

Université de Montréal

**Étude de l'interaction CCL20/CCR6 et de son rôle dans  
l'homéostasie des lymphocytes T.**

Par :  
Sophie CORNEAU

Département de Médecine, Sciences biomédicales  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès Sciences (M. Sc.)  
en Sciences biomédicales

Avril 2003

©, Sophie Corneau, 2003





**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Étude de l'interaction CCL20/CCR6 et de son rôle dans  
l'homéostasie des lymphocytes T.**

Présenté par :  
Sophie CORNEAU

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Nathalie Labrecque : Président rapporteur

Claude Perreault : Directeur de recherche

Réjean Lapointe : Membre du jury

## Résumé

La souris LckOM présente un développement T extra-thymique au niveau des ganglions mésentériques et ceux-ci ressemblent alors beaucoup plus à un thymus qu'à un ganglion. Ceci en fait un modèle de choix pour étudier quels sont les facteurs impliqués dans le développement des thymocytes. Afin de déterminer si une chémokine pouvait être responsable du phénotype observé chez la souris LckOM, nous avons quantifié l'expression de 19 chémokines et récepteurs dans les organes lymphoïdes de souris normales et LckOM. Seule l'expression de CCL20 est fortement augmentée dans les ganglions de la souris LckOM, suggérant que cette molécule puisse être impliquée dans le développement des lymphocytes à cet endroit. Nous avons donc approfondi l'étude de l'expression de cette chémokine et nous avons remarqué que les transcrits de CCL20 sont présents dans les organes cutanéomuqueux ainsi que dans le thymus normal. L'expression de CCL20 dans les tissus d'une souris CCR6<sup>-/-</sup> est similaire à celle d'une souris normale, à l'exception des intestins. Nous avons alors voulu étudier plus en détail les interactions de CCL20 avec son récepteur CCR6. Lorsque nous avons reconstitué le système immunitaire de souris B6 avec un mélange égal de progéniteurs d'origine CCR6<sup>+</sup> et CCR6<sup>-/-</sup>, ces derniers semblent posséder un avantage d'ensemencement de la moelle ou de prolifération. Lors d'études de chimotaxie, nous démontrons que les thymocytes d'origine CCR6<sup>-/-</sup> sont capables de migrer sous l'effet de CCL20, tout comme les lymphocytes provenant d'une souris normale. Ces résultats suggèrent l'existence d'un récepteur fonctionnel autre que CCR6 pour CCL20. Par ailleurs, les cellules T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> d'une souris CCR6<sup>-/-</sup> prolifèrent moins que celles d'une souris B6. La proportion de cette population de cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires est aussi plus faible dans les ganglions périphériques d'une souris CCR6<sup>-/-</sup>. Ces résultats démontrent que CCL20 est la première molécule pouvant spécifiquement augmenter la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires *via* son interaction avec le récepteur CCR6.

## Summary

With this study, we sought to determine which factors could be involved in the thymic development of lymphocytes. To do so, we have used the LckOM mice whose lymph nodes are the site of a massive extrathymic development, making this organ more «thymus-like». To see if a chemokine was instrumental in the extrathymic T cell development observed in the LckOM lymph node (LN), we quantified the expression of 19 chemokines and chemokine receptors in the lymphoid organs of LckOM and normal mice. We found that only CCL20 was up-regulated in the LckOM LN. By looking at this chemokine's transcripts levels in other tissues, we found that CCL20 was mainly expressed in skin, lung, intestines, B6 thymus and LckOM LN. A similar expression profile was found in the tissues of CCR6<sup>-/-</sup> mice, except for the intestines where it was significantly lower. We then decided to further investigate the interactions involving CCL20 and its receptor CCR6. When we performed experiments on hematopoietic chimeras reconstituted with equal parts of CCR6<sup>+</sup> and CCR6<sup>-/-</sup> progenitors, we found that the latter population has an elusive advantage over CCR6<sup>+</sup> cells in their proliferation or in bone marrow seeding. Chemotaxis experiments demonstrated that thymocytes isolated from CCR6<sup>-/-</sup> mice are able to migrate towards CCL20, as are normal lymphocytes. Those results strongly suggest that CCL20 might exert its functions by interacting with another receptor than CCR6. Furthermore, we found that CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> T cells of CCR6<sup>-/-</sup> origin proliferate less extensively than those of CCR6<sup>+</sup> origin. The proportion of this CD4<sup>+</sup> memory T cells was also lower in the peripheral LN of the CCR6<sup>-/-</sup> mice. Those results demonstrate that CCL20 is the first molecule that could specifically regulate the CD4<sup>+</sup> memory T cell pool in the periphery *via* its interaction with CCR6.

## Table des matières

<b>Page de titre</b>	page i
<b>Identification du jury</b>	page ii
<b>Résumé en français</b>	page iii
<b>Résumé en anglais</b>	page iv
<b>Table des matières</b>	page v
<b>Liste des tableaux</b>	page vi
<b>Liste des figures</b>	page vii
<b>Liste des sigles et abréviations</b>	page viii
<b>Dédicace</b>	page x
<b>Remerciements</b>	page xi
<b>Corps de l'ouvrage</b>	
<u>1- Introduction</u>	page 1
1.1) <i>Le thymus</i>	page 1
1.2) <i>Le modèle LckOM</i>	page 2
1.3) <i>Les chémokines : généralités</i>	page 3
1.4) <i>Les chémokines : CCL20</i>	page 7
1.5) <i>Les récepteurs de chémokines : CCR6</i>	page 10
<u>2- Matériel et méthodes</u>	page 13
<u>3- Résultats</u>	page 20
<u>4- Discussion</u>	page 30
<u>5- Références</u>	page 42
<u>6- Légendes et figures</u>	page xii

## Liste des tableaux

Tableau I : Classification de quelques chémokines  
et de leurs récepteurs.

Page 6

Tableau II : Liste des oligonucléotides utilisés pour  
les réactions de RT-PCR.

Page 15

## Liste des figures

- Figure 1** : Comparaison de la protéine CCL20 humaine et murine. Page xiii
- Figure 2** : Expression de quelques chémokines et récepteurs de chémokines dans le thymus B6, le ganglion B6 et le ganglion LckOM. Page xv
- Figure 3** : Expression de CCL20 dans différents tissus chez les souris B6, LckOM et CCR6<sup>-/-</sup>. Page xvii
- Figure 4** : Régulation de l'accumulation des cellules T CD4<sup>+</sup> en périphérie sous l'effet des interactions CCL20/CCR6. Page xix
- Figure 5** : Chémotaxie des lymphocytes totaux isolés à partir de la rate, des ganglions et du thymus chez les souris B6 et CCR6<sup>-/-</sup>. Page xxi
- Figure 6** : Chémotaxie des thymocytes et des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires chez la souris B6. Page xxiii
- Figure 7** : Analyse phénotypique des sous-populations T CD4<sup>+</sup> mémoires chez les souris B6 et CCR6<sup>-/-</sup>. Page xxv
- Figure 8** : Prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> sous l'effet des interactions CCL20/CCR6. Page xxvii

## Liste des sigles et abréviations

CCL, CXCL, XCL, CX3CL: Chémokines

CCR, CXCR, XCR, CX3CR: Récepteurs de chémokines

DP: Double positif

SP: Simple positif

MO: Moelle Osseuse

OM: Oncostatin M

VIH: Virus d'Immunodéficience Humaine

kDa: kilo Dalton (unité de masse)

IL: Interleukine

TNF: Facteur Nécrosant de Tumeurs (*Tumor Necrosis Factor*)

LPS: Lipopolysaccharide

RANTES: *Regulated on Activation, Normal Thymus Expressed and Secreted*

IP-10: Protéine inductible par l'interféron (*Interferon inducible Protein 10*)

SLC: *Secondary Lymphoid organ Chemokine*

HEV: Veinules à endothélium cubique (*High Endothelial Venules*)

LARC: *Liver and Activation Regulated Chemokine*

MIP: *Macrophage Inflammatory Protein*

ARN(m): Acide Ribonucléique (messenger)

ICAM: Molécule d'adhésion intercellulaire (*Intercellular Adhesion Molecule*)

IFN: Interféron

NF: Facteur Nucléaire (*Nuclear Factor*)

NK: Tueuse Naturelle (*Natural Killer*)

TGF: Facteur de Croissance de Tumeur (*Tumor Growth Factor*)

PHA: Phytohémagglutinine

TCR: Récepteur de Cellules T (*T Cell Receptor*)

Th: T aidant (*T Helper*)

LFA: Antigène associé à la fonction lymphocytaire (*Lymphocyte Function associated Antigen*)

RT-PCR: Transcription Inverse-Réaction de polymérase en chaîne (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

DNase: enzyme digérant l'ADN

ADN(c): Acide Désoxyribonucléique (complémentaire)

M-MLV: Virus de la leucémie murine de Moloney (*Murine Moloney Leukemia Virus*)

BSA: Albumine Bovine Sérique (*Bovine Serum Albumin*)

FITC: Fluorescéine Isothiocyanate

PE: Phycoérythrine

PerCP: Protéine périnidique de la chlorophylle-a (*Perinidin Chlorophyll-a Protein*)

APC: Allophycocyanine

BrdU: 5-bromo-2'-désoxyuridine

HSA: *Heat Stable Antigen*

CLA: *Cutaneous Lymphocyte Antigen*

PBS: Saline tamponnée au phosphate (*Phosphate Buffered Saline*)

bp : paire de base (*base pair*)

*À ma mère  
Suzanne Caron  
1949-1998*

## Remerciements

Tout d'abord je remercie le Dr. Claude Perreault pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et ainsi m'avoir permis d'évoluer dans un environnement aussi stimulant. J'y ai beaucoup appris, non seulement sur l'immunologie mais aussi sur moi-même.

Ensuite, je remercie Sylvie Brochu pour toutes les discussions que nous avons eues, scientifiques ou non. Elles se sont avérées de précieuses aides aux moments critiques. «Du choc des cerveaux jaillit la lumière», paraît-il!

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire ayant contribué de près ou de loin à l'avancement de mon projet, et en particulier Gaël Dulude pour son travail de débroussaillage de chémokines et Isabelle Louis pour les expériences sur les greffes.

Finalement, je remercie ma fille Élyane qui me rappelle à chaque instant combien un détail, si minime soit-il, peut être important.

## 1- Introduction

### 1.1) *Le thymus*

Le thymus est un organe fascinant qui, bien qu'à l'étude depuis plus de 50 ans, n'a pas encore révélé tous ses secrets. Apparu avec l'arrivée du système immunitaire adaptatif, il est très conservé dans l'évolution chez tous les vertébrés à mâchoires. Dans la première année de la vie d'un individu, le thymus est indispensable à la formation de lymphocytes pouvant reconnaître et agir contre une multitude de pathogènes. Par contre, la quantité de nouveaux lymphocytes naïfs générés par le thymus diminue au fil du temps.

Lors de l'atrophie thymique, la partie fonctionnelle du thymus est peu à peu remplacée par du tissu fibreux et des graisses. Il y a quelques années encore, cette involution représentait sans doute un «mal nécessaire», permettant à l'organisme une économie d'énergie substantielle. Maintenant, à l'heure de la mondialisation, de plus en plus de gens se retrouvent exposés à des pathogènes que leur organisme n'a pas nécessairement rencontrés lors du développement actif de leur système immunitaire. Avec l'involution thymique, la lutte contre ces pathogènes devient donc plus ardue, en particulier pour les personnes âgées ou immunocompromises. La recherche de substituts pouvant restaurer ou remplacer la fonction thymique est donc une voie d'exploration des plus excitante, permettant au passage de lever le voile sur certains phénomènes thymiques encore obscurs.

## 1.2) Le modèle LckOM

Nous possédons un modèle murin où le transgène d'une cytokine inflammatoire, l'oncostatin M, est surexprimé sous le contrôle du promoteur proximal p56Lck. La surexpression se produit donc uniquement au niveau des organes lymphoïdes. La souris LckOM ainsi générée présente deux particularités frappantes: 1) une capacité unique à supporter un développement extra-thymique massif et 2) l'accumulation de cellules T matures présentant en grande majorité un phénotype mémoire.<sup>1,2,3</sup> Ce développement extra-thymique est présent uniquement dans les ganglions lymphatiques de la souris et est indépendant de la présence d'un thymus.<sup>2,3</sup> Cet effet de l'oncostatin M sur le développement de cellules T extra-thymiques dans le ganglion pourrait en fait représenter l'amplification d'une voie déjà présente et récemment caractérisée chez des souris *nude*.<sup>4</sup> Contrairement à ce qui a déjà été observé pour les cellules T intraépithéliales intestinales (un autre modèle de développement extra-thymique)<sup>5</sup>, les proportions des divers compartiments lymphocytaires présents à l'intérieur du ganglion mésentérique LckOM (double négatifs, double positifs et simple positifs) sont remarquablement similaires à celles que l'on retrouve dans un thymus normal.<sup>3</sup> De plus, ces cellules T matures qui s'accumulent en grande quantité peuvent être considérées comme étant fonctionnelles puisqu'elles possèdent la capacité de rejeter des cellules tumorales allogéniques.<sup>2</sup> Cependant, à l'instar du thymus, les facteurs responsables du recrutement et du développement des progéniteurs T à l'intérieur du ganglion mésentérique

de la souris LckOM, demeurent encore inconnus. Toutefois, nous croyons qu'il pourrait s'agir des mêmes facteurs dans les deux cas. Ainsi, l'élucidation de ces facteurs chez notre modèle LckOM pourrait révéler l'existence de cibles potentielles permettant d'améliorer et/ou de remplacer la fonction thymique réduite chez des individus âgés ou immunoincompétents. Cela pourrait aussi permettre de mieux comprendre de quelle façon le développement et l'homéostasie des cellules T sont régulés.

