



HAL
open science

**ORGANO-SPÉCIFICITÉ DE L'ENDOTHÉLIUM :
MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION
D'UNE MOLÉCULE RÉGULATRICE DE
L'ADHÉSION, NOMMÉE ARM-1**

Nathalie Lamerant-Fayel

► **To cite this version:**

Nathalie Lamerant-Fayel. ORGANO-SPÉCIFICITÉ DE L'ENDOTHÉLIUM : MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION D'UNE MOLÉCULE RÉGULATRICE DE L'ADHÉSION, NOMMÉE ARM-1. domain_other. Université d'Orléans, 2004. Français. NNT: . tel-00009386v1

HAL Id: tel-00009386

<https://theses.hal.science/tel-00009386v1>

Submitted on 6 Jun 2005 (v1), last revised 3 Aug 2005 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

par Nathalie LAMERANT-FAYEL

**Organo-spécificité de l'endothélium : mise en évidence et
caractérisation d'une molécule régulatrice
de l'adhésion, nommée ARM-1**

Soutenue le 17 décembre 2004

Membres du jury :

Thierry JAFFREDO
W. Jim van DIJK
Friedrich PILLER
Francis DELMOTTE
Claudine KIEDA

Directeur de Recherche, CNRS, Paris
Professeur, Université d'Amsterdam, Pays-Bas
Chargé de Recherche, INSERM, Orléans
Professeur, Université d'Orléans
Directeur de Recherche, CNRS, Orléans

A Jeanne, mon soleil de tous les jours

A David, mon tout

A ma famille, qui m'est si précieuse

REMERCIEMENTS

Je remercie le professeur Paul Vigny pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans.

Je remercie Claudine Kieda, ma directrice de thèse, pour le soutien qu'elle m'a toujours accordé, pour son enthousiasme perpétuel et ses idées débordantes. J'ai acquis, grâce à elle, une confiance en moi et une autonomie que je n'aurais pas soupçonnées.

Je tiens à remercier Jim van Dijk ainsi que Thierry Jaffredo qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse. J'adresse également mes remerciements à Friedrich Piller et à Francis Delmotte pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je remercie Véronique et Friedrich pour leurs nombreux conseils techniques. Je remercie également Hélène Bénédicti, Nicole Bureau et Françoise Schoentgen.

Je remercie Christelle Breton pour son aide dans l'analyse bioinformatique de ma protéine d'intérêt.

Je remercie Jean-Paul Souillou et Béatrice Charreau qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire pour m'apprendre la méthode du « Differential Display ». Je remercie également Gwénola Boulday.

Je remercie Ludovic Landemarre et Olivier Michel pour leur aide dans nos essais d'obtention d'anticorps.

Un merci tout particulier pour Michèle, sans qui nous serions tous perdus au laboratoire. Je la remercie chaleureusement pour tous ces précieux conseils, notamment dans le soin de nos très chères cellules endothéliales (parfois très capricieuses...). Je la remercie pour sa gentillesse et sa très grande disponibilité.

Tout ce travail a été réalisé dans la bonne humeur grâce à l'ambiance chaleureuse du laboratoire et à la présence de nombreux amis.

Je remercie Claire, ma voisine de « paillasse », avec qui nous nous sommes toujours serrés les coudes, notamment les soirs quand il fallait encore trouver le réactif « miracle » pour sauver notre expérience... Je la remercie aussi pour sa présence réconfortante en un moment très, très particulier, inoubliable pour moi.

Je remercie David qui se souviendra sans doute de mes « supers » tris de cellules avec 0,0001% de cellules vertes (là, j'ai exagéré !!!).

Je remercie Pauline, toujours souriante et prête à rendre service, pour son aide précieuse dans les dernières manip avant la rédaction.

Je n'oublie pas Magdalena, Alexandra, Christine, Stéphanie, Mahajoub, Laure, Mélanie, Natacha, Pierre, Pédro et les autres.

Je remercie enfin Dany, Annie-Claude Roche, Michel Monsigny et tous les autres membres du laboratoire qui ont participé à la bonne ambiance générale.

ABREVIATIONS

aa	: acide aminé
ACE	: <i>angiotensin converting enzyme</i>
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNc	: acide désoxyribonucléique complémentaire
ARM-1	: <i>adhesion regulating molecule 1</i>
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
BSA	: <i>bovine serum albumin</i>
<i>C. crescentus</i>	: <i>Caulobacter crescentus</i>
CAM	: <i>cell adhesion molecule</i>
CDS	: <i>coding sequence</i>
CE	: cellule endothéliale
CEA	: <i>carcinoembryonic antigen</i>
CLA	: <i>cutaneous lymphocyte associated antigen</i>
dATP	: 2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	: 2'-deoxycytidine 5'-triphosphate
dGTP	: 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	: mélange de dATP, dCTP, dGTP et dTTP
DO	: densité optique
dTTP	: 2'-deoxythymidine 5'-triphosphate
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EC	: cellule endothéliale (« Endothelial Cell »)
ESL-1	: <i>E-selectin ligand 1</i>
FGF	: <i>fibroblast growth factor</i>
FITC	: <i>fluorescein iso-thiocyanate</i>
GAG	: glycosaminoglycane
GFP	: <i>green fluorescent protein</i>
GlyCAM-1	: <i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1</i>
GPI	: glycosylphosphatidylinositol
h	: heure
HCA	: <i>hydrophobic cluster analysis</i>
HCl	: chlorure d'hydrogène
HEC	: haute cellule endothéliale (« High Endothelial Cell »)
HECa10	: lignée murine de hautes cellules endothéliales de ganglions lymphatiques périphériques clone a10
HECpp	: lignée murine de hautes cellules endothéliales de plaques de Peyer
HEV	: haute veinule endothéliale (« High Endothelial Venule »)
His	: histidine
HLMEC	: lignée humaine de cellules endothéliales microvasculaires de poumon (« Human Lung Microvascular Endothelial Cells »)
HMLNEC	: lignée humaine de hautes cellules endothéliales de ganglions lymphatiques mésentériques (« Human Mesenteric Lymph Nodes Endothelial Cells »)
HPLNEC-B3	: lignée humaine de hautes cellules endothéliales de ganglions lymphatiques périphériques, clone B3 (« Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells clone B3 »)
hrGFP	: <i>humanized recombinant green fluorescent protein</i>
HSkMEC	: lignée humaine de cellules endothéliales microvasculaires de peau (« Human Skin Microvascular Endothelial Cells »)
ICAM	: <i>intracellular cell adhesion molecule</i>
IL	: interleukine
INF	: interféron
IPTG	: isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRES	: <i>internal ribosome entry site</i>
KCl	: chlorure de potassium
LPS	: lipopolysaccharides

M	: molaire
MAd	: <i>mucosal addressin</i>
MAdCAM	: <i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MAP	: <i>mitogene activated proteins</i>
MECA	: <i>mouse endothelial cell antigen</i>
MEM	: <i>minimun essential medium</i>
min	: minute
N°	: numéro
pb	: paire de base
PBS	: tampon phosphate (« Phosphate Buffer Saline »)
PBSc	: PBSc complet (contenant 1 mM de CaCl ₂ et 0,5 mM de MgCl ₂)
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PECAM	: <i>platelet-endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	: paraformaldéhyde
PSGL-1	: <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RNA	: <i>ribonucleic acid</i>
rpm	: rotation par minute
s	: seconde
SAB	: <i>serum albumin bovine</i>
TNF	: <i>tumor necrosis factor</i>
trc	: tryptophane
TRITC	: <i>tetramethylrhodamine isothiocyanate</i>
VAP	: <i>vascular adhesion protein</i>
VCAM	: <i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	: <i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R2	: <i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

(hors articles)

FIGURE 1 : PROCESSUS FAISANT INTERVENIR L'ENDOTHELIUM.....	14
FIGURE 2 : PASSAGE TRANSENDOTHELIAL ORGANO-SPECIFIQUE DE CELLULES CIRCULANTES DANS LE SANG.....	14
FIGURE 3 : PRODUITS D'EXPRESSION ET/OU DE SECRETION DES CELLULES ENDOTHELIALES RELATIFS A LA PHYSIOLOGIE DES VAISSEAUX .	18
FIGURE 4 : STRUCTURE DES VAISSEAUX SANGUINS.....	19
FIGURE 5 : VOIES DE RECIRCULATION DES LYMPHOCYTES.....	22
FIGURE 6 : PROCESSUS EN CASCADE MENANT A LA DOMICILIATION DES LYMPHOCYTES ET AU RECRUTEMENT DES LEUCOCYTES DURANT L'INFLAMMATION.....	24
FIGURE 7 : PRINCIPALES MOLECULES INTERVENANT DANS LA RECONNAISSANCE ENTRE CELLULES ENDOTHELIALES ET LEUCOCYTES.....	27
FIGURE 8 : REPRESENTATION STRUCTURALE DES SELECTINES.....	28
FIGURE 9 : PRINCIPAUX LIGANDS DES SELECTINES.....	31
FIGURE 10 : VOIES DE SIGNALISATION INITIEES PAR LA LIAISON DES SELECTINES OU DE LEURS LIGANDS.....	33
FIGURE 11 : LES QUATRES FAMILLES DE CHIMIOKINES	38
FIGURE 12 : LES RECEPTEURS DE CHIMIOKINES ET LEURS LIGANDS .	39
FIGURE 13 : PROCESSUS FAISANT INTERVENIR LES CHIMIOKINES.....	40
FIGURE 14 : LES DIFFERENTES SOUS-UNITES α ET β , COMPOSANT LES INTEGRINES	43
FIGURE 15 : MECANISMES D'ACTIVATION DES INTEGRINES.....	46
FIGURE 16 : ACTIVATION SEQUENTIELLE DES INTEGRINES.....	47
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TRANSMIGRATION DES LEUCOCYTES ET DES JONCTIONS INTERCELLULAIRES	48
FIGURE 18 : LES PROTEINES DE JONCTIONS ENDOTHELIALES	49
FIGURE 19 : MOLECULES ENDOTHELIALES IMPLIQUEES DANS L'ETAPE DE TRANSMIGRATION DU LEUCOCYTE	51
FIGURE 20 : MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA CASCADE DE L'ADHESION, SELON LE TISSU CONSIDERE	55
FIGURE 21 : EXPRESSION PREFERENTIELLE DE RECEPTEURS DE GLYCOCONJUGUES SUIVANT L'ORIGINE DES CELLULES ENDOTHELIALES	67
FIGURE 22 : PRINCIPE DE LA METHODE DU « RNA DIFFERENTIAL DISPLAY ».	74
FIGURE 23 : EXTRAIT D'UNE AUTORADIOGRAPHIE DE GEL DE POLYACRYLAMIDE APRES MIGRATION DES PRODUITS DE PCR.....	76
FIGURE 24 : EXPRESSION D'ARM-1 DANS LES LIGNEES HECa10 ET HECpp, ANALYSEE PAR RT-PCR.	79
FIGURE 25 : ALIGNEMENT MULTIPLE DES SEQUENCES PROTEIQUES D'ARM-1 ET DE SES HOMOLOGUES.....	82
FIGURE 26 : TRACE HCA D'ARM-1	83
FIGURE 27 : REPRESENTATION DES PROFILS D'HYDROPHOBICITE DE DIFFERENTES PROTEINES.....	84
FIGURE 28 : SITES POTENTIELS DE GLYCOSYLATION D'ARM-1.....	85
FIGURE 29 : PLASMIDES PERMETTANT L'EXPRESSION D'ARM-1 AVEC UN EPITOPE MYC.....	89
FIGURE 30 : PLASMIDE PERMETTANT LA COEXPRESSION D'ARM-1 AVEC LA PROTEINE hrGFP	90
FIGURE 31 : PROFILS DE CYTOMETRIE DES CELLULES HSkMEC TRANSFECTEES PAR LE VECTEUR PIREs-hrGFP-ARM-1 (AVANT LE TRI).	91
FIGURE 32 : PROFILS DE CYTOMETRIE DES DIFFERENTES POPULATIONS DE CELLULES HSkMEC UTILISEES POUR LES EXPERIENCES D'ADHESION CELLULAIRE (QUATRE SEMAINES APRES LE TRI).	92
FIGURE 33 : MARQUAGE DES CELLULES HSkMEC, TRANFECTEES OU NON PAR LE VECTEUR pIREs-hrGFP-ARM-1.....	93
FIGURE 34 : ADHESION DE CELLULES NKL SUR DIFFERENTES LIGNEES DE CELLULES ENDOTHELIALES MISES DANS UN CONTEXTE TUMORAL.	123
FIGURE 35 : EXPRESSION D'ARM-1 AU SEIN DE CELLULES ENDOTHELIALES MISES DANS UN CONTEXTE TUMORAL	124
FIGURE 36 : VECTEURS D'EXPRESSION UTILISES POUR L'IMMUNISATION GENIQUE.....	127
FIGURE 37 : VECTEURS UTILISES POUR L'EXPRESSION D'ARM-1 DANS <i>ESCHERICHIA COLI</i>	129
FIGURE 38 : STRUCTURE DE LA PAROI DE LA BACTERIE <i>CAULOBACTER CRESCENTUS</i>	131
FIGURE 39 : STRUCTURE DE LA PROTEINE RsaA.....	132
FIGURE 40 : PLASMIDE UTILISE POUR L'EXPRESSION DE PROTEINES DANS LE SYSTEME <i>C. CRESCENTUS</i>	133
FIGURE 41 : OBTENTION D'AGREGATS PROTEIQUES APRES FILTRATION SUR MEMBRANE DE NYLON D'UNE CULTURE DE 72 HEURES DE BACTERIES B5 BAC, TRANSFORMEES PAR LE PLASMIDE pCX-RsaA ⁶⁹⁰⁻¹⁰³⁶	135

TABLE 1 :	CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DES SELECTINES.	29
TABLE 2 :	EXPRESSION EN SURFACE DE LA E- ET DE LA P-SELECTINE PAR LES HUVEC EN REPONSE A DIFFERENTS STIMULI.	30
TABLE 3 :	PRINCIPAUX LIGANDS DE LA L-SELECTINE.	32
TABLE 4 :	PRINCIPAUX LIGANDS DE LA P-SELECTINE.	32
TABLE 5 :	PRINCIPAUX LIGANDS DE LA E-SELECTINE.	32
TABLE 6 :	INTEGRINES IMPLIQUEES DANS L'ADHESION DES LEUCOCYTES A L'ENDOTHELIUM.	44
TABLE 7 :	MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES IMPLIQUES DANS LE RENFORCEMENT DE L'ADHESION DES LEUCOCYTES SUR L'ENDOTHELIUM.	44
TABLE 8 :	IDENTIFICATION DE PEPTIDES POUVANT ETRE UTILISES POUR CIBLER L'ENDOTHELIUM.	62
TABLE 9 :	FRAGMENTS D'ADNc IDENTIFIES PAR LA METHODE DU « DIFFERENTIAL DISPLAY »	77
TABLE 10 :	PROTEINES HOMOLOGUES A ARM-1.....	81

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	7
SOMMAIRE.....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
CHAPITRE I- L'ENDOTHELIUM.....	17
I- Caractéristiques.....	17
A- Origine et structure.....	17
B- Fonctions.....	18
C- Les hautes veinules post-capillaires (HEV).....	19
1- Présentation, distribution et rôle des HEV.....	19
2- Contrôle de la spécialisation des HEV par le micro-environnement.....	20
3- Caractéristiques des hautes cellules endothéliales (HEC).....	21
3.1- Caractéristiques morphologiques et structurales.....	21
3.2- Marqueurs des HEC.....	21
II- Rôle dans le trafic cellulaire.....	22
A- La recirculation des lymphocytes.....	22
B- Le recrutement leucocytaire lors d'une inflammation.....	23
C- Le processus de recrutement.....	23
D- Implications dans la dissémination des cellules cancéreuses.....	25
CHAPITRE II- L'ADHESION CELLULAIRE : LES ACTEURS DE LA RECONNAISSANCE CELLULAIRE.....	27
I- L'adhésion primaire : reconnaissance et roulement.....	27
A- Les sélectines et leurs ligands.....	28
1- Présentation des sélectines : structure et régulation de leur expression.....	28
2- Les ligands des sélectines.....	30
2.1- Les structures glycaniques reconnues.....	30
2.2- Les ligands protéiques.....	31
3- La signalisation au travers des sélectines.....	33
B- Les autres molécules impliquées dans l'adhésion primaire.....	34
1- Les intégrines.....	34
2- Le CD44.....	35
3- VAP-1.....	35

II- Le chimiotactisme et la stimulation des leucocytes.....	36
A- Le chimiotactisme et la stimulation des partenaires cellulaires	36
1- Le chimiotactisme	36
2- La stimulation des partenaires cellulaires	37
B- Les médiateurs du chimiotactisme et de la stimulation.....	37
1- Les cytokines	37
2- Les chimioattractants	38
3- Les chimiokines	38
3.1- Définition et classification.....	38
3.2- Les récepteurs de chimiokines.....	39
3.3- Rôles des chimiokines	40
3.4- Leurs rôles dans l'adhésion cellulaire	41
III- Le renforcement de l'adhésion.....	42
A- Présentation des intégrines : structure, rôle et ligands	43
B- Les intégrines et la transduction des signaux	45
1- La transduction du signal de « l'intérieur vers l'extérieur »	45
2- La transduction du signal de "l'extérieur vers l'intérieur"	45
C- Activation des intégrines dans l'adhésion cellulaire	45
IV- La diapédèse.....	48
A- Les jonctions intercellulaires endothéliales.....	49
B- Les acteurs de la diapédèse	50
1- PECAM-1	51
2- Le CD99.....	52
3- La VE-cadhérine	52
4- Les protéines JAM	52
CHAPITRE III-L'ORGANO-SPECIFICITE DE L'ENDOTHELIUM.....	54
I- L'organo-spécificité de l'endothélium dans le processus de circulation des leucocytes.....	55
A- Les sélectines et leurs ligands	55
B- Les chimiokines et leurs récepteurs.....	57
1- CCL21	57
2- CCL25	58
3- CCL17 et CCL27	59
4- CCL28/MEC	59
5- Les glycosaminoglycannes	60
II- L'organo-spécificité de l'endothélium comme cible thérapeutique	60
A- Caractérisation.....	61
B- Implications dans le développement de nouveaux traitements thérapeutiques anticancéreux.....	62
STRATEGIE DE RECHERCHE.....	65
RESULTATS.....	70

PREMIERE PARTIE : ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE GENES ENTRE DEUX LIGNEES DE HAUTES CELLULES ENDOTHELIALES 71

I- Analyse de l'expression différentielle de gènes entre deux lignées de hautes cellules endothéliales par la méthode du « differential display ».....	73
A- Introduction	73
B- Matériels et méthodes.....	74
1- Culture cellulaire et extraction d'ARN totaux.....	74
2- RT-PCR et électrophorèse	75
3- Clonage et séquençage.....	76
C- Résultats	77
1- Identification des ADNc différemment exprimés entre les lignées HECa10 et HECpp.....	77
2- Confirmation de l'expression différentielle des ADNc identifiés	78
II- Confirmation de l'expression préférentielle d'ARM-1 dans la lignée HECpp.....	79
A- Matériels et méthodes.....	79
B- Résultats	79
III- Connaissances actuelles des propriétés d'ARM-1	80
A- Identification d'ARM-1	80
B- Etude de sa séquence protéique.....	80
C- Fonctions d'ARM-1	86

DEUXIEME PARTIE : ETUDES DE L'EXPRESSION ET DES PROPRIETES ADHESIVES DE LA PROTEINE ARM-1 AU SEIN DES CELLULES ENDOTHELIALES..... 88

I- Matériels et méthodes	89
A- Les vecteurs d'expression utilisés	89
B- Tri par cytométrie en flux des cellules endothéliales de peau transfectées, exprimant ARM-1	91
II- Résultats	93
Article soumis à publication « Adhesion properties of ARM-1 protein on endothelial cells ».....	96

TROISIEME PARTIE : EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES A L'ETUDE DE LA PROTEINE ARM-1 120

I- Etude de l'expression d'ARM-1 au niveau de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral.....	121
A- Matériels et méthodes.....	121
B- Résultats	122
1- Adhésion cellulaire suite à l'activation des cellules endothéliales par les milieux conditionnés.....	122
2- Expression d'ARM-1 au sein de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral.....	123

II- Essai d'activation des cellules endothéliales pour favoriser une éventuelle expression d'ARM-1 à la surface cellulaire.....	124
III- Essai d'obtention d'anticorps dirigés contre la protéine ARM-1	125
A- Obtention d'anticorps anti-ARM-1 par immunisation génique	125
1- L'immunisation génique	125
2- Immunisation génique chez le rat et chez la poule	126
2.1- Matériels et méthodes.....	126
2.2- Résultats	128
B- Expression de la protéine ARM-1 dans un système <i>E. coli</i>	129
1- Matériels et méthodes	129
2- Résultats.....	131
C- Expression de la protéine ARM-1 dans un système <i>Caulobacter</i>	131
1- Description du système d'expression dans <i>Caulobacter</i>	131
2- Matériels et méthodes	133
3- Résultats	134

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 136

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 143

TRAVAUX COMPLEMENTAIRES A MON TRAVAIL DE THESE..... 162

PARTIE I : chapitre d'un livre intitulé « Cancer growth and progression »
(2^{ème} édition, éditeur Hans Kaiser, Kluwer Academic eds)..... 163

PARTIE II : Article « Original human endothelial cell lines as a proof of chemokines contribution to organospecificity » soumis à publication dans le journal « Experimental Cell Research »..... 177

ANNEXES 187

ANNEXE 1	188
ANNEXE 2	190
ANNEXE 3	193
ANNEXE 4	194
ANNEXE 5	195

A l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium joue un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (figure 1) (Cines *et al.*, 1998).

