminution de l'interaction entre leucocytes et cellules endothéliales diminuant ainsi la réponse inflammatoire. En effet, les souris dont le gène SDC-1 a été invalidé présentent des interactions entre cellules leucocytaires et cellules endothéliales plus fréquentes, une augmentation du recrutement leucocytaire en réponse au TNF- $\alpha$  dans le système vasculaire oculaire. (*Götte et al., 2002*) Il a largement été démontré dans différents contextes inflammatoires que le SDC-1 agit comme un régulateur négatif de l'adhérence leucocytaire sur les cellules endothéliales. (*Götte et al., 2005; 2002; Zhang et al., 2013*)

Le CD44, quant à lui, induit le recrutement des leucocytes *in vitro* après son interaction avec son ligand, l'acide hyaluronique (HA). Cela a été confirmé *in vivo*, les souris dont le gène CD44



a été invalidé présentent un faible taux de recrutement leucocytaire notamment dans les articulations synoviales. (McDonald and Kubes, 2015; Khan et al., 2004) De plus, les articulations synoviales des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde contiennent des quantités considérables de CD44 ainsi que du ligand HA. (Naor et Nedvetzki, 2003)

Dans la continuité de ce projet, il sera intéressant d'étudier la conséquence fonctionnelle de l'interaction entre RANTES/CCL5 et ses co-récepteurs CD44 et SDC-1 par rapport à son interaction avec le SDC-4. Pour cela, les cellules endothéliales seront prétraitées avec des anticorps neutralisants anti-CD44, anti-SDC-1 ou anti-SDC-4, afin de vérifier si ces interactions ont un impact sur le recrutement monocyttaire induit par l'axe RANTES-SDC-4 dans un contexte inflammatoire et dans le même modèle cellulaire.

Au regard des nombreux événements moléculaires capables de réguler (positivement ou négativement) le recrutement leucocytaire, des résultats contradictoires obtenus en fonction des modèles *in vitro* ou *in vivo* utilisés, il sera important dans la suite des travaux de faire le choix d'un contexte inflammatoire précis afin de poursuivre nos études dans ce modèle *in vitro*, puis de développer un modèle *in vivo* pour mimer davantage les processus se déroulant dans un organisme entier.

### **Choix des modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo***

L'ensemble de nos expériences a été réalisé *in vitro* en utilisant les HUVECs, un modèle fiable et largement utilisé dans l'étude des processus physiologiques et pathologiques du système vasculaire. (Jiménez et al., 2013) Cependant, le système vasculaire est constitué non seulement des veines qui sont chargées de ramener le sang chargé en CO<sub>2</sub> des organes vers le cœur mais aussi des artères dont la fonction est de conduire le sang riche en oxygène du cœur vers les différents organes. À cela s'ajoutent les capillaires qui résident à l'intérieur des organes où sont présentes également des fonctions endothéliales microvasculaires spécifiques à l'organe comme le maintien d'une barrière hémato-encéphalique dans le cerveau, la clairance des cellules endothéliales sinusoidales dans le foie et la filtration du sang par le segment vasculaire glomérulaire. Les cellules endothéliales dans ces différents vaisseaux sanguins dans les différents organes sont exposées à des micro-environnements différents ce qui génère **une hétérogénéité fonctionnelle**. (Aird, 2012)

Par conséquent, le choix du type des cellules endothéliales pour étudier le recrutement des leucocytes doit se faire en fonction du contexte général voire de la pathologie étudiée. Par exemple, afin d'étudier le recrutement monocyttaire associé à la phase précoce de

l'athérosclérose, une pathologie des artères, il serait souhaitable d'utiliser les cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC), les cellules endothéliales de l'artère coronaire humaine (HCAEC)...

Malgré les nombreux modèles *in vitro* et *in silico* permettant d'étudier le recrutement leucocytaire, il n'existe à l'heure actuelle aucune autre stratégie, que l'utilisation de modèles animaux pour évaluer les mécanismes de l'inflammation tenant compte de l'ensemble des mécanismes physiologiques et physiopathologiques, et plus particulièrement d'évaluer le mécanisme d'action et l'efficacité de nouvelles thérapies sur ce processus. (*Tang et al., 2007; Sperandio et al. 2006; Muller and Luscinskas, 2008*)

Afin d'étudier le rôle de l'axe RANTES-SDC-4 dans le recrutement monocytaire nous pourrions générer un modèle d'inflammation sous-cutanée induite par l'implantation d'une éponge de polyester-polyuréthane chez la souris dont le gène SDC-4 a été invalidé et d'administrer RANTES/CCL5 localement d'une façon dose et temps dépendants.

# CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette thèse montre que la chimiokine RANTES/CCL5 induit le recrutement monocytaire en augmentant la capacité des cellules endothéliales à interagir avec les monocytes *via* l'activation de voies de signalisation intra-endothéliale telle les voies Rho GTPases et PKCs ( $\alpha$  et  $\delta$ ) dépendantes. L'activité de RANTES/CCL5 passe également par la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine, de la Y654- $\beta$ -caténine et de la déphosphorylation de la Y731-VE-cadhérine, qui *in fine* permet aux monocytes de migrer à travers les cellules endothéliales de l'endothélium. La phosphorylation de ces résidus de la VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine est régulée méticuleusement par les deux isoformes PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$ . La PKC $\alpha$ , à l'inverse de la PKC $\delta$ , induit la phosphorylation de la Y685-VE-cadhérine et de la Y-654- $\beta$ -caténine mais diminue la déphosphorylation de Y731-VE-cadhérine. La PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$  jouent un rôle opposé dans la migration trans-endothéliale des monocytes : la première induit ce processus alors que la deuxième l'inhibe.

L'effet de RANTES/CCL5 sur les cellules endothéliales permettant le recrutement des monocytes dépend de son oligomérisation et de sa liaison avec CCR1, CCR5 et les chaînes GAGs, qui pourraient notamment être celles portées par le SDC-4.

Cette étude fondamentale a permis de faire la lumière sur l'implication des cellules endothéliales et leur réponse à différents stimuli pour réguler le recrutement leucocytaire. Nous retenons que les RCPGs (CCR1, CCR5) et les chaînes GAGs agissent en synergie pour transmettre les signaux induits par la liaison de RANTES/CCL5. De ce fait, le ciblage unique d'un des RCPGs ou le ciblage unique de l'interaction entre RANTES/ CCL5 et les GAGs n'est pas suffisant. La stratégie thérapeutique qui semble être la plus prometteuse c'est l'utilisation d'un variant de RANTES-CCL5 incapable de se fixer sur les GAGs mais qui interagit avec les RCPGs sans pour autant les activer ; l'affinité de ce variant pour les RCPGs devant être supérieure à celle de RANTES/CCL5 natif.

D'autre part, l'utilisation des mimétiques de GAGs est également une solution prometteuse grâce à leur pouvoir de séquestration de chimiokines solubles empêchant leur interaction avec les GAGs membranaires et diminuant leur interaction avec les RCPGs. Ces mimétiques de glycosaminoglycannes peuvent être d'origine naturels et notamment purifiés à partir d'algues

comme les fucoïdanes ou les carrhagénanes ou obtenus par synthèse organique. Cependant, de nouvelles études sont nécessaires pour déterminer le motif saccharidique précis permettant la meilleure affinité avec RANTES/CCL5.

Malgré leur rôle important, cibler des effecteurs des voies de signalisation tels que la PKC $\alpha$ , la PKC $\delta$  ou les Rho GTPases s'avère délicat en raison de la redondance des voies de signalisation intracellulaire.

En conclusion, bien que l'importance du recrutement des leucocytes, notamment des monocytes, soit bien connue dans les conditions pathologiques ; les mécanismes précis sous-tendant ce processus restent difficiles à élucider et méritent de plus amples investigations dans le but de développer de nouvelles thérapies anti-inflammatoires curatives. Cependant, ce travail expérimental et le bilan bibliographique de ce document montrent clairement que pour obtenir une efficacité optimale, la stratégie devra être spécifique et cibler les voies de signalisation actives au cours du déroulement des différentes phases de l'inflammation.

**RÉFÉRENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41.
- Abdala-Valencia, H., Berdnikovs, S., and Cook-Mills, J.M. (2011). Mechanisms for vascular cell adhesion molecule-1 activation of ERK1/2 during leukocyte transendothelial migration. *PLoS One* 6, e26706.
- Adam, A.P. (2015). Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–24.
- Afratis, N.A., Nikitovic, D., Multhaupt, H.A.B., Theocharis, A.D., Couchman, J.R., and Karamanos, N.K. (2017). Syndecans – key regulators of cell signaling and biological functions. *FEBS J.* 284, 27–41.
- Agere, S.A., Kim, E.Y., Akhtar, N., and Ahmed, S. (2017). Syndecans in chronic inflammatory and autoimmune diseases: Pathological insights and therapeutic opportunities. *J. Cell. Physiol.* 233, 6346–6358.
- Ahn, J.J., Jung, J.P., Park, S.E., Lee, M., Kwon, B., and Cho, H.R. (2015). Involvement of Protein Kinase C- $\delta$  in Vascular Permeability in Acute Lung Injury. *Immune Netw.* 15, 206–211.
- Aird, W.C. (2012). Endothelial Cell Heterogeneity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006429
- Aktary, Z., Alaei, M., and Pasdar, M. (2017). Beyond cell-cell adhesion: Plakoglobin and the regulation of tumorigenesis and metastasis. *Oncotarget* 8, 32270–32291.
- Alcaide, P., Newton, G., Auerbach, S., Sehrawat, S., Mayadas, T.N., Golan, D.E., Yacono, P., Vincent, P., Kowalczyk, A., and Luscinskas, F.W. (2008). p120-Catenin regulates leukocyte transmigration through an effect on VE-cadherin phosphorylation. *Blood* 112, 2770–2779.
- Alcaide, P., Martinelli, R., Newton, G., Williams, M.R., Adam, A., Vincent, P.A., and Luscinskas, F.W. (2012). p120-Catenin prevents neutrophil transmigration independently of RhoA inhibition by impairing Src dependent VE-cadherin phosphorylation. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 303, C385–C395.
- Aldinucci, D., and Colombatti, A. (2014). The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators Inflamm.* 2014.
- Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A., and Couchman, J.R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 505–528.
- Al-Kurdi, R., Gulino-Debrac, D., Martel, L., Legrand, J.-F., Renault, A., Hewat, E., and Vénien-Bryan, C. (2004). A Soluble VE-cadherin Fragment Forms 2D Arrays of Dimers upon Binding to a Lipid Monolayer. *J. Mol. Biol.* 337, 881–892.
- Allingham, M.J., Buul, J.D. van, and Burridge, K. (2007a). ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration. *J. Immunol.* 179, 4053–4064.
- Alon, R., and Ley, K. (2008). Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 525–532.
- Amado-Azevedo, J., Reinhard, N.R., van Bezu, J., de Menezes, R.X., van Beusechem, V.W., van Nieuw Amerongen, G.P., van Hinsbergh, V.W.M., and Hordijk, P.L. (2017). A CDC42-centered signaling unit is a dominant positive regulator of endothelial integrity. *Sci. Rep.* 7, 10132

- Appay, V., and Rowland-Jones, S.L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* *22*, 83–87.
- Appay, V., Brown, A., Cribbes, S., Randle, E., and Czaplewski, L.G. (1999). Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties characterization of nonaggregating, noninflammatory rantes mutants. *J. Biol. Chem.* *274*, 27505–27512.
- Aveleira, C.A., Lin, C.-M., Abcouwer, S.F., Ambrosio, A.F., and Antonetti, D.A. (2010). TNF- Signals Through PKC /NF- B to Alter the Tight Junction Complex and Increase Retinal Endothelial Cell Permeability. *Diabetes* *59*, 2872–2882.
- Azzi, S., Hebda, J.K., and Gavard, J. (2013). Vascular Permeability and Drug Delivery in Cancers. *Front. Oncol.* *3*, 211.
- Bachelier, F., Ben-Baruch, A., Burkhardt, A.M., Combadiere, C., Farber, J.M., Graham, G.J., Horuk, R., Sparre-Ulrich, A.H., Locati, M., Luster, A.D., et al. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* *66*, 1–79.
- Baltus, T., Weber, K.S., Johnson, Z., Proudfoot, A.E., and Weber, C. (2003). Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium. *Blood* *102*, 1985–1988.
- Baluk, P., Bolton, P., Hirata, A., Thurston, G., and McDonald, D.M. (1998). Endothelial gaps and adherent leukocytes in allergen-induced early- and late-phase plasma leakage in rat airways. *Am. J. Pathol.* *152*, 1463–1476.
- Baluk, P., Fuxe, J., Hashizume, H., Romano, T., Lashnits, E., Butz, S., Vestweber, D., Corada, M., Molendini, C., Dejana, E., et al. (2007). Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J. Exp. Med.* *204*, 2349–2362.
- Barcelos, L.S., Coelho, A.M., Russo, R.C., Guabiraba, R., Souza, A.L.S., Bruno-Lima Jr., G., Proudfoot, A.E.I., Andrade, S.P., and Teixeira, M.M. (2009). Role of the chemokines CCL3/MIP-1 $\alpha$  and CCL5/RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice. *Microvasc. Res.* *78*, 148–154.
- Barlic, J., and Murphy, P.M. (2007). Chemokine regulation of atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* *82*, 226–236.
- Barreiro, O., Yáñez-Mó, M., Serrador, J.M., Montoya, M.C., Vicente-Manzanares, M., Tejedor, R., Furthmayr, H., and Sánchez-Madrid, F. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol.* *157*, 1233–1245.
- Barreiro, O., vicente-manzanares, M., Urzainqui, A., Yáñez-Mó, M., and Sánchez-Madrid, F. (2004). Interactive protrusive structures during leukocyte adhesion and transendothelial migration. *Front Biosci.* *9*, 1849-1863.
- Bass, M.D., and Humphries, M.J. (2002). Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. *Biochem. J.* *368*, 1–15.
- Bass, M.D., Williamson, R.C., Nunan, R.D., Humphries, J.D., Byron, A., Morgan, M.R., Martin, P., and Humphries, M.J. (2011). A Syndecan-4 Hair Trigger Initiates Wound Healing through Caveolin- and RhoG-Regulated Integrin Endocytosis. *Dev. Cell* *21*, 681–693.
- Baumeister, U., Funke, R., Ebnet, K., Vorschmitt, H., Koch, S., and Vestweber, D. (2005). Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J.* *24*, 1686–1695.

- Bazzoni, G. (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 525–530.
- Berdnikovs, S., Pavlov, V.I., Abdala-Valencia, H., McCary, C.A., Klumpp, D.J., Tremblay, M.L., and Cook-Mills, J.M. (2012). PTP1B Deficiency Exacerbates Inflammation and Accelerates Leukocyte Trafficking In Vivo. *J. Immunol.* *188*, 874–884.
- Binch, A.L., Shapiro, I.M., and Risbud, M.V. (2016). Syndecan-4 in intervertebral disc and cartilage: Saint or Synner? *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *52–54*, 355–362.
- Birukova, A.A., Malyukova, I., Poroyko, V., and Birukov, K.G. (2007). Paxillin- $\beta$ -catenin interactions are involved in Rac/Cdc42-mediated endothelial barrier-protective response to oxidized phospholipids. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *293*, L199–L211.
- Birukova, A.A., Tian, Y., Dubrovskiy, O., Zebda, N., Sarich, N., Tian, X., Wang, Y., and Birukov, K.G. (2012). VE-cadherin trans-interactions modulate Rac activation and enhancement of lung endothelial barrier by iloprost. *J. Cell. Physiol.* *227*, 3405–3416.
- Bixel, M.G., Petri, B., Khandoga, A.G., Khandoga, A., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., März, S., Krombach, F., and Vestweber, D. (2007). A CD99-related antigen on endothelial cells mediates neutrophil but not lymphocyte extravasation in vivo. *Blood* *109*, 5327–5336.
- Blaise, S., Polena, H., and Vilgrain, I. (2015). Soluble vascular endothelial-cadherin and auto-antibodies to human vascular endothelial-cadherin in human diseases: Two new biomarkers of endothelial dysfunction. *Vasc. Med.* *20*, 557–565.
- Bonavita, O., Mollica Poeta, V., Massara, M., Mantovani, A., and Bonecchi, R. (2018). Regulation of hematopoiesis by the chemokine system. *Cytokine* *109*, 76–80.
- Bonecchi, R., and Graham, G.J. (2016). Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. *Front. Immunol.* *7*, 224.
- Brasch, J., Harrison, O.J., Ahlsen, G., Carnally, S.M., Henderson, R.M., Honig, B., and Shapiro, L. (2011). Structure and Binding Mechanism of Vascular Endothelial Cadherin: A Divergent Classical Cadherin. *J. Mol. Biol.* *408*, 57–73.
- Braunersreuther, V., Pellieux, C., Pelli, G., Burger, F., Steffens, S., Montessuit, C., Weber, C., Proudfoot, A., Mach, F., and Arnaud, C. (2010). Chemokine CCL5/RANTES inhibition reduces myocardial reperfusion injury in atherosclerotic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *48*, 789–798.
- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., and Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* *87*, 630–641.
- Brinkmann, B.F., Steinbacher, T., Hartmann, C., Kummer, D., Pajonczyk, D., Mirzapourshafiyi, F., Nakayama, M., Weide, T., Gerke, V., and Ebnet, K. (2016). VE-cadherin interacts with cell polarity protein Pals1 to regulate vascular lumen formation. *Mol. Biol. Cell* *27*, 2811–2821.
- Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., Frye, M., Rossaint, J., Zarbock, A., Cagna, G., Linnepe, R., Schulte, D., Nottebaum, A.F., et al. (2011). Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J. Exp. Med.* *208*, 2393–2401.
- Broman, M.T., Kouklis, P., Gao, X., Ramchandran, R., Neamu, R.F., Minshall, R.D., and Malik, A.B. (2006). Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. *Circ. Res.* *98*, 73–80.