### *1.3) Les chémokines : généralités*

Étant donné qu'elles sont principalement reconnues pour leurs propriétés chémoattractantes, nous avons donc considéré les chémokines comme suspect numéro un dans le recrutement des progéniteurs au niveau du ganglion LckOM. Comptant plus de 50 ligands et 19 récepteurs, les chémokines constituent la famille de cytokines la plus importante à ce jour. Elles sont devenues le point de mire de nombreuses recherches depuis qu'il a été démontré que certains récepteurs de chémokines (CCR5 et CXCR4) pouvaient servir de co-récepteurs facilitant l'entrée du VIH dans les cellules. Les chémokines sont de petites protéines sécrétées d'environ 8 à 10 kDa à l'exception de la fractalkine (XCL1) qui possède un domaine transmembranaire.<sup>6</sup> Elles sont caractérisées par la présence de quatre résidus cystéines conservés dans leur portion N-terminale. D'ailleurs, c'est selon la position des deux premiers résidus cystéine conservés que l'on

classe les chémokines en quatre sous-groupes : CC ou  $\beta$  (bêta) où les deux cystéines sont adjacentes, CXC ou  $\alpha$  (alpha) où les deux cystéines sont séparées par un seul acide aminé, CX<sub>3</sub>C où les deux cystéines sont séparées par trois acides aminés et finalement XC chez qui la première cystéine est absente. Malgré le fait que leur rôle principal consiste à recruter et veiller au positionnement adéquat des leucocytes à la manière d'un chef d'orchestre, elles peuvent aussi être impliquées dans une multitude de phénomènes physiologiques<sup>7,8,9</sup>. Il est alors possible de diviser les chémokines selon leur fonction. Elles peuvent être inflammatoires, c'est-à-dire induites dans le cadre d'une réaction immune par des cytokines telles que IL-1 ou TNF- $\alpha$  ou par le LPS. Les chémokines inflammatoires peuvent être produites par plusieurs types cellulaires comme par exemple les cellules endothéliales, les cellules stromales ou les leucocytes eux-mêmes. Elles sont surtout actives au niveau des neutrophiles et autres cellules du système immunitaire inné<sup>10,11,12</sup>. IL-8<sup>13</sup>, RANTES<sup>14</sup> et IP-10<sup>15</sup> représentent quelques membres de ce groupe de chémokines. D'autre part, il existe certaines chémokines dites homéostatiques. Dans ce cas, elles sont exprimées de façon constitutive dans les organes lymphoïdes et participent à la compartimentalisation et au maintien de l'équilibre de diverses populations cellulaires à l'intérieur de ces organes<sup>16</sup>. Un bon représentant de ce groupe est la chémokine CCL21/SLC<sup>17,18,19</sup> produite par les cellules endothéliales des HEV et par les cellules stromales dans la zone T des ganglions lymphatiques<sup>20</sup>. Celle-ci permet aux lymphocytes portant le récepteur CCR7

à leur surface de pouvoir traverser les HEV et ainsi migrer dans les organes lymphoïdes secondaires.<sup>21,22,23,24</sup> CCL25, qui joue possiblement un rôle dans la régulation du trafic des prothymocytes à l'intérieur du thymus<sup>25</sup>, peut également être inclus dans ce groupe. Cependant, cette division n'est pas absolue et quelques chémokines, comme CCL20<sup>26</sup>, peuvent se retrouver dans les deux groupes. Il s'agit donc d'une cible des plus intéressantes et nous avons décidé d'y accorder un peu plus d'attention.

Tableau I : Classification fonctionnelle de quelques chémokines et de leurs récepteurs. Adapté de la référence 26.

Fonction	Chémokines	Récepteurs
Inflammatoire	MIP-1 $\alpha$ /CCL3, RANTES/CCL5, MCP-2/CCL8, MCP-3/ CCL7	CCR1
	MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13	CCR2
	MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13, RANTES/CCL5	CCR3
	Éotaxine-1/CCL11, Éotaxine-2/CCL24, Éotaxine-3/CCL26, MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4, RANTES/CCL5, MCP-2/CCL8, MEC/CCL28	CCR5
	I309/CCL1	CCR8
	MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11	CXCR3
	CXCL16	CXCR6
	Fractalkine/CX3CL1	CX3CR1
	TARC/CCL17, MDC/CCL22	CCR4
	MIP-3 $\alpha$ /CCL20	CCR6
Homéostatique	ELC/CCL19, SLC/CCL21	CCR7
	TECK/CCL25	CCR9
	CTACK/CCL27, MEC/CCL28	CCR10
	SDF-1/CXCL12	CXCR4
	BCA-1/CXCL13	CXCR5
	DC-CK1/CCL18	Inconnu

#### 1.4) Les chémokines : CCL20

CCL20, aussi appelée LARC<sup>27</sup>, Exodus<sup>28</sup> ou MIP-3 $\alpha$ <sup>29</sup>, est une chémokine bien particulière qui a surtout été étudiée chez l'humain. Tout d'abord, le gène codant pour CCL20 possède 4 exons et 3 introns ce qui représente une structure non classique pour une bêta chémokine. En effet, les gènes de ces dernières sont habituellement composés de 3 exons et 2 introns<sup>30</sup>. De plus, le gène de CCL20 est situé sur la bande q35-q36 du chromosome 2 tandis que la majorité des gènes codant pour les autres bêta chémokines sont regroupés sur la bande q11.2 du chromosome 17.<sup>27,30</sup>

CCL20 est une petite protéine d'environ 8kDa possédant 96 acides aminés dont les 26 premiers servent de peptide signal. La protéine mature est donc constituée de 70 acides aminés. Cependant, un épissage alternatif de l'ARN messager peut déléter un codon en N-terminal et ainsi générer un isoforme dont le premier acide aminé est une sérine au lieu d'une alanine. Il a toutefois été démontré que cet isoforme est tout aussi fonctionnel que la protéine originale et donc la signification de cet épissage reste encore inconnue.<sup>30</sup> Finalement, CCL20 possède une phénylalanine en position 23 et une alanine en position 28 alors que ces positions sont respectivement occupées par une tyrosine et une thréonine chez la majorité des autres bêta chémokines.<sup>31</sup> Tous ces faits font que CCL20 ne possède que peu d'homologie avec les autres membres de son sous-groupe (20% à 28%). Des résultats similaires ont été observés chez la souris malgré que la

séquence en acides aminés entre les protéines murine et humaine ne montre que 65% d'identité.<sup>31,32</sup> Ces différences se reflètent surtout aux extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine ainsi que dans la boucle suivant le pont disulfure formé par les acides aminés glycine-9 et phénylalanine-19 de la protéine humaine (Figure 1).<sup>33</sup> Plusieurs autres formes tronquées de la protéine, en C-terminal cette fois, ont aussi été identifiées chez l'humain.<sup>34</sup>

Chez l'humain, l'ARN messenger de CCL20 a été détecté par Northern blot dans les poumons, le thymus, les ganglions périphériques, les intestins, le foie foetal, la prostate, les testicules ainsi que dans les tissus inflammés comme les amygdales, l'appendice et les lésions psoriatiques de la peau.<sup>27,28,35,36,37,38</sup> Certains auteurs ont aussi noté une forte expression au niveau du foie<sup>38</sup>, d'autres non.<sup>28,37</sup> Les cellules épithéliales comme les kératinocytes constituent la principale source cellulaire de CCL20 mais les cellules endothéliales, les cellules dendritiques, les fibroblastes, les cellules T et les monocytes activés peuvent aussi en contenir.<sup>28,29,34,36,37,39,40</sup> Chez la souris, la littérature mentionne que le thymus, l'intestin, le côlon et l'appendice sont positifs pour l'expression de CCL20 en Northern blot. Toutefois, cette expression peut être induite par le LPS dans les ganglions, la rate, les poumons et le foie.<sup>31,32</sup>

Le manque de similitude avec les autres bêta chémokines se reflète aussi au niveau de la fonction puisque CCL20 n'exerce pas son action

chémoattractante sur les mêmes types cellulaires. En effet, il a été démontré que CCL20 attire surtout les cellules dendritiques immatures<sup>37,41</sup>, les cellules B<sup>42,43</sup> ainsi que les cellules T activées<sup>44</sup> mais pas les monocytes<sup>27</sup> qui sont pourtant reconnus comme étant la cible principale des bêta chémokines. Des rôles possibles dans la régulation constitutive du trafic des cellules de Langerhans vers la peau<sup>45</sup> ainsi que dans l'adhésion de lymphocytes T mémoires à ICAM-1 *in vitro*<sup>46</sup> lui ont aussi été attribués.

Une autre particularité de CCL20 est qu'il s'agit d'une chémokine à la fois homéostatique et inflammatoire. En effet, bien qu'elle soit exprimée de façon constitutive dans plusieurs tissus, son expression peut être régulée par plusieurs cytokines présentes lors d'une réaction inflammatoire, par exemple TNF- $\alpha$ , IL-1 et IFN- $\gamma$ , tout dépendant du type cellulaire impliqué.<sup>34,39,47,48</sup> Cependant, certaines études démontrent que les voies de signalisation enclenchées sous l'effet de ces cytokines peuvent être différentes. Scapini *et al.* ont démontré que des neutrophiles stimulés par le TNF- $\alpha$  peuvent produire CCL20 et que ce phénomène est modulé négativement par l'interleukine-10.<sup>49</sup> Il semble que cette augmentation de l'expression de CCL20 induite par le TNF- $\alpha$  se produise directement lorsque la sous-unité p65 (RelA) du facteur de transcription NF- $\kappa$ B se lie au promoteur de CCL20.<sup>50,51</sup> Par ailleurs, il a été démontré que l'activation de la voie p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) joue un rôle important dans la régulation tardive de CCL20 médiée par le LPS et l'INF- $\gamma$ .<sup>52</sup> De plus, ces

mêmes auteurs ont montré que le formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) active rapidement l'expression de CCL20 par la voie *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) p42/44 en stabilisant son ARN messenger. Finalement, il semble que CCL20 forme un couple "monogame" avec son récepteur CCR6, ce qui contraste avec le fait que la majorité des chémokines sont redondantes, une chémokine pouvant lier plusieurs récepteurs et un récepteur pouvant lier plusieurs chémokines.

#### 1.5) Les récepteurs de chémokines : CCR6

À la manière de son ligand, le récepteur CCR6 fait lui aussi bande à part de son sous-groupe. En effet, le gène codant pour ce récepteur serpentine à 7 domaines transmembranaires se trouve sur la bande q27 du chromosome 6 alors que ceux de la majorité des autres récepteurs à bêta chémokines sont situés sur la bande p21 du chromosome 3<sup>40,41,44</sup>. Phylogénétiquement parlant, CCR6 se trouve ainsi plus près de CXCR1 et CXCR2.<sup>37,41</sup> De plus, le gène de CCR6 humain comporte 2 exons, contrairement à celui de CCR6 murin et des autres récepteurs à bêta chémokines qui n'en possèdent qu'un, et code pour une protéine de 367 acides aminés. Par contre, lorsque l'on compare la protéine CCR6 humaine à la protéine CCR6 murine, cette dernière possède 8 acides aminés de moins à son extrémité N-terminale et un de plus à son extrémité C-terminale. Elle possède aussi deux sites potentiels de N-glycosylation de moins.<sup>31</sup>

Que ce soit chez l'humain ou chez la souris, l'ARN messenger de CCR6 est exprimé principalement dans les tissus lymphoïdes, les testicules et le petit intestin ainsi que chez les lymphocytes B et T et les cellules dendritiques myéloïdes immatures.<sup>31,38,41,53</sup> Les monocytes et les cellules NK n'expriment pas ce récepteur<sup>38</sup> mais il semble que les cellules NKT peu cytotoxiques contiennent des transcrits de CCR6.<sup>54</sup> L'expression de ce récepteur serait plus forte parmi les cellules CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup><sup>44</sup> ainsi que chez des cellules T CD4<sup>+</sup> de souris âgées.<sup>55</sup> Finalement, l'expression de CCR6 au niveau des centres germinatifs est controversée.<sup>43,56</sup>

Tout comme CCL20, l'expression de CCR6 peut être régulée par différentes cytokines telles que TGF-1 $\beta$ <sup>57</sup>, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et par la PHA.<sup>58</sup> Il semble que la régulation de CCR6 soit un événement tardif et il a été démontré que le mode d'activation utilisé influence fortement l'expression du récepteur à la surface des cellules.<sup>59</sup> Par exemple, l'expression de CCR6 est diminuée: 1) lors de la maturation pour les cellules dendritiques<sup>60</sup> et 2) après l'engagement du TCR pour les cellules T.<sup>61</sup> Par ailleurs, l'expression de CCR6 semble plus susceptible d'être régulée à la baisse chez les cellules T CD8<sup>+</sup> ce qui suggère une différence fonctionnelle de ce récepteur entre les cellules CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.<sup>62</sup> En fait, il a été démontré que, chez les CD8<sup>+</sup>, CCR6 est exprimé uniquement sur les cellules de phénotype mémoire et non sur les cellules naïves ou effectrices.<sup>63</sup> Il a également été démontré que ce

récepteur est surtout présent sur des cellules de type Th-1.<sup>61,62,64</sup> L'expression de CCR6 colocalise avec la molécule d'adhésion LFA-1 et permet ainsi d'augmenter l'adhésion des cellules T sur les cellules endothéliales activées.<sup>65</sup> Ceci suggère donc une fonction alternative de ce récepteur. Un rôle de recrutement séquentiel des cellules dendritiques lui a aussi été attribué.<sup>66</sup> Finalement, le fait que CCR6 peut se lier aux bêta défensines<sup>67</sup> suggère que ce récepteur peut posséder des propriétés antimicrobiennes.

Le but premier de ce projet était tout d'abord de déterminer si une chémokine pouvait être impliquée dans les étapes précoces de développement extra-thymique. Après avoir identifié CCL20 comme molécule suspecte, nous avons voulu examiner sa distribution tissulaire. Ainsi, nous avons remarqué chez la souris déficiente en CCR6 (CCR6<sup>-/-</sup>) une expression de CCL20 presque identique à celle d'une souris normale. Nous avons également voulu étudier plus en détail le rôle des interactions CCL20/CCR6 dans l'homéostasie des lymphocytes T. Nous avons ainsi pu déterminer que ces interactions permettent de réguler la taille du réservoir de cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires en périphérie en favorisant la prolifération de ces cellules.

## 2- Matériel et méthodes

### *Animaux*

Les souris C57BL/6 (B6; normales) et B6.SJL-*Ptprc<sup>a</sup>Pep3<sup>b</sup>*/BoyJ (B6.SJL; Ly 5.1<sup>+</sup>) ont été obtenues chez «*The Jackson Laboratory*» (Bar Harbor, ME). Les souris déficientes en CCR6 (CCR6<sup>-/-</sup>)<sup>68</sup> ont été gracieusement fournies par le Dr. S. A. Lira (Schering-Plough Research Institute). Les souris transgéniques LckOM sur fond C57BL/6 ont été décrites en détails précédemment.<sup>2,3</sup> Les colonies ont été maintenues et hébergées sous micro-isolateurs ventilés et stériles dans des conditions spécifiques au centre de recherche Guy-Bernier selon les standards du Conseil Canadien de Protection des Animaux.