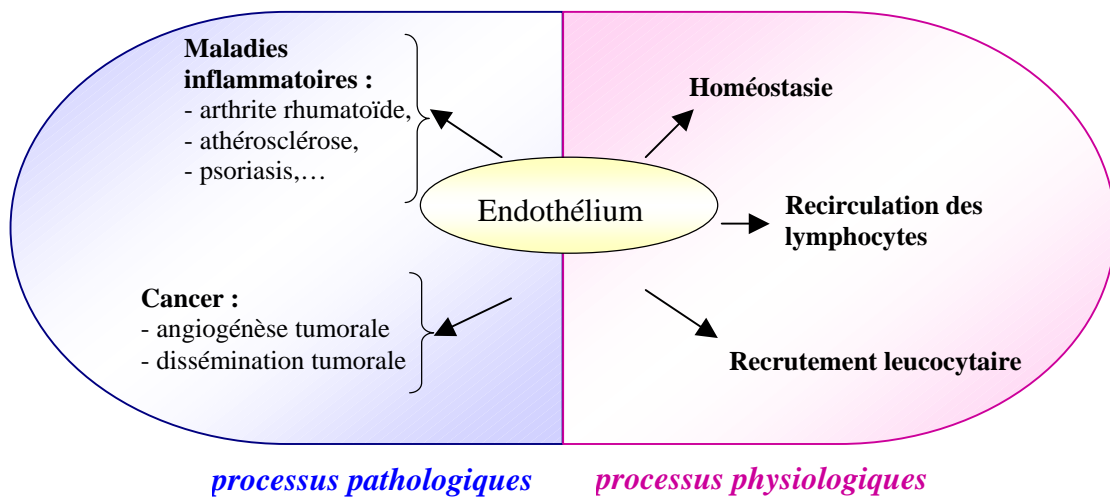


Figure 1 : processus faisant intervenir l'endothélium.

Un grand nombre de ces processus implique le passage de cellules circulantes, du sang dans les tissus, au travers de la barrière endothéliale (figure 2).

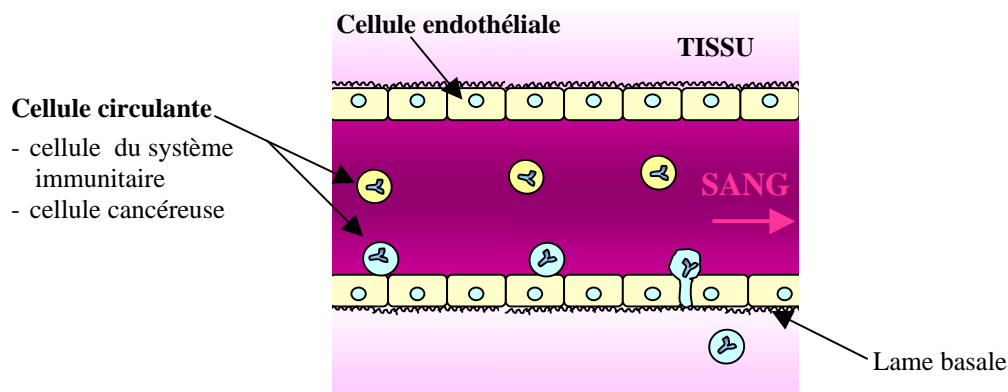


Figure 2 : passage transendothélial organo-spécifique de cellules circulantes dans le sang.

Ce passage est hautement contrôlé par l'endothélium. Une reconnaissance très étroite entre les cellules endothéliales et la cellule circulante est nécessaire, faisant intervenir de nombreuses molécules d'adhésion.

Le passage des cellules au travers de la barrière endothéliale s'effectue de manière organo-spécifique (Butcher *et al.*, 1980; Kieda, 2003) : suivant son origine tissulaire, l'endothélium

sélectionne des populations spécifiques de cellules circulantes. Ceci se vérifie dans la recirculation des lymphocytes et dans le recrutement leucocytaire lors d'une inflammation, mais également dans le cas de cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses mammaires, circulantes dans le sang, migrent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques périphériques alors que les cellules cancéreuses de colon envahissent préférentiellement les plaques de Peyer.

Ainsi, le passage organo-spécifique des cellules cancéreuses du sang dans les tissus détermine les sites préférentiels de colonisations secondaires de ces cellules (métastases) (McCarthy *et al.*, 1991; Pauli *et al.*, 1990).

Connaître les mécanismes moléculaires de l'organo-spécificité de l'endothélium est d'un intérêt majeur pour le traitement du cancer et de nombreuses maladies inflammatoires. Cette approche thérapeutique est d'autant plus intéressante que l'on va pouvoir cibler spécifiquement les thérapies dans tel ou tel tissu, agressé ou infecté, réduisant considérablement les effets secondaires observés lors de traitements classiques tels que la chimiothérapie dans le cas du cancer.

Chapitre I- L'endothélium

L'endothélium borde le système vasculaire dans son entier et est composé d'une monocouche de cellules endothéliales, constituée approximativement de $1 \text{ à } 6 \times 10^{13}$ cellules chez l'adulte. L'endothélium forme ainsi un « organe » d'environ un kilo et représente une surface totale de $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$ (Augustin *et al.*, 1994). Il est semi-perméable et contrôle le transfert de petites et de grosses molécules. Bien qu'il ait longtemps été considéré comme une barrière inerte permettant de séparer le sang des tissus sous-jacents, on sait aujourd'hui que les cellules endothéliales qui le constituent sont dynamiques et ont un rôle extrêmement important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Fajardo, 1989).

I- Caractéristiques

A- Origine et structure

Les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques proviennent d'un même précurseur, l'hémangioblaste (Choi *et al.*, 1998). Sous l'influence de facteurs environnementaux tels que le VEGF, la différenciation cellulaire peut être suivie par différents marqueurs tels que le facteur de transcription SLC/tal-1 ou le récepteur du VEGF, VEGF-R2 (Jaffredo *et al.*, 1998; Minko *et al.*, 2003). Lors du développement embryonnaire, l'arbre vasculaire se construit suite à deux phénomènes distincts : la vasculogénèse (formation de vaisseaux sanguins à partir des cellules précurseurs) et l'angiogénèse (formation de vaisseaux à partir de vaisseaux existants). Contrairement à la vasculogénèse, l'angiogénèse peut également avoir lieu chez l'adulte, dans un cas de réparation tissulaire ou dans un contexte tumoral.

Bien que toutes les cellules endothéliales vasculaires (CE) partagent certaines fonctions, une grande hétérogénéité existe au sein de ces cellules, à la fois au niveau structural et fonctionnel, le long de l'arbre vasculaire, mais également dans les lits microvasculaires de certains organes (Garlanda et Dejana, 1997; Gerritsen, 1987).

Ainsi, loin d'être une population homogène de cellules, l'endothélium représente une association de sous-ensembles cellulaires, localisés à l'intérieur des vaisseaux sanguins de différents tissus. Bien que partageant certaines caractéristiques communes, chaque sous-ensemble s'adapte de façon unique à la demande du micro-environnement. Par exemple, au niveau structural, les CE peuvent former une monocouche continue et serrée dans des organes

tels que le cerveau ou les poumons, où elles doivent remplir des fonctions importantes de « barrière ». Alternativement, elles peuvent former une couche discontinue avec des fenêtres intercellulaires dans des organes tels que le rein, la rate ou la moelle osseuse, permettant un échange rapide de fluides, de particules et de cellules. Relativement à cela, les organes lymphoïdes secondaires (à l'exception de la rate) présentent des CE nommées hautes cellules endothéliales (HEC) qui sont des CE post capillaires spécialisées, supportant et contrôlant le passage de très nombreux lymphocytes du sang dans les tissus (Girard et Springer, 1995).

L'origine de cette hétérogénéité reste peu caractérisée. On sait cependant que l'environnement dans lequel se situe la cellule endothéliale joue un rôle extrêmement important dans la détermination de ses fonctions : les CE « communiquent » avec l'organe et le tissu environnant, soit par l'intermédiaire de facteurs solubles ou présents dans la matrice (cytokines, thrombine,...), soit par des interactions cellule-cellule. Par exemple, des cellules endothéliales aortiques, cultivées sur une matrice dérivée de cellules de rein, développent des fenêtres intercellulaires (Milici *et al.*, 1985).

Les CE sont également sensibles aux forces mécaniques relatives au flux sanguin.

B- Fonctions

L'endothélium possède de nombreuses propriétés synthétiques et métaboliques (figure 3), notamment pour la régulation de l'homéostasie et la sécrétion de nombreuses substances vaso-actives régissant le tonus et la croissance vasculaire.

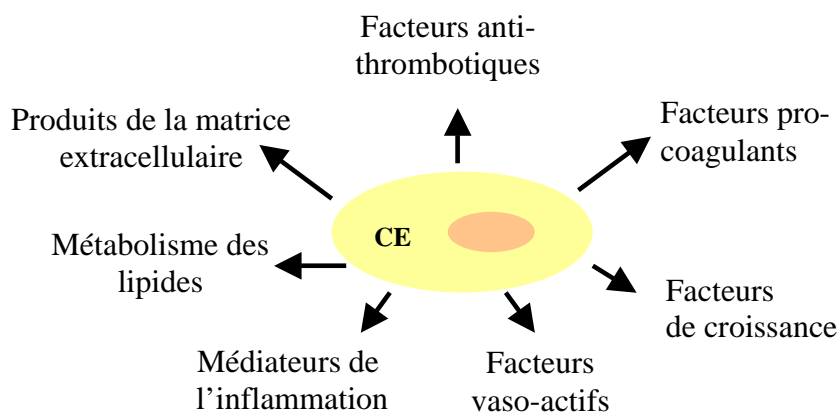


Figure 3 : produits d'expression et/ou de sécrétion des cellules endothéliales relatifs à la physiologie des vaisseaux (d'après Sumpio *et al.*, 2002).

Ces cellules exercent des actions autocrines et paracrines importantes à travers leur influence sur les cellules du muscle lisse ou sur les cellules circulantes du sang comme les plaquettes ou les leucocytes. L'endothélium intervient également dans la formation de nouveaux vaisseaux (processus nommé angiogénèse) et dans la régulation des réponses immunes et inflammatoires, en contrôlant le passage des leucocytes du sang dans les tissus. De ce fait, un mauvais fonctionnement de l'endothélium est en cause dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose ou le cancer mais également dans de nombreuses maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde.

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons exclusivement aux cellules endothéliales microvasculaires (figure 4). En effet, ce sont elles qui assurent en grande majorité le trafic cellulaire, plus précisément la recirculation des lymphocytes et le recrutement leucocytaire suite à une inflammation ou à une agression.

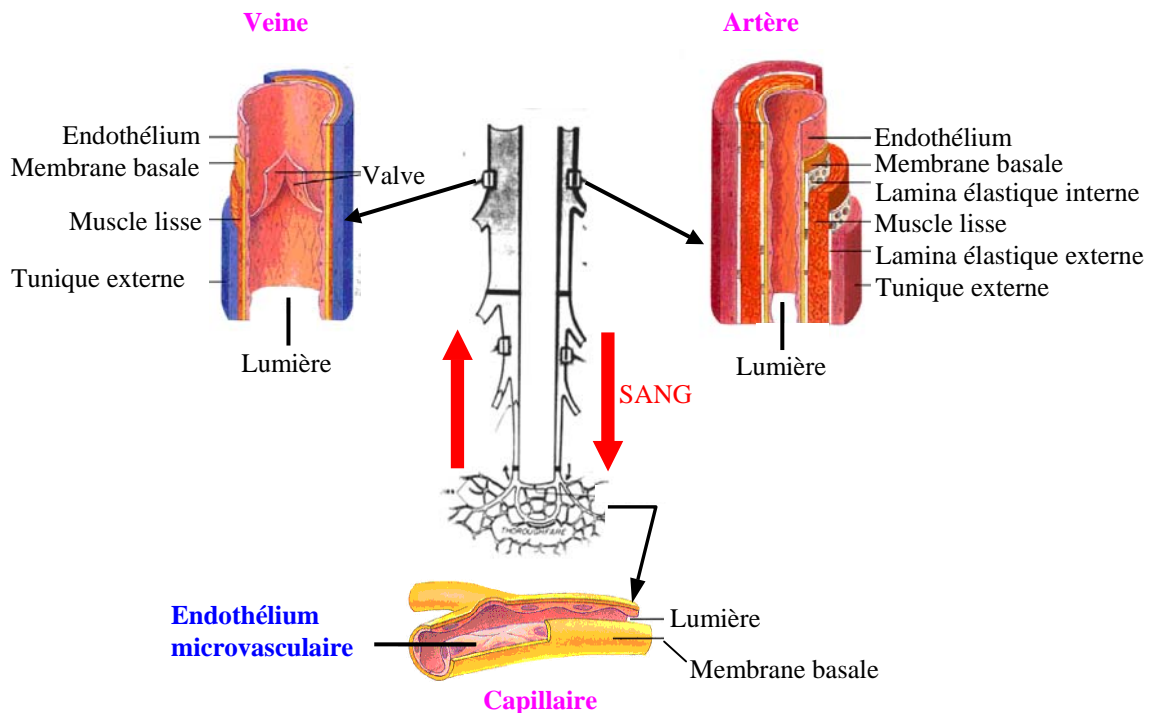


Figure 4 : structure des vaisseaux sanguins (d'après les sites internet <http://www.engin.umich.edu/class/bme456/bloodves/bloodves.htm> et <http://www.sci.sdsu.edu/class/bio590/pictures/lect5/5.2.html>)

- C- Les hautes veinules post-capillaires (HEV)
 - 1- Présentation, distribution et rôle des HEV

Dans les organes lymphoïdes, l'adhésion et la migration des lymphocytes au travers de

l'endothélium se fait au niveau de sites spécialisés de l'appareil vasculaire post-capillaire appelés veinules à haut endothélium (HEV, « High Endothelial Venules »). Il s'agit de sites privilégiés de pénétration des lymphocytes (Girard et Springer, 1995). Les veinules à haut endothélium sont présentes dans tous les organes lymphoïdes secondaires, exceptée la rate. On les trouve donc dans les ganglions lymphatiques périphériques et les tissus lymphoïdes liés aux tractus digestifs (appendice, plaques de Peyer), respiratoire (bronches, végétations, amygdales), uro-génital et aux glandes mammaires lactantes. Des vaisseaux de type HEV sont observés dans des tissus non lymphoïdes chroniquement inflammés et permettent le recrutement des lymphocytes dans ces sites d'inflammation. Il est donc permis aux lymphocytes de quitter la circulation sanguine *via* des veinules non spécialisées, le phénotype "haut" n'étant pas primordial (Binns *et al.*, 1996).

2- Contrôle de la spécialisation des HEV par le micro-environnement

Les hautes cellules endothéliales (HEC, « High Endothelial Cell »), constituant les HEV, sont un exemple de différenciation des CE. Cette spécialisation est sous le contrôle du micro-environnement en général, de la lymphe, des cytokines et des molécules de la matrice extracellulaire en particulier, mais aussi des forces de flux. Lorsque les ganglions lymphatiques périphériques sont privés de lymphe par étranglement des canaux lymphatiques afférents, leur morphologie change pour donner un phénotype « plat » ; l'expression de l'adressine vasculaire GlyCAM-1 diminue très fortement et il y a inhibition totale de l'adhésion assurée par la L-sélectine (Mebius *et al.*, 1993). La lymphe contient des cellules ou des facteurs qui régulent le phénotype et la fonction des HEV, tel le drainage constant des antigènes à partir des tissus périphériques. Ainsi, l'injection directe d'antigènes dans le ganglion privé de lymphe restaure la morphologie caractéristique des HEV (Mebius *et al.*, 1991). Par ailleurs, l'activation des cellules lymphoïdes provoque la sécrétion de nombreuses cytokines qui contribuent au maintien des hauts endothéliums et constituent une différence majeure entre les micro-environnements des HEV et des veinules post-capillaires non lymphoïdes. Cependant les cytokines ne suffisent pas à induire la spécialisation des HEV. Les molécules de la matrice extracellulaire, connues pour déterminer la différenciation des cellules endothéliales, jouent aussi un rôle important dans l'induction de la spécialisation des HEV et dans le maintien du phénotype « haut » (Girard et Springer, 1995). Enfin, les forces de cisaillement affectent, elles aussi, la structure et les fonctions de l'endothélium.

3- Caractéristiques des hautes cellules endothéliales (HEC)

3.1- Caractéristiques morphologiques et structurales

Les hautes cellules endothéliales présentent une morphologie particulière ; elles sont cuboïdes et hautes (10 à 12 μm). Leur ultrastructure est caractérisée par un appareil de Golgi très développé, d'abondants poly-ribosomes et un réticulum endoplasmique rugueux. Ceci traduit une activité de biosynthèse intense qui n'est pas observée dans les cellules de l'endothélium plat. Ces cellules contiennent aussi de nombreuses structures vésiculaires associées à la membrane plasmique, tels les granules de Weibel-Palade, qui traduisent d'abondantes sécrétions.

Les hautes cellules endothéliales présentent, en plus de leurs caractéristiques morphologiques et ultra-structurales, des caractères biochimiques spécifiques.

3.2- Marqueurs des HEC

Ces cellules expriment des molécules membranaires caractéristiques de leur différenciation en cellules du haut endothélium. Par exemple, dans le système murin, l'antigène MECA-325 (Mouse Endothelial Cell Antigen) est présent sur les HEC des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer, mais demeure absent des autres endothéliums vasculaires (Duijvestijn *et al.*, 1986). Cependant, il est également détecté sur les vaisseaux de type HEV induits dans les sites d'inflammations chroniques et au niveau des veinules à parois fines de la lamina propria intestinale.

Parmi les marqueurs des HEC se trouvent de nombreuses molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et participant à l'organo-spécificité du processus. Les molécules nommées « adressines » vasculaires en sont un exemple : ce sont des glycoprotéines allongées, substituées par des O-glycannes. On distingue les adressines vasculaires périphériques (PNAd : Peripheral Nodes Addressin) et les adressines vasculaires du système muqueux (MAd : Mucosal Addressin). Ces molécules seront décrites plus en détails dans le chapitre II. I-A-2.