- Bruzzone, R., White, T.W., and Paul, D.L. (1996). Connections with Connexins: the Molecular Basis of Direct Intercellular Signaling. *Eur. J. Biochem.* 238, 1–27.
- Bünemann, E., Hoff, N.-P., Buhren, B.A., Wiesner, U., Meller, S., Bölke, E., Müller-Homey, A., Kubitzka, R., Ruzicka, T., Zlotnik, A., et al. (2018). Chemokine ligand–receptor interactions critically regulate cutaneous wound healing. *Eur. J. Med. Res.* 23, 4.
- Buul, J.D. van, Anthony, E.C., Fernandez-Borja, M., BurrIDGE, K., and Hordijk, P.L. (2005). Proline-rich Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) Mediates Vascular Endothelial-Cadherin-based Cell-Cell Adhesion by Regulating  $\beta$ -Catenin Tyrosine Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 280, 21129–21136.
- Cain, R.J., Vanhaesebroeck, B., and Ridley, A.J. (2010). The PI3K p110 $\alpha$  isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J. Cell Biol.* 188, 863–876.
- Calkins, C.C., Hoepner, B.L., Law, C.M., Novak, M.R., Setzer, S.V., Hatzfeld, M., and Kowalczyk, A.P. (2003). The Armadillo Family Protein p0071 Is a VE-cadherin- and Desmoplakin-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 278, 1774–1783.
- Cambien, B., Richard-Fiardo, P., Karimjee, B.F., Martini, V., Ferrua, B., Pitard, B., Schmid-Antomarchi, H., and Schmid-Alliana, A. (2011). CCL5 Neutralization Restricts Cancer Growth and Potentiates the Targeting of PDGFR $\beta$  in Colorectal Carcinoma. *PLOS ONE* 6, e28842.
- Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a004994.
- Carman, C.V., Sage, P.T., Sciuto, T.E., de la Fuente, M.A., Geha, R.S., Ochs, H.D., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M., and Springer, T.A. (2007). Transcellular Diapedesis Is Initiated by Invasive Podosomes. *Immunity* 26, 784–797.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.-G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., et al. (1999a). Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell* 98, 147–157.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.-G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., et al. (1999b). Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell* 98, 147–157.
- Carpenter, A.C., and Alexander, J.S. (2008). Endothelial PKC $\delta$  activation attenuates neutrophil transendothelial migration. *Inflamm. Res.* 57, 216–229.
- Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bianco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., et al. (2003). The conditional inactivation of the  $\beta$ -catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J. Cell Biol.* 162, 1111–1122.
- Cecchinato, V., and Ugucioni, M. (2018). Insight on the regulation of chemokine activities. *J. Leukoc. Biol.*
- Cecchinato Valentina, D’Agostino Gianluca, Raeli Lorenzo, and Ugucioni Mariagrazia (2015). Chemokine interaction with synergy-inducing molecules: fine tuning modulation of cell trafficking. *J. Leukoc. Biol.* 99, 851–855.
- Cerutti, C., and Ridley, A.J. (2017). Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp. Cell Res.* 358, 31–38.

- Charni, F., Friand, V., Haddad, O., Hlawaty, H., Martin, L., Vassy, R., Oudar, O., Gattegno, L., Charnaux, N., and Sutton, A. (2009). Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* *1790*, 1314–1326.
- Chen, E. (2004). Syndecan-2 is essential for angiogenic sprouting during zebrafish development. *Blood* *103*, 1710–1719.
- Chen, X.L., Nam, J.-O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C.T., Goka, E., Lim, S.-T., Tomar, A., Tanjoni, I., Uryu, S., et al. (2012). VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev. Cell* *22*, 146–157.
- Cheng, B., Montmasson, M., Terradot, L., and Rousselle, P. (2016). Syndecans as Cell Surface Receptors in Cancer Biology. A Focus on their Interaction with PDZ Domain Proteins. *Front. Pharmacol.* *7*, 10.
- Chiasson, C.M., Wittich, K.B., Vincent, P.A., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2009). p120-Catenin Inhibits VE-Cadherin Internalization through a Rho-independent Mechanism. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1970–1980.
- Choi, Y., Yun, J.-H., Yoo, J., Lee, I., Kim, H., Son, H.-N., Kim, I.-S., Yoon, H.S., Zimmermann, P., Couchman, J.R., et al. (2016). New structural insight of C-terminal region of Syntenin-1, enhancing the molecular dimerization and inhibitory function related on Syndecan-4 signaling. *Sci. Rep.* *6*, 36818.
- Chow, M.T., and Luster, A.D. (2014). Chemokines in Cancer. *Cancer Immunol. Res.* *2*, 1125–1131.
- Claesson-Welsh, L. (2015). Vascular permeability—the essentials. *Ups. J. Med. Sci.* *120*, 135–143.
- Coluccia, A.M.L., Vacca, A., Duñach, M., Mologni, L., Redaelli, S., Bustos, V.H., Benati, D., Pinna, L.A., and Gambacorti-Passerini, C. (2007). Bcr-Abl stabilizes  $\beta$ -catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* *26*, 1456–1466.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6Chi and Ly6Clo Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice. *Circulation* *117*, 1649–1657.
- Cook-Mills, J.M., Johnson, J.D., Deem, T.L., Ochi, A., Wang, L., and Zheng, Y. (2004). Calcium mobilization and Rac1 activation are required for VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) stimulation of NADPH oxidase activity. *Biochem. J.* *378*, 539–547.
- Cooper, L.J.N., Mittendorf, E.A., Moyes, J., and Prabhakaran, S. (2018). *Immunotherapy in Translational Cancer Research* (John Wiley & Sons).
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M.G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., et al. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9815–9820.
- Couchman, J.R. (2010). Transmembrane Signaling Proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 89–114.
- Couchman, J.R., Gopal, S., Lim, H.C., Nørgaard, S., and Mulhaupt, H.A. (2015). Syndecans: from peripheral coreceptors to mainstream regulators of cell behaviour. *Int. J. Exp. Pathol.* *96*, 1–10.
- Crown, S.E., Yu, Y., Sweeney, M.D., Leary, J.A., and Handel, T.M. (2006). Heterodimerization of CCR2 Chemokines and Regulation by Glycosaminoglycan Binding. *J. Biol. Chem.* *281*, 25438–25446.

- Daneshjou, N., Sieracki, N., van Nieuw Amerongen, G.P., Conway, D.E., Schwartz, M.A., Komarova, Y.A., and Malik, A.B. (2015). Rac1 functions as a reversible tension modulator to stabilize VE-cadherin trans-interaction. *J. Cell Biol.* *208*, 23–32.
- Daugherty, R.L., Serebryanny, L., Yemelyanov, A., Flozak, A.S., Yu, H.-J., Kosak, S.T., deLanerolle, P., and Gottardi, C.J. (2014).  $\alpha$ -Catenin is an inhibitor of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 5260–5265.
- Dejana, E. (2004). Endothelial cell–cell junctions: happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 261–270.
- Dejana, E. (2010). The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ. Res.* *107*, 943–952.
- Dejana, E., and Orsenigo, F. (2013). Endothelial adherens junctions at a glance. *J Cell Sci* *126*, 2545–2549.
- Dejana, E., and Vestweber, D. (2013). Chapter Six - The Role of VE-Cadherin in Vascular Morphogenesis and Permeability Control. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, F. van Roy, ed. (Academic Press), pp. 119–144.
- Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* *121*, 2115–2122.
- Dejana, E., Orsenigo, F., Molendini, C., Baluk, P., and McDonald, D.M. (2009). Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res.* *335*, 17–25.
- de Munnik, S.M., Smit, M.J., Leurs, R., and Vischer, H.F. (2015). Modulation of cellular signaling by herpesvirus-encoded G protein-coupled receptors. *Front. Pharmacol.* *6*, 40
- Del Maschio, A., Zanetti, A., Corada, M., Rival, Y., Ruco, L., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1996). Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J. Cell Biol.* *135*, 497–510.
- Denning, M.F. (2012). Specifying protein kinase C functions in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* *25*, 466–476.
- Denys, A., Hichami, A., and Khan, N.A. (2005). n-3 PUFAs modulate T-cell activation via protein kinase C- $\alpha$  and - $\epsilon$  and the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *J. Lipid Res.* *46*, 752–758.
- Deshauer, C., Morgan, A.M., Ryan, E.O., Handel, T.M., Prestegard, J.H., and Wang, X. (2015). Interactions of the Chemokine CCL5/RANTES with Medium Sized Chondroitin Sulfate Ligands. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *23*, 1066–1077.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* *29*, 313–326.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (2005).  $\alpha$ -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- $\beta$ -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* *123*, 903–915.
- Duc, N.M., Kim, H.R., and Chung, K.Y. (2015). Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *763*, 214–222.
- Duluc, L., and Wojciak-Stothard, B. (2014). Rho GTPases in the regulation of pulmonary vascular barrier function. *Cell Tissue Res.* *355*, 675–685.

- Edderkaoui, B. (2017). Potential Role of Chemokines in Fracture Repair. *Front. Endocrinol.* 8, 39.
- Elfenbein, A., and Simons, M. (2013). Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 3799–3804.
- Elfenbein, A., Rhodes, J.M., Meller, J., Schwartz, M.A., Matsuda, M., and Simons, M. (2009). Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4–synectin–RhoGDI1 complex and is reversed by PKC $\alpha$  in a Rac1 activation pathway. *J. Cell Biol.* 186, 75–83.
- Ellyard, J.I., Simson, L., Bezos, A., Johnston, K., Freeman, C., and Parish, C.R. (2007). Eotaxin Selectively Binds Heparin AN INTERACTION THAT PROTECTS EOTAXIN FROM PROTEOLYSIS AND POTENTIATES CHEMOTACTIC ACTIVITY IN VIVO. *J. Biol. Chem.* 282, 15238–15247.
- Escobar, D.J., Desai, R., Ishiyama, N., Folmsbee, S.S., Novak, M.N., Flozak, A.S., Daugherty, R.L., Mo, R., Nanavati, D., Sarpal, R., et al. (2015).  $\alpha$ -Catenin phosphorylation promotes intercellular adhesion through a dual-kinase mechanism. *J. Cell Sci.* 128, 1150–1165.
- Esko, J.D., Kimata, K., and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans.
- Falk, M.M., Kells, R.M., and Berthoud, V.M. (2014). Degradation of connexins and gap junctions. *FEBS Lett.* 588, 1221–1229.
- Falk, M.M., Bell, C.L., Kells Andrews, R.M., and Murray, S.A. (2016). Molecular mechanisms regulating formation, trafficking and processing of annular gap junctions. *BMC Cell Biol.* 17.
- Ferber, A., Yaen, C., Sarmiento, E., and Martinez, J. (2002). An Octapeptide in the Juxtamembrane Domain of VE-Cadherin Is Important for p120ctn Binding and Cell Proliferation. *Exp. Cell Res.* 274, 35–44.
- Filippi, M.-D. (2016). Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv. Immunol.* 129, 25–53.
- Flemming, S., Burkard, N., Renschler, M., Vielmuth, F., Meir, M., Schick, M.A., Wunder, C., Germer, C.-T., Spindler, V., Waschke, J., et al. (2015). Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc. Res.* 107, 32–44.
- Flier, J., Boorsma, D.M., Beek, P.J. van, Nieboer, C., Stoof, T.J., Willemze, R., and Tensen, C.P. (2001). Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J. Pathol.* 194, 398–405.
- Furuse, M. (2010). Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002907
- Gallicano, G.I., Bauer, C., and Fuchs, E. (2001). Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature. *Development* 128, 929–941.
- Gandhi, N.S., and Mancera, R.L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 455–482.
- Garrett, J.P., Lowery, A.M., Adam, A.P., Kowalczyk, A.P., and Vincent, P.A. (2017). Regulation of endothelial barrier function by p120-catenin· VE-cadherin interaction. *Mol. Biol. Cell* 28, 85–97.
- Gavard, J. (2013). Endothelial permeability and VE-cadherin: A wacky comradeship. *Cell Adhes. Migr.* 7, 465–471.

- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 8, 1223.
- Gavard, J., Hou, X., Qu, Y., Masedunskas, A., Martin, D., Weigert, R., Li, X., and Gutkind, J.S. (2009). A Role for a CXCR2/Phosphatidylinositol 3-Kinase  $\gamma$  Signaling Axis in Acute and Chronic Vascular Permeability. *Mol. Cell. Biol.* 29, 2469–2480.
- Gory-Faure, S., Prandini, M.H., Pointu, H., Rouillot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., and Huber, P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* 126, 2093–2102.
- Götte, M., Jousen, A.M., Klein, C., Andre, P., Wagner, D.D., Hinkes, M.T., Kirchhof, B., Adamis, A.P., and Bernfield, M. (2002). Role of syndecan-1 in leukocyte–endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1135–1141.
- Götte, M., Bernfield, M., and Jousen, A.M. (2005). Increased Leukocyte–Endothelial Interactions in Syndecan-1–Deficient Mice Involve Heparan Sulfate–Dependent and –Independent Steps. *Curr. Eye Res.* 30, 417–422.
- Gouwy, M., Struyf, S., Catusse, J., Proost, P., and Damme, J.V. (2004). Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* 76, 185–194.
- Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and Chemokine Receptors: Positioning Cells for Host Defense and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 659–702.
- Grootjans, J.J., Reekmans, G., Ceulemans, H., and David, G. (2000). Syntenin–Syndecan Binding Requires Syndecan–Syntenin and the Co-operation of Both PDZ Domains of Syntenin. *J. Biol. Chem.* 275, 19933–19941.
- Guo, M., Wu, M.H., Granger, H.J., and Yuan, S.Y. (2004). Transference of recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain alters endothelial junctional integrity and porcine microvascular permeability. *J. Physiol.* 554, 78–88.
- Guo, M., Breslin, J.W., Wu, M.H., Gottardi, C.J., and Yuan, S.Y. (2008). VE-cadherin and  $\beta$ -catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 294, C977–C984.
- Hämmerling, B., Grund, C., Boda-Heggemann, J., Moll, R., and Franke, W.W. (2006). The complexus adhaerens of mammalian lymphatic endothelia revisited: a junction even more complex than hitherto thought. *Cell Tissue Res.* 324, 55–67.
- Harrington, E.O., Brunelle, J.L., Shannon, C.J., Kim, E.S., Mennella, K., and Rounds, S. (2003). Role of Protein Kinase C Isoforms in Rat Epididymal Microvascular Endothelial Barrier Function. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 626–636.
- Harrington, E.O., Shannon, C.J., Morin, N., Rowlett, H., Murphy, C., and Lu, Q. (2005). PKC $\delta$  regulates endothelial basal barrier function through modulation of RhoA GTPase activity. *Exp. Cell Res.* 308, 407–421.
- Harris, E.S., and Nelson, W.J. (2010). VE-Cadherin: At the Front, Center, and Sides of Endothelial Cell Organization and Function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 651–658.
- Hartsock, A., and Nelson, W.J. (2008). Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 660–669.