### *Quantification de l'expression de l'ARNm par RT-PCR*

Pour l'analyse par RT-PCR semi-quantitatif, l'ARN total fut isolé à partir des différents organes murins à l'aide du kit RNeasy<sup>®</sup> pour extraction de l'ARN total (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) en suivant les instructions du manufacturier. Après avoir été traité à la DNase I (Ambion, Austin, TX ) pour éliminer tout ADN génomique contaminant, l'ARN total fut divisé en deux parties: une partie fut inversement transcrite en ADNc et l'autre a subi le même traitement mais sans l'ajout de l'enzyme transcriptase inverse (pseudo transcrite). Les ADNc premier brin furent générés en utilisant des

hexamères aléatoires et la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen, Burlington, Canada). Les séquences d'intérêt ont ensuite été amplifiées par PCR dans des réactions contenant l'équivalent de 100 ng d'ARN. Un marquage radioactif des réactions de PCR fut réalisé en utilisant 2.5 µCi d' $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  déoxycytidine-5'-triphosphate (dCTP) et les produits furent séparés par migration dans un gel de polyacrylamide 5%. Après le séchage du gel, les produits furent quantifiés à l'aide d'un PhosphorImager (GS-525, Bio-Rad Laboratories, ON, Canada) et du logiciel Multi-Analyst<sup>®</sup> (Bio-Rad). Les réactions de PCR ont été réalisées en triplicata lors d'au moins trois expériences indépendantes. Aucun produit PCR spécifique n'a été détecté lorsque le mélange pseudo-transcrit fut utilisé comme gabarit. Les conditions de PCR étaient : une dénaturation initiale de 4 min à 94°C, puis 25 à 30 cycles à 94°C pour 30 s, 55°C pour 30 s, 72°C pour 30 s, suivi d'un cycle d'extension finale à 72°C pour une durée de 10 min. Les contrôles internes d'ARN ribosomal 18S «*alternate QuantumRNA™*» avec les compétimères d'Ambion™ (Ambion, Austin, TX) ont été utilisés. Le ratio optimal d'oligonucléotides:compétimères 18S fut déterminé pour chaque gène selon les instructions du manufacturier et varient entre 1:9, 1:10, 1:11 ou 1:12. Les oligonucléotides sens et antisens utilisés pour les réactions de RT-PCR sont indiqués dans le tableau II à la page suivante.

**Tableau II** : Liste des oligonucléotides utilisés pour les réactions de RT-PCR.

<b>Cible</b>	<b>Séquence des oligonucléotides</b>	<b>Taille du produit</b>
<b>CCL2</b>	5'-CCC AAT GAG TAG GCT GGA GA-3' 5'-CCT TAG GGC AGA TGC AGT TT-3'	202 bp
<b>CCL4</b>	5'-TGT CTG CCC TCT CTC TCC TC-3' 5'-GTC TGC CTC TTT TGG TCA GG-3'	201 bp
<b>CCL17</b>	5'-CCA TCG TGT TTC TGA CTG TCC-3' 5'-TTG TGT TCG CCT GTA GTG CAT-3'	250 bp
<b>CCL19</b>	5'-CTC GGC CTC TCA GAT TCT TG-3' 5'-GTC ACA GAC AGG CAG CAG TC-3'	189bp
<b>CCL20</b>	5'-CTT GCT TTG GCA TGG GTA CT-3' 5'-TCA GCG CAC ACA GAT TTT CT-3'	200 bp
<b>CCL21</b>	5'- TCC GAG GCT ATA GGA AGC AA-3' 5'-TTA GAG GTT CCC CGG TTC TT-3'	199 bp
<b>CCL22</b>	5'- GCC CTC TGG TCA TTA GAC ACC TG-3' 5'-TCG TTG GCA AGG CTC TTG CTG-3'	413 bp
<b>CCL25</b>	5'-GCA ACC TAC GTG CTG TGA GA-3' 5'-CGC TTG TAC TGT TGG GGT TC-3'	201 bp
<b>CXCL12</b>	5'-TCC TCT TGC TGT CCA GCT CT-3' 5'-GGC ACA GTT TGG AGT GTT GA-3	219 bp
<b>XCL1</b>	5'-GCT GAT CCA GAA GCC AAA TG-3' 5'-CAA TGG GTT TGG GAA CTG AG-3'	200 bp
<b>CCR1</b>	5'-AGC CTG AAG CAG TGG AAG AG-3' 5'-CAG ATT GTA GGG GGT CCA GA-3'	201 bp
<b>CCR2</b>	5'-TGG CTG TGT TTG CCT CTC TA-3' 5'-CCT ACA GCG AAA CAG GGT GT-3'	200 bp
<b>CCR4</b>	5'-ATG GCG TTA ACA AGC TCC AC-3' 5'-CAC TCA AGG GCT CAT TGT CA-3'	200 bp
<b>CCR5</b>	5'-GTG TTT GCC TCT CTC CCA GA-3' 5'-CGA AAC AGG GTG TGG AGA AT-3'	200 bp
<b>CCR6</b>	5'- TAC GCT CCA GAA CAC TGA CG-3' 5'-CCC AAA GAA CAG CTC CAG TC-3'	200 bp
<b>CCR7</b>	5'-TGC TTC AAG AAG GAT GTG CGG-3' 5'- GAG GAA AAG GAT GTC TGC CAC G-3'	151 bp
<b>CCR9</b>	5'-CCA TGA TGC CCA CAG AAC TC-3' 5'-TGA CCT TCA GGA TCA AGA CAG C-3'	660 bp
<b>CXCR4</b>	5'-GTC TAT GTG GGC GTC TGG AT-3' 5'-ACA GGA GAG GAT GAC GAT GC-3'	204 bp
<b>DARC</b>	5'- CAA GGG GCT GAA GAT AGC AC-3' 5'-GGC TTC TGT CAC ATT CAG CA-3'	190bp

### *Chémotaxie*

Tout d'abord, une suspension cellulaire fut obtenue à partir des divers organes totaux fraîchement prélevés. Les érythrocytes furent éliminés par lyse hypotonique dans une solution de Tris-NH<sub>4</sub>Cl. Après 2 lavages, les cellules furent comptées à l'hémacymètre et resuspendues à 30x10<sup>6</sup> cellules/mL dans une solution de RPMI 1640 contenant 0.5% BSA. Une partie fut conservée pour caractériser l'échantillon de départ. La protéine CCL20 murine recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) fut diluée à des concentrations variant de 0 à 1000ng/mL dans le RPMI/BSA et un volume de 600µL fut pipeté dans le puits du bas d'un appareil Transwell (Costar #3421). Un filtre de polycarbonate fut déposé sur le puits et 100µL de la suspension cellulaire fut ajouté dans la chambre du haut ainsi formée et le tout fut incubé à 37°C/5% CO<sub>2</sub> pour 3-4h. Après la migration, les plaques furent centrifugées à 1800rpm 10 min et les cellules ayant traversé la membrane et migré dans le puits du bas furent récoltées en prenant soin de bien laver le dessous du filtre puis elles furent comptées à l'hémacymètre. Finalement, les cellules ayant migré ainsi que celles de l'échantillon de départ furent marquées avec divers anticorps selon la méthode standard et le tout fut analysé par flux cytométrie. La méthode employée fut la même dans les cas où seules les cellules CD4<sup>+</sup> furent utilisées. Toutefois la suspension cellulaire de départ fut préalablement déplétée en cellules B et T CD8<sup>+</sup> à l'aide de billes magnétiques anti-B220 et anti-CD8 (Dynal, Oslo, Norvège) selon les recommandations du fabricant.

### *Cytométrie en flux*

Le marquage de surface a été réalisé tel que décrit précédemment<sup>3</sup> et les cellules ont été analysées à l'aide d'un cytomètre en flux FACScalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson, Mountain View, CA) à l'aide du logiciel CellQuest. Les réactifs suivants ont été obtenus chez BD Biosciences: anti-CD4 conjugué au PerCP ou à l'APC, anti-CD8 conjugué à l'APC, anti-BrdU, anti-CLA humain, anti-CD3, anti-CD24 (HSA), anti-CD44, anti-CD62L et anti-Thy1.2 conjugués au FITC, anti-CD19, anti-CD44, anti-CD62L, anti-CD69, anti-LPAM et anti-IAb conjugués au PE, anti-Ly 5.1 et anti-Ly 5.2 couplés à la biotine et streptavidine conjuguée au PE, au PerCP ou à l'APC.

### *Marquage au BrdU*

Le marquage au BrdU fut réalisé tel que décrit par Tough and Sprent<sup>69</sup>. Brièvement, suite au marquage de surface, les cellules furent resuspendues dans une solution froide de NaCl 0.15 M. Elles furent ensuite fixées par l'ajout goutte à goutte d'éthanol 95% froid, incubées sur glace 30 min, puis lavées avec une solution de PBS. Les cellules furent ensuite perméabilisées pendant 30 min à l'aide d'une solution de PBS contenant 1% de paraformaldéhyde et 0.01% de Tween 20, centrifugées, puis incubées 30 min avec 50 KU de DNase I (Sigma Chemical Co.) dans 0.15 M NaCl et 4.2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 5. Après avoir été lavées, les cellules furent incubées 30 min

avec l'anticorps anti-BrdU conjugué au FITC puis relavées 2 fois avec une solution de PBS pour finalement être analysées par cytométrie en flux.

### *Thymectomies*

À l'âge de 4 à 5 semaines, les souris furent anesthésiées par injection intrapéritonéale de 75 mg/kg de pentobarbital sodique (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario, Canada), et le thymus fut aspiré à l'aide d'une canule introduite au dessus du noeud suprasternal. La complétion de l'opération fut vérifiée pour chaque animal par inspection visuelle au moment du sacrifice. Les transplantations furent réalisées au moins 2 semaines post-opération.

### *Greffes de moelle osseuse*

La moelle osseuse récoltée à partir des fémurs et des tibias des souris donneuses CCR6<sup>-/-</sup> (OM<sup>-</sup>CCR6<sup>-/-</sup>), B6 (OM<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>) et LckOM (OM<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) fut déplétée en cellules T à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-Thy-1.2 mAb (Cedarlane, Hornby, Canada) et en utilisant du sérum de lapin (*Low-Tox-M rabbit complement*, Cedarlane) comme source de complément. L'efficacité de la déplétion fut vérifiée par cytométrie en flux. Les chimères hématopoïétiques furent générées en injectant ces cellules de moelle

osseuse à des souris receveuses (B6) irradiées (10 Gy). Dans le cas de greffes avec des cellules provenant de donneuses LckOM, les souris receveuses furent thymectomisées en plus d'être irradiées.

### 3- Résultats

#### *3.1) Quantification de l'expression de l'ARNm par RT-PCR*

Afin de déterminer si une chémokine pouvait effectivement jouer un rôle dans le développement extra-thymique observé chez la souris LckOM, nous avons tout d'abord quantifié par RT-PCR l'expression de 10 chémokines et 9 récepteurs de chémokines reconnus pour être exprimés dans les organes lymphoïdes (Figure 2A). Nous avons choisi de procéder par RT-PCR puisque cette technique est plus sensible que le Northern blot et cela pouvait donc nous permettre de détecter de faibles niveaux d'expression le cas échéant. Ces travaux, réalisés par Gaël Dulude, nous ont permis d'observer deux différences significatives entre la souris B6 et la souris LckOM. Premièrement, l'expression d'une de ces chémokines, CCL20, est fortement augmentée dans le ganglion LckOM et dans le thymus B6 comparativement au ganglion B6 (Figure 2B,C). La spécificité des oligonucléotides utilisés pour l'amplification de CCL20 fut confirmée par le séquençage des produits PCR. Deuxièmement, l'expression de CCL25 n'est pas augmentée dans le ganglion LckOM bien qu'elle soit plus de 100 fois supérieure dans un thymus normal, toujours en comparant avec le ganglion B6 (Figure 2A). La comparaison des ganglions B6 et LckOM nous a aussi permis d'observer une augmentation de 2 à 3 fois des transcrits de CCL2, CCL4, CXCR4 et CCR9 ainsi qu'une diminution de 6 à 7 fois de ceux de CCL17 et CCL22 (Figure 2A).

Afin de vérifier que l'expression de CCL20 était augmentée uniquement dans le ganglion LckOM, nous avons quantifié l'expression de l'ARN messager de cette chémokine dans plusieurs organes chez la souris LckOM et aussi chez la souris B6 normale, toujours par RT-PCR (Figure 3). Nous avons trouvé que l'expression de l'ARNm de CCL20 est surtout présent dans les intestins, les poumons, la peau, le thymus B6 et plus faiblement dans le foie. Nous ne remarquons aucune expression de cette chémokine dans le rein, l'estomac, le coeur, le cerveau et la rate. Aucune différence statistiquement significative ne fut observée entre l'expression de CCL20 chez les souris B6 et LckOM excepté au niveau du ganglion LckOM où l'expression est supérieure, tel qu'observé précédemment (Figure 2). Nous avons aussi mesuré le niveau d'expression de CCL20 dans les organes de souris déficientes en CCR6, le seul récepteur connu de CCL20 jusqu'à présent (Figure 3). Le patron d'expression de CCL20 retrouvé chez la souris CCR6<sup>-/-</sup> est le même que celui retrouvé chez une souris normale et aucune différence statistiquement significative ne fut observée entre les deux souris sauf au niveau des intestins.

### *3.2) Rôle de CCL20 dans l'homéostasie des cellules T*

Afin de déterminer si CCL20 joue un rôle dans le développement extra-thymique des cellules T chez la souris LckOM, nous avons procédé à

l'analyse de souris chimères hématopoïétiques. Le système immunitaire de souris receveuses thymectomisées et irradiées a été reconstitué avec un mélange 50:50 de moelle osseuse T-déplétée provenant de souris donneuses CCR6<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> (Ly5.1<sup>+</sup>) et CCR6<sup>-/-</sup>OM<sup>-</sup> (Ly5.1<sup>-</sup>). Nous avons choisi de procéder ainsi puisque les essais de compétition représentent l'approche la plus sensible pour évaluer l'influence d'une molécule quelconque sur le développement cellulaire<sup>70,71</sup>. De plus, comme l'oncostatin exerce son action de façon paracrine, les cellules OM<sup>+</sup> et OM<sup>-</sup> contribuent au développement extra-thymique de la même manière<sup>3</sup> et la capacité de repopulation de ces cellules peut être comparée directement dans le même individu. Ces travaux, réalisés par Isabelle Louis, nous ont permis d'observer que la proportion de cellules CCR6<sup>-/-</sup> retrouvée parmi les cellules de la moelle osseuse et des ganglions (doubles positifs, CD4 et CD8 simples positifs) est plus grande que celle des cellules CCR6<sup>+</sup> (Figure 4A). Ceci signifie donc que les progéniteurs hématopoïétiques d'origine CCR6<sup>-/-</sup> possèdent un étrange avantage sur les cellules CCR6<sup>+</sup> en ce qui concerne leur prolifération et/ou leur capacité d'ensemencer la moelle. Ces résultats suggèrent aussi que l'interaction de CCL20 avec CCR6 n'est pas essentielle pour le recrutement des progéniteurs dans le ganglion LckOM. Cependant, il n'est pas exclu qu'un autre récepteur puisse prendre le relais à cette étape du développement extra-thymique.