II- Rôle dans le trafic cellulaire

A- La recirculation des lymphocytes

La défense efficace de l'organisme contre l'invasion de pathogènes étrangers est fortement dépendante de la présence d'un clone de lymphocytes portant la bonne spécificité d'antigène dans un lieu donné et à un temps donné. Pour cela, les cellules T et les cellules B recirculent en permanence à travers l'organisme (figure 5) (Gowans et Knight, 1964).

Les lymphocytes naïfs libérés des organes lymphoïdes primaires ne recirculent qu'à travers les organes lymphoïdes secondaires, où les antigènes s'accumulent et sont présentés par des cellules spécialisées (cellules dendritiques en particulier). Ils passent ainsi du sang dans les tissus lymphoïdes secondaires, *via* les HEC, puis retournent dans le sang *via* la circulation lymphatique et recirculent ainsi jusqu'à la rencontre d'un antigène spécifique.

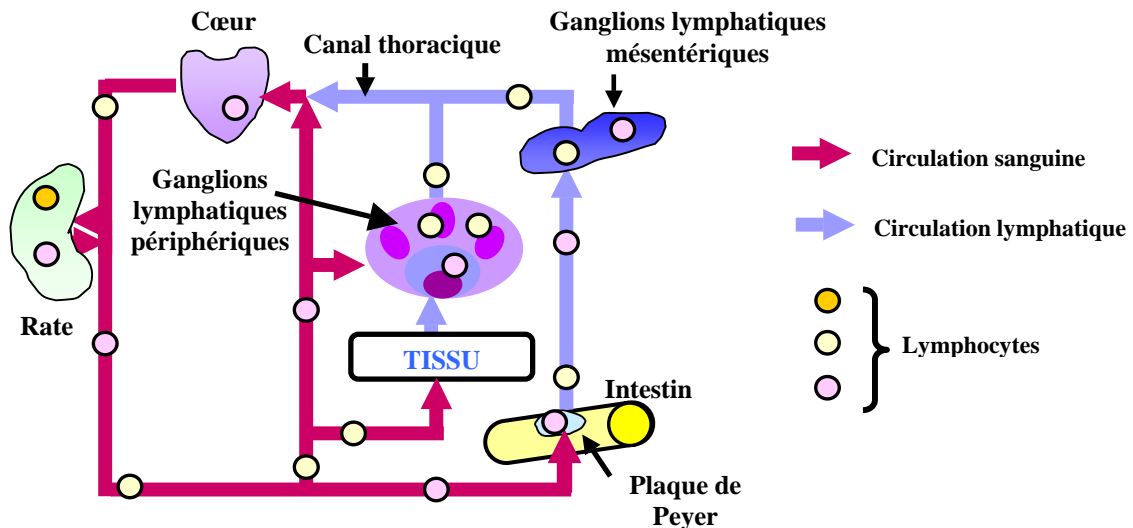


Figure 5 : voies de recirculation des lymphocytes (extrait du livre *Immunologie Revillard*, 3^{ème} édition, De Boeck Université).

La domiciliation et la recirculation de ces cellules ne se font pas de manière aléatoire. Il a été observé que les cellules B naïves recirculaient de façon préférentielle dans les plaques de Peyer et la rate, alors que les cellules T naïves recirculaient de façon préférentielle dans les ganglions lymphatiques périphériques (Stevens *et al.*, 1982). Les organes lymphoïdes secondaires montrent un très fort niveau de spécialisation et sont structurés en plusieurs zones (zones de cellules T et zones de cellules B) afin de répondre le plus rapidement et le plus efficacement à toutes les agressions.

Lorsqu'un lymphocyte naïf rencontre son antigène, il subit une expansion clonale en lymphocytes effecteurs puis retourne à nouveau dans la circulation sanguine. Contrairement aux cellules naïves, les lymphocytes mémoires recirculent également au travers de tissus non lymphoïdes mais montrent, de même, un profil de recirculation bien spécifique, souvent tissu-spécifique (Butcher et Picker, 1996). En effet, les lymphocytes mémoires ont tendance à recirculer dans les sites lymphoïdes dans lesquels ils ont été activés, ainsi que dans les tissus non lymphoïdes drainés par l'organe lymphoïde en question (Butcher et Picker, 1996; Gowans et Knight, 1964). Ainsi, différentes sous-populations de cellules mémoires existent, avec chacune des voies de recirculation tissu-spécifique (Picker, 1994).

De nombreux travaux ont montré que les ganglions lymphatiques périphériques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (tractus digestifs, respiratoire et uro-génital) représentaient deux voies de recirculation bien distinctes au niveau fonctionnel en terme de domiciliation des lymphocytes mémoires (Stevens *et al.*, 1982; Warnock *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 2000).

B- Le recrutement leucocytaire lors d'une inflammation

L'inflammation est une réponse essentielle de l'organisme suite à l'agression de tissus ou à l'invasion extérieure de pathogènes. Un certain nombre de cellules du système immunitaire vont alors intervenir pour combattre l'infection : mis à part les lymphocytes, nous trouvons les granulocytes, les monocytes, les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles, chaque type cellulaire étant plus adapté à combattre telle ou telle agression. Ces cellules vont également être capables de passer du sang dans les tissus en employant une voie similaire aux lymphocytes mais utilisant des molécules d'adhésion parfois différentes et répondant à des chimio-attractants particuliers.

C- Le processus de recrutement

Le passage du leucocyte du sang dans les tissus est guidé par une reconnaissance étroite entre le leucocyte et les cellules endothéliales, puis par la diapédèse (passage du leucocyte à travers l'endothélium). Ce processus est hautement régulé et est spécifique du tissu (Picker et Butcher, 1992). L'interaction leucocyte-cellule endothéliale est par conséquent un point central de régulation du système immunitaire, contrôlant efficacement l'accès de

sous-populations spécialisées de leucocytes à certains tissus et influençant ainsi la nature de la réponse immunitaire locale et de la réponse inflammatoire. Cette grande spécificité de domiciliation des leucocytes implique une reconnaissance étroite entre les deux partenaires : ceci est le phénomène de double reconnaissance (Kieda et Monsigny, 1986). Au niveau moléculaire, ce processus est régulé par l'expression spatio-temporelle de molécules d'adhésion (Berg *et al.*, 1989), présentes à la fois sur les leucocytes circulants et sur les cellules endothéliales, en coopération notamment des chimiokines (Cyster, 1999; Gunn *et al.*, 1998). Plusieurs familles de molécules d'adhésion ont été mises en évidence à ce jour : les sélectines, les intégrines et les ligands de la superfamille des immunoglobulines.

Un modèle d'adhésion leucocytaire à l'endothélium vasculaire a été décrit et présente plusieurs étapes (Butcher, 1991; Butcher et Picker, 1996; Springer, 1994). Il est applicable à différents tissus, bien que le détail des signaux impliqués diffère. On distingue quatre grandes étapes (figure 6) : le roulement, l'activation des intégrines, l'adhésion ferme et la diapédèse.

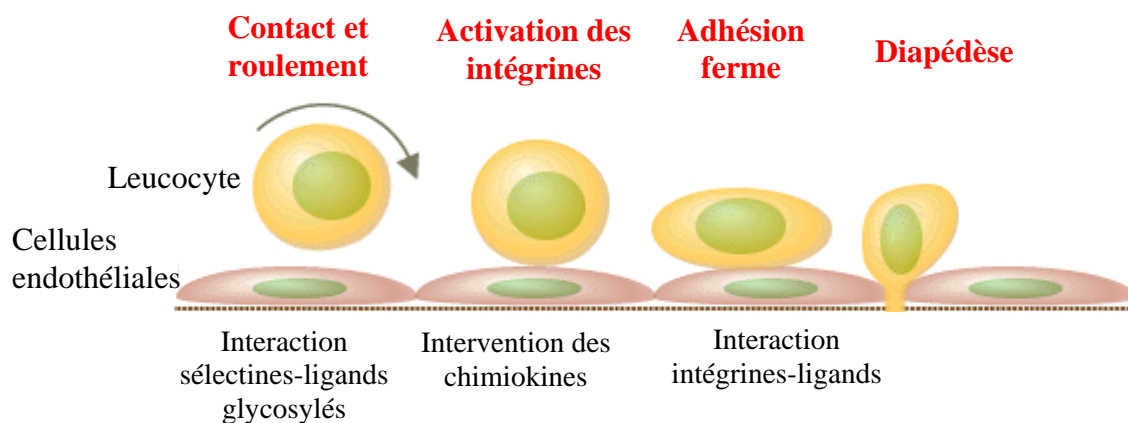


Figure 6 : processus en cascade menant à la domiciliation des lymphocytes et au recrutement des leucocytes durant l'inflammation.

Selon ce modèle aujourd'hui bien reconnu, la recirculation commence avec les leucocytes circulants dans le sang, interagissant de façon transitoire et réversible avec l'endothélium vasculaire. Ceci est permis par la présence de molécules d'adhésion exprimées au niveau des villosités des deux partenaires cellulaires. Ce processus, appelé « roulement », implique le plus souvent les sélectines (Tedder *et al.*, 1995), qui interagissent avec les épitopes saccharidiques des adressines. Moins fréquemment, ce phénomène fait intervenir des membres de la superfamille des immunoglobulines qui se lient aux intégrines du leucocyte (Alon *et al.*, 1995; Berlin *et al.*, 1995). Le roulement des leucocytes amène ces derniers au contact de l'endothélium où ils peuvent échantillonner la surface à la recherche de facteurs d'activation. Ces derniers (souvent des chimiokines) se lient à des récepteurs, couplés aux

protéines G et exprimés à la surface des leucocytes (Campbell *et al.*, 1996) (Luster, 1998). Cette liaison provoque l'activation rapide d'une autre classe de molécules d'adhésion, les intégrines. Les intégrines, ainsi activées, se lient à leurs ligands de la superfamille des immunoglobulines, exprimés à la surface de l'endothélium, permettant alors l'arrêt et l'adhésion ferme du leucocyte (Campbell *et al.*, 1998). Grâce à des signaux de migration appropriés, le leucocyte peut alors migrer à travers l'endothélium afin de pénétrer dans le tissu sous-jacent, où un gradient de chimiokines associé au tissu peut, dans certains cas, diriger sa localisation vers le site inflammé, par exemple.

Les molécules d'adhésion sont sans doute la clé de la spécificité de domiciliation des leucocytes mais, bien qu'un certain nombre de ces molécules aient déjà été identifiées, les mécanismes moléculaires de la spécificité ne sont pas encore totalement élucidés.

La compréhension de ces mécanismes est au centre de la recherche médicale visant à soulager les symptômes de maladies telles que l'athérosclérose, l'arthrite, l'asthme ou le psoriasis, qui sont en partie dus à une réponse inflammatoire inappropriée.

D- Implications dans la dissémination des cellules cancéreuses

Dans le cancer, les cellules endothéliales jouent un rôle double, d'une part, dans la croissance de la tumeur et, d'autre part, dans sa dissémination. La croissance de tumeurs solides nécessite la présence de néovascularisation pour garantir un apport essentiel d'oxygène et de nutriments (Folkman et Cotran, 1976). Ainsi, les cellules endothéliales au sein de la tumeur, stimulées par des facteurs angiogéniques tels que les chimiokines, vont former de nouveaux vaisseaux : c'est le phénomène d'angiogénèse. Ce processus intervient également dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques.

D'autre part, la migration des cellules tumorales et les métastases présentent de nombreux points communs avec la circulation des leucocytes. Les cellules tumorales circulantes dans le sang vont être reconnues, comme les leucocytes, par les cellules endothéliales et vont ainsi entrer dans les tissus sous-jacents et coloniser de nouveaux organes, d'une manière tissu-spécifique. Différents types de cancer sont connus pour présenter des sites privilégiés de colonisation secondaire (Nicolson, 1993) : les cancers du sein favorisent les ganglions lymphatiques périphériques, la moelle osseuse, le poumon et le foie ; les mélanomes malins montrent un profil similaire mais ont également une forte incidence sur les métastases de la peau ; le cancer de la prostate favorise la moelle osseuse. Les sites de colonisation secondaire

des cellules cancéreuses vont, en fait, être déterminés par les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales. La connaissance des molécules responsables de la spécificité de domiciliation rendra possible le blocage de ce processus et, cela, de manière organo-spécifique.

Le blocage de ce processus sera également très utile dans le traitement de nombreuses maladies inflammatoires où un dérèglement des cellules endothéliales est généralement observé (Ley, 1996) : étant en permanence sous l'influence de signaux inflammatoires, les CE recrutent de manière incontrôlée de nombreuses cellules du système immunitaire, menant dans certains cas à la dégradation du tissu environnant (polyarthrite rhumatoïde).

Les thérapies visant à bloquer le recrutement cellulaire vont cibler des molécules ayant une action directe dans l'adhésion telles que les sélectines, ou bien des molécules agissant indirectement telles que les enzymes de la glycosylation. Dans des maladies inflammatoires telles que l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde, de nombreuses molécules subissent des modifications de leur glycosylation influençant le développement de la maladie (Havenaar *et al.*, 1998; Van Den Heuvel *et al.*, 2000)

Chapitre II-

L'adhésion cellulaire : les acteurs de la reconnaissance cellulaire

La reconnaissance cellulaire, permettant au leucocyte circulant dans le sang de passer au travers la barrière endothéliale pour rejoindre le tissu sous-jacent, fait intervenir de nombreuses molécules d'adhésion. Celles-ci sont présentes à la fois sur le leucocyte et les cellules endothéliales (figure 7). Nous allons décrire dans ce chapitre les différentes familles de molécules d'adhésion connues à ce jour et intervenant dans ce processus. Nous montrerons comment ces molécules, agissant de concert, permettent une reconnaissance étroite entre les deux partenaires.

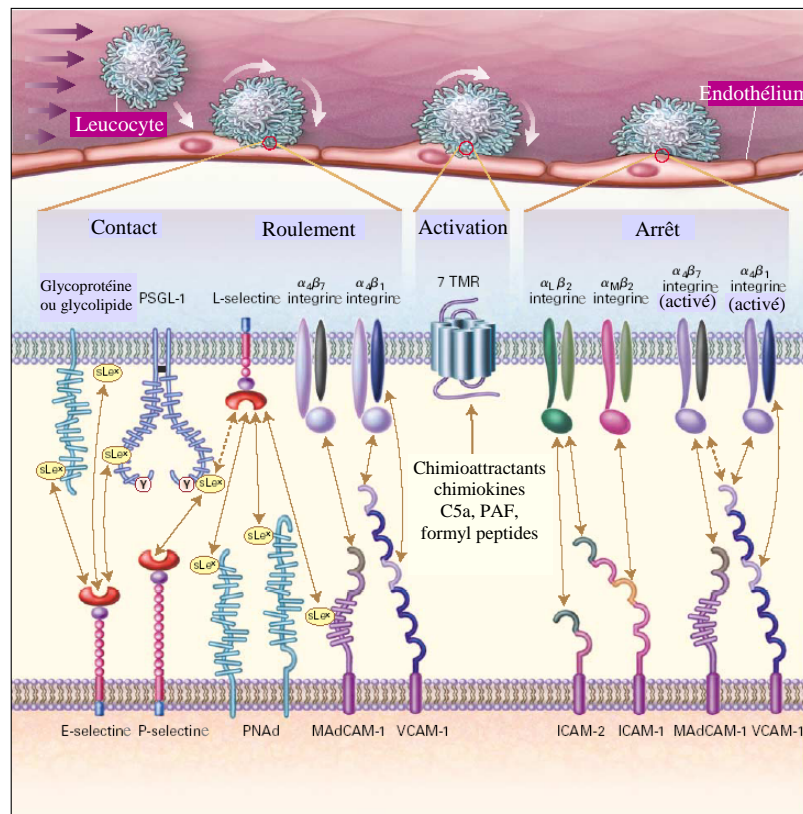


Figure 7 : principales molécules intervenant dans la reconnaissance entre cellules endothéliales et leucocytes (d'après von Andrian et Mackay, 2000).

I- L'adhésion primaire : reconnaissance et roulement

L'adhésion primaire comprend un premier aspect qui est la reconnaissance mutuelle, spécifique entre les leucocytes circulants et les cellules de l'endothélium. Le second aspect est

désigné par le terme de « roulement ». Il peut être décrit comme étant un ensemble d'interactions de faible affinité et de courte durée entre les deux partenaires ; il aboutit, sous l'effet des forces de stress mécanique ou de cisaillement dues au flux sanguin, à un déplacement par rotation des leucocytes sur l'endothélium. Le roulement ne conduit pas systématiquement à une adhésion ferme qui est nécessaire à la diapédèse ultérieure; fréquemment les leucocytes se détachent et repartent dans la circulation sanguine. Cette première étape de l'adhésion implique le plus souvent la famille des sélectines ou, moins fréquemment, des membres de la superfamille des immunoglobulines qui se lient aux intégrines du leucocyte, ou encore, fait intervenir d'autres molécules d'adhésion comme le CD44 ou VAP-1.

A- Les sélectines et leurs ligands

1- Présentation des sélectines : structure et régulation de leur expression

Les sélectines, glycoprotéines transmembranaires de type I, ont une distribution restreinte au système vasculaire et leucocytaire. Contrairement à la majorité des molécules d'adhésion, les sélectines fonctionnent comme des lectines, se liant à des ligands saccharidiques. Trois sélectines ont été identifiées : la E-, la P- et la L-sélectine, les lettres E, L et P se référant au type cellulaire à partir duquel la molécule a initialement été isolée (E : Endothéliale, P : Plaquettaire et L : Leucocytaire). Les trois sélectines sont très proches au niveau structural (figure 8).

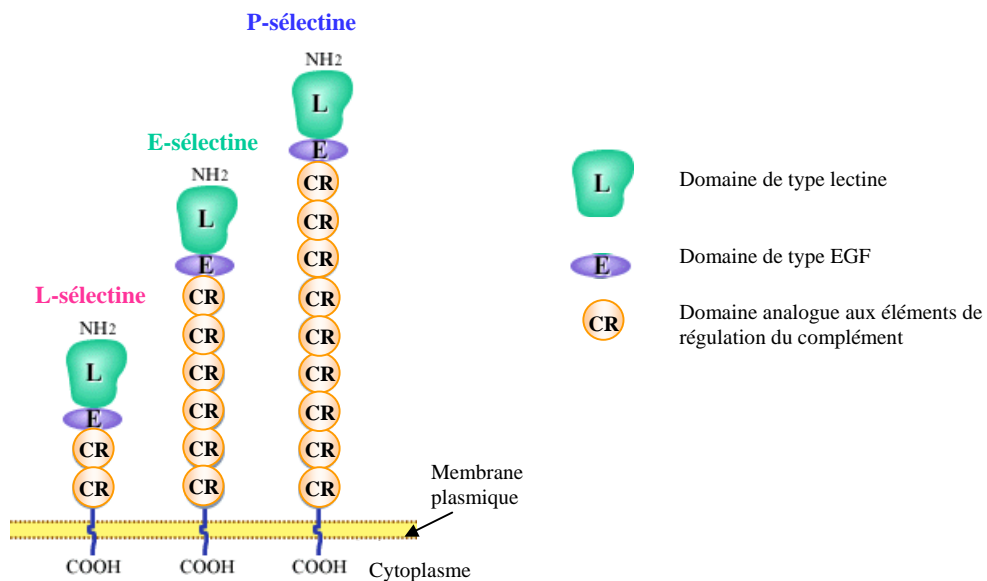


Figure 8 : représentation structurale des sélectines (d'après Patel *et al.*, 2002).

Les tableaux ci-dessous nous résument les principales caractéristiques de chacune des trois sélectines.

Table 1 : caractéristiques principales des sélectines.