- Heemskerk, N., Schimmel, L., Oort, C., Rijssel, J. van, Yin, T., Ma, B., Unen, J. van, Pitter, B., Huvencers, S., Goedhart, J., et al. (2016). F-actin-rich contractile endothelial pores prevent vascular leakage during leukocyte diapedesis through local RhoA signalling. *Nat. Commun.* 7, 10493.
- Herron, C.R., Lowery, A.M., Hollister, P.R., Reynolds, A.B., and Vincent, P.A. (2011). p120 regulates endothelial permeability independently of its NH2 terminus and Rho binding. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 300, H36–H48.
- Hewat, E.A., Durmort, C., Jacquamet, L., Concord, E., and Gulino-Debrac, D. (2007). Architecture of the VE-cadherin Hexamer. *J. Mol. Biol.* 365, 744–751.
- Hilger, D., Masureel, M., and Kobilka, B.K. (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 4–12.
- HILLYER, P., Mordelet, E., Flynn, G., and Male, D. (2003). Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 431–441.
- Hintermann, E., Bayer, M., Ehser, J., Aurrand-Lions, M., Pfeilschifter, J.M., Imhof, B.A., and Christen, U. (2016). Murine junctional adhesion molecules JAM-B and JAM-C mediate endothelial and stellate cell interactions during hepatic fibrosis. *Cell Adhes. Migr.* 10, 419–433.
- Hirano, F., Komura, K., Fukawa, E., and Makino, I. (2003). Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced RANTES chemokine expression via activation of NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase: roles of TNF- $\alpha$  in alcoholic liver diseases. *J. Hepatol.* 38, 483–489.
- Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S.V., Proudfoot, A.E.I., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., and Wells, T.N.C. (1997). Glycosaminoglycans Mediate Cell Surface Oligomerization of Chemokines. *Biochemistry* 36, 13570–13578.
- Hordijk, P.L. (2016). Recent insights into endothelial control of leukocyte extravasation. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 1591–1608.
- Horowitz, A., and Simons, M. (1998). Regulation of Syndecan-4 Phosphorylation in Vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 10914–10918.
- Horowitz, A., Tkachenko, E., and Simons, M. (2002). Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J. Cell Biol.* 157, 715–725.
- Hu, T., RamachandraRao, S.P., Siva, S., Valancius, C., Zhu, Y., Mahadev, K., Toh, I., Goldstein, B.J., Woolkalis, M., and Sharma, K. (2005). Reactive oxygen species production via NADPH oxidase mediates TGF- $\beta$ -induced cytoskeletal alterations in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289, F816–F825.
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2000). Requirement for  $\beta$ -Catenin in Anterior-Posterior Axis Formation in Mice. *J. Cell Biol.* 148, 567–578.
- Hughes, C.E., and Nibbs, R.J.B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.*
- Hundelshausen, P. von, Weber, K.S.C., Huo, Y., Proudfoot, A.E.I., Nelson, P.J., Ley, K., and Weber, C. (2001). RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation* 103, 1772–1777.
- Hundelshausen, P. von, Agten, S.M., Eckardt, V., Blanchet, X., Schmitt, M.M., Ippel, H., Neideck, C., Bidzhekov, K., Leberzammer, J., Wichapong, K., et al. (2017). Chemokine interactome mapping enables tailored intervention in acute and chronic inflammation. *Sci. Transl. Med.* 9, eaah6650.

- Iden, S., Rehder, D., August, B., Suzuki, A., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Ohno, S., Behrens, J., Vestweber, D., and Ebnet, K. (2006). A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. *EMBO Rep.* 7, 1239–1246.
- Ignatov, A., Robert, J., Gregory-Evans, C., and Schaller, H.C. (2006). RANTES stimulates Ca<sup>2+</sup> mobilization and inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) formation in cells transfected with G protein-coupled receptor 75. *Br. J. Pharmacol.* 149, 490–497.
- Ilan, N., Tucker, A., and Madri, J.A. (2003). Vascular Endothelial Growth Factor Expression,  $\beta$ -Catenin Tyrosine Phosphorylation, and Endothelial Proliferative Behavior: A Pathway for Transformation? *Lab. Invest.* 83, 1105–1115.
- Imberty, A., Lortat-Jacob, H., and Pérez, S. (2007). Structural view of glycosaminoglycan–protein interactions. *Carbohydr. Res.* 342, 430–439.
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 42, 11–55.
- Ishiguro, K., Kadomatsu, K., Kojima, T., Muramatsu, H., Iwase, M., Yoshikai, Y., Yanada, M., Yamamoto, K., Matsushita, T., Nishimura, M., et al. (2001). Syndecan-4 Deficiency Leads to High Mortality of Lipopolysaccharide-injected Mice. *J. Biol. Chem.* 276, 47483–47488.
- Issekutz, A.C., and Issekutz, T.B. (1995). Monocyte migration to arthritis in the rat utilizes both CD11/CD18 and very late activation antigen 4 integrin mechanisms. *J. Exp. Med.* 181, 1197–1203.
- Jiménez, N., Krouwer, V.J.D., and Post, J.A. (2013). A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology* 65, 1–14.
- Jin, R., Xiao, A.Y., Song, Z., Yu, S., Li, J., Cui, M.-Z., and Li, G. (2018). Platelet CD40 Mediates Leukocyte Recruitment and Neointima Formation after Arterial Denudation Injury in Atherosclerosis-Prone Mice. *Am. J. Pathol.* 188, 252–263.
- Johnson, A.M., Roach, J.P., Hu, A., Stamatovic, S.M., Zochowski, M.R., Keep, R.F., and Andjelkovic, A.V. (2018). Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure. *FASEB J.* 32, 2615–2629.
- Johnson, Z., Kosco-Vilbois, M.H., Herren, S., Cirillo, R., Muzio, V., Zaratini, P., Carbonatto, M., Mack, M., Smailbegovic, A., Rose, M., et al. (2004). Interference with Heparin Binding and Oligomerization Creates a Novel Anti-Inflammatory Strategy Targeting the Chemokine System. *J. Immunol.* 173, 5776–5785.
- Katsumoto, K., and Kume, S. (2013). The Role of CXCL12-CXCR4 Signaling Pathway in Pancreatic Development. *Theranostics* 3, 11–17.
- Kawka, E., Witowski, J., Fouquet, N., Tayama, H., Bender, T.O., Catar, R., Dragun, D., and Jörres, A. (2014). Regulation of Chemokine CCL5 Synthesis in Human Peritoneal Fibroblasts: A Key Role of IFN- $\gamma$ . *Mediators Inflamm.* 2014.
- Khalid, A., Wolfram, J., Mu, C., Mai, J., Yang, Z., Wang, F., Zhao, Y., Ferrari, M., Ma, X., Yang, Y., et al. (2015). Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. *Mini Rev. Med. Chem.* 15, 1063–1072.
- Khan, A.I., Kerfoot, S.M., Heit, B., Liu, L., Andonegui, G., Ruffell, B., Johnson, P., and Kuberski, P. (2004). Role of CD44 and Hyaluronan in Neutrophil Recruitment. *J. Immunol.* 173, 7594–7601.

- Khotskaya, Y.B., Dai, Y., Ritchie, J.P., MacLeod, V., Yang, Y., Zinn, K., and Sanderson, R.D. (2009). Syndecan-1 Is Required for Robust Growth, Vascularization, and Metastasis of Myeloma Tumors in Vivo. *J. Biol. Chem.* *284*, 26085–26095.
- Kim, H.-R., Kim, K.-W., Kim, B.-M., Cho, M.-L., and Lee, S.-H. (2015). The Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* *10*.
- Kim, M.-H., Curry, F.-R.E., and Simon, S.I. (2009). Dynamics of neutrophil extravasation and vascular permeability are uncoupled during aseptic cutaneous wounding. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *296*, C848–C856.
- Koenen, R.R., Hundelshausen, P. von, Nesmelova, I.V., Zerneck, A., Liehn, E.A., Sarabi, A., Kramp, B.K., Piccinini, A.M., Paludan, S.R., Kowalska, M.A., et al. (2009). Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat. Med.* *15*, 97–103.
- Komarova, Y., and Malik, A.B. (2010). Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. *Annu. Rev. Physiol.* *72*, 463–493.
- Komarova, Y.A., Kruse, K., Mehta, D., and Malik, A.B. (2017). Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circ. Res.* *120*, 179–206.
- Koo, B.-K., Jung, Y.S., Shin, J., Han, I., Mortier, E., Zimmermann, P., Whiteford, J.R., Couchman, J.R., Oh, E.-S., and Lee, W. (2006). Structural Basis of Syndecan-4 Phosphorylation as a Molecular Switch to Regulate Signaling. *J. Mol. Biol.* *355*, 651–663.
- Kouklis, P., Konstantoulaki, M., and Malik, A.B. (2003). VE-cadherin-induced Cdc42 Signaling Regulates Formation of Membrane Protrusions in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 16230–16236.
- Kouklis, P., Konstantoulaki, M., Vogel, S., Broman, M., and Malik, A.B. (2004). Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ. Res.* *94*, 159–166.
- Kraan, M.C., Patel, D.D., Haringman, J.J., Smith, M.D., Weedon, H., Ahern, M.J., Breedveld, F.C., and Tak, P.P. (2001). The development of clinical signs of rheumatoid synovial inflammation is associated with increased synthesis of the chemokine CXCL8 (interleukin-8). *Arthritis Res.* *3*, 65–71.
- Kramp, B.K., Megens, R.T.A., Sarabi, A., Winkler, S., Projahn, D., Weber, C., Koenen, R.R., and von Hundelshausen, P. (2013). Exchange of extracellular domains of CCR1 and CCR5 reveals confined functions in CCL5-mediated cell recruitment: *Thromb. Haemost.* *110*, 795–806.
- Krensky, A.M., and Ahn, Y.-T. (2007). Mechanisms of Disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* *3*, 164.
- Krishnan, A., Almén, M.S., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2012). The Origin of GPCRs: Identification of Mammalian like Rhodopsin, Adhesion, Glutamate and Frizzled GPCRs in Fungi. *PLoS ONE* *7*, e29817.
- Krohn, R., Raffetseder, U., Bot, I., Zerneck, A., Shagdarsuren, E., Liehn, E.A., Santbrink, P.J. van, Nelson, P.J., Biessen, E.A., Mertens, P.R., et al. (2007). Y-Box Binding Protein-1 Controls CC Chemokine Ligand-5 (CCL5) Expression in Smooth Muscle Cells and Contributes to Neointima Formation in Atherosclerosis-Prone Mice. *Circulation* *116*, 1812–1820.
- Kroon, J., Schaefer, A., Rijssel, J. van, Hoogenboezem, M., Alphen, F. van, Hordijk, P., Stroes, E.S.G., Strömblad, S., Rheenen, J. van, and Buul, J.D. van (2018). Inflammation-Sensitive Myosin-X Functionally Supports Leukocyte Extravasation by Cdc42-Mediated ICAM-1-Rich Endothelial Filopodia Formation. *J. Immunol.* *200*, 1790–1801.



- Kufareva, I., Gustavsson, M., Zheng, Y., Stephens, B.S., and Handel, T.M. (2017). What do structures tell us about chemokine receptor function and antagonism? *Annu. Rev. Biophys.* *46*, 175–198.
- Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1996). The Gap Junction Communication Channel. *Cell* *84*, 381–388.
- Kumar, P., Shen, Q., Pivetti, C.D., Lee, E.S., Wu, M.H., and Yuan, S.Y. (2009). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev. Mol. Med.* *11*, e19.
- Kwon, M.-J., Park, J., Jang, S., Eom, C.-Y., and Oh, E.-S. (2016). The Conserved Phenylalanine in the Transmembrane Domain Enhances Heteromeric Interactions of Syndecans. *J. Biol. Chem.* *291*, 872–881.
- Lal-Nag, M., and Morin, P.J. (2009). The claudins. *Genome Biol.* *10*, 235.
- Lambaerts, K., Wilcox-Adelman, S.A., and Zimmermann, P. (2009). The signalling mechanisms of syndecan heparan sulphate proteoglycans. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 662–669.
- Lampugnani, M.G., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T.O., et al. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin,  $\beta$ -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J. Cell Biol.* *161*, 793–804.
- Lampugnani, M.G., Orsenigo, F., Rudini, N., Maddaluno, L., Boulday, G., Chapon, F., and Dejana, E. (2010). CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci* *123*, 1073–1080.
- Langer, H.F., and Chavakis, T. (2009). Leukocyte – endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* *13*, 1211–1220.
- Lefkowitz, R.J. (2013). A Brief History of G-Protein Coupled Receptors (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* *52*, 6366–6378.
- Legrand, P., Bibert, S., Jaquinod, M., Ebel, C., Hewat, E., Vincent, F., Vanbelle, C., Concord, E., Vernet, T., and Gulino, D. (2001). Self-assembly of the Vascular Endothelial Cadherin Ectodomain in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent Hexameric Structure. *J. Biol. Chem.* *276*, 3581–3588.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007a). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 678–689.
- Li, H., Shi, X., Liu, J., Hu, C., Zhang, X., Liu, H., Jin, J., Opolon, P., Vannier, J.-P., Perricaudet, M., et al. (2010). The soluble fragment of VE-cadherin inhibits angiogenesis by reducing endothelial cell proliferation and tube capillary formation. *Cancer Gene Ther.* *17*, 700–707.
- Li, J., Guo, Y., Luan, X., Qi, T., Li, D., Chen, Y., Ji, X., Zhang, Y., and Chen, W. (2012). Independent roles of monocyte chemoattractant protein-1, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted and fractalkine in the vulnerability of coronary atherosclerotic plaques. *Circ. J.* *76*, 2167–2173.
- Liang, W.G., Triandafillou, C.G., Huang, T.-Y., Zulueta, M.M.L., Banerjee, S., Dinner, A.R., Hung, S.-C., and Tang, W.-J. (2016). Structural basis for oligomerization and glycosaminoglycan binding of CCL5 and CCL3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 5000–5005.
- Liao, F., Li, Y., O'Connor, W., Zanetta, L., Bassi, R., Santiago, A., Overholser, J., Hooper, A., Mignatti, P., Dejana, E., et al. (2000). Monoclonal Antibody to Vascular Endothelial-cadherin Is a Potent Inhibitor of Angiogenesis, Tumor Growth, and Metastasis. *Cancer Res.* *60*, 6805–6810.

- Lim, S.-T., Longley, R.L., Couchman, J.R., and Woods, A. (2003). Direct Binding of Syndecan-4 Cytoplasmic Domain to the Catalytic Domain of Protein Kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) Increases Focal Adhesion Localization of PKC $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 278, 13795–13802.
- Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K., & Esko, J. D. (2015). Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans.
- Liu, G.-T., Chen, H.-T., Tsou, H.-K., Tan, T.-W., Fong, Y.-C., Chen, P.-C., Yang, W.-H., Wang, S.-W., Chen, J.-C., and Tang, C.-H. (2014). CCL5 promotes VEGF-dependent angiogenesis by down-regulating miR-200b through PI3K/Akt signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Oncotarget* 5, 10718–10731.
- Liu, G.-T., Huang, Y.-L., Tzeng, H.-E., Tsai, C.-H., Wang, S.-W., and Tang, C.-H. (2015). CCL5 promotes vascular endothelial growth factor expression and induces angiogenesis by down-regulating miR-199a in human chondrosarcoma cells. *Cancer Lett.* 357, 476–487.
- Lobritz, M.A., Ratcliff, A.N., Marozsan, A.J., Dudley, D.M., Tilton, J.C., and Arts, E.J. (2013). Multifaceted Mechanisms of HIV Inhibition and Resistance to CCR5 Inhibitors PSC-RANTES and Maraviroc. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2640–2650.
- Ma, S.-C., Li, Q., Peng, J.-Y., Zhouwen, J.-L., Diao, J.-F., Niu, J.-X., Wang, X., Guan, X.-D., Jia, W., and Jiang, W.-G. (2017). Claudin-5 regulates blood-brain barrier permeability by modifying brain microvascular endothelial cell proliferation, migration, and adhesion to prevent lung cancer metastasis. *CNS Neurosci. Ther.* 23, 947–960.
- Mahida, Y.R., Ceska, M., Effenberger, F., Kurlak, L., Lindley, I., and Hawkey, C.J. (1992). Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-I/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin. Sci.* 82, 273–275.
- Mahla, R.S. (2015). HIV-1 Infection: The Functional Importance of SDF1, CCR2 and CCR5 in Protection and Therapeutics. *Health Care Curr. Rev.* 3, 1–5.
- Maillard, L., Saito, N., Hlawaty, H., Friand, V., Suffee, N., Chmilewsky, F., Haddad, O., Laguillier, C., Guyot, E., and Ueyama, T. (2014). RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway. *Biol. Open* BIO20148227.
- Majumdar, R., Sixt, M., and Parent, C.A. (2014). new paradigms in the establishment and maintenance of gradients during directed cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 30, 33–40.
- Makino, Y., Cook, D.N., Smithies, O., Hwang, O.Y., Neilson, E.G., Turka, L.A., Sato, H., Wells, A.D., and Danoff, T.M. (2002). Impaired T Cell Function in RANTES-Deficient Mice. *Clin. Immunol.* 102, 302–309.
- Makó, V., Czúcz, J., Weiszár, Z., Herczenik, E., Matkó, J., Prohászka, Z., and Cervenak, L. (2010). Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS. *Cytometry A* 77A, 962–970.
- Malaud, E., Merle, D., Piquer, D., Molina, L., Salvétat, N., Rubrecht, L., Dupaty, E., Galea, P., Cobo, S., Blanc, A., et al. (2014). Local carotid atherosclerotic plaque proteins for the identification of circulating biomarkers in coronary patients. *Atherosclerosis* 233, 551–558.
- Mamdouh, Z., Chen, X., Pierini, L.M., Maxfield, F.R., and Muller, W.A. (2003). Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature* 421, 748–753.