Un autre fait intéressant a capté notre attention. En effet, les splénocytes  $CD4^+$  de ces chimères sont enrichis en cellules d'origine  $CCR6^+$ , mais pas les  $CD8^+$  (Figure 4A). Il apparaît donc possible que les interactions CCL20/CCR6 soient en mesure de réguler la taille du réservoir de cellules T  $CD4^+$  dans la rate d'une souris en présence d'oncostatin. Nous avons donc voulu vérifier si ce phénomène pouvait aussi se produire dans un environnement dépourvu d'oncostatin, c'est-à-dire au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) d'une souris non transgénique pour l'oncostatin. Nous avons employé la même méthode que précédemment mais cette fois-ci, des receveuses normales euthymiques et irradiées furent reconstituées avec un mélange 50:50 de moelle osseuse T-déplétée provenant de souris donneuses  $OM^+CCR6^+$  ( $Ly5.1^+$ ) et  $OM^+CCR6^{-/-}$  ( $Ly5.1^-$ ). Les résultats obtenus ici correspondent à ceux mentionnés plus haut. Les cellules d'origine  $CCR6^{-/-}$  sont plus abondantes que celles d'origine  $CCR6^+$  dans la moelle osseuse et le thymus et on remarque un enrichissement sélectif des cellules T  $CD4^+$  d'origine  $CCR6^+$  dans la rate (Figure 4B). Donc il est probable que les interactions *via* CCR6 régulent l'abondance des cellules T  $CD4^+$  dans les organes lymphoïdes secondaires et ce, indépendamment de leur origine thymique ou extra-thymique. Ceci soulève donc deux hypothèses. Les interactions entre CCL20 (produit par les cellules stromales)<sup>72</sup> et CCR6 à la surface des cellules T  $CD4^+$  1) favorisent la survie et/ou l'expansion de ces cellules en périphérie ou 2) favorisent l'émigration de ces cellules des organes lymphoïdes primaires

vers la périphérie. Le fait que les cellules CD4<sup>+</sup> d'origine CCR6 déficiente ne s'accumulent pas dans les organes lymphoïdes primaires est un fort argument en défaveur de cette dernière hypothèse.

### 3.3) Réponse à CCL20

La littérature ne fournissant que peu de données à ce sujet, nous avons voulu évaluer la réponse à CCL20 par des lymphocytes provenant d'une souris normale. Par ailleurs, les résultats obtenus à partir des expériences mentionnées dans la section précédente (Figure 4 A,B) viennent remettre en doute la question de la monogamie entre le couple formé par CCL20 et son récepteur, CCR6. Afin de vérifier la contribution de CCR6 à la réponse de cellules d'origine B6, nous avons comparé cette réponse avec celle de cellules d'origine CCR6<sup>-/-</sup> (Figure 5). Pour ce faire, nous avons effectué des essais de chémotaxie à l'aide de chambres Transwell et nous avons analysé la proportion et le phénotype des cellules capables de traverser la membrane sous l'effet de diverses concentrations de CCL20. Le pourcentage de migration observé fut calculé en fonction du nombre de cellules de chacune des sous-population et non en fonction du nombre total de cellules de chaque organe. En ce qui concerne les cellules des organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques; Figure 5 B,C), nous observons une faible migration des cellules d'origine B6, mis à part les cellules B. En ce qui concerne le thymus B6, les résultats indiquent une migration de tous les

types cellulaires avec un pic de réponse se situant à une concentration de 100nM de CCL20. Nous remarquons aussi que, parmi les lymphocytes T isolés à partir d'un thymus normal, il semble que les cellules T CD4<sup>+</sup> migrent davantage que les autres types cellulaires. Cette observation n'est toutefois pas statistiquement significative. En ce qui concerne la souris CCR6<sup>-/-</sup>, nous avons observé une absence de migration des cellules isolées à partir des ganglions lymphatiques et de la rate de ces souris. Toutefois, la grande surprise fut le résultat obtenu pour les thymocytes provenant de la souris déficiente en CCR6. En effet, nous remarquons pour ces cellules un profil de migration similaire à celui observé pour des thymocytes normaux, bien que dans des proportions un peu plus faibles. De plus, le pic de réponse pour les cellules CCR6<sup>-/-</sup> se situe à 10nM de CCL20, ce qui signifie que ces cellules nécessitent 10 fois moins de chémokine pour produire sensiblement la même réponse que des cellules normales. Cela laisse envisager une réponse plus rapide et/ou plus spécifique. De même, ces résultats suggèrent la présence d'un récepteur fonctionnel autre que CCR6, du moins au niveau du thymus d'une souris CCR6<sup>-/-</sup>. Par contre, l'absence de migration à des concentrations de CCL20 plus élevées que 10nM pour les cellules CCR6<sup>-/-</sup> pourrait être due à une désensibilisation plus rapide.

Par la suite, nous avons voulu vérifier s'il y avait une sous-population particulière qui était responsable de la migration préférentielle observée au niveau des cellules CD4<sup>+</sup> thymiques. Comme précédemment, nous avons

procédé par essais Transwell mais cette fois-ci en utilisant des marqueurs de maturation/activation puisque certaines études réalisées chez l'humain démontrent que les réponses à CCL20 sont limitées aux cellules mémoires/activées.<sup>44,59</sup> Nous avons choisi le marqueur HSA puisque les thymocytes immatures l'expriment fortement et que son expression est perdue avec la maturation. Nous avons également choisi CD69 puisque c'est un marqueur d'activation précoce qui est présent sur les thymocytes en sélection positive. Ce marqueur a aussi été choisi parce que nous nous sommes demandé si le processus de sélection dans le thymus pouvait suffisamment activer les cellules au point où elles pourraient devenir sensibles à CCL20. Les résultats obtenus (Figure 6) montrent que l'action chémoattractante exercée par CCL20 sur les sous-populations  $\text{HSA}^+\text{CD69}^+$ ,  $\text{HSA}^+\text{CD69}^-$  et  $\text{HSA}^-\text{CD69}^-$  n'est pas statistiquement différente (Figure 6A) bien qu'elle semble plus élevée pour les deux premières qui représentent respectivement les thymocytes très immatures et les thymocytes matures prêts à sortir du thymus. Nous avons aussi caractérisé les réponses obtenues à partir de lymphocytes isolés la rate et des ganglions lymphatiques en utilisant le marqueur CD44. Les résultats obtenus montrent qu'en périphérie, les cellules  $\text{CD4}^+$  répondant à CCL20 sont majoritairement  $\text{CD44}^{\text{hi}}$ , c'est-à-dire de phénotype mémoire/activé (Figure 6 B,C).

### 3.4) Étude des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires

Comme nous n'observons pas une absence totale de cellules CD4<sup>+</sup> d'origine CCR6<sup>-/-</sup> dans la rate des chimères et comme il a été démontré que l'expression de CCR6 à la surface des cellules T se situe principalement sur les cellules de phénotype mémoire, nous pensons que seules ces cellules pourraient être affectées par l'absence de CCR6. Nous avons donc voulu vérifier si des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires se comportaient de façon différente en absence d'interaction CCL20/CCR6. Pour ce faire, nous avons tout d'abord isolé les lymphocytes à partir de la rate, des ganglions mésentériques et des ganglions périphériques (inguinal, axial, brachial) de souris normales et de souris CCR6 déficientes. Puis, nous avons procédé à l'analyse phénotypique de ces cellules en cytométrie en flux à l'aide des marqueurs CD44 et CD62L. Comme on peut le voir à la figure 7A, la proportion de lymphocytes T mémoires, c'est-à-dire CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>, est similaire chez les deux souris dans la rate ainsi que dans les ganglions mésentériques. Cependant, cette proportion est plus faible dans les ganglions périphériques de la souris CCR6<sup>-/-</sup>.

Comme nous n'avons remarqué qu'une diminution et non pas une absence totale de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires chez la souris CCR6<sup>-/-</sup>, nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle seule une sous-population de cellules T mémoires serait affectée par l'absence de CCR6. Nos études démontrent

que, dans les organes non-lymphoïdes, l'expression des transcrits de CCL20 est restreinte aux tissus cutanéomuqueux (Figure 3A). Aussi, certaines études réalisées chez l'humain ont montré que presque tous les CD4<sup>+</sup> mémoires  $\alpha_4\beta_7^+$  (se rendant à l'intestin), ainsi qu'une bonne partie des CD4<sup>+</sup> mémoires CLA<sup>+</sup> (se rendant à la peau), expriment CCR6 à leur surface.<sup>44,73</sup> Nous avons donc analysé ces deux sous-populations en cytométrie en flux à partir de la rate et des ganglions de souris normales et CCR6<sup>-/-</sup>. Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe aucune différence statistiquement significative entre les deux types de souris (Figure 7B).

Afin de déterminer quel pouvait être le facteur responsable de cette diminution de la proportion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires chez la souris CCR6<sup>-/-</sup>, nous avons comparé le taux de prolifération de ces cellules chez des souris normales et CCR6<sup>-/-</sup>. Les souris ont été abreuvées avec de l'eau supplémentée en BrdU pendant 10 jours et les sous-populations CD62L<sup>hi</sup> et CD62L<sup>lo</sup> de cellules CD4<sup>+</sup> furent analysées séparément puisque leur taux de prolifération est différent.<sup>69</sup> Les résultats, obtenus par Isabelle Louis, montrent que la proportion de cellules BrdU<sup>+</sup> (ayant proliféré) parmi la population CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup> est plus faible chez une souris CCR6<sup>-/-</sup> (Figure 8). Puisque la proportion de cellules apoptotiques parmi les populations CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> et CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>lo</sup> est similaire chez les deux souris<sup>72</sup>, ces résultats suggèrent que, chez une souris normale, les interactions CCL20/CCR6

régulent l'accumulation des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires en périphérie en augmentant leur taux de prolifération.

#### 4- Discussion

Les mécanismes et les molécules régissant l'entrée des progéniteurs hématopoïétiques dans le thymus sont malheureusement encore inconnus. Nous possédons toutefois un outil unique pour l'étude de tels phénomènes, la souris LckOM. Comme il existe quelques études selon lesquelles l'entrée des progéniteurs dans le thymus implique un mécanisme faisant intervenir les chémokines<sup>74,75</sup>, nous avons décidé d'analyser l'expression de quelques chémokines et récepteurs de chémokines reconnus pour être exprimés dans les organes lymphoïdes. Pour qu'une molécule soit considérée comme candidate dans le développement thymique et extra-thymique, il fallait qu'elle soit exprimée fortement au niveau du thymus B6 et des ganglions LckOM tout en étant peu ou pas exprimée dans les ganglions B6 et la rate B6 et LckOM. En effet, il n'y a pas de développement extra-thymique dans ces derniers organes qui demeurent donc de «vrais» organes lymphoïdes secondaires. Les résultats, présentés à la figure 2, montrent que seule CCL20 possède le profil d'expression recherché. En effet, bien que CCL25 soit fortement exprimée dans un thymus normal, elle est presque absente du ganglion LckOM. Ce profil d'expression corrèle bien avec le fait que les cellules épithéliales thymiques sont la principale source de CCL25<sup>76</sup> et suggère que cette chémokine n'est pas impliquée dans le développement extra-thymique observé dans le ganglion LckOM. Quelques différences d'expression ont aussi été observées pour CCL2, CCL4, CCL17, CCL22, CXCR4 et CCR9. Bien que ces variations mineures puissent avoir un impact

biologique significatif, elles n'ont pas été étudiées plus en détail. Nous sommes toutefois en mesure d'expliquer que certaines des différences observées entre les souris B6 et LckOM peuvent être causées par un nombre supérieur de vaisseaux sanguins (CCL2, CCL4, CXCR4) et de lymphocytes immatures (CXCR4, CCR9).<sup>77,78,79,80</sup> La production locale d'oncostatin, cytokine de type Th1<sup>81,82</sup>, pourrait être responsable de la diminution de l'expression de CCL17 et CCL22, chémokines associées aux réponses Th2. En fait, il a déjà été démontré que l'expression de CCL22 est diminuée par les cytokines de type Th1.<sup>83</sup>

Afin de pouvoir véritablement considérer CCL20 comme molécule candidate pour le recrutement des progéniteurs dans le ganglion LckOM, il fallait s'assurer que l'augmentation d'expression de l'ARN messager de CCL20 observée à cet endroit ne se produisait pas dans d'autres organes chez cette souris. Pour ce faire, nous avons quantifié l'expression de CCL20 par RT-PCR dans divers tissus de la souris LckOM et nous avons comparé cette expression avec celle obtenue dans les mêmes tissus pour une souris normale. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3 et démontrent que l'expression de CCL20 est bel et bien augmentée uniquement dans le ganglion chez la souris LckOM. Une autre observation intéressante se dégage de ces résultats. Le fait que le petit intestin soit un site potentiel de développement extra-thymique<sup>84</sup> et qu'il s'agit d'un tissu où l'expression de l'ARN messager de CCL20 est forte laisse croire que cette chémokine

pourrait en effet intervenir dans le développement des lymphocytes T, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur du thymus.

Nous avons aussi quantifié les transcrits de CCL20 dans les mêmes tissus mais chez une souris déficiente en CCR6, le seul récepteur connu de CCL20 jusqu'à présent (Figure 3). La seule différence statistiquement significative que nous avons observée entre l'expression de l'ARN messenger de CCL20 dans les organes d'une souris normale par rapport à ceux d'une souris CCR6<sup>-/-</sup> se situe au niveau des intestins. Ces résultats corrélient assez bien avec les études publiées précédemment qui montrent que des souris déficientes en CCR6 semblent tout à fait normales, la différence avec les souris contrôles se situant dans la réponse aux pathogènes entériques et le développement des plaques de Peyer.<sup>68,85</sup> Ceci soulève quelques hypothèses : 1) Les cellules productrices de CCL20 sont des cellules résidentes des organes et n'ont pas besoin d'un signal passant par CCR6 pour se positionner correctement là où elles doivent exercer leur activité. Il a récemment été démontré que ce sont les cellules stromales qui sont les principales productrices de CCL20 dans le thymus B6<sup>72</sup> ce qui confirme en partie cette hypothèse. 2) L'ARN messenger de CCL20 est présent dans les tissus de la souris CCR6<sup>-/-</sup> mais il n'est pas traduit en protéine. Ce phénomène a déjà été rapporté pour la chémokine RANTES/CCL5 dont l'ARN messenger est emmagasiné dans des réserves intracellulaires sans qu'il y ait nécessairement de traduction en protéine.<sup>86</sup> Des études en

Western blot ou en immunohistochimie pourraient permettre de déterminer si les niveaux d'ARN messager retrouvés dans les différents tissus de la souris B6 et ceux de la souris CCR6<sup>-/-</sup> se reflètent au niveau protéique et sont effectivement comparables chez les deux souris.