	<i>P-sélectine</i>	<i>E-sélectine</i>	<i>L-sélectine</i>
Masse moléculaire	140 kDa	107 à 115 kDa	90 à 110 kDa
Localisation	Plaquettes, CE	CE	Au niveau des microvilli de la plupart des leucocytes
Expression	Constitutive Présente dans des granules de sécrétion : les α -granules (plaquettes) et les corps de Weibel-Palade (CE). Expression régulée également au niveau transcriptionnel (table 2).	Non constitutive Expression régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs d'activation tels que le TNF- α et l'IL-1 β (table 2).	Constitutive Après activation, rapide élimination de la surface cellulaire par clivage enzymatique \Rightarrow détachement et/ou progression du leucocyte lors du roulement sur l'endothélium.
Activation	Possible présentation à la surface en quelques minutes (voir table 2) puis rapide internalisation par endocytose et dégradation dans les lysosomes	Maximum d'expression en surface observé dans un délai de 3 à 4h puis lente endocytose et dégradation dans les lysosomes	
Fonction	Recrutement précoce des leucocytes durant la réponse inflammatoire « Roulement secondaire » au niveau des plaquettes formant un pont entre les leucocytes et les CE	Recrutement des leucocytes durant la réponse inflammatoire	Récepteur de domiciliation des lymphocytes Recrutement des leucocytes dans les sites d'inflammation Interactions leucocyte-leucocyte \Rightarrow rôle potentiel dans l'amplification de la réponse inflammatoire
Sécrétion	Existence d'une forme soluble sécrétée plutôt qu'éliminée de la surface \Rightarrow voie de régulation de l'adhésion des leucocytes	Faible portion relarguée \Rightarrow signaux chimio-attractants sur les monocytes et activation des intégrines β 2.	Existence d'une forme soluble \Rightarrow régulation de l'adhésion des leucocytes sur les endothéliums activés

Table 2 : expression en surface de la E- et de la P-sélectine par les HUVEC en réponse à différents stimuli.

Sélectine	Stimulus	Pic d'expression en surface	Retour à l'état de base
E-sélectine	IL-1 β	4 h	de façon générale, entre 16 et 24 heures
	LPS	4-8 h	
	Oncostatine M	4 h	
	TNF- α	4 h	
P-sélectine	Histamine	3-5 min	de façon générale, entre 30 et 60 minutes
	IL-4	24 h	
	IL-13	24-48 h	
	Oncostatine M	15 min	
		24 h	
	Thrombine	30 min	

2- Les ligands des sélectines

Les sélectines se lient à des structures saccharidiques présentes sur des glycoprotéines, des glycolipides ou des protéoglycannes. Seules quelques glycoprotéines sont glycosylées correctement pour permettre une liaison efficace aux sélectines. Ainsi la protéine elle-même n'est pas suffisante pour être un ligand de sélectine : elle nécessite d'être exprimée dans le bon site cellulaire pouvant fournir le répertoire nécessaire d'enzymes de glycosylation qui lui conféreront sa fonction de ligand de sélectines.

2.1- Les structures glycaniques reconnues

Les ligands des sélectines sont de nature glycanique fucosylée, sialylée et accessoirement sulfatée. Il s'agit de structures dont les motifs de base sont le trisaccharide Lewis X (Le^X , CD15) ($Gal\beta 1,4(Fuc\alpha 1,3)GlcNAc$), le sialyl Lewis X (sLe^X) ($NeuAc\alpha 2,3Gal\beta 1,4(Fuc\alpha 1,3)GlcNAc$) et son isomère le sialyl Lewis A (sLe^A) ($NeuAc\alpha 2,3Gal\beta 1,3(Fuc\alpha 1,4)GlcNAc$).

Au contraire de la E-sélectine, les L- et P-sélectines reconnaissent en plus les sulfatides et les polysaccharides sulfatés tels que la fucoïdine et l'héparine. Le défaut d'expression des ligands fonctionnels des sélectines à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales empêche tout roulement et donc, tout recrutement (Etzioni, 1994).

2.2- Les ligands protéiques

Les parties glycaniques des ligands sont indéniablement le facteur déterminant autorisant ou non les interactions avec les sélectines. Cependant, la reconnaissance et l'affinité entre les deux partenaires sont fonctions de la conformation, du regroupement et de l'accessibilité des structures glycaniques. La partie protéique des ligands assure cette présentation appropriée des structures glycaniques et favorise la reconnaissance entre les partenaires (figure 9).

Les sélectines, elles-mêmes substituées par des glycanes de type sLe^x , ont un rôle potentiel de contre-récepteur vis-à-vis des sélectines d'un autre partenaire cellulaire (Picker *et al.*, 1991). La liste des ligands que nous allons présenter n'est pas exhaustive du fait de la multitude existante de ligands physiologiques substitués par ce type de structure.

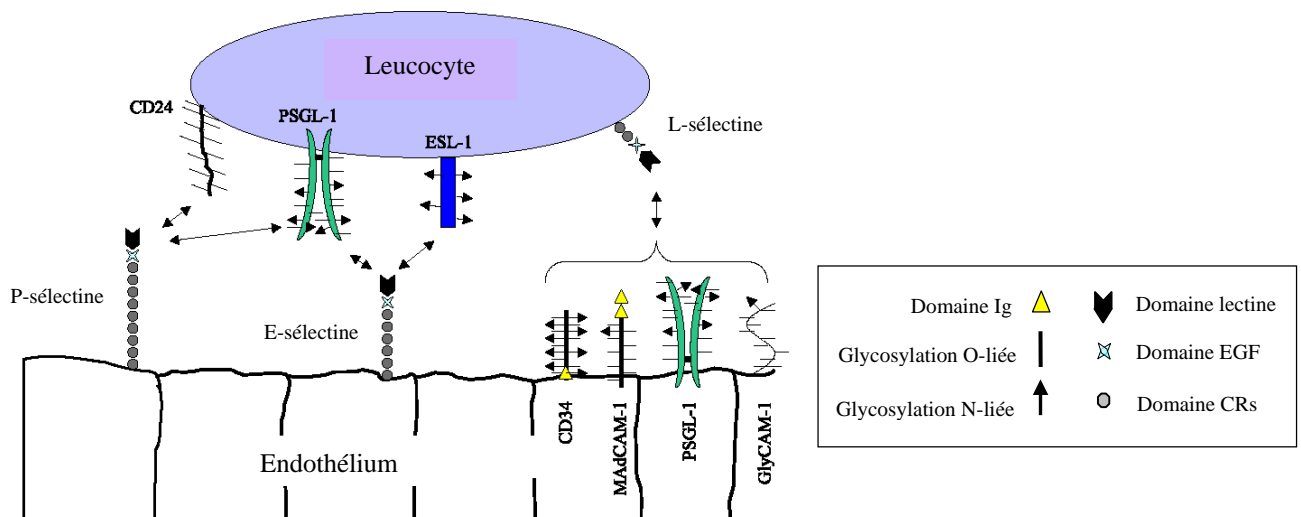


Figure 9 : principaux ligands des sélectines (d'après Ehrhardt *et al.*, 2004).

Les tables ci-dessous nous résument les principales caractéristiques des ligands de chacune des trois sélectines.

Table 3 : principaux ligands de la L-sélectine.

Nom	GlyCAM-1	CD34	MAdCAM-1	Sgp 200
Masse moléculaire	50 kDa	90 kDa	60 kDa	200 kDa
Glycosylation	Type sialomucine, 6' sulfo sLe ^x	Type sialomucine et N-glycannes	Type mucine	Type sialomucine
Distribution	Veinules post-capillaires des organes lymphoïdes périphériques (HEV)	Vaisseaux sanguins et veinules post-capillaires des organes lymphoïdes périphériques. Cellules hématopoïétiques	Veinules post-capillaires des tissus lymphoïdes muqueux	Veinules post-capillaires des organes lymphoïdes périphériques (HEV)

Parmi les ligands de la L-sélectine, on distingue les adressines vasculaires périphériques (PNAd : Peripheral Nodes Addressin, GlyCAM-1, CD34 et Sgp200) et l'adressine vasculaire du système muqueux (MAd : Mucosal Addressin, MAdCAM-1). La présence de ces ligands est spécifique du tissu et y favorisera la domiciliation des lymphocytes en initiant des contacts avec la L-sélectine. On compte également parmi les ligands de la L-sélectine la molécule PSGL-1, décrite parmi les ligands de la P-sélectine.

MAdCAM-1 est également un ligand de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$.

Table 4 : principaux ligands de la P-sélectine.

Nom	PSGL-1	CD24 (HSA)
Masse moléculaire	Homodimère de 240 kDa	28 à 70 kDa
Glycosylation	Sialomucine	Type mucine
Distribution	Cellules myéloïdes, dendritiques et lymphocytes	Lymphocytes, neutrophiles, érythrocytes, cellules tumorales

Table 5 : principaux ligands de la E-sélectine.

Nom	CLA	ESL-1
Masse moléculaire	200 kDa	150 kDa
Glycosylation	Sialylé, sLe ^x	Fucosylé
Distribution	Lymphocytes T domiciliés au niveau de la peau	Cellules myéloïdes

Les nécessités structurales nécessaires à la reconnaissance des ligands par la E-sélectine sont différentes de celles requises par les L- et P-sélectines. La sulfatation, qui a été montrée comme essentielle pour les ligands des L- et P-sélectines, n'est pas indispensable pour la E-sélectine. La E-sélectine peut également se lier au ligand PSGL-1 et à la L-sélectine.

3- La signalisation au travers des sélectines

Bien que les sélectines aient à l'origine été découvertes comme molécules d'adhésion, elles peuvent également agir comme molécules de signalisation (figure 10) (Laudanna *et al.*, 1994; Lorenzon *et al.*, 1998). La liaison à leur ligand induit diverses réponses, telles qu'une entrée de calcium (Laudanna *et al.*, 1994) ou l'activation de protéines MAP kinases (Hu *et al.*, 2000). Cela conduit à différents effets comme la régulation de certaines intégrines, indépendamment ou en coopération des chimiokines (Gopalan *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 1995).

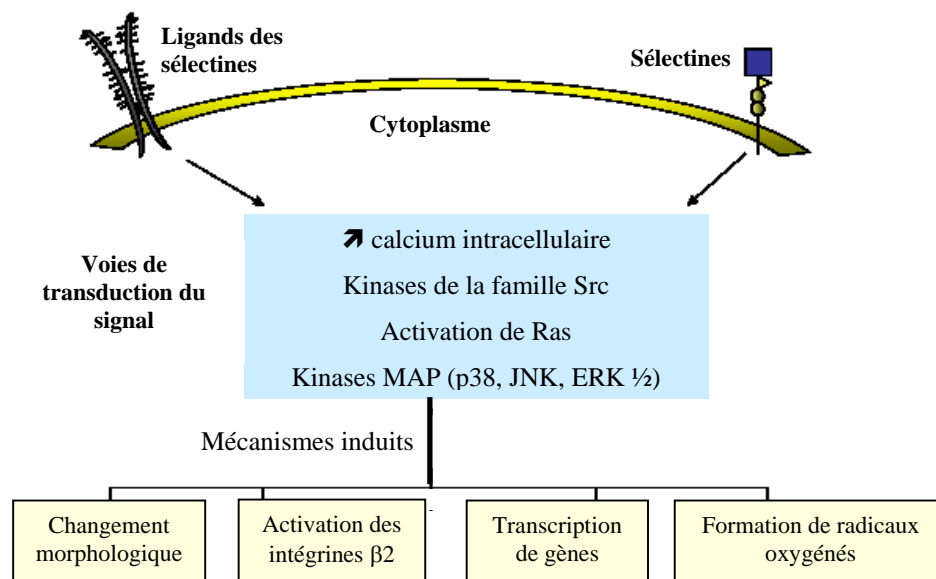


Figure 10 : voies de signalisation initiées par la liaison des sélectines ou de leurs ligands (d'après Patel *et al.*, 2002).

La signalisation est bidirectionnelle car elle est observée dans les cellules circulantes mais également dans les cellules endothéliales. Ainsi, au lieu de capturer simplement de manière physique les leucocytes à partir du flux sanguin, les étapes d'attachement puis de roulement *via* les sélectines servent aussi à induire des changements fonctionnels dans les deux

partenaires. Ces changements peuvent être suffisamment importants pour produire et réguler une réponse inflammatoire.

B- Les autres molécules impliquées dans l'adhésion primaire

1- Les intégrines

Un paragraphe détaillé est consacré aux intégrines et à leur intervention dans le renforcement de l'adhésion et dans l'arrêt des leucocytes sur l'endothélium, étapes tardives de la cascade (Chap. II . partie III.). Cependant, certaines intégrines, notamment l' $\alpha4\beta7$ et l' $\alpha4\beta1$, sont également des intervenants majeurs lors des stades précoces des phénomènes d'adhésion entre leucocytes et cellules endothéliales.

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β et localisées à la surface des cellules circulantes. Le plus souvent, les leucocytes maintiennent leurs intégrines dans un état non adhésif et, de ce fait, celles-ci nécessitent des signaux d'activation (souvent les chimiokines) pour pouvoir se lier à leurs ligands. Cependant, certaines intégrines ($\beta1$ et $\beta7$) sont parfois exprimées dans un état adhésif constitutif : elles peuvent alors assurer les étapes précoces de l'adhésion, c'est à dire les premiers contacts entre le leucocyte et les cellules endothéliales et l'étape de roulement des leucocytes sur l'endothélium (Alon *et al.*, 1995; Berlin *et al.*, 1995). Au contraire, les intégrines $\beta2$ sont constitutivement exprimées dans un état de faible avidité : elles nécessitent d'être activées pour induire l'adhésion cellulaire. De ce fait, on pensait qu'elles ne pouvaient intervenir que dans les étapes tardives (étape d'adhésion ferme du leucocyte) mais il a été montré récemment qu'elles étaient également capables d'assurer les étapes de roulement du leucocyte, du moins pour l'intégrine $\alpha L\beta2$ (Henderson *et al.*, 2001; Sigal *et al.*, 2000). En effet, les chimiokines et les ligands des intégrines sont capables en quelques fractions de seconde de moduler l'avidité des intégrines (voir chapitre II. Partie III-C). En fait, les intégrines participant au roulement semblent de faible affinité alors que les intégrines nécessaires à l'arrêt des leucocytes sont de forte affinité (Chen *et al.*, 1999).

Plusieurs cas de figure sont envisageables. Les intégrines peuvent assurer seules, sans intervention des sélectines, l'adhésion primaire des lymphocytes sous des conditions de flux (Berlin *et al.*, 1995). Il est également possible d'assister à une complémentarité des rôles entre

les intégrines et les sélectines dans l'étape de roulement des leucocytes (Bargatze *et al.*, 1995).

2- Le CD44

Le CD44 se présente sous différentes isoformes et est exprimé par de nombreux types cellulaires (lymphocytes, macrophages, cellules endothéliales...) (Lesley et Hyman, 1998).

L'interaction du CD44 avec l'acide hyaluronique, exprimé sur les cellules endothéliales, participe à l'activation des leucocytes et permet le roulement des lymphocytes sous des conditions de flux mimant le flux physiologique (Clark *et al.*, 1996). Récemment, il a été montré que l'interaction du CD44 avec les chondroïtines sulfates, autres ligands du CD44, pouvait également engendrer le roulement des leucocytes (Murai *et al.*, 2004).

Sous l'effet d'une inflammation locale, il y a redistribution des molécules de CD44 sur des surfaces accessibles telles que les microvilli. L'étape d'arrêt ferme du leucocyte dans la voie initiée par le CD44 semble impliquer préférentiellement l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, comparativement à l'intégrine $\alpha L\beta 2$ (Siegelman *et al.*, 2000).

Pour se lier à l'acide hyaluronique, le CD44 doit subir des modifications post-traductionnelles telles que des O-glycosylations, des N-glycosylations, des phosphorylations, des sulfatations et l'ajout de chaînes latérales de glycosaminoglycannes (Bartolazzi *et al.*, 1996; Maiti *et al.*, 1998). Ces modifications, qui diffèrent suivant les types cellulaires et l'état d'activation de la cellule, peuvent profondément affecter la capacité de liaison du CD44 à son ligand. Ce sont les principaux mécanismes régulant la fonction du CD44, décrits à ce jour.

Le CD44 participe à la domiciliation des lymphocytes et aux phénomènes d'inflammation. Il intervient également dans l'invasion tumorale (Lesley *et al.*, 1997). Des changements dans l'expression du CD44 sont associés à une large variété de cancers et à leur degré de malignité (augmentation de son expression et modifications dans le profil des isoformes exprimées).

3- VAP-1

VAP-1, molécule initialement mise en évidence sur les vaisseaux synoviaux, est également présente sur les HEC des ganglions lymphatiques périphériques, sur l'endothélium hépatique et sur les microcapillaires de nombreux autres tissus (Salmi *et al.*, 1993). Cette molécule est aussi exprimée par d'autres types cellulaires tels que les cellules dendritiques des centres germinatifs et les cellules musculaires lisses.

VAP-1 induit l'adhésion de lymphocytes dans les ganglions lymphatiques périphériques et sur certains endothéliums inflammés où son expression est augmentée (Salmi et Jalkanen, 1992). Elle favorise également l'adhésion de cellules T sur l'endothélium hépatique (McNab *et al.*, 1996).

VAP-1 semble intervenir dans les étapes de roulement des leucocytes et, sans doute également, dans des étapes plus tardives comme la diapédèse.

VAP-1 est une sialoglycoprotéine homodimérique composée de deux sous-unités de 90 kDa, ayant une forte homologie avec les protéines SSAO (« semicarbazide-sensitive amine oxidases »). La fonction de cette activité oxydative n'est pas encore élucidée. Deux formes de VAP-1 ont été mises en évidence, une forme membranaire et une forme soluble. L'expression de VAP-1 est régulée de manière tissu-spécifique et cellule spécifique. Sa surexpression ne peut avoir lieu que dans un microenvironnement donné (Arvilommi *et al.*, 1997). L'adhésion *via* VAP-1 est dépendante de structures saccharidiques, notamment d'acides sialiques. A l'heure actuelle, le ligand de VAP-1 n'est pas encore connu : c'est probablement une molécule de type lectine, exprimée par certaines sous-populations de leucocytes.

VAP-1 est préférentiellement impliquée dans l'adhésion des lymphocytes CD8+ (cellules T « killer ») et CD16+ (« natural killer ») au niveau des HEV des ganglions lymphatiques périphériques et des amygdales (Salmi *et al.*, 1997).

II- Le chimiotactisme et la stimulation des leucocytes

Les phénomènes d'adhésion impliquent initialement la production de médiateurs activant l'endothélium à proximité du site d'inflammation et induisant le roulement des leucocytes. L'étape suivante correspond à la stimulation des leucocytes et au chimiotactisme induit par des cytokines et des chimioattractants, produits localement.

A- Le chimiotactisme et la stimulation des partenaires cellulaires

1- Le chimiotactisme

Lors de la chimiotaxie, les cellules se déplacent, attirées par des concentrations croissantes d'agents chimioattractants. Ces agents sont généralement des molécules solubles qui diffusent à partir de leur site de production. La chimiotaxie et la présence de molécules d'adhésion sont étroitement liées, d'une part, parce que l'adhésion et l'attraction sur une

surface sont nécessaires à la progression des cellules vers les chimioattractants et, d'autre part, parce que ces chimioattractants peuvent stimuler l'expression ou l'activation des molécules d'adhésion.

Une alternative à la chimiotaxie est l'haptotaxie qui se définit par la migration des cellules vers les régions de plus haute adhésion. Ainsi, en présence d'un gradient de ligands organisé à la surface des cellules ou de la matrice extracellulaire, la migration des cellules va se faire en direction de la zone de plus forte densité en ligand, même en absence de gradient de chimioattractants. La chimiotaxie et l'haptotaxie peuvent guider ensemble les déplacements des cellules (Springer, 1995).

2- La stimulation des partenaires cellulaires

Au niveau de l'endothélium, les stimulations entraînent surtout des changements quantitatifs puisque des molécules, auparavant absentes, sont induites selon des cinétiques propres à chacune d'elles. Il s'agit des E- et P-sélectines à des stades précoces, et des ICAM, VCAM et autres molécules de la superfamille des immunoglobulines au cours de cette étape de stimulation des leucocytes.