- Mamdouh, Z., Kreitzer, G.E., and Muller, W.A. (2008). Leukocyte transmigration requires kinesin-mediated microtubule-dependent membrane trafficking from the lateral border recycling compartment. *J. Exp. Med.* *205*, 951–966.
- Mamdouh, Z., Mikhailov, A., and Muller, W.A. (2009). Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *J. Exp. Med.* *206*, 2795–2808.
- Manon-Jensen, T., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2013). Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. *FEBS J.* *280*, 2320–2331.
- Marçais, A., Tomkowiak, M., Walzer, T., Coupet, C.-A., Ravel-Chapuis, A., and Marvel, J. (2006). Maintenance of CCL5 mRNA stores by post-effector and memory CD8 T cells is dependent on transcription and is coupled to increased mRNA stability. *Eur. J. Immunol.* *36*, 2745–2754.
- Marchese, A., and Benovic, J.L. (2001). Agonist-promoted Ubiquitination of the G Protein-coupled Receptor CXCR4 Mediates Lysosomal Sorting. *J. Biol. Chem.* *276*, 45509–45512.
- 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. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* *154*, 1870–1878.
- Marinković, G., Kroon, J., Hoogenboezem, M., Hoeben, K.A., Rüter, M.S., Kurakula, K., Rubio, I.O., Vos, M., Vries, C.J.M. de, Buul, J.D. van, et al. (2014). Inhibition of GTPase Rac1 in Endothelium by 6-Mercaptopurine Results in Immunosuppression in Nonimmune Cells: New Target for an Old Drug. *J. Immunol.* *192*, 4370–4378.
- Marinković, G., Heemskerk, N., Buul, J.D. van, and Waard, V. de (2015). The Ins and Outs of Small GTPase Rac1 in the Vasculature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *354*, 91–102.
- Marmon, S., Hinchey, J., Oh, P., Cammer, M., de Almeida, C.J., Gunther, L., Raine, C.S., and Lisanti, M.P. (2009). Caveolin-1 Expression Determines the Route of Neutrophil Extravasation through Skin Microvasculature. *Am. J. Pathol.* *174*, 684–692.
- Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C., and Teixeira, M.M. (2013). Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* *17*, 1439–1460.
- Martin, D., Galisteo, R., and Gutkind, J.S. (2009). CXCL8/IL8 Stimulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression and the Autocrine Activation of VEGFR2 in Endothelial Cells by Activating NFκB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) Complex. *J. Biol. Chem.* *284*, 6038–6042.
- Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M., and Vita, C. (2001). Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. *Biochemistry* *40*, 6303–6318.
- Mause, S.F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R.R., and Weber, C. (2005). Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *25*, 1512–1518.
- McDonald, B., and Kubes, P. (2015). Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking. *Front. Immunol.* *6*, 68
- Meda, P. (1996). Connexines, canaux jonctionnels et communications cellulaires. *médecine/sciences* *12*, 909.

- Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2018). Overview of the Mechanisms that May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands. *Front. Immunol.* 8, 1970
- Miao, C., Yang, Y., He, X., Li, X., Huang, C., Huang, Y., Zhang, L., Lv, X.-W., Jin, Y., and Li, J. (2013). Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell. Signal.* 25, 2069–2078.
- Mikelis, C.M., Simaan, M., Ando, K., Fukuhara, S., Sakurai, A., Amornphimoltham, P., Masedunskas, A., Weigert, R., Chavakis, T., Adams, R., et al. (2015). RhoA and ROCK mediate histamine-induced vascular leakage and anaphylactic shock. *Nat. Commun.* 6, 6725.
- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., and Ridley, A.J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat. Cell Biol.* 8, 113–123.
- Miller, M.C., and Mayo, K.H. (2017). Chemokines from a Structural Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2088.
- Mineta Katsuhiko, Yamamoto Yasuko, Yamazaki Yuji, Tanaka Hiroo, Tada Yukiyo, Saito Kuniaki, Tamura Atsushi, Igarashi Michihiro, Endo Toshinori, Takeuchi Kosei, et al. (2011). Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett.* 585, 606–612.
- Mohs, A., Kuttkat, N., Reißing, J., Zimmermann, H.W., Sonntag, R., Proudfoot, A., Youssef, S.A., de Bruin, A., Cubero, F.J., and Trautwein, C. (2017). Functional role of CCL5/RANTES for HCC progression during chronic liver disease. *J. Hepatol.* 66, 743–753.
- Moll, R., Sievers, E., Hämmerling, B., Schmidt, A., Barth, M., Kuhn, C., Grund, C., Hofmann, I., and Franke, W.W. (2009). Endothelial and virgular cell formations in the mammalian lymph node sinus: endothelial differentiation morphotypes characterized by a special kind of junction (complexus adhaerens). *Cell Tissue Res.* 335, 109–141.
- Monaghan-Benson, E., and Burridge, K. (2009). The Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Microvascular Permeability Requires Rac and Reactive Oxygen Species. *J. Biol. Chem.* 284, 25602–25611.
- Mondrinos, M.J., Zhang, T., Sun, S., Kennedy, P.A., King, D.J., Wolfson, M.R., Knight, L.C., Scalia, R., and Kilpatrick, L.E. (2014). Pulmonary Endothelial Protein Kinase C-Delta (PKC $\delta$ ) Regulates Neutrophil Migration in Acute Lung Inflammation. *Am. J. Pathol.* 184, 200–213.
- Montecucco, F., Lenglet, S., Gayet-Ageron, A., Bertolotto, M., Pelli, G., Palombo, D., Pane, B., Spinella, G., Steffens, S., Raffaghello, L., et al. (2010). Systemic and Intraplaque Mediators of Inflammation Are Increased in Patients Symptomatic for Ischemic Stroke. *Stroke* 41, 1394–1404.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (1999). Endothelial Claudin. *J. Cell Biol.* 147, 185–194.
- Muller, W.A. (2013). Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet. Pathol.* 50, 7–22.
- Muller, W.A. (2016). Transendothelial Migration: Unifying Principles from the Endothelial Perspective. *Immunol. Rev.* 273, 61–75.
- Muller, W.A., and Luscinskas, F.W. (2008). Assays of Transendothelial Migration in vitro. *Methods Enzymol.* 443, 155–176.

- Murakami, M., and Simons, M. (2009). Regulation of Vascular Integrity. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 87, 571–582.
- Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J.A., and Simons, M. (2002). Protein kinase C (PKC)  $\delta$  regulates PKC $\alpha$  activity in a syndecan-4-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 277, 20367–20371.
- Murakami, T., Frey, T., Lin, C., and Antonetti, D.A. (2012). Protein Kinase C $\beta$  Phosphorylates Occludin Regulating Tight Junction Trafficking in Vascular Endothelial Growth Factor–Induced Permeability In Vivo. *Diabetes* 61, 1573–1583.
- Muramatsu, F., Kidoya, H., Naito, H., Hayashi, Y., Iba, T., and Takakura, N. (2017). Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin. *J. Biochem. (Tokyo)* 162, 55–62.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145–176.
- Nanes, B.A., Chiasson-MacKenzie, C., Lowery, A.M., Ishiyama, N., Faundez, V., Ikura, M., Vincent, P.A., and Kowalczyk, A.P. (2012). p120-catenin binding masks an endocytic signal conserved in classical cadherins. *J. Cell Biol.* 199, 365–380.
- Nanes, B.A., Grimsley-Myers, C.M., Cadwell, C.M., Robinson, B.S., Lowery, A.M., Vincent, P.A., Mosunjac, M., Früh, K., and Kowalczyk, A.P. (2017). p120-catenin regulates VE-cadherin endocytosis and degradation induced by the Kaposi sarcoma–associated ubiquitin ligase K5. *Mol. Biol. Cell* 28, 30–40.
- Naor, D., and Nedvetzki, S. (2003). CD44 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 5, 105–115.
- Nellen, A., Heinrichs, D., Berres, M.-L., Sahin, H., Schmitz, P., Proudfoot, A.E., Trautwein, C., and Wasmuth, H.E. (2012). Interference with Oligomerization and Glycosaminoglycan Binding of the Chemokine CCL5 Improves Experimental Liver Injury. *PLOS ONE* 7, e36614.
- Neumann, E., Khawaja, K., and Müller-Ladner, U. (2014). G protein-coupled receptors in rheumatology. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10, 429–436.
- Nibbs, R.J.B., and Graham, G.J. (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 815–829.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5–deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653–660.
- Nomiyama, H., and Yoshie, O. (2015). Functional roles of evolutionary conserved motifs and residues in vertebrate chemokine receptors. *J. Leukoc. Biol.* 97, 39–47.
- Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A.C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., Lyck, R., Engelhardt, B., Kamenyeva, O., et al. (2008). VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J. Exp. Med.* 205, 2929–2945.
- Oas, R.G., Nanes, B.A., Esimai, C.C., Vincent, P.A., García, A.J., and Kowalczyk, A.P. (2013). p120-catenin and  $\beta$ -catenin differentially regulate cadherin adhesive function. *Mol. Biol. Cell* 24, 704–714.
- O’Brien, S.J., and Moore, J.P. (2000). The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev.* 177, 99–111.

- Oh, E.-S., Woods, A., and Couchman, J.R. (1997a). Syndecan-4 Proteoglycan Regulates the Distribution and Activity of Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 272, 8133–8136.
- Oh, E.-S., Woods, A., and Couchman, J.R. (1997b). Multimerization of the Cytoplasmic Domain of Syndecan-4 Is Required for Its Ability to Activate Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 272, 11805–11811.
- Oh, E.-S., Woods, A., Lim, S.-T., Theibert, A.W., and Couchman, J.R. (1998). Syndecan-4 Proteoglycan Cytoplasmic Domain and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Coordinately Regulate Protein Kinase C Activity. *J. Biol. Chem.* 273, 10624–10629.
- Omicinski, C.J., Vanden Heuvel, J.P., Perdew, G.H., and Peters, J.M. (2011). Xenobiotic Metabolism, Disposition, and Regulation by Receptors: From Biochemical Phenomenon to Predictors of Major Toxicities. *Toxicol. Sci.* 120, S49–S75.
- Øynebråten, I., Barois, N., Bergeland, T., Kückler, A.M., Bakke, O., and Haraldsen, G. (2015). Oligomerized, filamentous surface presentation of RANTES/CCL5 on vascular endothelial cells. *Sci. Rep.* 5, 9261.
- Pai, R., Ha, H., Kirschenbaum, M.A., and Kamanna, V.S. (1996). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  on mesangial cell MCP-1 expression and monocyte migration: mechanisms mediated by signal transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7, 914–923.
- Pacifici, M., Shimo, T., Gentili, C., Kirsch, T., Freeman, T.A., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., and Koyama, E. (2005). Syndecan-3: a cell-surface heparan sulfate proteoglycan important for chondrocyte proliferation and function during limb skeletogenesis. *J. Bone Miner. Metab.* 23, 191–199.
- Pakianathan, D.R., Kuta, E.G., Artis, D.R., Skelton, N.J., and Hébert, C.A. (1997). Distinct but Overlapping Epitopes for the Interaction of a CC-Chemokine with CCR1, CCR3, and CCR5. *Biochemistry* 36, 9642–9648.
- Park, P.W. (2018). Isolation and functional analysis of syndecans. *Methods Cell Biol.* 143, 317–333.
- Patel, J., Channon, K.M., and McNeill, E. (2013). The Downstream Regulation of Chemokine Receptor Signalling: Implications for Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013.
- Patel-Hett, S., and D'Amore, P.A. (2011). Signal Transduction in Vasculogenesis and Developmental Angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 353–363.
- Pfeiffer, F., Kumar, V., Butz, S., Vestweber, D., Imhof, B.A., Stein, J.V., and Engelhardt, B. (2008). Distinct molecular composition of blood and lymphatic vascular endothelial cell junctions establishes specific functional barriers within the peripheral lymph node. *Eur. J. Immunol.* 38, 2142–2155.
- Phillipson, M., Kaur, J., Colarusso, P., Ballantyne, C.M., and Kubes, P. (2008). Endothelial Domes Encapsulate Adherent Neutrophils and Minimize Increases in Vascular Permeability in Paracellular and Transcellular Emigration. *PLOS ONE* 3, e1649.
- Pichert, A., Schlorke, D., Franz, S., and Arnhold, J. (2012). Functional aspects of the interaction between interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans. *Biomater* 2, 142–148.
- Piedra, J., Martínez, D., Castaño, J., Miravet, S., Duñach, M., and Herreros, A.G. de (2001). Regulation of  $\beta$ -Catenin Structure and Activity by Tyrosine Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 20436–20443.

- Piedra, J., Miravet, S., Castaño, J., Pálmer, H.G., Heisterkamp, N., García de Herreros, A., and Duñach, M. (2003). p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate  $\beta$ -Catenin Tyr-142 Phosphorylation and  $\beta$ -Catenin- $\alpha$ -Catenin Interaction. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 2287–2297.
- Pomin, V., and Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals* *11*, 27.
- Potter, M.D., Barbero, S., and Cheresh, D.A. (2005a). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120-and  $\beta$ -catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J. Biol. Chem.* *280*, 31906–31912.
- Potter, M.D., Barbero, S., and Cheresh, D.A. (2005b). Tyrosine Phosphorylation of VE-cadherin Prevents Binding of p120- and  $\beta$ -Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal State. *J. Biol. Chem.* *280*, 31906–31912.
- Proudfoot, A.E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., and Wells, T.N. (2001). The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J. Biol. Chem.* *276*, 10620–10626.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003a). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 1885–1890.
- Proudfoot, A.E., Johnson, Z., Bonvin, P., and Handel, T.M. (2017). Glycosaminoglycan interactions with chemokines add complexity to a complex system. *Pharmaceuticals* *10*, 70.
- Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G.J., Segerer, S., Nibbs, R.J.B., et al. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat. Immunol.* *10*, 101–108.
- Prydz, K. (2015). Determinants of Glycosaminoglycan (GAG) Structure. *Biomolecules* *5*, 2003–2022.
- Rajagopalan, L., and Rajarathnam, K. (2006). Structural Basis of Chemokine Receptor Function—A Model for Binding Affinity and Ligand Selectivity. *Biosci. Rep.* *26*, 325–339.
- Reyat, J.S., Chimen, M., Noy, P.J., Szyroka, J., Rainger, G.E., and Tomlinson, M.G. (2017). ADAM10-Interacting Tetraspanins Tspan5 and Tspan17 Regulate VE-Cadherin Expression and Promote T Lymphocyte Transmigration. *J. Immunol.* *199*, 666–676.
- Rezaei, M., Friedrich, K., Wielockx, B., Kuzmanov, A., Kettelhake, A., Labelle, M., Schnittler, H., Baretton, G., and Breier, G. (2012). Interplay between neural-cadherin and vascular endothelial-cadherin in breast cancer progression. *Breast Cancer Res. BCR* *14*, R154.
- Rho, S.-S., Ando, K., and Fukuhara, S. (2017a). Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions. *J. Nippon Med. Sch.* *84*, 148–159.
- Rho, S.-S., Ando, K., and Fukuhara, S. (2017b). Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions. *J. Nippon Med. Sch.* *84*, 148–159.
- Romanova, L.Y., Alexandrov, I.A., Nordan, R.P., Blagosklonny, M.V., and Mushinski, J.F. (1998). Cross-Talk between Protein Kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) and - $\delta$  (PKC- $\delta$ ): PKC- $\alpha$  Elevates the PKC- $\delta$  Protein Level, Altering Its mRNA Transcription and Degradation. *Biochemistry* *37*, 5558–5565.