Afin de déterminer si les interactions CCL20/CCR6 jouent un rôle dans le développement extra-thymique des cellules T chez la souris LckOM, nous avons procédé à l'analyse de souris chimères hématopoïétiques dont le système immunitaire fut reconstitué avec un mélange 50:50 de cellules d'origine CCR6<sup>+</sup>OM<sup>+</sup> et CCR6<sup>-/-</sup>OM<sup>-</sup>. Les résultats présentés à la figure 4 indiquent que les cellules d'origine CCR6<sup>-/-</sup> semblent posséder un avantage sur les cellules d'origine normale en ce qui concerne soit leur prolifération, soit leur capacité d'ensemencement de la moelle osseuse. Ceci étant vrai peu importe que les cellules de la souris donneuse soient d'origine OM<sup>+</sup> ou non, ces résultats démontrent que l'interaction de CCL20 avec CCR6 n'est pas essentielle dans le développement thymique ou extra-thymique des cellules T. Ces résultats suggèrent par contre que CCL20 pourrait exercer ses fonctions par l'intermédiaire d'un récepteur encore inconnu. En effet, il a déjà été démontré que CCL20 pouvait déplacer la chémokine éotaxine, possiblement en se liant avec une faible affinité au récepteur CXCR3.<sup>87, 88</sup> L'étude de cet autre récepteur potentiel sera des plus utile afin de déterminer avec certitude si CCL20 influence les étapes précoces du développement des cellules T et si cet effet est médié par autre chose que CCR6.

Nous avons décidé d'étudier la réponse à CCL20 par des lymphocytes normaux car peu de données à ce sujet sont actuellement disponibles chez la souris. Lorsque nous regardons les résultats obtenus pour les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques; Figure 5 B,C), nous remarquons en général que la migration est très faible, sauf pour les cellules B. Ces résultats sont en accord avec les études de Bowman *et al.* qui ont démontré que les cellules B migrent légèrement plus en réponse à CCL20 que les cellules T<sup>89</sup>. Au niveau du thymus (Figure 5A), tous les types cellulaires sont capables de répondre à CCL20. Il est difficile d'effectuer des comparaisons avec la littérature puisque les études précédentes ne concernent que l'ensemble des lymphocytes T et pas une sous-population en particulier<sup>32,37</sup>. Parmi les cellules T, les CD4<sup>+</sup> semblent toutefois plus susceptibles à l'effet de CCL20 que les cellules des autres compartiments T. Bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative pour le nombre d'individus que nous avons étudiés (n=3), elle serait en accord avec une étude réalisée chez l'humain qui mentionne que CCR6 est surtout exprimé sur les cellules CD4<sup>+</sup><sup>44</sup>.

Les résultats que nous avons obtenus pour les expériences de greffes suggèrent que CCR6 n'est peut-être pas le seul récepteur de CCL20. Nous avons donc voulu savoir si des cellules isolées à partir de la souris CCR6<sup>-/-</sup> étaient en mesure de répondre à cette chémokine. Les résultats de

chémotaxie présentés à la figure 5 montrent que oui, du moins en ce qui concerne les thymocytes. À notre connaissance, nous sommes les premiers à démontrer une réponse chémoattractante des cellules de la souris  $CCR6^{-/-}$ . La principale différence entre les cellules d'origine B6 et celles d'origine  $CCR6^{-/-}$  est que les cellules B (CD19+) du thymus  $CCR6^{-/-}$  sont sensibles à CCL20 mais pas ceux de la périphérie. Ainsi, s'il existe un autre récepteur fonctionnel pour CCL20, celui-ci pourrait être exprimé uniquement dans le thymus. Le fait que les cellules d'origine  $CCR6^{-/-}$  ne migrent que pour des concentrations de CCL20 de 10nM peut signifier que cet autre récepteur serait plus efficace, entraînant ainsi une réponse cellulaire pour des concentrations 10 fois plus faibles de chémoattractant que celles requises par des cellules normales. Au contraire, cela peut aussi indiquer qu'il pourrait être désensibilisé plus rapidement.

Tous ces résultats suggèrent donc eux aussi la présence d'un autre récepteur que CCR6 pour CCL20. Il est cependant difficile de déterminer si ces faibles niveaux de migration sont significatifs. Néanmoins, une chose est certaine : tous les types cellulaires présentant une réponse à CCL20, que ce soit ceux d'origine B6 ou ceux d'origine  $CCR6^{-/-}$ , ont migré plus efficacement sous l'effet de la chémoattractant que sous l'effet du milieu seul (contrôle négatif). Nous pouvons donc considérer que les réponses obtenues sont réelles. Il sera toutefois possible de confirmer ces résultats en mesurant le flux calcique généré par CCL20 dans des cellules normales et d'origine CCR6

déficientes. En effet, certaines études ont démontré qu'une élévation du calcium intracellulaire pouvait survenir à des doses de chémokine pour lesquelles nous n'avons pas observé de migration chez la souris B6.<sup>31</sup>

Par la suite, nous avons voulu mieux caractériser la population de cellules T CD4<sup>+</sup> qui répondait à CCL20. Comme on peut le voir à la figure 6, il semble qu'il s'agisse surtout de thymocytes immatures récemment sélectionnés positivement (HSA<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) ou bien ayant complété leur maturation et prêts à sortir du thymus (HSA<sup>-</sup>CD69<sup>-</sup>) mais ces différences sont statistiquement significatives ( $p < 0.1$ ) uniquement pour une concentration de 1000nM de CCL20. En périphérie, les cellules répondant à CCL20 sont en majorité des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de phénotype mémoire (CD44<sup>hi</sup>). Ces résultats sont en accord avec certaines études réalisées chez l'humain qui mentionnent que CCR6 est surtout exprimé sur les cellules CD4<sup>+</sup><sup>44</sup> et que les réponses à CCL20 sont limitées aux cellules mémoires.<sup>44,59</sup>

Comme ce sont les cellules mémoires/activées qui semblent mieux répondre à CCL20, nous nous sommes donc intéressés plus en détail à cette sous-population de lymphocytes T. Nous avons ainsi montré que la proportion de cellules CD4<sup>+</sup> mémoires est plus faible dans les ganglions périphériques d'une souris CCR6<sup>-/-</sup> mais que ceci n'est pas attribuable à un changement dans la proportion des sous-populations CLA<sup>+</sup> et  $\alpha_4\beta_7^+$  (Figure 7). Nous avons décidé d'étudier ces sous-populations pour deux raisons :1) nos

études démontrent que, dans les organes non-lymphoïdes, l'expression des transcrits de CCL20 est restreinte aux tissus cutanéomuqueux (Figure 3A) avec une différence significative entre la souris normale et la souris CCR6<sup>-/-</sup> au niveau des intestins et 2) certaines études réalisées chez l'humain ont montré que presque toutes les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires  $\alpha_4\beta_7^+$  (se rendant à l'intestin), ainsi qu'une bonne partie des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires CLA<sup>+</sup> (se rendant à la peau), expriment CCR6 à leur surface.<sup>44,73</sup> La raison pour laquelle nous observons une diminution dans la proportion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires uniquement dans les ganglions périphériques et non dans la rate ou les ganglions mésentériques chez la souris CCR6<sup>-/-</sup> n'est pas encore claire. Néanmoins, ces résultats suggèrent que CCR6 n'influence pas de façon spécifique les cellules T CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> destinées à migrer vers la peau (cellules CLA<sup>+</sup>) ou vers les intestins (cellules  $\alpha_4\beta_7^+$ ). Il serait cependant intéressant de vérifier la présence de ces sous-populations directement à l'intérieur de ces tissus, c'est-à-dire au niveau de l'organe «d'arrivée» et non pas au niveau de l'organe de «départ». Ici, deux scénarios peuvent être imaginés. 1) Malgré une production similaire de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> et  $\alpha_4\beta_7^+$  chez les souris B6 et CCR6<sup>-/-</sup>, l'absence de CCR6 à la surface de ces cellules les empêche de quitter les vaisseaux pour entrer dans les tissus. 2) Dans le cas où un récepteur fonctionnel autre que CCR6 puisse être présent à la surface des cellules c'est plutôt l'absence de CCL20 qui ferait en sorte que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> $\alpha_4\beta_7^+$  de la souris CCR6<sup>-/-</sup> ne pourraient pas se rendre à l'intestin. En effet, le petit intestin est le seul endroit où on observe

une diminution significative des transcrits de CCL20 dans la souris CCR6<sup>-/-</sup> (Figure 3A). Ces hypothèses sont appuyées par les observations de Vārona *et al.* qui ont montré qu'il y avait 2 fois moins de cellules T CD4<sup>+</sup> à l'intérieur des plaques de Peyer chez une souris déficiente en CCR6.<sup>85</sup>

Par ailleurs, comme CCR6 est principalement exprimé sur des cellules de type Th-1<sup>61,62,64</sup>, il est aussi possible que les interactions CCL20/CCR6 régulent spécifiquement la prolifération de cette sous-population de cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires. Ceci pourrait expliquer la plus faible proportion de cellules BrdU<sup>+</sup> que nous retrouvons parmi la population CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> (CD4<sup>+</sup> mémoires) chez la souris CCR6 déficiente (figure 8). Des études à ce sujet seront d'ailleurs entreprises sous peu. Ainsi, nous tenterons de quantifier la proportion de cellules productrices d'IFN-γ et d'IL-4 dans un modèle de réponse Th1<sup>64</sup> induit chez des souris normales et CCR6<sup>-/-</sup>.

En ce moment, nous tentons également de tester l'hypothèse selon laquelle CCL20 pourrait posséder un récepteur alternatif. Nous avons commencé par la méthode standard, c'est-à-dire par des essais de liaison entre des cellules provenant d'une souris déficiente en CCR6 et une protéine CCL20 marquée à l'iode radioactif. Comme cette protéine n'est pas disponible commercialement pour la souris, nous avons dû ioder CCL20 nous-même. Cette réaction permet d'ajouter une molécule d'iode sur les résidus tyrosine de la protéine en lui infligeant toutefois des torsions considérables. Lorsque l'on regarde la séquence en acides aminés de CCL20 murin (Figure 1B en

haut) nous remarquons qu'il y a deux résidus tyrosine localisés tout près de la séquence DCCL. Certains auteurs croient que ce motif est impliqué dans la liaison spécifique au récepteur<sup>90</sup> alors il est possible que le fait de créer des torsions à cet endroit par l'ajout de molécules d'iode empêche l'interaction de CCL20 avec le récepteur. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de liaison en utilisant cette technique.

Nous avons donc changé de stratégie et nous avons décidé d'utiliser une technique qui nous permettrait de procéder à l'analyse des cellules liant CCL20 par cytométrie en flux. Pour ce faire, nous avons choisi d'exprimer CCL20 dans des cellules eucaryotes sous forme de protéine de fusion avec la *green fluorescent protein* (GFP). La protéine étant sécrétée, nous recueillons le surnageant de cellules transfectées avec notre construction CCL20GFP, nous l'appliquons directement sur des cellules provenant de la souris CCR6<sup>-/-</sup> puis nous analysons les cellules ayant lié la chémokine par flux cytométrie. Ces expériences se sont toutefois révélées infructueuses, probablement à cause de la faible affinité de liaison entre le monomère CCL20GFP et son récepteur.

Afin de pallier à ce problème d'affinité, nous avons décidé d'employer un dimère de CCL20 sous forme de protéine de fusion entre CCL20 et la portion Fc de l'immunoglobuline humaine. Nous incuberons cette protéine CCL20Fc avec des cellules provenant d'une souris CCR6<sup>-/-</sup> et nous analyserons par

flux cytométrie les cellules ayant lié la chémokine. Par la suite, il nous sera possible de faire un lysat à partir de ces cellules, d'immunoprécipiter le complexe CCL20/récepteur avec un anticorps anti-CCL20 puis de séquencer la protéine associée. Finalement, l'identification de ce récepteur sera effectuée par recherche bioinformatique.

En conclusion, la participation de CCL20 au développement des cellules T demeure encore un peu nébuleuse. En effet, dans notre modèle de chimères hématopoïétiques, on retrouve presque toujours une proportion supérieure de cellules d'origine CCR6<sup>-/-</sup> et ce, peu importe qu'elles proviennent d'un environnement permettant de générer des T thymiques (cellules OM<sup>-</sup>) ou des T extra-thymiques (cellules OM<sup>+</sup>). D'un côté, ces résultats indiquent que les interactions CCL20-CCR6 ne semblent pas requises pour le développement thymique ou extra-thymique des lymphocytes T. D'un autre côté, ces résultats, ainsi que ceux de chémotaxie, laissent envisager la possibilité que l'action de CCL20 à ce niveau puisse être médiée via un autre récepteur que CCR6. Les études permettant de vérifier cette hypothèse sont en cours présentement.

Aussi, une souris transgénique surexprimant CCL20 sous le contrôle du promoteur proximal p56Lck a été générée dans notre laboratoire. La surexpression sera donc limitée aux cellules T, plus particulièrement celles du thymus. Nous espérons donc que l'étude de cette souris nous renseignera davantage sur le rôle possible de cette chémokine dans le

développement thymique et éventuellement, extra-thymique des lymphocytes T.

Finalement, CCL20 est, à notre connaissance, la première molécule pouvant spécifiquement augmenter la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires via son interaction avec le récepteur CCR6. Ceci représente un intérêt majeur, surtout lorsqu'on sait que les cellules CD4<sup>+</sup> mémoires s'expandent généralement moins bien et possèdent une durée de vie plus courte que des CD8<sup>+</sup> mémoires.<sup>91</sup>

## 5- Références

1. Shen, M.M., R.C. Skoda, R.D. Cardiff, J. Campos-Torres, P. Leder, and D.M. Ornitz. 1994. Expression of LIF in transgenic mice results in altered thymic epithelium and apparent interconversion of thymic and lymph node morphologies. *EMBO J.* 13:1375-1385.
2. Clegg, C.H., J.T. Rulffes, P.M. Wallace, and H.S. Haugen. 1996. Regulation of an extrathymic T-cell development pathway by oncostatin M. *Nature* 384:261-263.
3. Boileau, C., M. Houde, G. Dulude, C.H. Clegg, and C. Perreault. 2000. Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M. *J. Immunol.* 164:5713-5720.
4. Guy-Grand, D., O. Azogui, S. Celli, S. Darce, M.C. Nussenzweig, P. Kourilsky, and P. Vassalli. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J. Exp. Med.* 197:333-341.
5. Poussier, P. and M. Julius. 1999. Speculation on the lineage relationships among CD4(-)8(+) gut-derived T cells and their role(s). *Semin. Immunol.* 11:293-303.
6. Bazan, J.F., K.B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D.R. Greaves, A. Zlotnik, and T.J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-644.