En revanche, les modifications observées à la surface des leucocytes sont principalement d'ordre qualitatif. Elles concernent essentiellement les intégrines dont l'état d'avidité et/ou d'affinité vis-à-vis de ses ligands est modifié (ceci est décrit plus en détails dans la partie dédiée à l'activation des intégrines, page 45). Toutefois, des changements quantitatifs sont également observés : les intégrines $\alpha M\beta 2$ et $\alpha X\beta 2$ peuvent, dans certains cas, être rapidement transloquées à partir de granules vers la membrane plasmique, et la L-sélectine peut être clivée sous l'effet des mêmes stimuli (Carlos et Harlan, 1990).

B- Les médiateurs du chimiotactisme et de la stimulation

1- Les cytokines

Le terme de « cytokine » est une appellation générique qui décrit des médiateurs solubles de communication cellulaire, différents des hormones classiques sécrétées par les glandes du système endocrinien. Les cytokines contrôlent la croissance, la différenciation du système hématopoïétique, mais aussi les réactions immunes et inflammatoires. Le caractère pléiotrope des cytokines permet à une seule cytokine d'assurer différentes activités biologiques. Par ailleurs, leurs actions sont parfois redondantes.

2- Les chimioattractants

Les chimioattractants interviennent non seulement lors de l'inflammation, mais aussi au cours de multiples processus tels que l'athérogénèse, l'hématopoïèse, les allergies, l'anaphylaxie, le trafic des lymphocytes, la coagulation, l'angiogénèse et la malignité tumorale (Murphy, 1994). Aux chimioattractants « classiques », que sont le leukotriène B4, le PAF (« Platelet Activating Factor »), les peptides formylés et le C5a, s'ajoute une nouvelle classe de chimioattractants qui compose la famille des chimiokines.

3- Les chimiokines

3.1- Définition et classification

Les chimiokines constituent une vaste famille multifonctionnelle de petites cytokines (8 à 14 kD) ayant des propriétés chimio-attractantes (cytoKINES CHIMIOattractantes). Elles sont synthétisées par de nombreux types cellulaires. Les chimiokines sont des protéines sécrétées, à l'exception de CXCL16 (Wilbanks *et al.*, 2001) et de CX3CL1 (Bazan *et al.*, 1997) qui peuvent être associées à la membrane.

La plupart des chimiokines possèdent dans leur séquence N-terminale quatre cystéines caractéristiques. Les chimiokines sont classées en quatre sous familles suivant l'arrangement des deux premières cystéines (Murphy *et al.*, 2000) : CXC (α), CC (β), C (γ) et CX3C (δ) (figure 11). Les familles CXC et CC sont les plus représentées.

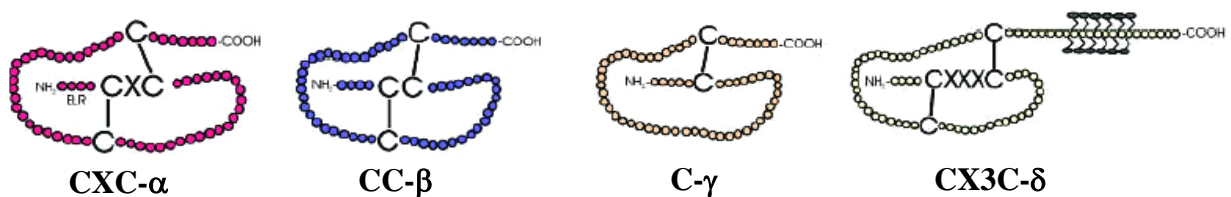


Figure 11 : les quatre familles de chimiokines (d'après Bajetto *et al.*, 2002).

Deux ponts disulfures sont formés, entre la première et la troisième cystéine ainsi qu'entre la deuxième et la quatrième. La seule exception à cette règle des 4 cystéines est la famille des chimiokines C(γ) qui ne possède que deux cystéines et qui parvient à maintenir une structure fonctionnelle avec seulement un pont disulfure.

3.2- Les récepteurs de chimiokines

Les chimiokines exercent leur activité biologique en se liant à des récepteurs exprimés à la surface cellulaire : ce sont des récepteurs à 7 fragments transmembranaires couplés aux protéines G trimériques. Basés sur la classe de chimiokines qu'ils lient, les récepteurs ont été classés en quatre sous familles : CXCR, CCR, CR et CX3CR (figure 12). Bien que plusieurs chimiokines puissent se lier à un même récepteur et qu'une même chimiokine puisse se lier à plusieurs récepteurs, l'interaction chimiokine-récepteur de chimiokines semble majoritairement restreinte à une même sous classe.

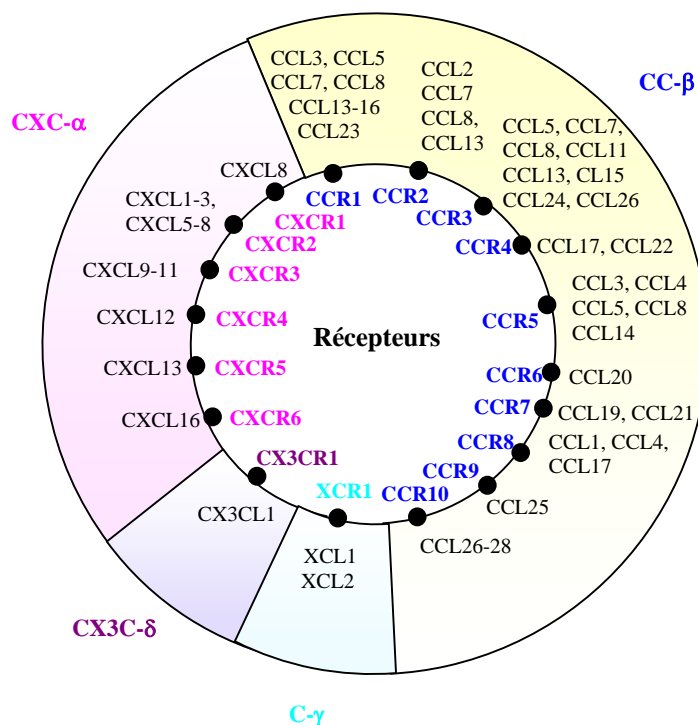


Figure 12 : les récepteurs de chimiokines et leurs ligands (d'après Murphy, 2002).

Les chimiokines peuvent également interagir avec deux autres types de molécule. D'une part, les chimiokines peuvent se lier à des récepteurs à 7 fragments transmembranaires n'induisant pas de transduction du signal : le DARC (« Duffy Antigen Receptor of Chemokines ») (Horuk *et al.*, 1993) et le D6 (Nibbs *et al.*, 1997). Ces récepteurs permettent sans doute l'élimination des chimiokines de la circulation si cela s'avère nécessaire. D'autre part, il a été montré que les chimiokines, chargées positivement, peuvent se lier à l'héparine et aux héparans sulfates, chargés négativement (Webb *et al.*, 1993; Witt et Lander, 1994). Les protéoglycannes contenant des héparans sulfate capturent les chimiokines dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules endothéliales : un gradient de concentration se crée

et permet de diriger le trafic des leucocytes *in vivo*. La liaison des chimiokines aux glycosaminoglycannes (GAGs) permettrait d'augmenter leur concentration locale et, par conséquent, d'augmenter leur liaison aux récepteurs exprimés à la surface des cellules circulantes (Hoogewerf *et al.*, 1997).

Les chimiokines présentées à la surface des cellules endothéliales peuvent être synthétisées par la cellule elle-même ou extraites du milieu extracellulaire. Les cellules endothéliales peuvent également endocyter des chimiokines sécrétées par les cellules du tissu sous-jacent et les transporter sur leur face luminale afin de les présenter aux leucocytes circulants (Middleton *et al.*, 1997).

3.3- Rôles des chimiokines

Les chimiokines interviennent dans de très nombreux processus physiologiques et pathologiques (Baggiolini *et al.*, 1997; Murphy *et al.*, 2000) (figure 13). Elles ont notamment un rôle clé dans la circulation des cellules du système immunitaire.

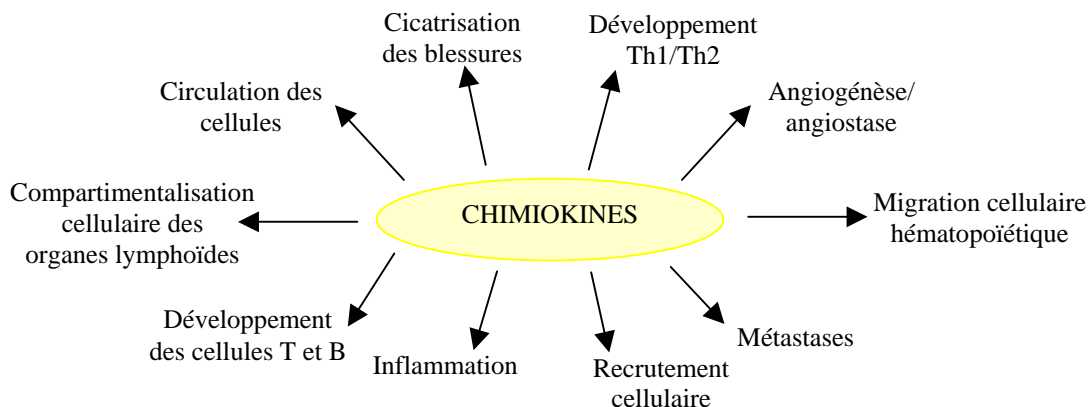


Figure 13 : processus faisant intervenir les chimiokines (d'après Rossi et Zlotnik, 2000).

Fonctionnellement, les chimiokines se séparent en deux familles (Moser et Loetscher, 2001). Certaines sont homéostatiques : elles sont produites et sécrétées constitutivement. Elles sont généralement impliquées dans la circulation des leucocytes :

- dans la moelle osseuse et le thymus, pendant l'hématopoïèse,
- pendant l'initiation de la réponse immunitaire adaptative dans la rate, les ganglions lymphatiques périphériques et les plaques de Peyer et
- dans la surveillance immunitaire des tissus périphériques sains.

Les autres chimiokines sont produites uniquement par les cellules en cas d'agression ou suite à un stimulus pro-inflammatoire (chimiokines inductibles) : elles vont alors diriger la migration des leucocytes effecteurs vers le site inflammé, infecté, agressé ou tumoral. Nombreuses de ces chimiokines inflammatoires ont des spectres d'action très larges et agissent sur les cellules du système immunitaire inné aussi bien qu'adaptatif (Moser *et al.*, 2004). De telles chimiokines peuvent également activer les cellules pour augmenter la réponse immunitaire et initier le processus de réparation.

Certaines chimiokines ont cependant la double fonction, homéostatique et inflammatoire.

Les chimiokines intervenant dans les phénomènes de migration cellulaire, leur expression non régulée est par conséquent associée à de nombreuses maladies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose (Baggiolini, 2001; Feng, 2000). D'autre part, une altération dans la balance entre chimiokines angiogéniques (stimulant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et angiostatiques (Strieter *et al.*, 1995) est responsable de maladies telles que la fibrose pulmonaire idiopathique, la pancréatite chronique et le psoriasis.

Enfin, les chimiokines sont impliquées dans certaines maladies infectieuses. Certains de leurs récepteurs servent de co-récepteurs à deux pathogènes humains importants : le plasmodium, parasite responsable du paludisme (Horuk *et al.*, 1993) et le virus de l'immunodéficience acquise (Feng *et al.*, 1996).

Par conséquent, intervenant dans de nombreux processus pathologiques, les chimiokines sont aujourd'hui des cibles thérapeutiques privilégiées.

3.4- Leurs rôles dans l'adhésion cellulaire

Les chimiokines ont un rôle important dans de nombreuses étapes de la cascade menant au passage du leucocyte à travers la barrière endothéliale. Elles interviennent dans :

- le chimiotactisme envers les leucocytes présents dans la circulation,
- la déstabilisation du roulement des leucocytes initié par les sélectines,
- l'activation des intégrines,
- la diapédèse.

Il a d'abord été montré que les chimiokines, présentant un gradient de concentration à la surface de l'endothélium, avaient la capacité d'attirer les leucocytes (action de chimiotactisme). Ensuite, des études ont révélé leur rôle direct dans l'adhésion cellulaire par

l'activation des intégrines et, par conséquent, dans l'arrêt ferme des leucocytes roulants sur l'endothélium. Les chimiokines sont généralement présentées à la surface de l'endothélium aux sites d'extravasation des leucocytes (Middleton *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1999). Il semble que l'activation des intégrines montre une préférence envers les chimiokines liées comparativement aux chimiokines solubles (Grabovsky *et al.*, 2000). Les chimiokines sont capables d'augmenter l'adhésion *via* les intégrines $\beta 2$ et $\alpha 4\beta 1$ (Campbell *et al.*, 1998). Au sein d'une même cellule, elles sont capables de réguler différemment l'avidité de ces intégrines (Weber *et al.*, 1996) : ceci suggère un rôle pour les chimiokines dans le passage de l'adhésion utilisant les intégrines $\alpha 4\beta 1$ à l'adhésion utilisant les intégrines $\beta 2$. Leur action sur l'activité des intégrines $\alpha 4\beta 1$ semble plus transitoire (Grabovsky *et al.*, 2000; Weber et Springer, 1998).

L'augmentation de la liaison des intégrines $\alpha 4$ et $\beta 2$ à leurs ligands, par l'action des chimiokines et d'autres chimioattractants, a lieu *via* une augmentation de l'affinité et/ou de l'avidité de ces intégrines (Chan *et al.*, 2001; Constantin *et al.*, 2000) (voir chapitre II partie III-C).

Les chimiokines ont également un rôle dans les étapes plus précoces de la cascade. Certaines chimiokines solubles provoquent l'élimination de la L-sélectine à la surface cellulaire par endoprotéolyse, impliquant les chimiokines comme régulateurs négatifs du roulement initié par les sélectines (Alexander *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1991). Plus récemment, il a été montré que certaines chimiokines exprimées à la surface des cellules endothéliales pouvaient déstabiliser le roulement initié par la L-sélectine, ceci sur différents types de leucocytes. La déstabilisation observée n'est pas liée au clivage de la L-sélectine ; elle emprunte une voie nécessitant de l'énergie mais ne dépendant pas des voies de signalisation *via* les récepteurs de chimiokines (Grabovsky *et al.*, 2002).

La régulation des deux processus, roulement et adhésion ferme, par les chimiokines sous-entend qu'une balance et une coordination très précises de leurs activités existent au sein des contacts leucocyte-cellule endothéliale. Cette balance permettrait le passage optimal du roulement mené par les sélectines à l'adhésion ferme menée par les intégrines.

III- Le renforcement de l'adhésion

Seule une partie des leucocytes roulants vont s'aplatir et s'étaler pour finalement

adhérer fermement sur l'endothélium.

Le roulement rend possible la rencontre du leucocyte avec les médiateurs de l'activation, présents à la surface de l'endothélium, qui vont permettre l'activation des intégrines du leucocyte. Parallèlement, on assiste au désengagement des sélectines.

Dans leur conformation active, les intégrines, assurant l'arrêt des leucocytes, auront pour ligands des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines.

A- Présentation des intégrines : structure, rôle et ligands

Les intégrines sont exprimées constitutivement par les leucocytes et de nombreux autres types cellulaires. Ce sont des glycoprotéines qui se présentent sous forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β , reliées par une liaison non covalente. Dix-huit sous-unités α et huit sous-unités β ont été identifiées, formant au moins vingt quatre hétérodimères (figure 14). Les intégrines comportent un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire simple et une courte queue cytoplasmique, à l'exception de la sous-unité $\beta 4$ qui contient environ 1000 résidus intracellulaires. Les intégrines sont des récepteurs hétérogènes et redondants. Ce sont les récepteurs les plus importants pour les protéines de la matrice extracellulaire, telles que la fibronectine, les laminines, les collagènes ou la vitronectine. Elles contrôlent de ce fait les interactions cellule-matrice extracellulaire mais également les interactions cellule-cellule (Hood et Cheresh, 2002).

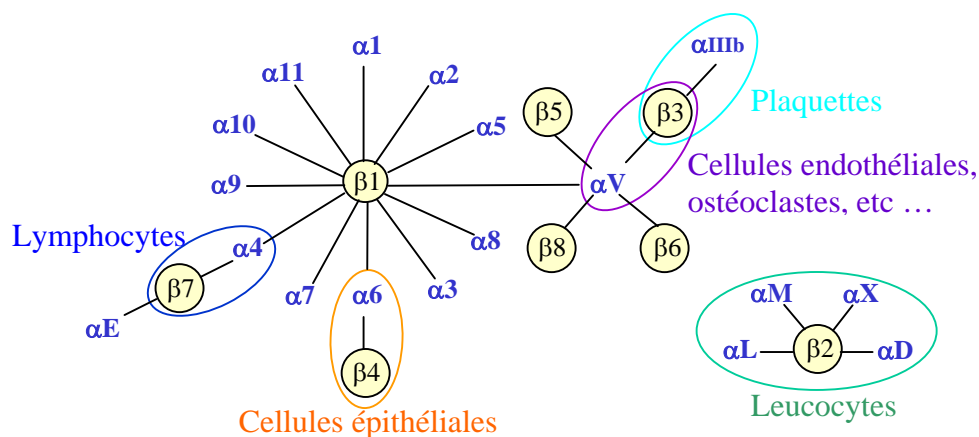


Figure 14 : les différentes sous-unités α et β , composant les intégrines (d'après Ruegg *et al.*, 2004).

Les leucocytes expriment principalement les intégrines $\alpha 4$ et $\beta 2$, qui vont être impliquées dans les interactions leucocyte-cellule endothéliale (table 6). Les intégrines $\beta 2$ ne sont

présentes que sur les parties planes des leucocytes, à la différence des intégrines α_4 , regroupées au niveau des microvilli, premiers sites de contact entre le leucocyte et la cellule endothéliale.

Table 6 : intégrines impliquées dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.

Sous-unité β	Sous-unité α	Noms	Distribution	Ligands
β_1 (CD29)	α_4 (CD49d)	VLA-4, LPAM-2	lymphocytes B et T, monocytes, fibroblastes	VCAM-1, fibronectine
β_2 (CD18)	α_L (CD11a)	LFA-1	lymphocytes B et T, monocytes, neutrophiles	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	α_M (CD11b)	Mac-1	monocytes, neutrophiles	ICAM-1, C3bi, fibrinogène
	α_X (CD11c)	P150,95	monocytes, neutrophiles, éosinophiles	C3bi, fibrinogène
β_7	α_4 (CD49d)	$\alpha_4\beta_7$, LPAM-1	lymphocytes B et T muqueux	MAdCAM-1, VCAM-1, fibronectine

Notons cependant que les intégrines $\alpha_V\beta_3$, exprimées par les cellules endothéliales, en liant PECAM-1, sont aussi impliquées dans l'adhésion ferme (Piali *et al.*, 1995).

L'interaction entre les intégrines et leurs ligands de la superfamille des immunoglobulines est particulièrement importante dans l'inflammation. La superfamille des immunoglobulines est composée de très nombreuses protéines, exprimées sur différents types cellulaires, dont les cellules endothéliales où l'expression de quelques unes de ces molécules est augmentée par des cytokines inflammatoires (table 7).

Table 7 : membres de la superfamille des immunoglobulines impliqués dans le renforcement de l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium.

Noms	Distribution	Expression	Ligands
ICAM-1	CE, monocytes, macrophages, cellules lymphoïdes, fibroblastes...	Expression constitutive faible Induction par IL-1, TNF α , IFN γ ...	$\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, acide hyaluronique
ICAM-2	CE, cellules mononucléaires...	Expression constitutive	$\alpha_L\beta_2$
VCAM-1	CE (majoritairement dans tissus lymphoïdes), fibroblastes	Expression non constitutive Induction par différentes cytokines	$\alpha_4\beta_1$ $\alpha_4\beta_7$
PECAM-1	CE (au niveau des jonctions), plaquettes, granulocytes, monocytes, cellules T...	Expression constitutive	PECAM-1 $\alpha_V\beta_3$
MAdCAM-1	CE (tissus lymphoïdes muqueux)	Expression constitutive	$\alpha_4\beta_7$, L-sélectine

B- Les intégrines et la transduction des signaux

Les intégrines doivent leur nom au fait qu'elles « intègrent » les activités de la matrice extracellulaire et celles du cytosquelette : il y a connexion entre les activités de la cellule et son environnement. Les intégrines sont des protéines transmembranaires reliées au cytosquelette qui reçoivent et transmettent des signaux extracellulaires. La signalisation s'effectue aussi bien de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (« inside-out signalling ») qu'à l'inverse (« outside-in signalling »).