- Roscic-Mrkic, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Gordon, C.J., Moore, J.P., Proudfoot, A.E., and Trkola, A. (2003). RANTES (CCL5) uses the proteoglycan CD44 as an auxiliary receptor to mediate cellular activation signals and HIV-1 enhancement. *Blood* 102, 1169–1177.
- Rosen, S.D. (2004). Ligands for L-Selectin: Homing, Inflammation, and Beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 129–156.
- Rostène, W., Kitabgi, P., and Parsadaniantz, S.M. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 895–903.
- Roura, S., Miravet, S., Piedra, J., de Herreros, A.G., and Duñach, M. (1999). Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 36734–36740.
- Roux, B.T., and Cottrell, G.S. (2014). G Protein-Coupled Receptors: What a Difference a ‘Partner’ Makes. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1112–1142.
- Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., Garrè, M., Liebner, S., Letarte, M., ten Dijke, P., et al. (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF- $\beta$  signalling. *EMBO J.* 27, 993–1004.
- Sáez, J.C., Berthoud, V.M., Brañes, M.C., Martínez, A.D., and Beyer, E.C. (2003). Plasma Membrane Channels Formed by Connexins: Their Regulation and Functions. *Physiol. Rev.* 83, 1359–1400.
- Saito, H., Minamiya, Y., Saito, S., and Ogawa, J. (2002). Endothelial Rho and Rho kinase regulate neutrophil migration via endothelial myosin light chain phosphorylation. *J. Leukoc. Biol.* 72, 829–836.
- Sanderson, M.J., Charles, A.C., Boitano, S., and Dirksen, E.R. (1994). Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 98, 173–187.
- Sandoval, R., Malik, A.B., Minshall, R.D., Kouklis, P., Ellis, C.A., and Tiruppathi, C. (2001). Ca<sup>2+</sup> signalling and PKC $\alpha$  activate increased endothelial permeability by disassembly of VE—cadherin junctions. *J. Physiol.* 533, 433–445.
- Sarpal, R., Pellikka, M., Patel, R.R., Hui, F.Y.W., Godt, D., and Tepass, U. (2012). Mutational analysis supports a core role for *Drosophila*  $\alpha$ -Catenin in adherens junction function. *J Cell Sci* 125, 233–245.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3. a004952.
- Sarris, M., Masson, J.-B., Maurin, D., Van der Aa, L.M., Boudinot, P., Lortat-Jacob, H., and Herbomel, P. (2012). Inflammatory Chemokines Direct and Restrict Leukocyte Migration within Live Tissues as Glycan-Bound Gradients. *Curr. Biol.* 22, 2375–2382.
- Sawa, Y., Sugimoto, Y., Ueki, T., Ishikawa, H., Sato, A., Nagato, T., and Yoshida, S. (2007). Effects of TNF- $\alpha$  on Leukocyte Adhesion Molecule Expressions in Cultured Human Lymphatic Endothelium. *J. Histochem. Cytochem.* 55, 721–733.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M., and Muller, W.A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* 3, 143–150.
- Schmelz, M., and Franke, W.W. (1993). Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting retothelial cells of lymph nodes. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 274–289.
- Schmidt, S., Moser, M., and Sperandio, M. (2013). The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol. Immunol.* 55, 49–58.



- Scholz, D., Devaux, B., Hirche, A., Pötzsch, B., Kropp, B., Schaper, W., and Schaper, J. (1996). Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* *284*, 415–423.
- Schulte, D., Küppers, V., Dartsch, N., Broermann, A., Li, H., Zarbock, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., Khandoga, A., Massberg, S., et al. (2011). Stabilizing the VE-cadherin–catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *EMBO J.* *30*, 4157–4170.
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C.P., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). Disintegrin Metalloprotease (ADAM) 10 Regulates Endothelial Permeability and T Cell Transmigration by Proteolysis of Vascular Endothelial Cadherin. *Circ. Res.* *102*, 1192–1201.
- Secchi, M., Grampa, V., and Vangelista, L. (2018). Rational CCL5 mutagenesis integration in a lactobacilli platform generates extremely potent HIV-1 blockers. *Sci. Rep.* *8*, 1890.
- Severin, I.C., Soares, A., Hantson, J., Teixeira, M., Sachs, D., Valognes, D., Scheer, A., Schwarz, M.K., Wells, T.N.C., Proudfoot, A.E.I., et al. (2012). Glycosaminoglycan analogs as a novel anti-inflammatory strategy. *Front. Immunol.* *3*, 293.
- Severson, E.A., and Parkos, C.A. (2009). Mechanisms of Outside-in Signaling at the Tight Junction by Junctional Adhesion Molecule A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1165*, 10–18.
- Shaw, J.P., Johnson, Z., Borlat, F., Zwahlen, C., Kungl, A., Roulin, K., Harrenga, A., Wells, T.N.C., and Proudfoot, A.E.I. (2004). The X-Ray Structure of RANTES. *Structure* *12*, 2081–2093.
- Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N., and Luscinskas, F.W. (2001). Real-Time Imaging of Vascular Endothelial-Cadherin During Leukocyte Transmigration Across Endothelium. *J. Immunol.* *167*, 2323–2330.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011a). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 762–774.
- Sidibé, A., and Imhof, B.A. (2014). VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. *Nat. Immunol.* *15*, 215–217.
- Simon, A.M., and McWhorter, A.R. (2002). Vascular Abnormalities in Mice Lacking the Endothelial Gap Junction Proteins connexin37 and connexin40. *Dev. Biol.* *251*, 206–220.
- Singh, S.K., Mishra, M.K., Eltoun, I.-E.A., Bae, S., Lillard, J.W., and Singh, R. (2018). CCR5/CCL5 axis interaction promotes migratory and invasiveness of pancreatic cancer cells. *Sci. Rep.* *8*, 1323.
- Söhl, G., and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.* *62*, 228–232.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2014). Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett.* *588*, 1423–1429.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2016). Kinase programs spatiotemporally regulate gap junction assembly and disassembly: effects on wound repair. *Semin. Cell Dev. Biol.* *50*, 40–48.
- Song, E., Zou, H., Yao, Y., Proudfoot, A., Antus, B., Liu, S., Jens, L., and Heemann, U. (2002). Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* *61*, 676–685.
- Sorgen, P.L., Trease, A.J., Spagnol, G., Delmar, M., and Nielsen, M.S. (2018). Protein–Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, , 1428.

- Soria, G., Lebel-Haziv, Y., Ehrlich, M., Meshel, T., Suez, A., Avezov, E., Rozenberg, P., and Ben-Baruch, A. (2012). Mechanisms regulating the secretion of the promalignancy chemokine CCL5 by breast tumor cells: CCL5's 40s loop and intracellular glycosaminoglycans. *Neoplasia* *14*, 1–IN3.
- Spagnol, G., Trease, A.J., Zheng, L., Gutierrez, M., Basu, I., Sarmiento, C., Moore, G., Cervantes, M., and Sorgen, P.L. (2018). Connexin43 Carboxyl-Terminal Domain Directly Interacts with  $\beta$ -Catenin. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 1562.
- Sperandio, M., Pickard, J., Unnikrishnan, S., Acton, S.T., and Ley, K. (2006). Analysis of Leukocyte Rolling In Vivo and In Vitro. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 346–371.
- Spindler, V., Schlegel, N., and Waschke, J. (2010). Role of GTPases in control of microvascular permeability. *Cardiovasc. Res.* *87*, 243–253.
- St Amant, E.V., Tauseef, M., Vogel, S.M., Gao, X.-P., Mehta, D., Komarova, Y., and Malik, A.B. (2012). PKC $\alpha$  Activation of p120-catenin Serine 879 Phospho-Switch Disassembles VE-cadherin Junctions and Disrupts Vascular Integrity. *Circ. Res.* *111*, 739–749.
- Stone, M.J., Hayward, J.A., Huang, C., E. Huma, Z., and Sanchez, J. (2017). Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 342
- Strand, M.E., Herum, K.M., Rana, Z.A., Skrbic, B., Askevold, E.T., Dahl, C.P., Vistnes, M., Hasic, A., Kvaløy, H., Sjaastad, I., et al. (2013) Innate immune signaling induces expression and shedding of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-4 in cardiac fibroblasts and myocytes, affecting inflammation in the pressure-overloaded heart. *FEBS J.* *280*, 2228–2247.
- Strey Anke, Janning Annette, Barth Holger, and Gerke Volker (2002). Endothelial Rho signaling is required for monocyte transendothelial migration. *FEBS Lett.* *517*, 261–266.
- Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., and Keane, M.P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* *16*, 593–609.
- Su, W., and Kowalczyk, A.P. (2017). The VE-cadherin cytoplasmic domain undergoes proteolytic processing during endocytosis. *Mol. Biol. Cell* *28*, 76–84.
- Suffee, N., Richard, B., Hlawaty, H., Oudar, O., Charnaux, N., and Sutton, A. (2011). Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1649–1653.
- Suffee, N., Hlawaty, H., Meddahi-Pelle, A., Maillard, L., Louedec, L., Haddad, O., Martin, L., Laguillier, C., Richard, B., and Oudar, O. (2012). RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. *Angiogenesis* *15*, 727–744.
- Suffee, N., Le Visage, C., Hlawaty, H., Aid-Launais, R., Vanneaux, V., Larghero, J., Haddad, O., Oudar, O., Charnaux, N., and Sutton, A. (2017). Pro-angiogenic effect of RANTES-loaded polysaccharide-based microparticles for a mouse ischemia therapy. *Sci. Rep.* *7*, 13294.
- Sun, Y., Hu, G., Zhang, X., and Minshall, R.D. (2009). Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. *Circ. Res.* *105*, 676–685.
- Sundd, P., Gutierrez, E., Koltsova, E.K., Kuwano, Y., Fukuda, S., Pospieszalska, M.K., Groisman, A., and Ley, K. (2012). ‘Slings’ enable neutrophil rolling at high shear. *Nature* *488*, 399–403.
- Surmi, B.K., and Hasty, A.H. (2010). The Role of Chemokines in Recruitment of Immune Cells to the Artery Wall and Adipose Tissue. *Vascul. Pharmacol.* *52*, 27–36.

- Sutton, A., Friand, V., Papy-Garcia, D., Dagouassat, M., Martin, L., Vassy, R., Haddad, O., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Saffar, L., et al. (2007). Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 2948–2958.
- Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., and Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* *10*, 923–934.
- Takeichi, M. (2018). Multiple functions of  $\alpha$ -catenin beyond cell adhesion regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *54*, 24–29.
- Tamamis, P., and Floudas, C.A. (2014). Elucidating a Key Anti-HIV-1 and Cancer-Associated Axis: The Structure of CCL5 (Rantes) in Complex with CCR5. *Sci. Rep.* *4*, 5447.
- Tan, M.C.B., Goedegebuure, P.S., Belt, B.A., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W.E., Eberlein, T.J., Hsieh, C.-S., and Linehan, D.C. (2009). Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 1746–1755.
- Tang, J., Ley, K.F., and Hunt, C.A. (2007). Dynamics of in silico leukocyte rolling, activation, and adhesion. *BMC Syst. Biol.* *1*, 14.
- Tanioka, M., Ikoma, A., Morita, K., Fujii, H., Toda, K.-I., Takahashi, K., Tanaka, T., Nishigori, C., Jin, G., Higashi, S., et al. (2001). Angiosarcoma of the scalp: absence of vascular endothelial cadherin in primary and metastatic lesions. *Br. J. Dermatol.* *144*, 380–383.
- Telo', P., Breviario, F., Huber, P., Panzeri, C., and Dejana, E. (1998). Identification of a Novel Cadherin (Vascular Endothelial Cadherin-2) Located at Intercellular Junctions in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *273*, 17565–17572.
- Thévenin, A.F., Margraf, R.A., Fisher, C.G., Kells-Andrews, R.M., and Falk, M.M. (2017). Phosphorylation regulates connexin43/ZO-1 binding and release, an important step in gap junction turnover. *Mol. Biol. Cell* *28*, 3595–3608.
- Thomas, M.A., Buelow, B.J., Nevins, A.M., Jones, S.E., Peterson, F.C., Gundry, R.L., Grayson, M.H., and Volkman, B.F. (2015). Structure-Function Analysis of CCL28 in the Development of Post-viral Asthma. *J. Biol. Chem.* *290*, 4528–4536.
- Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., et al. (2016). GPCR-G Protein- $\beta$ -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell* *166*, 907–919.
- Tian, X., Tian, Y., Gawlak, G., Meng, F., Kawasaki, Y., Akiyama, T., and Birukova, A.A. (2015). Asef controls vascular endothelial permeability and barrier recovery in the lung. *Mol. Biol. Cell* *26*, 636–650.
- Tiruppathi, C., Shimizu, J., Miyawaki-Shimizu, K., Vogel, S.M., Bair, A.M., Minshall, R.D., Predescu, D., and Malik, A.B. (2008). Role of NF- $\kappa$ B-dependent Caveolin-1 Expression in the Mechanism of Increased Endothelial Permeability Induced by Lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* *283*, 4210–4218.
- Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.-V., and Simons, M. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* *117*, 3189–3199.
- Tominaga, J., Fukunaga, Y., Abelardo, E., and Nagafuchi, A. (2008). Defining the function of  $\beta$ -catenin tyrosine phosphorylation in cadherin-mediated cell–cell adhesion. *Genes Cells* *13*, 67–77.

- Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D.J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1843*, 2563–2582.
- Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO J.* *31*, 2714–2736.
- Valiron, O., Chevrier, V., Usson, Y., Breviario, F., Job, D., and Dejana, E. (1996). Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *J. Cell Sci.* *109* (Pt 8), 2141–2149.
- van Buul, J.D., van Rijssel, J., van Alphen, F.P.J., van Stalborch, A.-M., Mul, E.P.J., and Hordijk, P.L. (2010). ICAM-1 Clustering on Endothelial Cells Recruits VCAM-1. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*.
- Van Buul, J.D., and Hordijk, P.L. (2004). Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 824–833.
- Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R., and Malik, A.B. (2008). Regulation of Endothelial Junctional Permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1123*, 134–145.
- Vangelista, L., Secchi, M., and Lusso, P. (2008). Rational design of novel HIV-1 entry inhibitors by RANTES engineering. *Vaccine* *26*, 3008–3015.
- Vassilev, V., Platek, A., Hiver, S., Enomoto, H., and Takeichi, M. (2017). Catenins Steer Cell Migration via Stabilization of Front-Rear Polarity. *Dev. Cell* *43*, 463-479.e5.
- van Veelen, W., Le, N.H., Helvensteijn, W., Blondin, L., Theeuwes, M., Bakker, E.R.M., Franken, P.F., van Gurp, L., Meijlink, F., van der Valk, M.A., et al. (2011).  $\beta$ -catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* *60*, 1204–1212.
- Velasco-Velázquez, M., Xolalpa, W., and Pestell, R.G. (2014). The potential to target CCL5/CCR5 in breast cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* *18*, 1265–1275.
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 692–704.
- Vestweber, D., Winderlich, M., Cagna, G., and Nottebaum, A.F. (2009). Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* *19*, 8–15.
- Vestweber, D., Wessel, F., and Nottebaum, A.F. (2014). Similarities and differences in the regulation of leukocyte extravasation and vascular permeability. *Semin. Immunopathol.* *36*, 177–192.
- Vielhauer, V., Anders, H.J., and Schlöndorff, D. (2002). LE RÔLE DES CHIMIOKINES ET DE LEURS RÉCEPTEURS DANS L'INITIATION ET LA PROGRESSION DES MALADIES RÉNALES. *Actual. Néphrologiques Jean Hambg. Flammarion Médecine-Sci. Paris* pp159-178.
- Villardaga, J.-P., Agnati, L.F., Fuxe, K., and Ciruela, F. (2010). G-protein-coupled receptor heteromer dynamics. *J Cell Sci* *123*, 4215–4220.
- Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Lima, G.K., Arantes, R.M.E., Kroon, E.G., Campos, M.A.D.S., Teixeira, M.M., and Teixeira, A.L. (2009). The Chemokine CCL5 Is Essential for Leukocyte Recruitment in a Model of Severe Herpes simplex Encephalitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1153*, 256–263.