7. Sallusto,F., C.R.Mackay, and A.Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 18:593-620.:593-620.
8. Rossi,D. and A.Zlotnik. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 18:217-42.:217-242.
9. Mackay,C.R. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat.Immunol.* 2:95-101.
10. Oppenheim,J.J., C.O.Zachariae, N.Mukaida, and K.Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu.Rev.Immunol.* 9:617-48.:617-648.
11. Baggiolini,M., B.Dewald, and B.Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv.Immunol.* 55:97-179.:97-179.
12. Schall,T.J. and K.B.Bacon. 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr.Opin.Immunol.* 6:865-873.
13. Bazzoni,F., M.A.Cassatella, F.Rossi, M.Ceska, B.Dewald, and M.Baggiolini. 1991. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J.Exp.Med.* 173:771-774.
14. Schall,T.J., K.Bacon, K.J.Toy, and D.V.Goeddel. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671.

15. Luster, A.D. and J.V. Ravetch. 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med.* 166:1084-1097.
16. Yoshie, O., T. Imai, and H. Nomiya. 1997. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J. Leukoc. Biol.* 62:634-644.
17. Nagira, M., T. Imai, K. Hieshima, J. Kusuda, M. Ridanpaa, S. Takagi, M. Nishimura, M. Kakizaki, H. Nomiya, and O. Yoshie. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J. Biol. Chem.* 272:19518-19524.
18. Hedrick, J.A. and A. Zlotnik. 1997. Lymphotactin: a new class of chemokine. *Methods Enzymol.* 287:206-15.:206-215.
19. Hromas, R., C.H. Kim, M. Klemsz, M. Krathwohl, K. Fife, S. Cooper, C. Schnizlein-Bick, and H.E. Broxmeyer. 1997. Isolation and characterization of Exodus-2, a novel C-C chemokine with a unique 37-amino acid carboxyl-terminal extension. *J. Immunol.* 159:2554-2558.
20. Gunn, M.D., K. Tangemann, C. Tam, J.G. Cyster, S.D. Rosen, and L.T. Williams. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:258-263.
21. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune

response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.

22. Luther,S.A., H.L.Tang, P.L.Hyman, A.G.Farr, and J.G.Cyster. 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:12694-12699.
23. Henning,G., L.Ohl, T.Junt, P.Reiterer, V.Brinkmann, H.Nakano, W.Hohenberger, M.Lipp, and R.Forster. 2001. CC chemokine receptor 7-dependent and -independent pathways for lymphocyte homing: modulation by FTY720. *J.Exp.Med.* 194:1875-1881.
24. Nakano,H. and M.D.Gunn. 2001. Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J.Immunol.* 166:361-369.
25. Uehara,S., A.Grinberg, J.M.Farber, and P.E.Love. 2002. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J.Immunol.* 168:2811-2819.
26. Moser,B. and P.Loetscher. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat.Immunol.* 2:123-128.
27. Hieshima,K., T.Imai, G.Opdenakker, J.Van Damme, J.Kusuda, H.Tei, Y.Sakaki, K.Takatsuki, R.Miura, O.Yoshie, and H.Nomiyama. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver.

Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J.Biol.Chem.* 272:5846-5853.

28. Hromas,R., P.W.Gray, D.Chantry, R.Godiska, M.Krathwohl, K.Fife, G.I.Bell, J.Takeda, S.Aronica, M.Gordon, S.Cooper, H.E.Broxmeyer, and M.J.Klemsz. 1997. Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood* 89:3315-3322.
29. Rossi,D.L., A.P.Vicari, K.Franz-Bacon, T.K.McClanahan, and A.Zlotnik. 1997. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J.Immunol.* 158:1033-1036.
30. Nelson,R.T., J.Boyd, R.P.Gladue, T.Paradis, R.Thomas, A.C.Cunningham, P.Lira, W.H.Brissette, L.Hayes, L.M.Hames, K.S.Neote, and S.R.McColl. 2001. Genomic organization of the CC chemokine mip-3alpha/CCL20/larc/exodus/SCYA20, showing gene structure, splice variants, and chromosome localization. *Genomics* 73:28-37.
31. Varona,R., A.Zaballos, J.Gutierrez, P.Martin, F.Roncal, J.P.Albar, C.Ardavin, and G.Marquez. 1998. Molecular cloning, functional characterization and mRNA expression analysis of the murine chemokine receptor CCR6 and its specific ligand MIP-3alpha. *FEBS Lett.* 440:188-194.
32. Tanaka,Y., T.Imai, M.Baba, I.Ishikawa, M.Uehira, H.Nomiyama, and O.Yoshie. 1999. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. *Eur.J.Immunol.* 29:633-642.

33. Hoover, D.M., C. Boulegue, D. Yang, J.J. Oppenheim, K. Tucker, W. Lu, and J. Lubkowski. 2002. The structure of human macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J. Biol. Chem.* 277:37647-37654.
34. Schutyser, E., S. Struyf, P. Menten, J.P. Lenaerts, R. Conings, W. Put, A. Wuyts, P. Proost, and J. Van Damme. 2000. Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$  from normal and transformed cells. *J. Immunol.* 165:4470-4477.
35. Homey, B., M.C. Dieu-Nosjean, A. Wiesenborn, C. Massacrier, J.J. Pin, E. Oldham, D. Catron, M.E. Buchanan, A. Muller, M.R. de Waal, G. Deng, R. Orozco, T. Ruzicka, P. Lehmann, S. Lebecque, C. Caux, and A. Zlotnik. 2000. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 164:6621-6632.
36. Dieu-Nosjean, M.C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J.J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik, and C. Caux. 2000. Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 192:705-718.
37. Power, C.A., D.J. Church, A. Meyer, S. Alouani, A.E. Proudfoot, I. Clark-Lewis, S. Sozzani, A. Mantovani, and T.N. Wells. 1997. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 $\alpha$  from lung dendritic cells. *J. Exp. Med.* 186:825-835.

38. Baba, M., T. Imai, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, K. Hieshima, H. Nomiyama, and O. Yoshie. 1997. Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J. Biol. Chem.* 272:14893-14898.
39. Nakayama, T., R. Fujisawa, H. Yamada, T. Horikawa, H. Kawasaki, K. Hieshima, D. Izawa, S. Fujiie, T. Tezuka, and O. Yoshie. 2001. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int. Immunol.* 13:95-103.
40. Liao, F., R. Alderson, J. Su, S. J. Ullrich, B. L. Kreider, and J. M. Farber. 1997. STRL22 is a receptor for the CC chemokine MIP-3alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:212-217.
41. Greaves, D. R., W. Wang, D. J. Dairaghi, M. C. Dieu, B. Saint-Vis, K. Franz-Bacon, D. Rossi, C. Caux, T. McClanahan, S. Gordon, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 186:837-844.
42. Liao, F., A. K. Shirakawa, J. F. Foley, R. L. Rabin, and J. M. Farber. 2002. Human B cells become highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding. *J. Immunol.* 168:4871-4880.
43. Krzysiek, R., E. A. Lefevre, J. Bernard, A. Foussat, P. Galanaud, F. Louache, and Y. Richard. 2000. Regulation of CCR6 chemokine

receptor expression and responsiveness to macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in human B cells. *Blood* 96:2338-2345.

44. Liao,F., R.L.Rabin, C.S.Smith, G.Sharma, T.B.Nutman, and J.M.Farber. 1999. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J.Immunol.* 162:186-194.
45. Charbonnier,A.S., N.Kohrgruber, E.Kriehuber, G.Stingl, A.Rot, and D.Maurer. 1999. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J.Exp.Med.* 190:1755-1768.
46. Campbell,J.J., J.Hedrick, A.Zlotnik, M.A.Siani, D.A.Thompson, and E.C.Butcher. 1998. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 279:381-384.
47. Abiko,Y., M.Nishimura, K.Kusano, K.Nakashima, K.Okumura, T.Arakawa, T.Takuma, I.Mizoguchi, and T.Kaku. 2003. Expression of MIP-3alpha/CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. *Arch.Oral Biol.* 48:171-175.
48. Izadpanah,A., M.B.Dwinell, L.Eckmann, N.M.Varki, and M.F.Kagnoff. 2001. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280:G710-G719.
49. Scapini,P., C.Laudanna, C.Pinardi, P.Allavena, A.Mantovani, S.Sozzani, and M.A.Cassatella. 2001. Neutrophils produce biologically

active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur.J.Immunol.* 31:1981-1988.

50. Sugita,S., T.Kohno, K.Yamamoto, Y.Imaizumi, H.Nakajima, T.Ishimaru, and T.Matsuyama. 2002. Induction of macrophage-inflammatory protein-3alpha gene expression by TNF-dependent NF-kappaB activation. *J.Immunol.* 168:5621-5628.
51. Harant,H., S.A.Eldershaw, and I.J.Lindley. 2001. Human macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20/LARC/Exodus/SCYA20 is transcriptionally upregulated by tumor necrosis factor-alpha via a non-standard NF-kappaB site. *FEBS Lett.* 509:439-445.
52. Scapini,P., L.Crepaldi, C.Pinardi, F.Calzetti, and M.A.Cassatella. 2002. CCL20/macrophage inflammatory protein-3alpha production in LPS-stimulated neutrophils is enhanced by the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and IFN-gamma through independent mechanisms. *Eur.J.Immunol.* 32:3515-3524.
53. Kucharzik,T., J.T.Hudson, III, R.L.Waikel, W.D.Martin, and I.R.Williams. 2002. CCR6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a CCR6 EGFP knock-in mouse. *Eur.J.Immunol.* 32:104-112.
54. Kim,C.H., B.Johnston, and E.C.Butcher. 2002. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100:11-16.

55. Mo,R., J.Chen, Y.Han, C.Bueno-Cannizares, D.E.Misek, P.A.Lescure, S.Hanash, and R.L.Yung. 2003. T cell chemokine receptor expression in aging. *J.Immunol.* 170:895-904.
56. Wehrli,N., D.F.Legler, D.Finke, K.M.Toellner, P.Loetscher, M.Baggiolini, I.C.MacLennan, and H.Acha-Orbea. 2001. Changing responsiveness to chemokines allows medullary plasmablasts to leave lymph nodes. *Eur.J.Immunol.* 31:609-616.
57. Yang,D., O.M.Howard, Q.Chen, and J.J.Oppenheim. 1999. Cutting edge: immature dendritic cells generated from monocytes in the presence of TGF-beta 1 express functional C-C chemokine receptor 6. *J.Immunol.* 163:1737-1741.
58. Yamashiro,S., J.M.Wang, D.Yang, W.H.Gong, H.Kamohara, and T.Yoshimura. 2000. Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. *Blood* 96:3958-3963.
59. Ebert,L.M. and S.R.McColl. 2002. Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 168:65-72.
60. Carramolino,L., L.Kremer, I.Goya, R.Varona, J.M.Buesa, J.Gutierrez, A.Zaballos, A.Martinez, and G.Marquez. 1999. Down-regulation of the beta-chemokine receptor CCR6 in dendritic cells mediated by TNF-alpha and IL-4. *J.Leukoc.Biol.* 66:837-844.
61. Sallusto,F., E.Kremmer, B.Palermo, A.Hoy, P.Ponath, S.Qin, R.Forster, M.Lipp, and A.Lanzavecchia. 1999. Switch in chemokine

receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur.J.Immunol.* 29:2037-2045.

62. Shimizu, Y., H. Murata, Y. Kashii, K. Hirano, H. Kunitani, K. Higuchi, and A. Watanabe. 2001. CC-chemokine receptor 6 and its ligand macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  might be involved in the amplification of local necroinflammatory response in the liver. *Hepatology* 34:311-319.
63. Wills, M.R., G. Okecha, M.P. Weekes, M.K. Gandhi, P.J. Sissons, and A.J. Carmichael. 2002. Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response. *J.Immunol.* 168:5455-5464.
64. Chiu, B.C., X.Z. Shang, V.R. Stolberg, E. Komuniecki, and S.W. Chensue. 2002. Population analysis of CD4+ T cell chemokine receptor transcript expression during in vivo type-1 (mycobacterial) and type-2 (schistosomal) immune responses. *J.Leukoc.Biol.* 72:363-372.
65. Maki, W., R.E. Morales, V.A. Carroll, W.G. Telford, R.N. Knibbs, L.M. Stoolman, and S.T. Hwang. 2002. CCR6 colocalizes with CD18 and enhances adhesion to activated endothelial cells in CCR6-transduced Jurkat T cells. *J.Immunol.* 169:2346-2353.
66. Vanbervliet, B., B. Homey, I. Durand, C. Massacrier, S. Ait-Yahia, O. de Bouteiller, A. Vicari, and C. Caux. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment:

possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur.J.Immunol.* 32:231-242.

67. Yang,D., O.Chertov, S.N.Bykovskaia, Q.Chen, M.J.Buffo, J.Shogan, M.Anderson, J.M.Schroder, J.M.Wang, O.M.Howard, and J.J.Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286:525-528.
68. Cook,D.N., D.M.Prosser, R.Forster, J.Zhang, N.A.Kuklin, S.J.Abbondanzo, X.D.Niu, S.C.Chen, D.J.Manfra, M.T.Wiekowski, L.M.Sullivan, S.R.Smith, H.B.Greenberg, S.K.Narula, M.Lipp, and S.A.Lira. 2000. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity.* 12:495-503.
69. Tough,D.F. and J.Sprent. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J.Exp.Med.* 179:1127-1135.
70. Protin,U., T.Schweighoffer, W.Jochum, and F.Hilberg. 1999. CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J.Immunol.* 163:4917-4923.
71. Wang,Q., J.Strong, and N.Killeen. 2001. Homeostatic competition among T cells revealed by conditional inactivation of the mouse Cd4 gene. *J.Exp.Med.* 194:1721-1730.
72. Louis,I., G.Dulude, S.Corneau, S.Brochu, C.Boileau, C.Meunier, C.Cote, N.Labrecque, and C.Perreault. 2003. Changes in the lymph node microenvironment induced by Oncostatin M. *Blood* 102:1397-1404.