1- La transduction du signal de « l'intérieur vers l'extérieur »

Les signaux transduits de l'intérieur vers l'extérieur modulent essentiellement l'affinité et l'avidité des intégrines pour leurs ligands. Grâce à leur interaction avec le cytosquelette, les intégrines peuvent se déplacer latéralement dans la membrane plasmique et se regrouper afin de permettre des interactions multivalentes coopératives entre récepteurs. Lorsque l'association au cytosquelette n'autorise plus ces mouvements, interdisant ainsi tout regroupement, l'avidité devient minime et l'adhésion ferme ne se fait plus.

2- La transduction du signal de « l'extérieur vers l'intérieur »

L'interaction des intégrines avec des éléments extérieurs régule de nombreux processus fondamentaux dont l'adhésion cellulaire stable, la migration transendothéliale, la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Le court domaine cytosolique des sous unités α et β des intégrines ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque : pour transduire des signaux, il doit se lier à des protéines structurales du cytosquelette (α -actinine, taline, vinculine) et à des protéines de signalisation (protéines tyrosines kinases, sérines/thréonine kinases...) (Dedhar et Hannigan, 1996).

Les deux voies, de l'intérieur vers l'extérieur et de l'extérieur vers l'intérieur, sont étroitement liées et inter-dépendantes l'une de l'autre.

C- Activation des intégrines dans l'adhésion cellulaire

L'activité des intégrines est dynamiquement régulée, indépendamment de leur niveau d'expression à la surface cellulaire. Le plus souvent, les leucocytes circulants maintiennent

leurs intégrines dans un état non adhésif afin d'éviter des adhésions non spécifiques sur les parois des vaisseaux sanguins. L'activation des intégrines sert de point de contrôle entre l'étape de roulement et celle de l'adhésion ferme.

Les intégrines ne vont être activées qu'en présence de signaux spécifiques engendrés par l'endothélium. Les mécanismes d'activation nécessitent la participation du cytosquelette et ne s'effectuent qu'en des points locaux du leucocyte où se trouvent les ligands et les signaux d'activation. L'activation entraîne au niveau des intégrines :

- un changement conformationnel, caractérisé par le passage rapide d'une conformation de faible affinité à une conformation de haute affinité. Il touche le site de liaison du ligand et permet ainsi d'augmenter le temps de liaison à celui-ci (figure 15A). Et/ou
- un changement configurationnel. Celui-ci implique le mouvement et le regroupement dans la membrane plasmique des molécules d'intégrines : il permet des interactions adhésives multivalentes entre les intégrines et leurs ligands et, donc, résulte en une force d'adhésion plus importante (figure 15B).

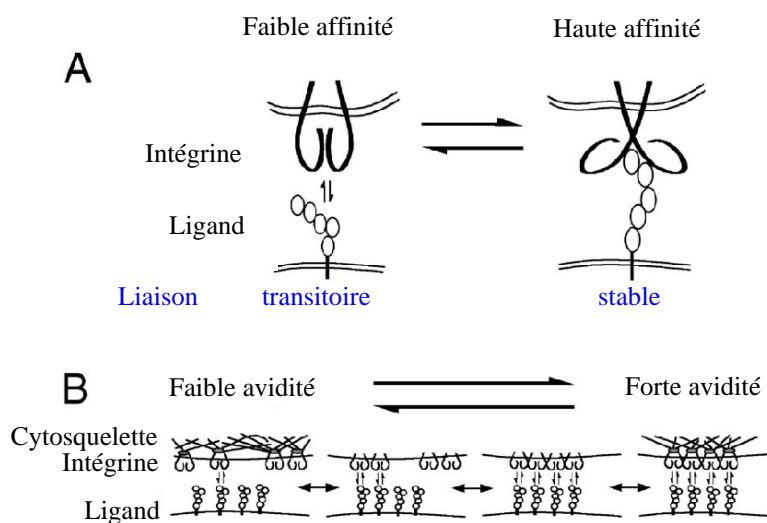


Figure 15 : mécanismes d'activation des intégrines. (A) changement conformationnel. (B) changement configurationnel (d'après Chan *et al.*, 2003).

Ainsi, le roulement mené par les sélectines permet aux leucocytes de rechercher des facteurs capables d'activer les intégrines exprimées à leur surface, ces facteurs étant principalement les chimiokines mais aussi les ligands des intégrines. Par exemple, la dimérisation d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales augmente l'affinité des intégrines $\alpha L\beta 2$ (Reilly *et al.*,

IV- La diapédèse

La diapédèse, passage du leucocyte à travers l'endothélium, est l'étape finale du processus de migration cellulaire. Cette étape intervient à la suite de l'adhésion ferme des leucocytes et de leur étalement sur l'endothélium. Contrairement aux précédentes étapes (roulement, renforcement de l'adhésion et arrêt ferme du leucocyte), la diapédèse est un processus moins bien décrit. Les mécanismes par lesquels le leucocyte réussit à franchir les jonctions intercellulaires, présentes entre les cellules endothéliales adjacentes, ne sont pas encore clairement établis. La diapédèse fait intervenir de façon active les cellules endothéliales : l'adhésion du leucocyte provoque des signaux dans les cellules endothéliales permettant l'ouverture des contacts et des jonctions intercellulaires et facilitant ainsi le passage du leucocyte (Vestweber, 2000).

Le phénomène de diapédèse se subdivise en deux étapes distinctes : la migration transendothéliale et la migration au travers de la lame basale.

La migration transendothéliale se réalise le plus souvent au niveau des jonctions cellulaires (Marchesi, 1961), en approximativement trois minutes, sous l'effet de stimuli provenant des cellules endothéliales (figure 17). Cependant, il a été montré que les leucocytes pouvaient également migrer à travers la cellule endothéliale elle-même (Feng *et al.*, 1998; Marchesi et Gowans, 1964).

Le passage des leucocytes à travers la lame basale, guidé par des chimioattractants, nécessite cinq à dix minutes (Ager, 1997).

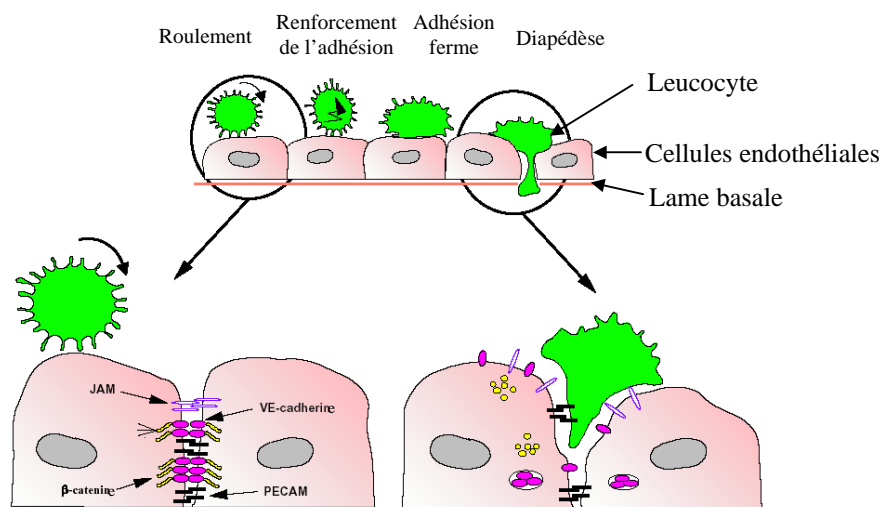


Figure 17 : représentation schématique de la transmigration des leucocytes et des jonctions intercellulaires (d'après Johnson-Leger *et al.*, 2000).

A- Les jonctions intercellulaires endothéliales

Les jonctions intercellulaires sont constituées de différentes protéines transmembranaires spécifiques à chaque type de jonction (Dejana *et al.*, 1995) (figure 18). Les jonctions entre cellules endothéliales présentent une complexité et une distribution différentes suivant les tissus, répondant ainsi aux exigences de l'environnement dans lequel elles se situent. Les jonctions serrées sont nombreuses là où le contrôle de la perméabilité doit être strict (notamment au niveau du cerveau). Au contraire, les jonctions sont très rudimentaires dans les veinules post-capillaires où la diapédèse des cellules et l'échange des constituants du plasma doivent être particulièrement efficaces : la perméabilité y sera essentiellement contrôlée par des jonctions "adhérentes" et par d'autres molécules d'adhésion telles que PECAM-1 (Dejana *et al.*, 1996).

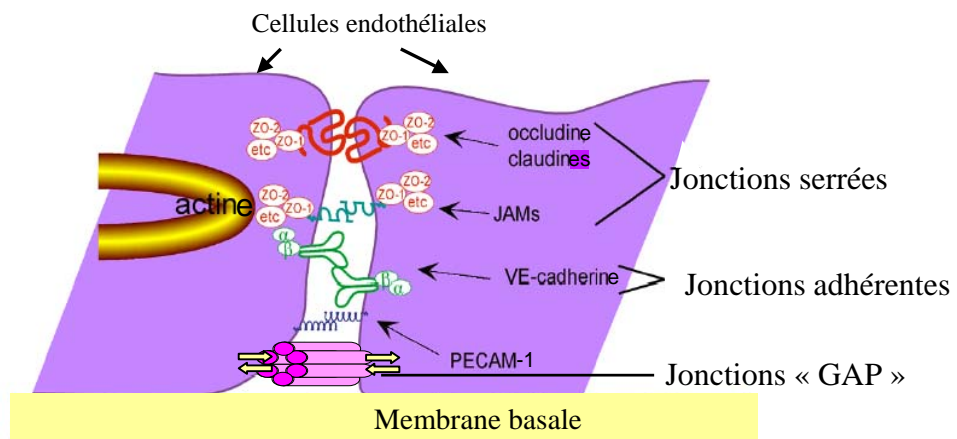


Figure 18 : les protéines de jonctions endothéliales (d'après Luscinskas *et al.*, 2002).

Au moins trois types de jonctions ont été décrits au niveau des cellules endothéliales : les jonctions « GAP », serrées et adhérentes (voir la revue de Luscinskas *et al.* (Luscinskas *et al.*, 2002)).

Les jonctions « GAP »

Les jonctions « GAP » sont des regroupements de canaux transmembranaires hydrophiles qui permettent l'échange direct d'ions et de petites molécules entre cellules adjacentes. *In vivo*, la fréquence des jonctions « GAP » est corrélée avec celle des jonctions serrées, et les deux sont souvent intercalées.

Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont les jonctions les plus apicales (les plus proches de la face luminale) et forment des contacts très proches entre cellules adjacentes, laissant croire à une fusion des membranes en certains points. Trois types de protéines transmembranaires se colocalisent avec les jonctions serrées : l'occludine, les claudines et les protéines JAM (Junctional Adhesion Molecule). A l'intérieur des cellules, plusieurs protéines de signalisation du cytosquelette sont concentrées dans les zones de jonction serrée, incluant le ZO-1 (« Zonula Occludens-1 ») et la cinguline. Le nombre de jonctions serrées dans les cellules endothéliales varie inversement avec la nécessité d'un contrôle de la perméabilité. Les HEC, qui permettent le passage de nombreux lymphocytes, sont quasiment dépourvues de jonctions serrées.

Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes apparaissent les plus importantes pour le contrôle de la perméabilité macromoléculaire dans l'endothélium. Elles sont formées par les VE-cadhérines. Le domaine cytosolique de la VE-cadhérine est relié aux caténines et à un réseau de protéines cytosoliques assurant son ancrage aux microfilaments d'actine du cytosquelette. Les cadhérines sont des protéines transmembranaires de 120 à 140 kDa qui permettent des interactions homophiles dépendantes des ions Ca^{2+} . Plusieurs autres membres de la famille des cadhérines ont été caractérisés dans différents tissus.

B- Les acteurs de la diapédèse

Six molécules, concentrées sur les bords latéraux des cellules endothéliales, sont décrites comme impliquées dans le processus de transmigration, chacune agissant sans doute à une étape différente. Il s'agit de PECAM-1, du CD99, de la VE-cadhérine et des protéines JAM (JAM-A, JAM-B et JAM-C) (figure 19).

PECAM-1 et les trois protéines JAM font parties de la superfamille des immunoglobulines, la VE-cadhérine, de la famille des cadhérines et le CD99 est une molécule unique. Toutes ces molécules ont la capacité d'interagir de manière homotypique. PECAM-1, CD99, JAM-A et JAM-C sont également exprimés par les leucocytes. Le processus de diapédèse nécessite les interactions homotypiques de PECAM-1 et du CD99. Les protéines JAMs, exprimées sur la cellule endothéliale, peuvent également interagir avec les intégrines du leucocyte.

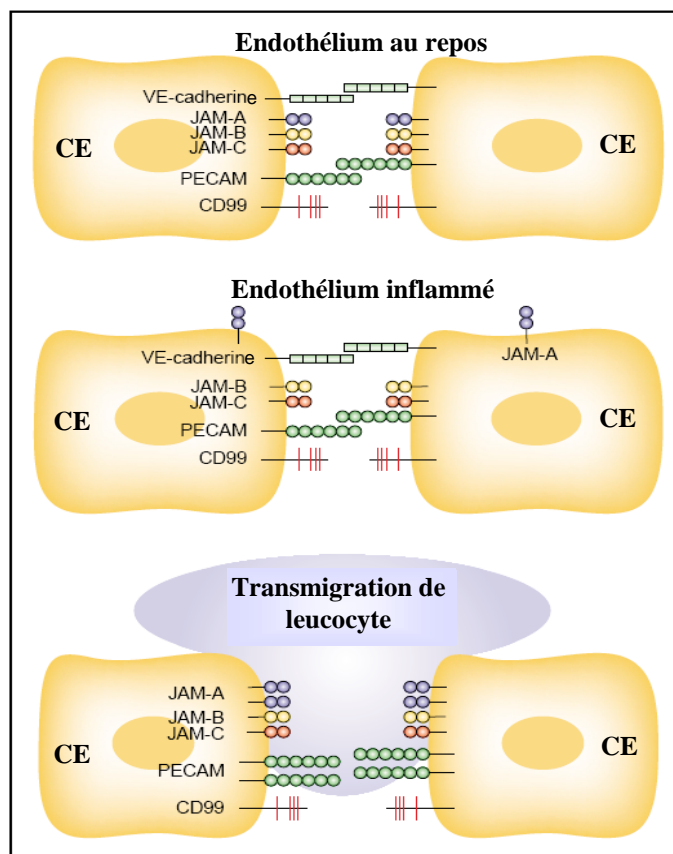


Figure 19 : molécules endothéliales impliquées dans l'étape de transmigration du leucocyte (d'après Muller, 2003).

1- PECAM-1

Membre de la superfamille des immunoglobulines, PECAM-1 agit comme molécule d'adhésion hétérotypique ou homotypique. Elle est exprimée de façon diffuse à la surface des leucocytes et se trouve concentrée sur les bords latéraux des cellules endothéliales (Muller *et al.*, 1989). Le blocage de l'interaction PECAM-PECAM bloque la diapédèse *in vitro* (Muller *et al.*, 1993) et *in vivo* (Bogen *et al.*, 1994).

PECAM-1 joue également un rôle dans le passage du leucocyte à travers la lame basale (Liao *et al.*, 1995). *In vivo*, l'interaction homotypique de PECAM-1, exprimée sur le leucocyte et la cellule endothéliale, augmente l'expression de l'intégrine $\alpha 6 \beta 3$ sur les leucocytes en cours de migration ; l'intégrine $\alpha 6 \beta 3$ est nécessaire pour une migration efficace au travers de la lame basale.

2- Le CD99

Plus récemment, Muller et collaborateurs ont identifié le CD99 comme une molécule importante pour l'extravasation des leucocytes (Schenkel *et al.*, 2002). Cette étude décrit pour la première fois le CD99 comme protéine endothéliale dont l'expression est concentrée sur les bords latéraux. Jusqu'à maintenant, il avait été décrit comme présent sur la plupart des leucocytes et également sur les globules rouges. Cette molécule n'appartient à aucune famille connue de protéines. Le CD99 est une protéine transmembranaire de 32 kDa, fortement O-glycosylée. Il interagit de manière homotypique. Des anticorps dirigés contre le CD99 bloquent *in vitro* la migration transendothéliale de monocytes, et ceci en incubant les anticorps avec les monocytes ou avec les cellules endothéliales (Schenkel *et al.*, 2002). Cette étude de Muller montre également, pour la première fois, une régulation séquentielle de la diapédèse : il semble que PECAM-1 agisse avant le CD99.

3- La VE-cadhérine

Différentes études ont montré que l'intégrité des jonctions adhérentes (constituées par la VE-cadhérine) était une barrière à la migration des neutrophiles. Cependant, des études réalisées *in vitro*, dans des conditions de flux, démontrent que la VE-cadhérine disparaît transitoirement des jonctions pendant la diapédèse (Allport *et al.*, 2000). Les auteurs de l'étude ne savent pas si cette disparition de la VE-cadhérine est un pré-requis ou une conséquence de ce processus de diapédèse.

4- Les protéines JAM

JAM-A

JAM-A est exprimée au niveau des jonctions serrées épithéliales et aux bords intercellulaires des cellules endothéliales. Chez l'homme, JAM-A est également exprimée au niveau des leucocytes et des plaquettes. Une étude *in vitro* lui a récemment attribué un rôle dans la transmigration de cellules T et de leucocytes polymorphonucléaires (Ostermann *et al.*, 2002). Les auteurs ont également montré une interaction de JAM-A avec l'intégrine $\alpha L\beta 2$.

JAM-B

JAM-B a initialement été observée aux bords latéraux des HEV (Palmeri *et al.*, 2000). L'implication de cette molécule dans les interactions leucocyte-cellule endothéliale n'a pas encore été établie. JAM-B se lie à JAM-C et à l'intégrine $\alpha4\beta1$.

JAM-C

JAM-C a été initialement rapportée comme une molécule fortement exprimée par les HEV (Aurrand-Lions *et al.*, 2001), puis par les HUVEC (Johnson-Leger *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que JAM-C avait un rôle dans la transmigration des neutrophiles (Chavakis *et al.*, 2004). JAM-C est également exprimée par certaines sous-populations de cellules B et de cellules T et par la plupart des monocytes (Johnson-Leger *et al.*, 2002).

Chapitre III- L'organo-spécificité de l'endothélium

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules endothéliales microvasculaires sont différentes suivant l'organe dans lequel elles se situent mais également au sein d'un même organe. Leur diversité s'observe au niveau moléculaire par l'expression différentielle de molécules liées :

- à une fonction particulière (recrutement cellulaire, angiogénèse,...),
- à un état particulier (état inflammatoire,...), ou
- à un contexte pathologique particulier (cancer,...).

Si l'on prend l'exemple de la recirculation des lymphocytes, décrit dans le chapitre II, Warnock et collaborateurs ont mis en évidence un niveau insoupçonné de spécialisation des hautes cellules endothéliales (HEC) dans les plaques de Peyer : bien qu'au sein d'un même organe et physiquement très proches, les HEC sont capables de recruter de façon différentielle les cellules T et les cellules B dans des micro-environnements particuliers, permettant ainsi un contrôle très segmenté le long du microcapillaire (Warnock *et al.*, 2000). Ceci est dû à la présence ou à l'absence de molécules d'adhésion particulières à la surface des cellules endothéliales et des cellules circulantes, ainsi qu'à la présence ou à l'absence de chimio-attractants particuliers.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser dans un premier temps à l'organo-spécificité de l'endothélium dans le trafic cellulaire puis, dans un second temps, nous aborderons son organo-spécificité de façon plus générale. Nous verrons l'intérêt de son étude pour le ciblage thérapeutique.