- Von Hundelshausen, P., Koenen, R.R., Sack, M., Mause, S.F., Adriaens, W., Proudfoot, A.E., Hackeng, T.M., and Weber, C. (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 105, 924–930.
- Wallez, Y., and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 794–809.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., and Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26, 1067–1077.
- Walther, C., and Ferguson, S.S.G. (2013). Chapter Four - Arrestins: Role in the Desensitization, Sequestration, and Vesicular Trafficking of G Protein-Coupled Receptors. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, L.M. Luttrell, ed. (Academic Press), pp. 93–113.
- Walzer, T., Marçais, A., Saltel, F., Bella, C., Jurdic, P., and Marvel, J. (2003). Cutting Edge: Immediate RANTES Secretion by Resting Memory CD8 T Cells Following Antigenic Stimulation. *J. Immunol.* 170, 1615–1619.
- Wang, X., Watson, C., Sharp, J.S., Handel, T.M., and Prestegard, J.H. (2011). Oligomeric Structure of the Chemokine CCL5/RANTES from NMR, MS, and SAXS Data. *Struct. Lond. Engl.* 19, 1138–1148.
- Wang, X., Sharp, J.S., Handel, T.M., and Prestegard, J.H. (2013). Chemokine Oligomerization in Cell Signaling and Migration. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 531–578.
- Watson, R.L., Buck, J., Levin, L.R., Winger, R.C., Wang, J., Arase, H., and Muller, W.A. (2015). Endothelial CD99 signals through soluble adenylyl cyclase and PKA to regulate leukocyte transendothelial migration. *J. Exp. Med.* 212, 1021–1041.
- Ways, D.K., Kukoly, C.A., deVente, J., Hooker, J.L., Bryant, W.O., Posekany, K.J., Fletcher, D.J., Cook, P.P., and Parker, P.J. (1995). MCF-7 breast cancer cells transfected with protein kinase C-alpha exhibit altered expression of other protein kinase C isoforms and display a more aggressive neoplastic phenotype. *J. Clin. Invest.* 95, 1906–1915.
- Weber, C., Weber, K.S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., and Nelson, P.J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO+ T cells. *Blood* 97, 1144–1146.
- Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437, 497–504.
- Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., Linnepe, R., Ipe, U., Stadtmann, A., Zarbock, A., et al. (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat. Immunol.* 15, 223–230.
- Wetering, S. van, Buul, J.D. van, Quik, S., Mul, F.P.J., Anthony, E.C., Klooster, J.-P. ten, Collard, J.G., and Hordijk, P.L. (2002). Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J. Cell Sci.* 115, 1837–1846.
- van Wetering, S., van den Berk, N., van Buul, J.D., Mul, F.P.J., Lommerse, I., Mous, R., Klooster, J.-P. ten, Zwaginga, J.-J., and Hordijk, P.L. (2003). VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 285, C343–C352.

- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., and Söhl, G. (2005). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biol. Chem.* 383, 725–737.
- Wilson, R.W., Ballantyne, C.M., Smith, C.W., Montgomery, C., Bradley, A., O'Brien, W.E., and Beaudet, A.L. (1993). Gene targeting yields a CD18-mutant mouse for study of inflammation. *J. Immunol.* 151, 1571–1578.
- Wójciak-Stothard, B., Williams, L., and Ridley, A.J. (1999). Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J. Cell Biol.* 145, 1293–1307.
- Woo, C.-H., Lim, J.-H., and Kim, J.-H. (2005). VCAM-1 upregulation via PKC $\delta$ -p38 kinase-linked cascade mediates the TNF- $\alpha$ -induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 288, L307–L316.
- Wood, M.N., Ishiyama, N., Singaram, I., Chung, C.M., Flozak, A.S., Yemelyanov, A., Ikura, M., Cho, W., and Gottardi, C.J. (2017).  $\alpha$ -Catenin homodimers are recruited to phosphoinositide-activated membranes to promote adhesion. *J. Cell Biol.* 216, 3767–3783.
- Wrobel, T., Mazur, G., Wolowiec, D., Jazwiec, B., Sowinska, E., and Kuliczowski, K. (2006). sVE-cadherin and sCD146 serum levels in patients with multiple myeloma. *Clin. Lab. Haematol.* 28, 36–39.
- Xiao, K., Allison, D.F., Buckley, K.M., Kottke, M.D., Vincent, P.A., Faundez, V., and Kowalczyk, A.P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J. Cell Biol.* 163, 535–545.
- Xie, J., Wang, J., Li, R., Dai, Q., Yong, Y., Zong, B., Xu, Y., Li, E., Ferro, A., and Xu, B. (2012). Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 250–258.
- Xie, L., Chiang, E.T., Wu, X., Kelly, G.T., Kanteti, P., Singleton, P.A., Camp, S.M., Zhou, T., Dudek, S.M., Natarajan, V., et al. (2016). Regulation of Thrombin-Induced Lung Endothelial Cell Barrier Disruption by Protein Kinase C Delta. *PLoS ONE* 11.
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal Structure of a Full-Length  $\beta$ -Catenin. *Struct. Lond. Engl.* 1993 16, 478–487.
- Xu, G., Craig, A.W.B., Greer, P., Miller, M., Anastasiadis, P.Z., Lilien, J., and Balsamo, J. (2004). Continuous association of cadherin with  $\beta$ -catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J. Cell Sci.* 117, 3207–3219.
- Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J.L., Zhou, X., and Cao, X. (2018). Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* 6.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., and Nelson, W.J. (2005). Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell* 123, 889–901.
- Yan, M., Zhang, X., Chen, A., Gu, W., Liu, J., Ren, X., Zhang, J., Wu, X., Place, A.T., Minshall, R.D., et al. (2017). Endothelial cell SHP-2 negatively regulates neutrophil adhesion and promotes transmigration by enhancing ICAM-1–VE-cadherin interaction. *FASEB J.* 31, 4759–4769.
- Yang, Y. (2012). Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci.* 2, 14.

- Yang, T., Roder, K.E., and Abbruscato, T.J. (2007). Evaluation of bEnd5 cell line as an in vitro model for the blood-brain barrier under normal and hypoxic/aglycemic conditions. *J. Pharm. Sci.* *96*, 3196–3213.
- Yeligar, S.M., Machida, K., Tsukamoto, H., and Kalra, V.K. (2009). Ethanol Augments RANTES/CCL5 Expression in Rat Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Human Endothelial Cells via Activation of NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , and AP-1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 5964–5976.
- Yellowley, C. (2013). CXCL12/CXCR4 signaling and other recruitment and homing pathways in fracture repair. *BoneKey Rep.* *2*.
- Yoshioka, K., Yoshida, K., Cui, H., Wakayama, T., Takuwa, N., Okamoto, Y., Du, W., Qi, X., Asanuma, K., Sugihara, K., et al. (2012). Endothelial PI3K-C2 $\alpha$ , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat. Med.* *18*, 1560–1569.
- Zanetta, L., Corada, M., Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Breviario, F., Moons, L., Carmeliet, P., Pepper, M.S., and Dejana, E. (2005). Downregulation of vascular endothelial-cadherin expression is associated with an increase in vascular tumor growth and hemorrhagic complications. *Thromb. Haemost.* *93*, 1041–1046.
- Zarbock, A., Lowell, C.A., and Ley, K. (2007). Syk signaling is necessary for E-selectin-induced LFA-1-ICAM-1 association and rolling but not arrest. *Immunity* *26*, 773–783.
- Zeng, L., Webster, S.V., and Newton, P.M. (2012). The biology of protein kinase C. *Adv. Exp. Med. Biol.* *740*, 639–661.
- Zeng, M., Zhang, H., Lowell, C., and He, P. (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced leukocyte adhesion and microvessel permeability. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *283*, H2420–H2430.
- Zernecke, A., Shagdarsuren, E., and Weber, C. (2008). Chemokines in Atherosclerosis: An Update. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1897–1908.
- Zhang, H., and Issekutz, A.C. (2002). Down-modulation of monocyte transendothelial migration and endothelial adhesion molecule expression by fibroblast growth factor: reversal by the anti-angiogenic agent SU6668. *Am. J. Pathol.* *160*, 2219–2230.
- Zhang, L.-Z., and Lei, S. (2016). Changes of junctions of endothelial cells in coronary sclerosis: A review. *Chronic Dis. Transl. Med.* *2*, 22–26.
- Zhang, R.-Y., Li, L., Wu, J., and Tang, Y.-Q. (2012). Vascular endothelial-cadherin: A possible link between endocytosis and ectodomain shedding. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 266.
- Zhang, X., Wu, C., Song, J., Götte, M., and Sorokin, L. (2013). Syndecan-1, a Cell Surface Proteoglycan, Negatively Regulates Initial Leukocyte Recruitment to the Brain across the Choroid Plexus in Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* *191*, 4551–4561.
- Zhao, Y.D., Ohkawara, H., Rehman, J., Wary, K.K., Vogel, S.M., Minshall, R.D., Zhao, Y.-Y., and Malik, A.B. (2009). Bone Marrow Progenitor Cells Induce Endothelial Adherens Junction Integrity by Sphingosine-1-Phosphate-Mediated Rac1 and Cdc42 Signaling. *Circ. Res.* *105*, 696–704.
- Zheng, Y., Han, G.W., Abagyan, R., Wu, B., Stevens, R.C., Cherezov, V., Kufareva, I., and Handel, T.M. (2017). Structure of CC Chemokine Receptor 5 with a Potent Chemokine Antagonist Reveals Mechanisms of Chemokine Recognition and Molecular Mimicry by HIV. *Immunity* *46*, 1005-1017.e5.
- Zhou, X., Stuart, A., Dettin, L.E., Rodriguez, G., Hoel, B., and Gallicano, G.I. (2004). Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture. *J. Cell Sci.* *117*, 3129–3140.

- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 564–580.
- Zimmermann, N., Conkright, J.J., and Rothenberg, M.E. (1999). CC Chemokine Receptor-3 Undergoes Prolonged Ligand-induced Internalization. *J. Biol. Chem.* *274*, 12611–12618.
- Zimmermann, P., Tomatis, D., Rosas, M., Grootjans, J., Leenaerts, I., Degeest, G., Reekmans, G., Coomans, C., and David, G. (2001). Characterization of Syntenin, a Syndecan-binding PDZ Protein, as a Component of Cell Adhesion Sites and Microfilaments. *Mol. Biol. Cell* *12*, 339–350.
- Zimmermann, P., Zhang, Z., Degeest, G., Mortier, E., Leenaerts, I., Coomans, C., Schulz, J., N’Kuli, F., Courtoy, P.J., and David, G. (2005). Syndecan Recycling Is Controlled by Syntenin-PIP2 Interaction and Arf6. *Dev. Cell* *9*, 377–388.
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: A New Classification System and Their Role in Immunity. *Immunity* *12*, 121–127.
- Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., and Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 597–606.



# ANNEXES

# **Matériels et Méthodes**

## A. Modèles cellulaires

### I. Cellules endothéliales HUVECs

Les expériences ont été réalisées sur des cellules endothéliales humaines de la veine du cordon ombilical (HUVECs CRL-1730, ATCC). Ces cellules endothéliales adhérentes ont été cultivées dans un milieu *Endothelial Cell Basal Medium 2* (ECBM 2, PromoCell, France) contenant 12% de sérum de veau fœtal (SVF), *Epidermal Growth Factor* (EGF, 5 ng/mL), hydrocortisone (0.2 µg/mL), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF, 0.5 ng/mL), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF, 10 ng/mL), *Insulin like Growth Factor-1* (IGF-1, 20 ng/mL), l'acide ascorbique (1 µg/mL), l'héparine (22.5 µg/mL) et 1% pénicilline-streptomycine (Invitrogen).

Lorsque les cellules sont confluentes (soit environ deux fois par semaine) les cellules sont trypsinées puis réensemencées à  $10^5$  cellules/mL sous une hotte à flux laminaire vertical. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub>.

### II. Monocytes Mono Mac 6

La lignée de cellules Mono Mac 6 (MM6), un don du Pr H.W. Löms Ziegler-Heitbrock (Institute for Immunology, University of Munich, Germany), est cultivée à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 (ATCC) enrichi de 10 % de SVF, 1 % de Penicilline- streptomycine et 0.1% d'insuline bovine. Le passage des cellules se fait sous hotte à flux laminaire vertical où les monocytes sont ensemencés à  $2.5 \cdot 10^5$  cellules/mL et cultivées dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO<sub>2</sub>.

## **B. Matériels**

### **I. Cytokines et chimiokines**

Dans l'ensemble des expériences les cellules HUVECs ont tout d'abord été activées avec le TNF- $\alpha$  (1 ng/mL, Life Technologies, France) pendant 16 h à 37°C.

Puis, les HUVECs ont été stimulées ou non avec 3 nmol/L de RANTES natif ou l'un des mutants : 3Ala-RANTES (<sup>44</sup>AANA<sup>47</sup>), mutant incapable de se fixer sur les GAGs, ou E66A-RANTES, mutant dimère incapable de s'oligomériser en polymère, (un don de L. Martin, CEA-iBiTec-S, Institut de biologie et de technologies de Saclay) pendant 2 h ou en temps différé (5 minutes, 10 min ou 30 min) à 37°C.

Dans les expériences d'étude de la migration trans-endothéliale des monocytes, la protéine recombinante MCP-1 (3 nmol/L, R & D Systems Villejust, France.) a été utilisée et placée dans la partie inférieure de la chambre de Boyden (Transwell).

## II. Anticorps

Différents anticorps ont été utilisés dans les différentes expériences de ce projet.

<b>Isotypes</b>			
Cible	Clone	Concentration	Fournisseur
<b>Isotype</b>	Souris IgG1	1 µg/mL	BD Biosciences Pharmigen
<b>Isotype</b>	Souris IgG2a	1 µg/mL ou 10 µg/mL	BD Biosciences Pharmigen
<b>Isotype</b>	Lapin IgG	1 µg/mL	R&D Systems
<b>Anticorps primaires</b>			
<b>ICAM-1</b>	mAb Souris IgG1, clone P2A4	1 µg/mL	Millipore
<b>VCAM-1</b>	mAb Souris IgG1, clone M/K-2	1 µg/mL	Santa Cruz
<b>E-sélectine</b>	mAb Souris IgG2a, clone CTB202	1 µg/mL	Santa Cruz
<b>PECAM-1</b>	mAb Souris IgG1, clone JC70	1 µg/mL	Santa Cruz
<b>RANTES</b>	Lapin IgG	4 µg/mL	Peptotech,
<b>SDC-4</b>	mAb Souris IgG2a, clone 5G9	10 µg/mL	Santa Cruz
<b>Anticorps secondaire</b>			
<b>Lapin IgG</b>	chèvre-Alexa Fluor 647	10 µg/mL	Invitrogen
<b>Rat IgG</b>	Chèvre-Alexa Fluor 488	10 µg/mL	Invitrogen
<b>Souris IgG</b>	Chèvre-Alexa Fluor 647	10 µg/mL	Invitrogen
<b>Souris IgG</b>	Chèvre-Alexa Fluor 488	10 µg/mL	Invitrogen

**Tableau 2.** Les anticorps et isotypes utilisés pour la cytométrie en flux

mAb : anticorps monoclonal (*monoclonal antibody*), pAb : anticorps polyclonal (*polyclonal antibody*).