73. Hudak,S., M.Hagen, Y.Liu, D.Catron, E.Oldham, L.M.McEvoy, and E.P.Bowman. 2002. Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J.Immunol.* 169:1189-1196.
74. Anderson,G., B.C.Harman, K.J.Hare, and E.J.Jenkinson. 2000. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin.Immunol.* 12:457-464.
75. Wilkinson,B., J.J.Owen, and E.J.Jenkinson. 1999. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J.Immunol.* 162:3873-3881.
76. Wurbel,M.A., J.M.Philippe, C.Nguyen, G.Victorero, T.Freeman, P.Wooding, A.Miazek, M.G.Mattei, M.Malissen, B.R.Jordan, B.Malissen, A.Carrier, and P.Naquet. 2000. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur.J.Immunol.* 30:262-271.
77. Rayner,K., S.Van Eersel, P.H.Groot, and T.J.Reape. 2000. Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the ApoE knockout mouse. *J.Vasc.Res.* 37:93-102.
78. Aliberti,J., Reis e Sousa, M.Schito, S.Hieny, T.Wells, G.B.Huffnagle, and A.Sher. 2000. CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat.Immunol.* 1:83-87.
79. Salcedo,R., K.Wasserman, H.A.Young, M.C.Grimm, O.M.Howard, M.R.Anver, H.K.Kleinman, W.J.Murphy, and J.J.Oppenheim. 1999.

- Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am.J.Pathol.* 154:1125-1135.
80. Carramolino,L., A.Zaballos, L.Kremer, R.Villares, P.Martin, C.Ardavin, A.Martinez, and G.Marquez. 2001. Expression of CCR9 beta-chemokine receptor is modulated in thymocyte differentiation and is selectively maintained in CD8(+) T cells from secondary lymphoid organs. *Blood* 97:850-857.
  81. Rogge,L., E.Bianchi, M.Biffi, E.Bono, S.Y.Chang, H.Alexander, C.Santini, G.Ferrari, L.Sinigaglia, M.Seiler, M.Neeb, J.Mous, F.Sinigaglia, and U.Certa. 2000. Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays. *Nat.Genet.* 25:96-101.
  82. Broxmeyer,H.E., H.A.Bruns, S.Zhang, S.Cooper, G.Hangoc, A.N.McKenzie, A.L.Dent, U.Schindler, L.K.Naeger, T.Hoey, and M.H.Kaplan. 2002. Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M. *Immunity.* 16:815-825.
  83. Yamashita,U. and E.Kuroda. 2002. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev.Immunol.* 22:105-114.
  84. Abo,T. 2001. Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation. *Int.Immunopharmacol.* 1:1261-1273.
  85. Varona,R., R.Villares, L.Carramolino, I.Goya, A.Zaballos, J.Gutierrez, M.Torres, A.Martinez, and G.Marquez. 2001. CCR6-deficient mice

have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. *J.Clin.Invest* 107:R37-R45.

86. Swanson, B.J., M. Murakami, T.C. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 2002. RANTES production by memory phenotype T cells is controlled by a posttranscriptional, TCR-dependent process. *Immunity*. 17:605-615.
87. Weng, Y., S.J. Siciliano, K.E. Waldburger, A. Sirotina-Meisher, M.J. Staruch, B.L. Daugherty, S.L. Gould, M.S. Springer, and J.A. DeMartino. 1998. Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J.Biol.Chem.* 273:18288-18291.
88. Sullivan, S.K., D.A. McGrath, F. Liao, S.A. Boehme, J.M. Farber, and K.B. Bacon. 1999. MIP-3 $\alpha$  induces human eosinophil migration and activation of the mitogen-activated protein kinases (p42/p44 MAPK). *J.Leukoc.Biol.* 66:674-682.
89. Bowman, E.P., J.J. Campbell, D. Soler, Z. Dong, N. Manlongat, D. Picarella, R.R. Hardy, and E.C. Butcher. 2000. Developmental switches in chemokine response profiles during B cell differentiation and maturation. *J.Exp.Med.* 191:1303-1318.
90. Perez-Canadillas, J.M., A. Zaballos, J. Gutierrez, R. Varona, F. Roncal, J.P. Albar, G. Marquez, and M. Bruix. 2001. NMR solution structure of murine CCL20/MIP-3 $\alpha$ , a chemokine that specifically chemoattracts immature dendritic cells and lymphocytes through its

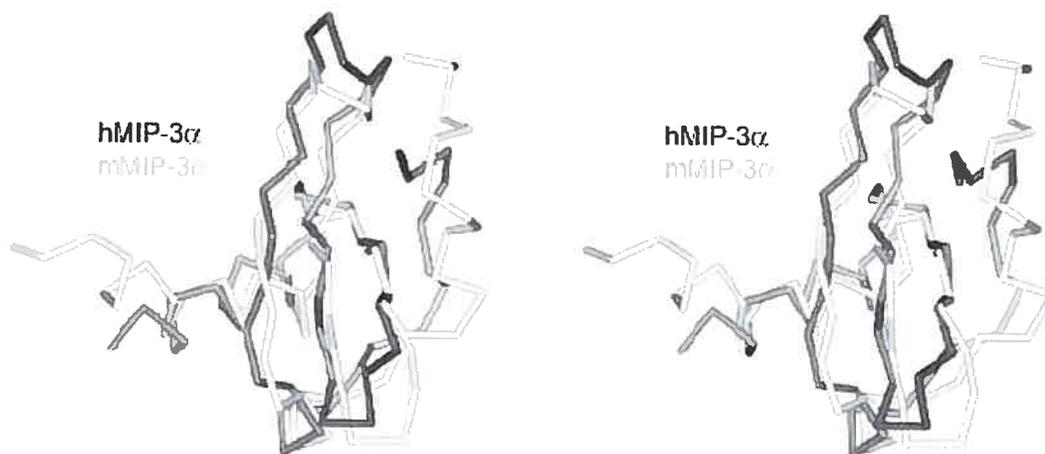
highly specific interaction with the beta-chemokine receptor CCR6.  
*J.Biol.Chem.* 276:28372-28379.

91. Homann,D., L.Teyton, and M.B.Oldstone. 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat.Med.* 7:913-919.

## 6- Légendes et figures

**Figure 1:** Comparaison de la protéine CCL20 murine et humaine au niveau **A)** de la structure **B)** de la séquence en acides aminés. **A)** Représentation stéréo tirée de la référence 33. **B)** Séquence protéique adaptée de la référence 31. Les acides aminés qui diffèrent entre la protéine murine (en haut) et la protéine humaine (en bas) sont indiqués en jaune et les 4 résidus cystéines conservés parmi la majorité des chémokines sont indiqués en bleu clair.

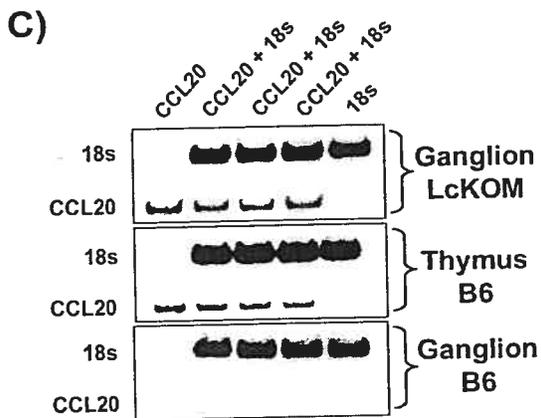
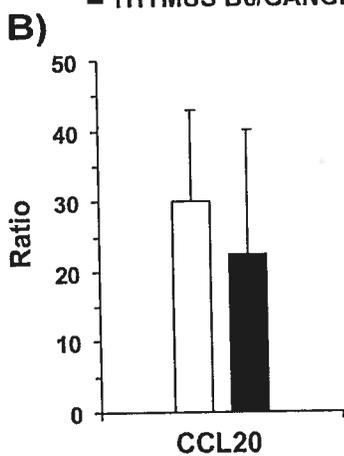
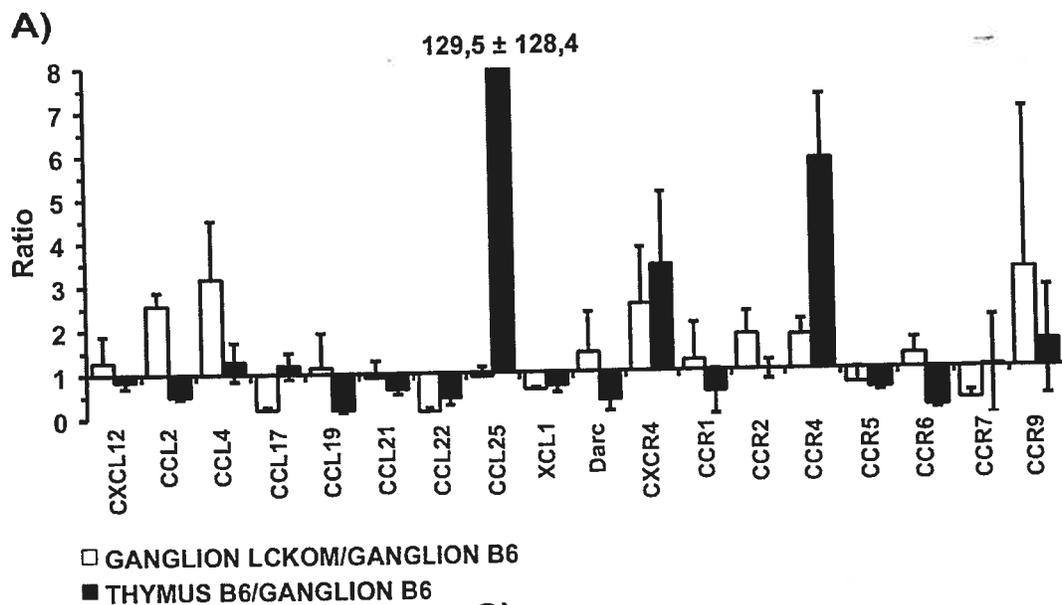
A)



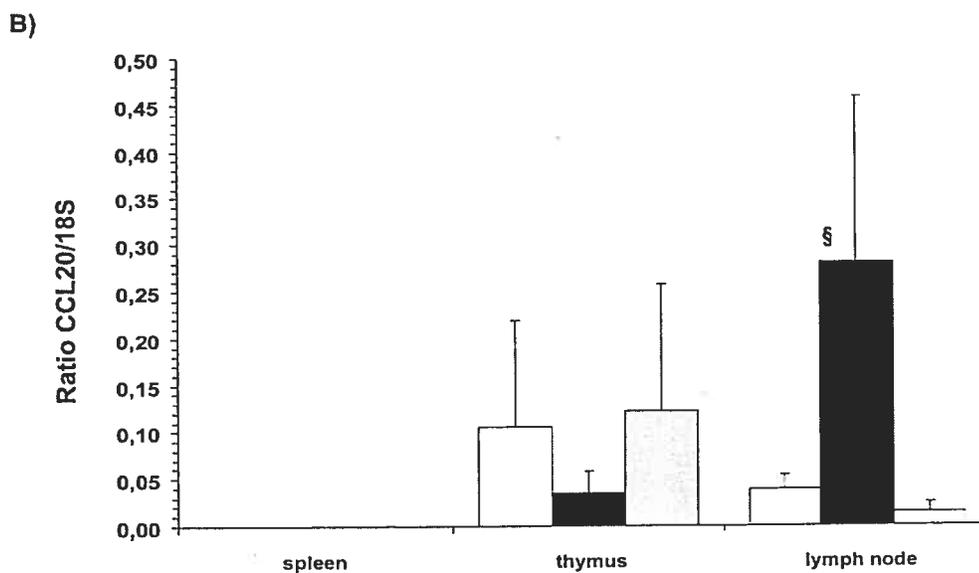
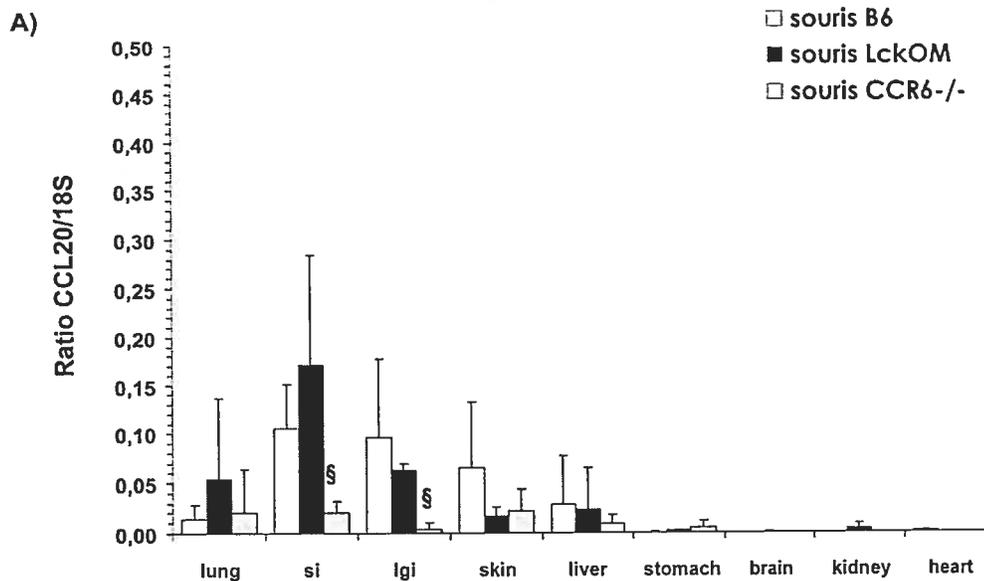
B)

ASNYDCCLSY IQTPL -PSRAIVGFTRQMADEACDINAIIFHTKKRKSVDADPKQNWVKRAVNLLSLRVKKM CCL20m  
 ASNFDCLGYTDRI LHP -KFIVGFTRQ LANEGCDINAIIFHTKKLSVCANPKQTWVK YIVRLLSKVKNM CCL20h