Concernant la thématique de cette partie, nous avons rédigé un chapitre d'un livre intitulé « Cancer growth and progression » (2^{ème} édition, éditeur Hans Kaiser, Kluwer Academic eds) dont le titre est : « Tumor and host endothelial cells selective interactions and modulation by microenvironmental chemokines ». Celui-ci est présenté à la fin de ce manuscrit, dans les travaux complémentaires à mon travail de thèse (partie I, page 163).

Un ligand particulier de la E-sélectine est le CLA (« cutaneous lymphocyte associated antigen ») (Berg *et al.*, 1991). Le ligand CLA définit une population de cellules T mémoires, associée à la peau et migrant préférentiellement dans des sites cutanés sains ou inflammés. Cette population est impliquée dans l'immunité locale et les réactions inflammatoires cutanées. Des mycoses fongiques et d'autres sous-types de lymphomes cutanés expriment le CLA (Meijer *et al.*, 1989; Picker *et al.*, 1990) mais pas l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, le récepteur de domiciliation associé aux muqueuses. L'expression hautement sélective du CLA sur les cellules T de lymphomes cutanés suggère que le CLA doit intervenir dans la dissémination spécifique *in vivo* de ces lymphomes dans la peau. Cependant la liaison du CLA à la E-sélectine n'explique pas totalement la domiciliation spécifique des cellules T mémoires CLA⁺ dans la peau. En effet, les neutrophiles expriment le CLA (De Boer *et al.*, 1994) mais ne migrent pas de façon préférentielle dans cette organe. De plus, la E-sélectine est induite au niveau de l'endothélium inflammé de sites cutanés et non cutanés. Comme nous le verrons plus tard, une autre étape dans la cascade de l'adhésion est nécessaire pour permettre cette spécificité de domiciliation dans la peau, faisant intervenir les chimiokines CTACK et TARC.

Malgré la large distribution de la L-sélectine, les reconnaissances dues à cette molécule tendent à être organo-spécifiques de par ses ligands, les adressines vasculaires : l'expression des adressines sur les cellules endothéliales est différente suivant les organes et les types de vaisseaux. On distingue les adressines vasculaires périphériques (PNAd : « Peripheral Nodes Addressin ») et les adressines vasculaires du système muqueux (MAd : « Mucosal Addressin »).

L'adressine typique des muqueuses est MAdCAM-1, dont l'expression est quasiment restreinte aux vaisseaux présents dans les muqueuses ou les tissus de type muqueux. Elle est l'un des quelques exemples de molécules d'adhésion de l'endothélium dont l'expression est ainsi restreinte à un tissu particulier. En plus d'être reconnue par la L-sélectine, MAdCAM-1 possède un domaine de type immunoglobuline qui peut interagir avec l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, un récepteur de domiciliation des lymphocytes mémoires/effecteurs dans les tissus muqueux également. MAdCAM-1 peut ainsi assurer l'étape de roulement mais aussi l'adhésion ferme. Par conséquent, la domiciliation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes muqueux et dans les autres tissus de type muqueux (intestins, ...) est fortement dépendante de l'interaction entre l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ du lymphocyte et son récepteur endothélial, MAdCAM-1 (Berlin *et al.*, 1993). Des souris déficientes pour la sous-unité $\beta 7$ montrent un trafic cellulaire

dans les tissus muqueux sévèrement réduit (Wagner *et al.*, 1996). Les cellules T de lymphomes gastro-intestinaux expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ mais pas le CLA (Drillenbourg *et al.*, 1997).

La domiciliation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes périphériques implique les adressines vasculaires périphériques, GlyCAM-1 et CD34 (Baumheter *et al.*, 1993; Hwang *et al.*, 1996).

B- Les chimiokines et leurs récepteurs

Dans la seconde étape de la cascade, les chimiokines et leurs récepteurs participent également à la spécificité de la domiciliation. Certaines chimiokines exprimées constitutivement, en conjonction avec d'autres molécules d'adhésion, jouent un rôle important dans la circulation des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires (voir la revue de Kunkel et Butcher (Kunkel et Butcher, 2002a)). D'autres chimiokines participent au ciblage dans les organes non lymphoïdes (voir les revues de Campbell et Butcher (Campbell et Butcher, 2000) et de Kunkel et Butcher (Kunkel et Butcher, 2002b)).

1- CCL21

La chimiokine CCL21 (également nommée SLC, « secondary lymphoid-tissue chemokine », ou 6-CKine) est associée aux tissus lymphoïdes secondaires. Elle est exprimée dans les hautes veinules endothéliales des ganglions lymphatiques périphériques et des plaques de Peyer. Elle est également exprimée dans les zones de cellules T de la rate, des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer et dans l'endothélium lymphatique de nombreux organes (Gunn *et al.*, 1998). CCL21 agit par l'intermédiaire du récepteur CCR7. Elle exerce une activité chimioattractante fortement efficace vis-à-vis des lymphocytes, avec une activité préférentielle sur les cellules T naïves (Gunn *et al.*, 1998). CCL21 induit l'adhésion ferme des lymphocytes T naïfs *via* l'interaction de l'intégrine $\beta 2$ à son ligand ICAM-1, une étape nécessaire au recrutement du lymphocyte. La seule autre molécule montrée comme activant l'intégrine $\beta 2$ des lymphocytes est l'adressine vasculaire périphérique, GlyCAM-1. Il est possible que CCL21 et GlyCAM-1 agissent en coopération pour stimuler l'adhésion ferme des lymphocytes aux HEC des ganglions lymphatiques périphériques. L'importance de CCL21 dans la domiciliation des cellules T dans les organes

lymphoïdes secondaires a été confirmée *in vivo* sur des souris *plt*, spontanément déficientes dans le gène de CCL21 (Gunn *et al.*, 1999). Dans ces souris, une forte absence de cellules T a été observée dans les ganglions lymphatiques périphériques et les plaques de Peyer. Quant la chimiokine est injectée en sous-cutané dans les souris *plt*, la lymphe afférente semble entraîner la chimiokine vers les ganglions drainants, où elle est finalement présentée sur la face luminale des HEV : la capacité des cellules T à adhérer aux HEV et à pénétrer dans l'organe est alors rétablie (Stein *et al.*, 2000).

La domiciliation *in vivo* des cellules T a lieu presque exclusivement aux sites des HEV présentant la chimiokine CCL21 (Warnock *et al.*, 2000).

Plusieurs études suggèrent que le récepteur CCR7 et ses ligands, CCL21 et CCL19, pourraient être associés à l'invasion et aux métastases des ganglions lymphatiques. Tout d'abord, le récepteur de chimiokines CCR7 est fortement exprimé sur les cellules cancéreuses humaines de sein ainsi que dans les métastases et les tumeurs malignes du sein (Muller *et al.*, 2001). Il faut préciser ici que le cancer du sein est caractérisé par un profil métastatique particulier impliquant les ganglions lymphatiques périphériques, la moelle osseuse, les poumons et le foie. De plus, CCL21 et CCL19 montrent une expression plus forte dans les premières destinations des métastases du cancer du sein. Ensuite, l'interaction entre le récepteur CCR7 et ses ligands est associée avec les métastases préférentielles du carcinome gastrique dans les ganglions lymphatiques (Mashino *et al.*, 2002). Enfin, dans des modèles murins, l'expression de CCR7 augmente les métastases de mélanome dans les ganglions lymphatiques drainants et l'inhibition de CCL21 bloque l'invasion tumorale de ces ganglions (Wiley *et al.*, 2001).

2- CCL25

Une autre chimiokine tissu-sélective est la chimiokine associée au thymus CCL25 (également nommée TECK, « thymus-expressed chemokine »). CCL25 est fortement exprimée dans l'intestin grêle (Vicari *et al.*, 1997). CCR9, le récepteur de CCL25, est exprimé par de petites populations de lymphocytes mémoires CD4⁺ et CD8⁺, exprimant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, le récepteur de domiciliation intestinal. CCR9 est exprimé par les lymphocytes isolés de l'intestin grêle et est absent des autres sous populations lymphocytaires mémoires (Zabel *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent un rôle pour CCL25 et son récepteur, CCR9, dans la domiciliation intestinale des leucocytes. L'extension selon laquelle cette paire chimiokine-

récepteur de chimiokine serait spécifiquement associée au compartiment intestinal, comparé à d'autres sites épithéliaux ou muqueux, reste à clarifier.

3- CCL17 et CCL27

Deux chimiokines différentes participent à la domiciliation spécifique des cellules circulantes dans la peau : CCL17 (également nommée TARC, « thymus and activation-regulated chemokine ») et CCL27 (également nommée CTACK, « cutaneous T cell-attracting chemokine »).

Le récepteur de chimiokines CCR4, sur les lymphocytes T, et son ligand CCL17 sont impliqués dans le recrutement de lymphocytes dans des sites cutanés sains ou inflammés (Campbell *et al.*, 1999). CCL17 semble constitutivement exprimée et hyper-induite sur les veinules cutanées, et semble absente des sites vasculaires intestinaux recrutant les lymphocytes. CCR4 est fortement exprimé par les lymphocytes mémoires CLA⁺ circulants dans la peau, et il est absent des cellules mémoires intestinales. CCR4 favorise les processus de diapédèse et de chimiotaxie à travers un gradient de CCL22 (autre ligand de CCR4), chimiokine sécrétée par les macrophages activés.

CCL27, constitutivement exprimée par les kératinocytes, attire également les cellules T mémoires de la peau (Morales *et al.*, 1999). CCL27 se lie au récepteur CCR10 qui est exprimé spécifiquement sur les lymphocytes T CLA⁺ circulants. CCL27 est probablement transcytosée au travers des cellules endothéliales pour être présentée à leur surface (Middleton *et al.*, 1997). L'expression de CCL27 peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α .

Les mélanomes malins ont un profil métastatique similaire à celui du cancer du sein mais ont également une forte incidence sur les métastases de la peau : ces mélanomes montrent de fort niveau d'expression du récepteur de chimiokines, CCR10, en plus des récepteurs CXCR4 et CCR7 (Muller *et al.*, 2001).

4- CCL28/MEC

La chimiokine CCL28 (également nommée MEC, « mucosae-associated epithelial chemokine ») semble avoir un rôle important dans la domiciliation des lymphocytes dans les tissus épithéliaux autres que la peau, incluant divers organes muqueux. L'ARNm de MEC est

abondamment observé dans les glandes salivaires, le colon, la trachée et les glandes mammaires (Pan *et al.*, 2000). MEC est constitutivement exprimée par les cellules épithéliales. Elle assure la chimiotaxie des lymphocytes par l'intermédiaire du récepteur CCR10, le récepteur connu de CCL27, et leur migration transendothéliale par l'intermédiaire du récepteur CCR3 (Pan *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000).

5- Les glycosaminoglycannes

Mis à part leurs récepteurs, les chimiokines peuvent également interagir avec des glycosaminoglycannes (GAG), présents à la surface des cellules endothéliales et dans la matrice extracellulaire. Les chimiokines varient dans l'affinité (et peut-être dans la spécificité) par laquelle elles interagissent avec les GAG (Witt et Lander, 1994) : une connaissance plus approfondie des interactions chimiokines-GAG pourrait mettre en lumière des différences fonctionnelles entre les chimiokines. Il est possible que, suivant le micro-environnement dans lequel elles se trouvent, les cellules endothéliales présentent à leur surface des GAG particuliers, avec des composants favorisant plus particulièrement l'interaction avec telle ou telle chimiokine. Ceci traduirait un niveau inattendu de spécificité des cellules endothéliales, qui reste cependant à démontrer.

II- L'organo-spécificité de l'endothélium comme cible thérapeutique

Nous allons nous intéresser dans cette partie à différents travaux mettant en évidence l'organo-spécificité de l'endothélium au sein de différents contextes (inflammatoire, tumoral, ...). Ces études soulignent la présence spécifique de certaines molécules dans le cadre de pathologies particulières : ces molécules se révèlent de fait des cibles de choix pour des thérapies médicamenteuses. Etant exprimées à la surface de l'endothélium, au contact du flux sanguin, ces molécules sont facilement accessibles par différents agents thérapeutiques. L'endothélium devient un moyen pour combattre certaines maladies, notamment le développement tumoral.

A- Caractérisation

Dans un cadre inflammatoire, l'exposition des cellules endothéliales à des cytokines (IL-1, TNF- α ,...) ou à des facteurs de croissance (VEGF, FGF-2,...) induit des changements complexes dans leur phénotype : elles sont, en quelque sorte, « reprogrammées » pour la synthèse de nouveaux gènes et la répression de certains autres (pour une revue, voir Mantovani *et al.* (Mantovani *et al.*, 1997)). On observe notamment l'expression accrue de nombreuses molécules d'adhésion telles que la E- ou la P-sélectine.

L'angiogénèse, qui est un autre exemple d'activation des cellules endothéliales, induit également des changements de phénotype, avec notamment une forte expression du VEGF et de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Brooks *et al.*, 1994).

Dans le cas du cancer, des différences considérables existent entre la vasculature normale et la vasculature tumorale. Les vaisseaux, au sein des tumeurs, présentent une morphologie spécifique, une perméabilité relativement incontrôlée, des fenêtres intercellulaires et un système vésiculaire très développé. De nombreux marqueurs de surface exprimés par les cellules endothéliales activées sont exprimés plus fortement sur la vasculature tumorale (ex VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, intégrine $\alpha v \beta 3$). Ces molécules sont des marqueurs de la prolifération endothéliale.

St Croix et collaborateurs ont comparé les profils d'expression de gènes entre des cellules endothéliales vasculaires dérivées de tissus colorectaux sains et malins, par la méthode SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). 79 transcrits ont été trouvés différemment exprimés entre ces deux types de tissus, dont 46 avec une expression au moins dix fois supérieure dans les cellules endothéliales de tissus tumoraux (St Croix *et al.*, 2000). Nombreux des transcrits identifiés correspondaient à des protéines impliquées dans la formation ou le remodelage de la matrice extracellulaire (collagène, métalloprotéases) : ce sont des processus extrêmement importants pour la formation de nouveaux vaisseaux. Une autre partie des transcrits ont permis de mettre en évidence des gènes non caractérisés à l'heure actuelle. Ces transcrits offrent des cibles thérapeutiques de choix.

Actuellement, de nombreux travaux utilisant la méthode du « phage display » *in vivo* rapportent l'identification de molécules, nommées « adresses » ou « signatures » vasculaires. La plupart de ces travaux utilisent des bibliothèques de peptides (Pasqualini et Ruoslahti, 1996) ou d'anticorps (Johns *et al.*, 2000). Par cette méthode, des peptides se liant spécifiquement à l'endothélium de certains organes ont été identifiés (table 8).

Table 8 : identification de peptides pouvant être utilisés pour cibler l'endothélium.

Peptide	Récepteur du peptide	Spécificité
CPGPEGAGC	Amino-peptidase P	Vasculature du sein normal et vasculature des lésions malignes ou hyperplasiques du sein (Essler et Ruoslahti, 2002)
LSIPPKA FQTPPQL LTPATAI	LOX-1 (lectin like oxidized LDL receptor)	LOX-1 est faiblement exprimé sur l'endothélium normale et très fortement exprimé sur l'endothélium associé à l'hypertension et à l'athérogénèse (White <i>et al.</i> , 2001))
Contient l'un des motifs suivants : AKxxK/R KxKxPK/R KxK	Récepteur de la transferrine	Récepteur fortement exprimé sur l'endothélium microvasculaire du cerveau (Xia <i>et al.</i> , 2000) ⇒ ciblage de maladies neurodégénératives
CTTHWGFTLC	MMP-2 et MMP-9	Métalloprotéases dégradant la matrice extracellulaire, impliquées dans le processus d'angiogénèse (Koivunen <i>et al.</i> , 1999) ⇒ ciblage des vaisseaux associés aux tumeurs (blocage de l'angiogénèse)
Peptides contenant le motif Arg-Gly-Asp (RGD)	$\alpha v \beta 3$	Intégrine contribuant à l'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire, impliquée dans le processus d'angiogénèse (Boger <i>et al.</i> , 2001) ⇒ ciblage des vaisseaux associés aux tumeurs

Ces adresses vasculaires peuvent être des cibles intéressantes pour des thérapies visant les vaisseaux sanguins de différents tissus ou tumeurs.

B- Implications dans le développement de nouveaux traitements thérapeutiques anticancéreux

La mise en évidence de molécules organo-spécifiques, attachées à un tissu particulier ou à un processus particulier tel que l'angiogénèse tumorale, offre de grands espoirs pour le

ciblage de thérapies et, notamment, de thérapies anticancéreuses. En effet, les thérapies anticancéreuses actuelles comme la chimiothérapie présentent l'inconvénient de ne pas cibler spécifiquement les tumeurs : les agents cytotoxiques sont diffusés à travers le corps et, de ce fait, touchent également des organes sains. De nombreux effets secondaires sont alors observés et plus ou moins bien supportés par le patient.

Pouvoir cibler plus spécifiquement l'action des agents anticancéreux sur la tumeur serait une avancée considérable. Depuis quelques années, deux nouvelles stratégies se développent : la stratégie anti-angiogénique et la stratégie anti-vasculaire (Barinaga, 1997). Ces stratégies n'attaquent pas directement les tumeurs mais ciblent les vaisseaux sanguins qui les alimentent. Les tumeurs induisent, par un processus nommé angiogénèse, la croissance de nouveaux vaisseaux pour obtenir l'oxygène et les nutriments dont elles ont besoin pour proliférer (Folkman, 1971). L'angiogénèse est donc un événement crucial qui n'a lieu chez l'adulte qu'en réponse à des stimuli pathologiques, sauf quelques exceptions. Elle intervient également dans le développement et la progression d'autres maladies comme l'arthrite et le diabète mais a un effet thérapeutique dans des maladies ischémiques telles que l'athérosclérose (Silvestre et Levy, 2002).

La stratégie anti-angiogénique a pour but d'inhiber le processus d'angiogénèse afin de bloquer le développement tumoral : pour cela, les chercheurs ont identifié des agents qui interfèrent avec les cellules endothéliales construisant les nouveaux vaisseaux. Ces agents agissent par différentes voies :

- soit, ils bloquent l'action de facteurs régulant positivement l'angiogénèse tels que le VEGF ou le bFGF. Des essais cliniques en phase I et II sont actuellement en cours concernant des anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF ou contre l'un de ses récepteurs tyrosine kinase;
- soit, ils régulent négativement l'angiogénèse (angiostatine, endostatine);
- soit, ils suppriment la capacité des cellules endothéliales à migrer à travers les tissus environnants pour former de nouveaux vaisseaux (inhibiteurs de métalloprotéases).

L'inconvénient de cette stratégie est qu'elle ne détruit pas la tumeur mais la réduit à un stade minimal, inoffensif pour le patient mais il demeure que celui-ci sera obligé de suivre le traitement à vie, à moins d'y associer une autre thérapie.

La stratégie anti-vasculaire va, quant à elle, être dirigée contre les vaisseaux sanguins déjà formés et associés aux tumeurs. Cette stratégie agit par l'intermédiaire de molécules spécifiquement exprimées au niveau des cellules endothéliales constituant ces vaisseaux. Deux exemples peuvent être cités :

- l'équipe de Ruoslahti utilise de petits peptides se liant spécifiquement aux cellules endothéliales de vaisseaux nouvellement formés (Pasqualini et Ruoslahti, 1996). Ils associent ces peptides à des drogues cytotoxiques comme la doxorubicine (Arap *et al.*, 1998), à des peptides proapoptotiques (Ellerby *et al.*, 1999) ou encore à des cytokines (Curnis *et al.*, 2000). Ils obtiennent ainsi une bien meilleure efficacité, comparativement aux traitements non ciblés. En adressant spécifiquement la drogue à la tumeur, cette stratégie épargne les autres tissus. L'apparition de résistances aux drogues est moins probable car les cellules endothéliales associées aux tumeurs ne sont pas cancéreuses. Par contre, comme pour la stratégie anti-angiogénique, cette approche ne détruit pas totalement la tumeur.
- l'équipe de Schnitzer utilise, quant à elle, des anticorps conjugués à une drogue cytotoxique (Schnitzer, 1998). Comme les peptides utilisés par l'équipe de Ruoslahti, ces anticorps sont dirigés contre des molécules spécifiquement exprimées par les cellules endothéliales associées aux tumeurs. Une particularité existe cependant : les molécules visées sont des protéines cavéolaires permettant la transcytose de molécules, c'est à dire leur transport de la circulation sanguine dans le tissu sous-jacent. De cette manière, la drogue pourrait vaincre la barrière endothéliale et accéder beaucoup plus facilement à la tumeur, d'où une bien meilleure efficacité d'action. De plus, cette stratégie permettrait d'enrayer totalement la tumeur puisque la drogue y aurait un accès direct.