<b>Isotypes</b>			
<b>Cible</b>	<b>Clone</b>	<b>Concentration</b>	<b>Fournisseur</b>
<b>Isotype</b>	Souris IgG2b	0.5 µg/mL	BD Biosciences Pharmigen
<b>Isotype</b>	Lapin IgG	0.5 ou 1 µg/mL	R&D Systems
<b>Isotype</b>	Souris IgG1	0.5 ou 1 µg/mL	BD Biosciences Pharmigen
<b>Isotype</b>	Souris IgG2a	1 µg/mL	BD Biosciences Pharmigen
<b>Anticorps primaires</b>			
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	mAb Souris IgG2b, clone 3/PKC $\alpha$	0.5 µg/mL	BD Biosciences Pharmigen
<b>PKC<math>\delta</math></b>	Lapin IgG, clone C17	0.5 µg/mL	Santa Cruz
<b>VE- cadherine</b>	pAb Lapin IgG	1 µg/mL	Abcam
<b>pY685 VE- cadherine</b>	pAb Lapin-IgG	1 µg/mL	Abcam
<b>pY731-VE- cadherine</b>	mAb Souris IgG2a	1 µg/mL	Sigma
<b><math>\beta</math>-Caténine</b>	mAb Souris IgG1	0,5 µg/mL	BD TRANSDUCTION Laboratories
<b>pY654 <math>\beta</math>-Caténine</b>	pAb Lapin IgG	1 µg/mL	ECM bioscience
<b>Actine</b>	pAb Lapin IgG, clone I-19-R	1 µg/mL	Santa Cruz
<b>Tubuline</b>	mAb Souris IgG1, clone B512	0,5µg/mL	Sigma
<b>Intégrine <math>\beta</math>1</b>	pAb Souris IgG1, clone N-20	1 µg/mL	Santa Cruz
<b>Anticorps secondaire</b>			
<b>Souris IgG</b>	Ane-HRP	0.16 µg/mL	Jackson ImmunoResearch
<b>Lapin IgG</b>	Ane-HRP	0.16 µg/mL	Jackson ImmunoResearch
<b>Chèvre IgG</b>	Ane-HRP	0.2 µg/mL	Santa Cruz

**Tableau 3.** Les anticorps et les isotypes utilisés en Western Blot

mAb : anticorps monoclonal (*monoclonal antibody*), pAb : anticorps polyclonal (*polyclonal antibody*).

### III. Outils moléculaires d'inhibition

Les HUVECs ont été pré-incubées avec des inhibiteurs pharmacologiques, des enzymes bactériennes ou transfectées avec des ARN interférents (siRNA) afin de cibler différentes protéines d'intérêt.

Inhibiteurs et activateur pharmacologiques			
Nom	Cible	Concentration	Fournisseur
<b>Gö6976</b>	PKC $\alpha$ / $\beta$ 1	1 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
<b>Rottlerine</b>	PKC $\delta$	1 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
<b>NSC</b>	Rac1	1 $\mu$ M	Calbiochem
<b>ML141</b>	Cdc42	10 $\mu$ M	Calbiochem
<b>PMA</b>	Activateur des PKC	0.5 $\mu$ M	Sigma-Aldrich
Enzymes			
Nom	Cible	Concentration	Fournisseur
<b>C3 exoenzyme transférase</b>	RhoA	10 ng/mL	Sigma-Aldrich
<b>Héparitinase I</b>	Chaînes HS	20 mU/mL	Sigma-Aldrich
<b>Héparitinase III</b>	Chaînes HS	10 mU/mL	Sigma-Aldrich
<b>Chondroïtinase ABC</b>	Chaînes CS	33 mU/mL	Sigma-Aldrich
siRNA			
Nom	Cible	Concentration	Fournisseur
<b>siRNA SDC-4</b>	ARNm SDC-4	300 nM	Eurogentec
<b>siRNA CCR1</b>	ARNm CCR1	100 nM	Eurogentec
<b>siRNA CCR5</b>	ARNm CCR5	100 nM	Eurogentec
<b>siRNA Scramble</b>	siRNA control	100 nM	Eurogentec

**Tableau 4.** Les outils moléculaires d'inhibition et d'activation

#### IV. Plasmides

Les HUVECs ont été transfectées avec différents plasmides préalablement construits au laboratoire. (Maillard *et al.* 2014)

Plasmide (abréviation)	Modification
N3-GFP (N3)	
SDC4WT-GFP (SDC-4)	GFP fusionné en C-terminal du SDC-4
SDC-4-S179A-GFP (S179A)	Sérine 179 mutée en alanine. SDC-4 non phosphorylable sur l'acide amine 179.
SDC-4-L188QQ (L188QQ)	Tyrosine 188 et lysines 189 et 190 mutées en leucine, glutamine et glutamine. SDC-4 avec domaine de fixation du PIP2 muté.
SDC-4-A198del-GFP (A198del)	Alanine 198 délétée. SDC-4 sans domaine de fixation des protéines à domaine PDZ.

**Tableau 5.** Les plasmides codant le SDC-4 ou ses mutants fusionnés avec la GFP



## C. Méthodes

### I. Amplification de plasmides et extraction de l'ADN plasmidique

#### 1. Transformation bactérienne

Les bactéries E.coli XL1- Blue Supercompetent Cells (Stratagene) ont été transformées avec les différents plasmides codants le SDC-4 sauvage ou ses mutants (S179A, L188QQ, A198del). Pour une adsorption du plasmide à la surface de la bactérie, les bactéries (50  $\mu$ L) ont été incubées avec l'un des plasmides (10 ng) pendant 30 minutes dans la glace. La transformation bactérienne a été faite par choc thermique en incubant le mélange 45 secondes dans un bain-marie à 42°C. Le choc thermique permet l'ouverture de pores dans la membrane plasmique de la bactérie et par conséquent une entrée plus importante de plasmide. Après un passage de 5 minutes dans la glace pour fermer les pores, les bactéries ont été incubées 1 heure à 37°C dans le milieu SOC (pour *Super Optimal broth with Catabolite repression* : tryptone (2%), extrait de levure (0.5%), NaCl (10 mM), KCl (2.5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM), MgSO<sub>4</sub> (10 mM), glucose (20 mM)), sous agitation (200 tour/minute). Les bactéries ont ensuite étéensemencées sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB Agar (pour *Lysogeny broth Agar* : tryptone (1%), extrait de levure (0.5%), NaCl (10 mM), agar (1.5%)) supplémenté en kanamycine (1  $\mu$ g/mL) une nuit à 37°C. Seules les bactéries transformées, contenant un plasmide codant le gène de résistance à la kanamycine, pourront proliférer. Après une nuit d'incubation à 37°C, les bactéries prolifèrent et forment des colonies sur le milieu de croissance (LB Agar).

#### 2. Culture bactérienne

##### 2.1. Amplification des bactéries en petit volume (Miniculture)

Plusieurs colonies bactériennes sont récupérées et amplifiées pendant une nuit à 37°C sous agitation (200 tour/minute) dans un tube contenant 5 mL du milieu de culture liquide LB Broth Base (tryptone (1%), extrait de levure (0.5%), NaCl (10 mM)) supplémenté en kanamycine (1  $\mu$ g/mL).

Suite à une nuit de culture, les bactéries (5 mL) sont divisées en deux parties, l'une de 3 mL utilisée, dans notre cas, pour une première extraction et validation de l'ADN plasmidique. Suite à cette validation, les bactéries restantes (2 mL) sont amplifiées en maxiculture afin d'améliorer le rendement de l'extraction de l'ADN (augmenter la concentration de l'ADN plasmidique).

## **2.2. Amplification des bactéries en grands volumes (Maxiculture)**

2mL de bactéries issues de la miniculture sont ajoutés à un erlenmeyer contenant 90mL de LB Broth Base puis incubées une nuit à 37°C sous agitation (200 tour/minute).

## **3. Extraction d'ADN plasmidique**

L'extraction de l'ADN plasmidique à l'aide du kit Qiagen plasmid purification (Qiagen, France). Une résine chargée positivement (DEAE (*Diethylaminoethyl*)-cellulose) qui fixe l'ADN plasmidique par le biais des interactions ioniques avec les groupements phosphates, chargés négativement, de l'ADN. L'ADN est ensuite purifié par lavages successifs avec des tampons de concentration croissante en NaCl.

### **3.1. Extraction d'ADN plasmidique en petite quantité (Miniprep)**

La miniculture bactérienne est récupérée et centrifugée à 10 000 g pendant 5 minutes. Le culot bactérien est suspendu dans un premier tampon P1 (300 µL) (Tris-Cl (50 mM) pH 8, EDTA (10 mM), RNaseA (100 µg/mL)). Puis, les bactéries sont lysées pendant 5 minutes par l'ajout du P2, un deuxième tampon, (300 µL) (NaOH (200 mM), SDS (1%)). La lyse est neutralisée par l'ajout de tampon P3 (300 µL) (acétate de potassium (3M) à pH 5.5) pendant 5 minutes dans la glace. Une centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes s'en suit afin d'éliminer les débris. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est versé dans la colonne échangeuse d'ions préalablement équilibrée avec du tampon QBT® (1 mL) (NaCl (750 mM) MOPS (50 mM), isopropanol (15%), Triton X-100 (0.15%), pH 7). L'ADN plasmidique fixé à la colonne est lavé deux fois avec du tampon QCC® (2 mL) (NaCl (1 M) MOPS (50 mM), isopropanol (15%), pH 7). L'élution de l'ADN plasmidique se fait par l'ajout du tampon QF® (800 µL) (NaCl (1.5 M), Tris-Cl (50 mM), isopropanol (15%), pH 8.5).

L'ADN plasmidique est précipité par l'ajout d'isopropanol (560 µL) et centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes. Le culot d'ADN plasmidique est lavé avec de l'éthanol (70%, 1 mL) puis centrifugé à 10 000 g pendant 10 minutes. À la fin, le culot d'ADN plasmidique est resuspendu dans du tampon TE (30µl) (Tris (10 mM), EDTA (1 mM), pH 8)

### **3.2. Extraction d'ADN plasmidique en grande quantité (Maxiprep )**

L'extraction en grande quantité de l'ADN plasmidique (maxiprep) (Qiagen, France) est semblable à la miniprep (Qiagen, France) ; seuls les volumes des tampons et la durée de centrifugation qui changent.

Le culot bactérien est suspendu dans le tampon P1 (10 mL). La lyse des bactéries est effectuée avec le tampon P2 (10 mL) et neutralisée avec le tampon P3 (10 mL) pendant 20 minutes dans la glace. L'ensemble est centrifugé à 10 000 g pendant 45 minutes. Les colonnes échangeuses d'ions sont préalablement équilibrées avec du tampon QBT<sup>®</sup> (10 mL). Les deux lavages de l'ADN plasmidique, fixé à la colonne, sont réalisés avec du tampon QC (30 mL) L'élution de l'ADN plasmidique se fait par l'ajout du tampon QF<sup>®</sup> (15 mL). La précipitation de l'ADN plasmidique se fait par l'ajout d'isopropanol (10.5 µL) ensuite une centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes. L'éthanol (70%, 5 mL) a été utilisé pour laver le culot d'ADN plasmidique puis une centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes s'en suit. La suspension du culot d'ADN plasmidique se fait dans du tampon TE (100 µL).

La pureté et la concentration, de l'ADN plasmidique obtenu par Miniprep et maxiprep (kit Qiagen, France), est mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop<sup>®</sup>.

#### **4. Digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose**

Dans le but de vérifier la qualité de l'ADN plasmidique (la taille du plasmide et la présence de l'insert codant pour le SDC-4 ou ses mutants), une double digestion enzymatique est réalisée en utilisant les enzymes de restriction KpnI et EcoRI suivie d'une migration sur un gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium (BET, un intercalant de l'ADN).

## **II. Transfection cellulaire et contrôle de son efficacité**

La transfection transitoire des HUVECs a été réalisée à l'aide de l'électroporateur Nucleofector II Devis (Lonza) et du kit Cell Line Nucleofector Kit V<sup>®</sup> (Lonza) contenant la solution Nucleofector V et les cuves de nucléofection.

Les HUVECs sont décollées avec un mélange trypsine/EDTA et lavées dans un tampon phosphate salin (PBS), puis reprises à 10<sup>6</sup> cellules dans 100µL de solution Nucleofector V (dont la composition n'est pas communiquée par le fournisseur) auxquels sont ajoutés 5µg de plasmide puis placées dans une cuve de nucléofection.

Les HUVECs sont transfectées en utilisant le programme « Nucleofector Program V-001 » de l'électroporateur (dont les paramètres ne sont pas communiqués par le fournisseur). Après la nucléofection, un milieu ECBM2 (500µL) complété par du SVF (12%) (ECMB-SVF) est ajouté aux cellules directement dans la cuve de nucléofection ; elles sont incubées dans le milieu ECMB-SVF (12%) à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 8h, temps nécessaire à l'adhérence cellulaire.

Les expériences utilisant ces cellules sont réalisées entre 48h et 72h après la nucléofection, temps pour lequel il a été montré précédemment une surexpression membranaire du SDC-4 en cytométrie de flux par rapport aux cellules non transfectées. (Maillard et al. 2014)

L'analyse de l'efficacité de transfection est réalisée systématiquement pour valider chaque expérience. L'efficacité de transfection des cellules endothéliales est analysée en utilisant la cytométrie en flux en mesurant l'intensité de fluorescence de la GFP émise par les HUVECs transfectées par les plasmides codant les protéines fusionnées avec la GFP. (Tableau 5 p. 272)

Les HUVECs transfectées sont lavées trois fois à l'aide d'une solution de PBS/BSA 0.1%, puis fixées avec une solution de paraformaldehyde à 1% (PFA, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 20min à 4°C à l'abri de la lumière. Après deux lavages au PBS/BSA 0.1%, avant d'être récupérées par grattage dans du PBS (500µL). La solution cellules/PBS est transvasée dans des tubes adaptés au cytomètre de flux. L'analyse est réalisée en FL-1, le cytomètre va détecter des longueurs d'ondes correspondant à du vert ( $\lambda_{excitation} = 395 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{émission} = 498 \text{ nm}$ ).

Dans chaque expérience, nous utilisons des cellules non transfectées comme contrôle négatif de transfection.

### III. Étude du recrutement monocytaire

Le recrutement monocytaire (arrêt, adhérence et migration trans-endothéliale) a été étudié en utilisant des cellules endothéliales HUVECs non transfectées ou transfectées avec des ARN interférant (ciblant SDC-4, CCR1 ou CCR5) ou transfectées avec les plasmides N3-GFP, SDC-4-GFP ou ses mutants (S179A, L188QQ, A198del). Les protocoles utilisés pour l'analyse de l'arrêt, de l'adhérence ou de la migration trans-endothéliales reste les mêmes que les cellules aient été ou non transfectées.

#### 1. Arrêt des monocytes sur la barrière endothéliale en condition de flux

Les cellules HUVEC ( $3 \cdot 10^5$ ) sontensemencées dans une chambre de culture en flux d'une surface de croissance de  $2,5 \text{ cm}^2$  (Ibidi µ-slide I 0,4Luer, Biovalley, Marne la Vallée, France). Après 8h d'incubation à 37°C, le milieu est changé pour éliminer les débris. Les cellules adhérentes restent dans la chambre de culture.

Après 24 heures dans la chambre de culture, les HUVECs forment une monocouche cellulaire. Les HUVECs ont ensuite été marquées avec un colorant orange physiologique du cytosol (5-(et-6)-(((4-chlorométhyl) benzoyl) amino) tétraméthylrhodamine) (CMTMR (10  $\mu$ M), Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) pendant 20 min à 37°C. Après deux lavages avec du milieu de culture ECBM2 basique (sans facteur de croissance et sans SVF), les HUVECs sont activées avec le TNF- $\alpha$  (1ng/mL) pendant 16 h; puis, les cellules sont stimulées ou non pendant 2 h avec RANTES/CCL5 ou avec un de ses mutants 3Ala- ou E66A-RANTES (3 nmol/L).

En parallèle, des Mono Mac 6 (MM6) préalablement marqués avec le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, 1 ng/mL) ( $\lambda_{excitation}=310\text{nm}$ ,  $\lambda_{émission}=456\text{nm}$ , bleu) (Roth Lauterbourg, France) ont été perfusés sous flux laminaire à 0,67 dyn/cm<sup>2</sup> à l'aide d'une pompe péristaltique (Miniplus 2, Gilson, Villiers-le-Bel, France) pendant 10 minutes. Les HUVECs ont ensuite été fixées et le nombre de monocytes arrêtés sur la monocouche de HUVECs a été quantifié sous microscopie à fluorescence (Zeiss, AXIOPHOT).

## **2. Adhérence des monocytes sur la barrière endothéliale en conditions statique**

Les cellules HUVECs ( $2 \cdot 10^5$ ) ont étéensemencées dans des chambres de culture Lab-Tek™ à huit puits pendant 24 heures. La monocouche des HUVECs a été marquée avec 10  $\mu$ M de CMTMR, un colorant physiologique du cytosol, pendant 20 min puis activée avec le TNF- $\alpha$  (1 ng/mL) pendant 16 h. Ensuite, les HUVECS ont été stimulées ou non avec RANTES ou un des mutants : 3Ala- ou E66A-RANTES (3 nmol/L) pendant 2 h à 37°C.