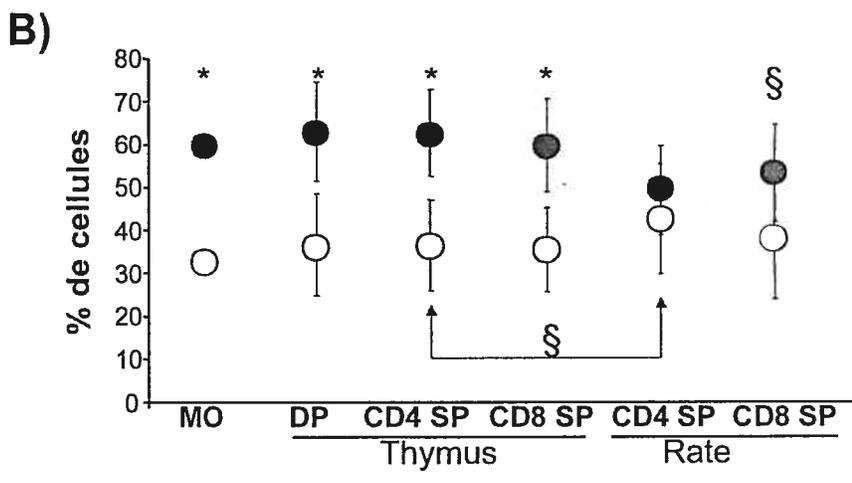
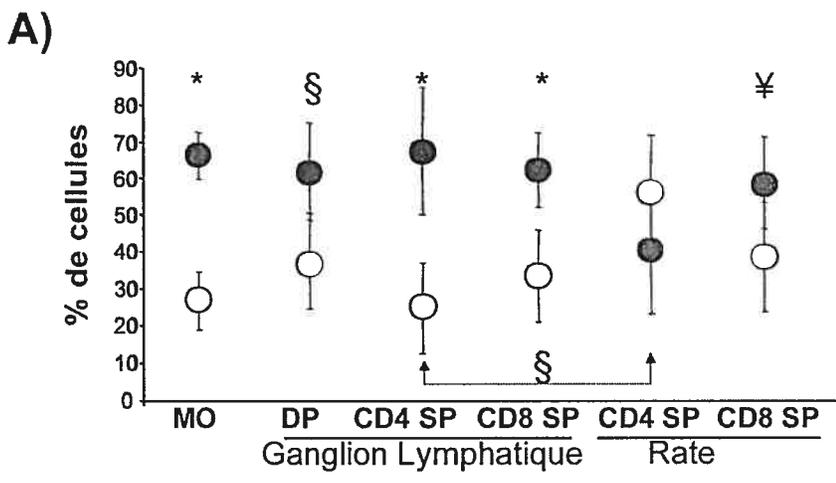
**Figure 2:** Expression de quelques chémokines et récepteurs de chémokines dans le ganglion LckOM. L'expression de 10 chémokines et de 9 récepteurs de chémokines a été étudiée par RT-PCR semiquantitatif performé en triplicata dans au moins 3 expériences indépendantes. **A) et B)** Le niveau d'expression de l'ARNm d'intérêt comparativement au niveau d'expression de la 18S (contrôle interne) a été estimé dans le thymus et les ganglions mésentériques de la souris B6 et dans les ganglions mésentériques de la souris LckOM. Les résultats sont montrés sous forme d'histogramme comme étant la moyenne  $\pm$  S.D. Le niveau d'expression dans les ganglions B6 fut arbitrairement défini à 1 et l'expression relative dans le thymus B6 et les ganglions LckOM est montrée sous forme de ratio entre thymus B6/ganglion B6 (rectangles blancs) et ganglion LckOM/ganglion B6 (rectangles noirs), respectivement. **C)** Phosphoimagerie de l'expression de CCL20 (CCL20+18S représenté en triplicata). **Résultats par Gaël Dulude**



**Figure 3:** Expression des transcrits de CCL20 dans les organes **A)** non lymphoïdes et **B)** lymphoïdes. L'expression de l'ARNm de CCL20 a été estimée dans les différents organes des souris B6 (rectangles blancs), LckOM (rectangles noirs) et CCR6<sup>-/-</sup> (rectangles gris) par RT-PCR semiquantitatif. Les résultats sont présentés sous forme de ratio entre l'expression de CCL20 et celle du contrôle interne (18S) et représentent la moyenne  $\pm$  S.D. de 3 à 9 individus indépendants par organe. pi=petit intestin, gi=gros intestin. § :  $p < 0.05$



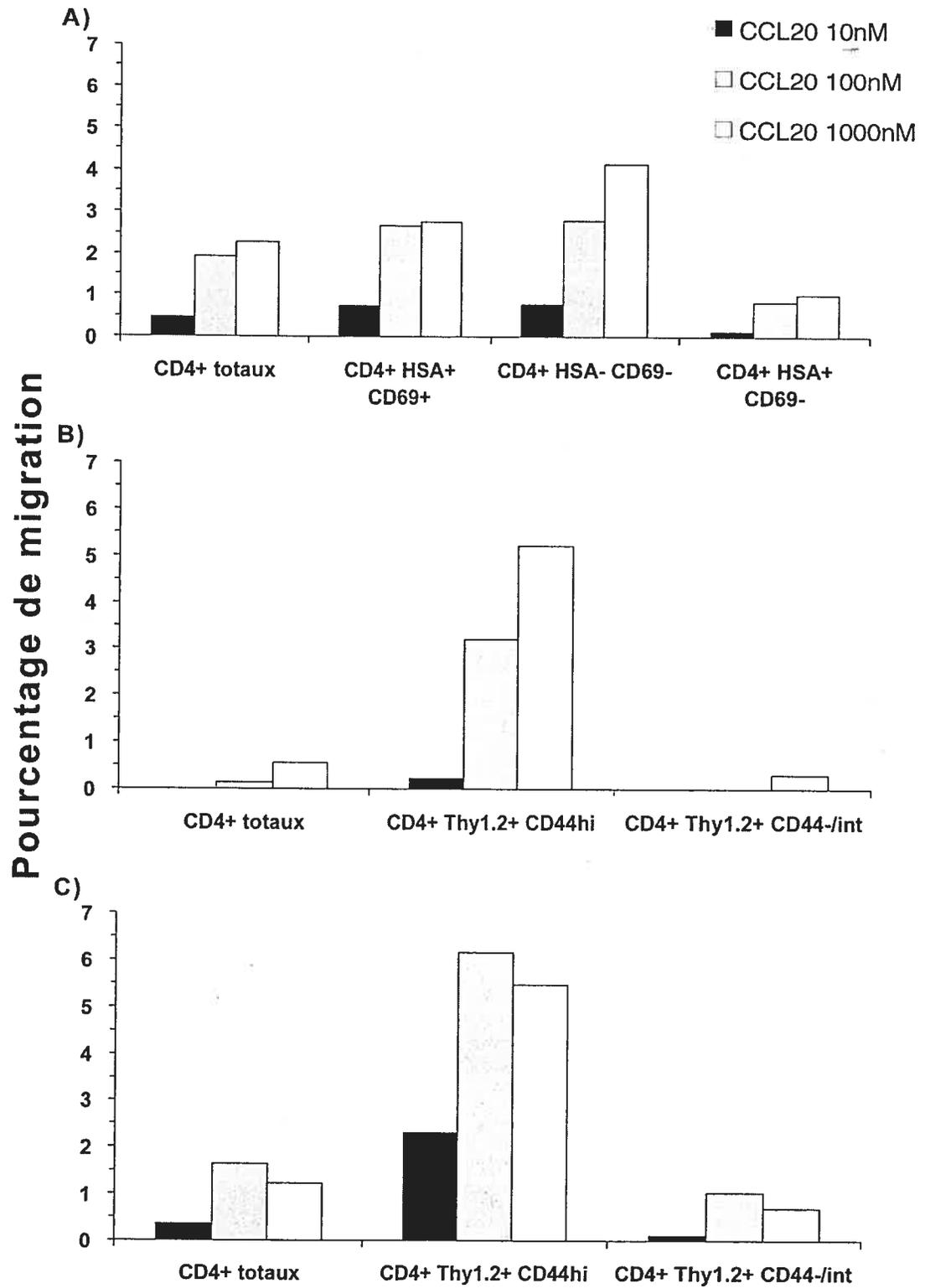
**Figure 4:** CCL20 régule l'accumulation des cellules T CD4<sup>+</sup> dans les organes lymphoïdes secondaires. **A)** Le système immunitaire de souris receveuses B6 thymectomisées et irradiées fut reconstitué avec un mélange 50:50 de cellules de moelle osseuse T-déplétée provenant de souris donneuses CCR6<sup>+</sup> (OM<sup>+</sup>Ly5.1<sup>+</sup>, cercles blancs) et CCR6<sup>-/-</sup> (OM<sup>-</sup>Ly5.1<sup>-</sup>, cercles noirs). **B)** Le système immunitaire de souris receveuses B6 non thymectomisées et irradiées fut reconstitué avec un mélange 50:50 de cellules de moelle osseuse T-déplétée provenant de souris donneuses CCR6<sup>+</sup> non transgéniques pour l'oncostatin (OM-Ly5.1<sup>+</sup>, cercles blancs) et CCR6<sup>-/-</sup> (OM-Ly5.1<sup>-</sup>, cercles noirs). **A)** et **B):** Proportion des cellules T d'origine CCR6<sup>+</sup> et CCR6<sup>-/-</sup> dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes des souris receveuses (moyenne ± S.D. de deux expériences indépendantes comprenant 6 souris par groupe). Les symboles statistiques (§ ¥ \*) réfèrent à la proportion de cellules d'origine CCR6<sup>+</sup> versus CCR6<sup>-/-</sup> au cours des différentes étapes de différenciation. La flèche indique l'augmentation significative de la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> présentes dans l'organe lymphoïde secondaire (rate) comparativement à l'organe lymphoïde "primaire" (thymus B6 et ganglion LckOM). §, p < 0.05; ¥, p < 0.01; \* < 0.001. **Résultats par Isabelle Louis**



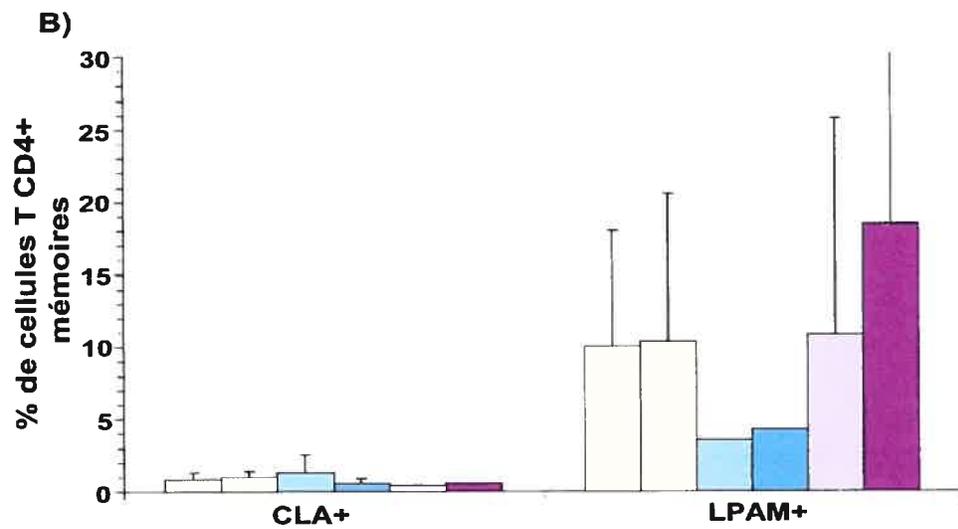
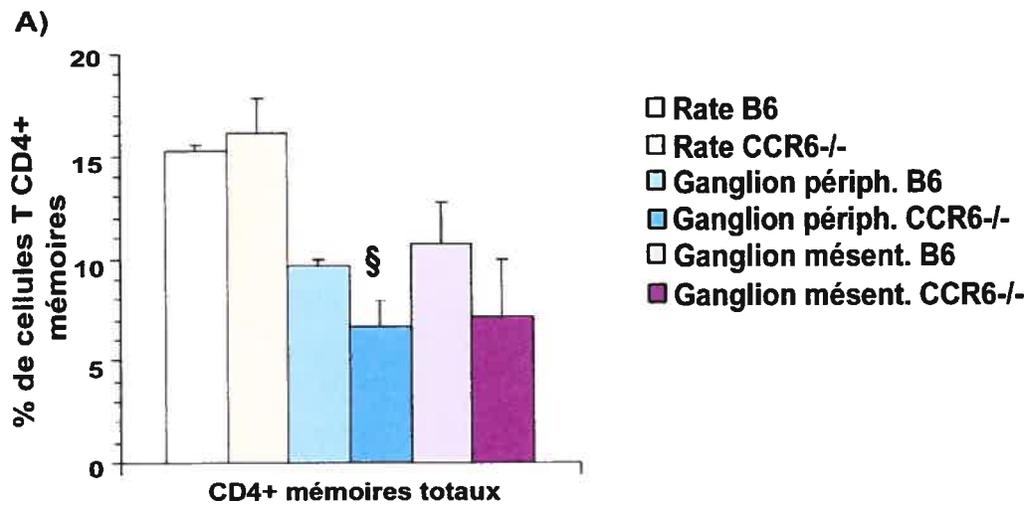
**Figure 5:** Migration générale en réponse à CCL20. Les cellules provenant des organes totaux de souris B6 et CCR6<sup>-/-</sup> furent incubées dans des chambres Transwell en présence de milieu seul ou de diverses quantités de CCL20 (nM) puis les cellules ayant traversé le filtre furent analysées par flux cytométrie. Les résultats sont montrés pour **A)** le thymus, **B)** les ganglions lymphatiques et **C)** la rate et représentent le pourcentage de cellules de chaque sous-population ayant migré sous l'effet de CCL20 (une expérience représentative sur 3). La formule utilisée est la suivante :  $[(\text{nombre de cellules après la migration à CCL20} - \text{nombre de cellules après la migration au milieu seul}) / \text{nombre de cellules au départ}] \times 100$  et est calculée en fonction de chaque sous-population.



**Figure 6:** Migration en réponse à CCL20 d'une sous-population de cellules T. Les cellules T CD4<sup>+</sup> provenant des organes totaux de souris B6 furent isolées par déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> et des cellules B à l'aide de billes magnétiques. Les cellules CD4<sup>+</sup> furent ensuite incubées dans des chambres Transwell en présence de milieu seul ou de diverses quantités de CCL20 (nM) puis les cellules ayant traversé le filtre furent analysées par flux cytométrie. Les résultats sont montrés pour **A)** le thymus, **B)** les ganglions lymphatiques et **C)** la rate et représentent le pourcentage de cellules de chaque sous-population ayant migré sous l'effet de CCL20 (une expérience représentative sur 3). La formule utilisée est la même que pour la figure précédente.



**Figure 7:** Analyse phénotypique des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires **A)** totaux et **B)** CLA<sup>+</sup> et  $\alpha_4\beta_7^+$ . Les cellules T CD4<sup>+</sup> provenant de la rate, des ganglions mésentériques et des ganglions périphériques de souris B6 et CCR6<sup>-/-</sup> furent isolées par déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> et des cellules B à l'aide de billes magnétiques. Les cellules CD4<sup>+</sup> furent ensuite marquées avec les anticorps anti-CD44 (cellules mémoires), anti-CLA (cellules CLA<sup>+</sup>) et anti-LPAM (cellules  $\alpha_4\beta_7^+$ ) puis analysées par flux cytométrie (n=3 individus indépendants).



**Figure 8 :** Des souris CCR6<sup>-/-</sup> (rectangles noirs) et CCR6<sup>+</sup> (rectangles blancs) non transgéniques pour l'oncostatin (OM<sup>-</sup>) furent abreuvées avec de l'eau supplémentée en BrdU pendant 10 jours. La proportion de cellules BrdU<sup>+</sup> parmi les splénocytes CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup> et CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup> est représentée (moyenne ± S.D. de une expérience comprenant 4 souris par groupe).

§, p < 0.05. **Résultats par Isabelle Louis**