Les monocytes MM6 pré-marqués avec le DAPI (1 ng/ml) ont été ajoutés sur la monocouche des HUVECs. L'ensemble a été incubé pendant 30 minutes à 37°C. Les HUVECs ont ensuite été fixées avec de la PFA 1% (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) à 4°C pendant 20 minutes. Le nombre de monocytes adhérents sur la monocouche des HUVECs a été quantifié sous microscopie à fluorescence (Zeiss, AXIOPHOT).

## **3. Migration trans-endothéliale des monocytes en chambre de Boyden (Transwell)**

Les chambres Transwell (ou chambre de Boyden) (8  $\mu$ m, Beckton Dickinson Le Pont de Claix, France) ont été recouvertes avec 100  $\mu$ g/mL de fibronectine (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France). Puis, les cellules HUVECs ( $2 \cdot 10^5$ ) ont été cultivées dans la partie supérieure de la chambre de Boyden. Après incubation à 37°C pendant 24 h, les HUVECs ont été activées avec du TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) pendant 16 h et ensuite stimulées ou non avec RANTES/CCL5 ou un de ses mutants : 3Ala- ou E66A-RANTES (3 nmol/L).

Parallèlement, des monocytes MM6 pré-colorés avec le CPD (Cell Proliferation Dye eFluor 670, 5 $\mu$ M, eBioscience S.A.S, Paris, France,  $\lambda_{\text{excitation}} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 670 \text{ nm}$ ), un colorant fluorescent rouge, pendant 10 min à 37°C puis lavés 2 fois avec du RPMI seul.

Dans chaque chambre supérieure, les monocytes MM6 ( $5 \cdot 10^5$ ) sont déposés sur la monocouche d'HUVECs, tandis que la chambre inférieure contient du milieu RPMI basique sans SVF supplémenté avec la chimiokine MCP-1 (3 nmol/L).

Les monocytes ayant migré pendant 2 h de la chambre supérieure vers la chambre inférieure en traversant la monocouche des HUVECs ont ensuite été quantifiés en utilisant la cytométrie en flux pour mesurer l'intensité de fluorescence en FL-4 ( $\lambda_{\text{excitation}} = 647 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 670 \text{ nm}$ , rouge).

#### IV. Évaluation des mécanismes impliqués dans le recrutement monocytaire

Pour évaluer l'implication des voies de signalisations (PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , Rac1 ou RhoA), l'implication des chaînes GAGs ou les RCPGs (CCR1, CCR5) dans le **recrutement monocytaire** (arrêt, adhérence et migration trans-endothéliale) induit par RANTES ; les HUVECs activées avec le TNF- $\alpha$  et stimulées par RANTES ont été :

- prétraitées ou non avec l'inhibiteur pharmacologique PKC $\alpha$ , PKC $\delta$ , Rac1 ou RhoA (**Tableau 4 p. 271**)
- pré-incubées ou non avec un mélange d'enzymes contenant de l'héparinase I (20mU), de l'héparinase III (10mU) et de la chondroïtinase ABC (33mU) (**Tableau 4 p. 271**) ;
- pré-incubées avec le contrôle isotype IgG2b ou les anticorps neutralisant anti- CCR1 ou et/ou anti-CCR5 ou siRNA CCR1 ou siRNA CCR5 ou leur contrôle. (**Tableau 4 p. 271**).

#### V. La microscopie électronique à transmission

Pour l'analyse ultra-structurale des cellules endothéliales HUVECs avant et après la migration trans-endothéliale des monocytes, la monocouche des cellules endothéliales HUVECs, activée avec le TNF- $\alpha$  et stimulée ou non avec RANTES, de chaque condition ont été récupérées de la chambre supérieure du Transwell puis ont été immergées dans une solution de fixation de 4% de paraformaldéhyde et de 1% de glutaraldéhyde dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) pendant 48 h, lavés dans du PBS, postfixés par incubation pendant 1 h avec 2% de tétroxyde d'osmium et déshydratés une série graduée de solutions d'éthanol. Les échantillons ont été

incorporés dans de la résine Epon, qui a été laissée à polymériser pendant 48 heures à 60 °C. Des coupes ultrafines ont été coupées, colorées avec 2,5% d'acétate d'uranyle et 1% de citrate de plomb, puis déposées sur des grilles de nickel formvar / recouvertes de carbone ou sur des grilles dorées pour examen au microscope électronique à transmission (TEM) à 100 kV (JEOL 1011, Tokyo). Japon).

## VI. Cytométrie en Flux

### 1. Étude de l'expression membranaire des molécules d'adhérences sur les HUVECs

L'expression membranaire de molécules d'adhérence, PECAM-1, E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, a été analysée en utilisant la cytométrie en flux sur des cellules HUVECs non perméabilisées activées avec le TNF- $\alpha$  (1ng/mL) puis stimulées ou non avec RANTES (3nmol/L). Après lavage des cellules avec un tampon PBS/BSA (0.1%) et leur fixation avec du PFA (1%) pendant 30 min à température ambiante, les cellules HUVECs ont été incubées pendant 2 h à 4°C avec les anticorps suivants dont les caractéristiques sont indiquées dans le **tableau 2** (page 269) : anti-ICAM-1 humain, anti-PECAM-1 humain, anti-E-sélectine humaine ou anti-VCAM-1 humain, dilué dans du PBS/BSA (0.1%). Le marquage aspécifique de chaque anticorps a été évalué en utilisant les isotypes des différents anticorps (**Tableau 2 p. 269**).

Puis, les cellules ont été incubées, pendant 30 min à température ambiante avec des anticorps secondaires développés chez la chèvre et couplé à l'Alexa Fluor 647 (10  $\mu$ g/mL) ( $\lambda_{\text{excitation}} = 652$  nm,  $\lambda_{\text{émission}} = 665$  nm) (Invitrogen Thermo Fisher Scientific, Brébières, France).

Les échantillons ont été analysés avec le cytomètre en flux FACSCalibur®.

### 2. Étude de la liaison de RANTES avec les récepteurs membranaires des HUVECs

Les HUVECs ont été pré-incubées avec RANTES, 3Ala-RANTES ou E66A-RANTES (3 nmol/L) pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, les cellules ont été fixées avec 1% de PFA pendant 30 min à 4°C. En outre, les HUVECs ont été incubées pendant 2 h à 4°C avec 4  $\mu$ g/mL d'anticorps polyclonal anti-RANTES ou de son isotype (4  $\mu$ g/ml) (**Tableau 2 p. 269**) dilué dans du PBS/BSA (0.1%). Ensuite, les cellules ont été lavées et incubées avec l'anticorps secondaire développé chez la chèvre, couplé à l'Alexa Fluor 488 (10 $\mu$ g/mL,  $\lambda_{\text{excitation}} = 488$  nm,  $\lambda_{\text{émission}} = 507$  nm Invitrogen, Brébières, France). Les échantillons ont été analysés avec le cytomètre en flux en utilisant le FACSCalibur®.

## VII. Étude de la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la $\beta$ -caténine

La phosphorylation des résidus tyrosines Y685 et Y731 de la VE-cadhérine et du résidu Y654 de la  $\beta$ -caténine des HUVECs a été étudiée en utilisant la technique de western blot.

Les HUVECs ( $10^6$ ) ont été ensemencées dans une boîte de culture T75 pendant 24 h et ensuite prétraitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique (**Tableau 4 p. 271**) pendant 2 h puis stimulées avec RANTES/CCL5 à différents temps (0, 5, 10 ou 30 min) à 37 ° C. Les cellules ont été lavées avec du PBS froid supplémenté de 1  $\mu$ M d'orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France) puis récupérées, en grattant le tapis cellulaire avec un grattoir adapté.

Après une centrifugation de 5min à 10 000g, les protéines ont été extraites des cellules HUVECs par l'ajout de 50  $\mu$ L de tampon de lyse (Tris (20 mM), NaCl (150 mM), NP40 (1%), PMSF (10 mM), Aprotinine (20  $\mu$ g/mL), Iodoacetamide (5 mM), Ophenanthroline (25 mM), Orthovanadate (1 mM), pH 8) aux culots cellulaires.

Les lysats ont été obtenus par centrifugation à 13 000 g pendant 20 minutes à 4°C et la concentration de protéines, dans les lysats cellulaires, a été déterminée en utilisant le kit d'analyse de protéines BCA (pour *BiCinchoninic acid Assay*, Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France) par spectrophotométrie à 570 nm.

La totalité des échantillons dénaturés (30 $\mu$ g de protéines) est déposée sur un gel de polyacrylamide composé d'un gel de concentration à 3% (Tris (50 mM) pH 6.8, SDS (0.1%), Acrylamide/Bis-acrylamide ((ratio : 37.5:1), 3%), APS (ammonium persulfate) (0.4%), Temed (0.1%)) suivi d'un gel de migration à 7% (Tris (375 mM) pH 8.8, SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (7%), (APS (0.4%), Temed (0.1%)) plongé dans la solution de migration (Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), pH 8.3). Une échelle de poids moléculaire de 10 à 250kDa (Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France) a été utilisée. La migration est réalisée à ampérage constant (30 mA) pendant une heure.

Après migration, les protéines séparées sur le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Healthcare Europe GMBH) dans un tampon de transfert (Tris (25 mM), Glycine (82 mM), Ethanol (20%)) à 130 Volts pendant une heure. Les membranes sont ensuite incubées avec le rouge Ponceau (0.1%) afin de mettre en évidence la totalité des protéines transférées sur la membrane.



Après saturation de la membrane, pendant une nuit à 4°C dans du PBS 0,1% Tween<sup>®</sup>20-5% lait écrémé, trois lavages consécutifs de 10min avec du PBS 0,1% Tween<sup>®</sup>20 sont effectués. Les membranes sont ensuite incubées en présence des anticorps primaires anti-VE-cadhérine (1µg/mL, Abcam), anti-pY685-VE-cadhérine (1µg/mL, Abcam) ou anti-pY731-VE-cadhérine (1µg/mL, Sigma Aldrich), anti-β-caténine (0.5 µg/mL, BD transduction) ou anti-pY654 β-caténine (1µg/mL, ECM bioscience) dilué dans le tampon d'incubation PBS-0,1% Tween<sup>®</sup>20 pendant 1h sous agitation à température ambiante (**Tableau 3 p. 270**).

Les membranes sont lavées trois fois avec PBS-0,1% Tween<sup>®</sup>20 pendant 10 minutes, puis incubées, pendant 1 heure sous agitation, dans une solution d'anticorps (anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (**Tableau 3 p. 270**) préparée dans un tampon de PBS-0,1% Tween<sup>®</sup>20. Les membranes sont enfin lavées trois fois avec du tampon de lavage pendant 10 minutes sous agitation.

Le marquage est ensuite révélé par le système d'analyse d'immunoblots ECL (pour *Enhanced chemiluminescent western blot detection*) (Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France). Les membranes sont incubées pendant 3 minutes dans une solution contenant le substrat de la peroxydase (luminol) est un agent chimique augmentant le signal. Un film photographique (GE Healthcare ECL Amersham<sup>™</sup> Hyperfilm<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific, France) est mis en contact avec chaque membrane. La lumière captée par le film est révélée à l'aide d'un bain dans une solution de révélateur (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) puis une solution de fixateur (Kodak).

### **VIII. Étude de la translocation membranaire des PKCs $\alpha$ et $\delta$**

Les cellules HUVECs ( $3.10^6$ ) ont été incubées à 37°C pendant 15 minutes avec 0,5 µM de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) utilisés comme un contrôle positif ou avec 3 nmol/L RANTES pendant 5, 10 ou 30min.

Les HUVECs ont été prétraitées ou non avec de Gö6976 (1 µM), inhibiteur de PKC $\alpha$  ou de Rottlerine (1 µM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), inhibiteur de la PKC $\delta$ , pendant 2 heures à 37°C.

Puis, la translocation des PKCs du cytosol vers la membrane plasmique des HUVECs a été évaluée en isolant la membrane plasmique de la fraction cytosolique en utilisant le Kit de fractionnement des protéines intracellulaires (Thermo Fisher Scientific Pierce, Brébières, France) comme décrit précédemment. (*Maillard et al. 2014*)

La fraction membranaire et la fraction cytosolique de chaque échantillon ont été analysées par électrophorèse SDS PAGE. Chaque fraction (10µg) a été déposée sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration à 3% et un gel de migration à 10 %. L'électrophorèse, le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose et la saturation sont identiques aux étapes du western blot décrites dans la partie VI-Etude de la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine de ce chapitre (page 280-281).

La PK $\alpha$  et la PKC  $\delta$  ont été détectées en incubant les membranes de nitrocellulose avec l'anticorps anti-PKC $\alpha$  (1 µg/mL, IgG2b-souris, BD Biosciences Pharmingen) ou l'anticorps anti PKC- $\delta$  (2 µg/ml, IgG-lapin Santa cruz) pendant 2 h à 4°C sous agitation.

Après trois lavages de 10 minutes sous agitation avec le tampon PBS-0.1% Tween<sup>®</sup>20, les membranes de nitrocellulose sont incubées, pendant 1 heure sous agitation, dans une solution d'anticorps (anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (**Tableau 3 p. 270**)). Les membranes sont lavées, ensuite la révélation est effectuée comme décrit précédemment.

## **IX. Test de perméabilité**

Ce test est réalisé dans une chambre de perméabilité (Costar, France) où la partie inférieure contient le milieu ECBM2 basique sans SVF alors que la partie supérieure Transwell (0,4µm polysters, Costar, France) contient une monocouche de cellules HUVECs. Le Dextran-FITC (70 kDa, Sigma-Aldrich, France) est déposé dans la partie supérieure. À la fin, le milieu de la partie inférieure est analysé pour mesurer le flux du dextran-FITC à travers la monocouche endothéliale.

Les cellules HUVECs ( $2 \cdot 10^5$ ) ont étéensemencées dans les Transwell (0,4µm polysters, Costar, France) avec 100 µg/mL de fibronectine (BD Biosciences Pharmingen, Pont de Claix, France). Les HUVECs sont cultivées à 37°C jusqu'à confluence.

À l'état de confluence les HUVECs forment une monocouche. À ce stade, les HUVECs sont activées avec le TNF- $\alpha$  (1ng/mL) pendant 16 h et ensuite stimulées ou non avec RANTES/CCL5 ou un des mutants : 3Ala- ou E66A-RANTES (3 nmol/L) pendant 2 h.

D'autre part, afin d'étudier l'implication des GAGs ou les RCPGs (CCR1, CCR5) les HUVECs activées avec le TNF- $\alpha$  et stimulées par RANTES ont été pré-incubées ou non avec des enzymes.

bactériennes qui clivent les GAGs ou des anticorps neutralisants anti-CCR1 ou CCR5 pendant 1h comme décrit précédemment (**Tableau 3 p. 270**)

Ensuite, une solution de dextran-FITC (3 µg/mL) dilué dans l'ECBM2 basique sans SVF a été ajoutée dans la chambre supérieure. Après 20 min d'incubation à température ambiante, le milieu de la chambre inférieure de chaque condition est analysé avec un lecteur de microplaques à fluorescence TIKAN® à  $\lambda_{\text{excitation}} = 652 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 665 \text{ nm}$ .

## **X. Analyse statistique**

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  ESM. Le pourcentage d'inhibition était  $(D1-D2) / D1$ . La valeur **D1** est **la différence** entre le nombre de monocytes, arrêtés, adhérents ou ayant transmigré à travers les **HUVECs stimulés avec RANTES** et le nombre des monocytes, arrêtés, adhérents ou ayant transmigré à travers les **HUVECs non stimulés**. La valeur **D2** est **la différence** entre le nombre de monocytes arrêtés, adhérents ou ayant transmigré à travers des **HUVEC stimulés avec RANTES et pré-incubés** avec des enzymes de clivage GAG, des inhibiteurs pharmacologiques ou des anticorps et celui des monocytes arrêtés, adhérents ou ayant transmigrés à travers des **HUVECs pré-incubés** avec des enzymes qui clivent les GAGs, des inhibiteurs pharmacologiques ou des anticorps et stimulés avec RANTES. Le pourcentage d'inhibition était :  $((D1 - D2) / D1) \times 100$ .

L'arrêt, l'adhérence ou la migration trans-endothéliale des monocytes relatifs induits par RANTES ont été calculés en considérant l'effet de RANTES (valeur D1) est de 100%.

La signification statistique a été évaluée par un test d'analyse de variance (ANOVA) effectué avec le logiciel Statview (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, Californie, États-Unis). Une valeur de  $p < 0,05$  a été utilisée comme critère de signification statistique.