Bien d'autres traitements peuvent être envisagés grâce à ce ciblage spécifique et de nombreux autres exemples pourraient être cités.

D'une manière générale, ces nouvelles approches ont l'avantage de cibler l'endothélium qui, de ce fait, au lieu d'être une barrière (comme c'est le cas pour les chimiothérapies classiques) devient un moyen pour combattre le développement des tumeurs.

L'identification de ces molécules vasculaires organo-spécifiques est donc d'une importance considérable pour le ciblage de thérapies. Mais cette recherche progresse lentement, en partie à cause des difficultés à isoler des populations pures de cellules endothéliales provenant d'un tissu donné.

Comme nous avons pu le voir au cours de cette introduction, les cellules endothéliales sont différentes suivant le tissu dans lequel elles se trouvent : leur organo-spécificité se révèle notamment dans l'expression différentielle de molécules. L'identification de ces molécules vasculaires organo-spécifiques est d'une importance considérable pour le ciblage de thérapies.

Au laboratoire, il a été entrepris et mis au point l'immortalisation de cellules endothéliales représentatives de divers organes et types de vaisseaux (Bizouarne *et al.*, 1993a). Elles sont immortalisées par divers agents et stabilisées dans leur phénotype (Brevet Kieda *et al.* CNRS, 99/16169) (Kieda *et al.*, 2002). Ces lignées expriment :

- les marqueurs constitutifs des cellules endothéliales (le facteur de von Willebrand, l'ACE),
- les marqueurs inductibles (les E- et P-sélectines) et
- les marqueurs spécifiques de certains tissus (GlyCAM-1 pour les tissus lymphoïdes périphériques, MAdCAM-1 pour les tissus lymphoïdes muqueux).

Ces lignées cellulaires conservent leur capacité à faire de l'angiogénèse quand elles sont sur une matrice appropriée. Elles sont le modèle idéal pour l'approche *in vitro* des réactions organo-sélectives.

Mon travail de thèse a été de mettre en évidence cette organo-spécificité en réalisant une étude d'expression différentielle de gènes entre deux lignées murines de hautes cellules endothéliales. L'une de ces lignées, nommée HECa10, est issue de ganglions lymphatiques périphériques, l'autre, nommée HECpp, est issue de plaques de Peyer. Ces cellules sont très proches morphologiquement et fonctionnellement puisqu'elles participent toutes deux à la recirculation des lymphocytes. Elles sélectionnent cependant des sous-populations lymphocytaires différentes, utilisant pour cela des molécules d'adhésion spécifiques (Warnock *et al.*, 1998; Warnock *et al.*, 2000). Les molécules d'adhésion et les chimiokines, identifiées à ce jour, ne suffisent pas à expliquer complètement l'organo-spécificité de domiciliation des lymphocytes entre ces deux types d'organes lymphoïdes.

Bien qu'étant immortalisées, les lignées HECa10 et HECpp expriment toujours les marqueurs spécifiques des HEC, notamment l'adressine périphérique, GlyCAM-1, pour la lignée

HECa10, et l'adressine muqueuse, MAdCAM-1, pour la lignée HECpp (Bizouarne *et al.*, 1993b).

Au laboratoire, il a été montré que ces deux lignées de HEC expriment de façon préférentielle à leur surface certains récepteurs de glycoconjugués (lectines endogènes) (Bizouarne *et al.*, 1993a) (figure 21). Cette étude a été réalisée grâce à l'utilisation de néoglycoprotéines, c'est à dire des molécules de SAB (sérum albumine bovine) sur lesquelles ont été greffés des résidus sucrés (Monsigny *et al.*, 1984).

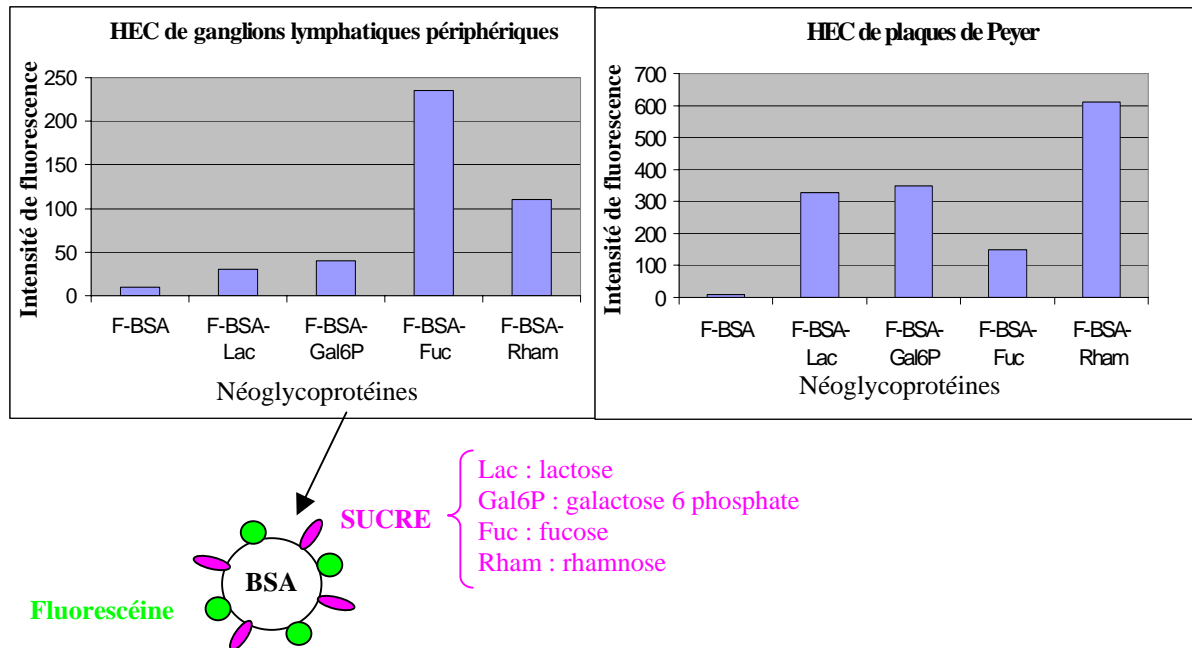


Figure 21 : expression préférentielle de récepteurs de glycoconjugués suivant l'origine des cellules endothéliales (adaptée de Bizouarne *et al.*, 1993b).

Comme le montre la figure ci-dessus, les HEC de ganglions lymphatiques périphériques expriment préférentiellement un récepteur au fucose alors que celles de plaques de Peyer expriment préférentiellement un récepteur au rhamnose. Le récepteur au fucose, présent sur les cellules HECa10, est différent des sélectines et peut promouvoir l'adhésion cellulaire (Bizouarne *et al.*, 1993b).

Le phénotype des cellules endothéliales est étroitement lié au micro-environnement dans lequel elles se trouvent *in vivo*. Cependant, comme le montre l'étude ci-dessus, les lignées développées au laboratoire conservent leur spécificité suivant le tissu d'origine, du moins en grande partie.

Notre étude d'expression différentielle de gènes, entre les lignées HECa10 et HECpp, complète les nombreuses comparaisons de cellules endothéliales déjà réalisées par différentes équipes. Nous pouvons notamment citer les travaux de Girard et collaborateurs (Girard *et al.*, 1999) et de Izawa et collaborateurs (Izawa *et al.*, 1999) qui ont comparé l'expression différentielle de gènes entre des hautes cellules endothéliales et des cellules endothéliales « plates ». Ils ont identifié de nombreux gènes différemment exprimés en relation avec la fonction particulière des HEC dans la domiciliation des lymphocytes. Dans notre cas, nous avons comparé deux lignées cellulaires très proches : elles ont la même morphologie, la même fonction (ce sont deux lignées de HEC). Elles diffèrent uniquement par leur tissu lymphoïde d'origine, représentant deux systèmes spécifiques de recirculation des lymphocytes. En les comparant, nous espérons mettre en évidence des gènes en relation directe avec l'organo-spécificité de domiciliation des lymphocytes.

D'autre part, utilisant des lignées cellulaires de souris, nous nous sommes affranchis, pour notre comparaison de gènes, des risques de bruit de fond liés à un environnement génétique particulier.

Pour cette étude, nous avons choisi la technique du « RNA differential display », basée sur l'amplification d'ADN complémentaires courts par RT-PCR, à l'aide d'amorces aléatoires (Liang et Pardee, 1992; Liang et Pardee, 1995).

Cette étude, développée dans la première partie des résultats de ma thèse, nous a permis de mettre en évidence dix ADN complémentaires (ADNc) exprimés de façon différente entre les deux types de HEC. Plus particulièrement, nous avons mis en évidence deux ADNc préférentiellement exprimés dans les HEC issues de plaques de Peyer et présentant une homologie de 100% avec l'ARNm de la protéine ARM-1 (Adhesion Regulating Molecule-1).

Dans la suite de ma thèse, notre étude s'est uniquement axée sur cette protéine particulière, récemment mise en évidence et restant peu caractérisée.

Dans un premier temps, nous avons essayé de confirmer l'expression différentielle d'ARM-1 en utilisant une réaction de rétro-transcription. L'expression préférentielle d'ARM-1 au sein des HEC de plaques de Peyer n'a pas pu être confirmée. Cependant, en observant l'expression de l'ARNm d'ARM-1 au sein des différentes lignées de cellules endothéliales dont nous disposons au laboratoire, nous avons pu mettre en évidence l'absence d'ARNm d'ARM-1 au sein des cellules endothéliales de peau. Comparée aux autres lignées de CE, la

lignée issue de la peau montre une faible capacité à induire l'adhésion de lymphocytes activés CEMT4. Simins et collaborateurs ont montré un rôle potentiel d'ARM-1 dans l'adhésion cellulaire (Simins *et al.*, 1999). Nous nous sommes alors demandés si l'absence d'ARM-1 dans les CE de peau avait un lien avec la faible capacité de ces cellules à promouvoir l'adhésion cellulaire.

Dans la seconde partie des résultats de ma thèse, nous verrons l'étude du rôle potentiel d'ARM-1 dans l'adhésion, au sein des cellules endothéliales. Nous avons également tenté de caractériser davantage la protéine en étudiant, d'une part, sa localisation cellulaire, et d'autre part, sa glycosylation. Ces résultats ont fait l'objet d'un article soumis à publication dans le journal *European Journal of Biochemistry : the FEBS Journal*.

Enfin, dans une dernière partie, nous verrons des études complémentaires réalisées sur ARM-1 afin d'approfondir son rôle au sein des cellules endothéliales.

De nombreuses techniques peuvent être utilisées afin de comparer l'expression différentielle de gènes. Nous pouvons citer notamment :

- les puces à ADN. Cette technique permet d'observer la modulation d'expression d'un très grand nombre de gènes mais elle ne peut mettre en évidence que les ADNs préalablement choisis et chargés sur la puce. De plus, elle nécessite un investissement important.
- l'hybridation soustractive suppressive (Diatchenko *et al.*, 1996). Elle met en évidence uniquement les gènes spécifiques d'une situation donnée, puisque tous les gènes communs entre les deux situations à comparer sont éliminés de l'analyse. Cette technique ne nécessite pas d'investissements importants.
- la méthode SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) (Velculescu *et al.*, 1995). Elle permet de représenter la totalité des gènes exprimés par une cellule ou un type cellulaire, dans une situation donnée, à la fois de manière qualitative et quantitative. Cette technique est néanmoins délicate à développer, même si elle ne nécessite pas de machine très perfectionnée.

Pour notre part, nous avons choisi la technique du « differential display » car elle est facile à mettre en place et ne nécessite pas d'appareil perfectionné, ce qui limite le coût de son développement. D'autre part, utilisant des amorces aléatoires (voir le principe de la méthode figure 22), nous n'avons aucun *a priori* sur les gènes recherchés contrairement à la technique des puces à ADN.

De nombreuses équipes ont utilisé la méthode du « differential display » pour comparer l'expression de gènes entre deux situations différentes, et notamment au niveau des CE. Une analyse de « differential display » a comparé, *in vitro*, l'expression de gènes dans les CE en division (phénomène rencontré lors de l'angiogénèse) par rapport aux cellules au repos (Kozian et Augustin, 1995). D'autres travaux se sont intéressés à l'identification de molécules régulées dans les CE lors de processus pathologiques tels que l'athérosclérose (Horrevoets *et al.*, 1999). Plus proche de l'étude que nous avons nous-même menée, Izawa et collaborateurs ont comparé l'expression différentielle de gènes entre des hautes cellules endothéliales et des cellules endothéliales « plates » (Izawa *et al.*, 1999).

I- Analyse de l'expression différentielle de gènes entre deux lignées de hautes cellules endothéliales par la méthode du « differential display ».

A- Introduction

La technique utilisée pour la réalisation de ce travail, le « RNA differential display », a été décrite pour la première fois en 1992 (Liang et Pardee, 1992) puis a subi certaines améliorations dans les années suivantes (Liang et Pardee, 1995; Liang et Pardee, 1998). Le principe du « RNA differential display » est basé sur l'amplification aléatoire d'ADNc courts, situés en partie 3' des gènes (figure 22). Je suis allée acquérir cette technique dans le laboratoire du Professeur J. P. Soulillou à Nantes, où elle a été développée avec quelques modifications par rapport à sa première description, en utilisant le kit « RNAimage » (GenHunter).

La rétro-transcription diffère d'une rétro-transcription ordinaire car elle est réalisée sur une très faible quantité d'ARN (0,2 µg), et sur un tiers des ARN messagers. En effet, trois oligo-dT, constitués de 11 dTTP plus une base (H-T11A, H-T11C et H-T11G), vont permettre trois rétro-transcriptions, chacune ne concernant que la fraction d'ARN messagers possédant la bonne terminaison en 3' (U, G ou C). Les ARN sont préalablement traités à la DNase pour éviter toute contamination par de l'ADN génomique. Pour chacune des trois rétro-transcriptions, quatre combinaisons d'amorces aléatoires ont été utilisées pour procéder à la PCR, offrant ainsi douze conditions d'amplification différentes. Une PCR de 40 cycles, réalisée en présence de α -(³³P)-dCTP, amplifie de manière aléatoire des fragments d'ADN. En théorie, 240 combinaisons d'amorces différentes (3 oligodT * 80 amorces arbitraires) seraient nécessaires pour couvrir 96 % du génome de mammifères.

Les produits d'amplification obtenus par PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Enfin, une autoradiographie est réalisée en 48 heures pour permettre la visualisation des fragments d'amplification obtenus. L'analyse de l'autoradiographie du gel de polyacrylamide permet de sélectionner des fragments d'ADNc, dont la taille varie de 100 à 500 pb, exprimés de façon différentielle selon les lignées cellulaires. En appliquant l'autoradiographie sur gel sec, la bande d'intérêt est notée, puis découpée du gel pour en extraire l'ADNc. Une nouvelle réaction de PCR est réalisée sur ce matériel, dans des conditions identiques à celles qui ont permis d'obtenir ce premier produit d'amplification (même combinaison d'amorces parmi les douze possibilités). Les ADNc

d'intérêt sont clonés et séquencés. Toutes les séquences sont ensuite soumises dans les banques de données (<http://ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.embl-heidelberg.de>).

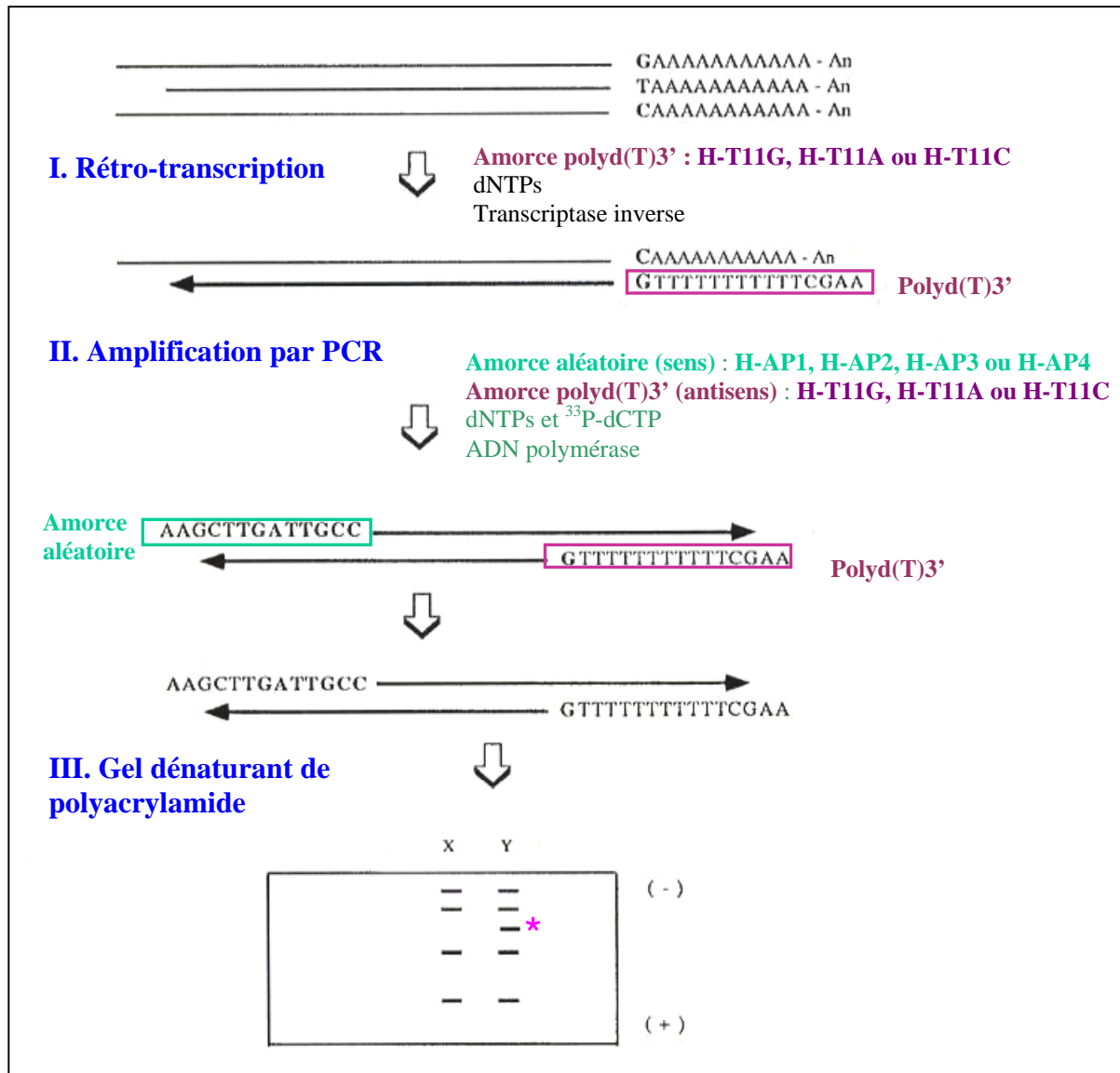


Figure 22 : principe de la méthode du « RNA differential display ».

B- Matériels et méthodes

1- Culture cellulaire et extraction d'ARN totaux

Les lignées de hautes cellules endothéliales de ganglions lymphatiques périphériques (HECa10) et de plaques de Peyer (HEC_{pp}) ont été cultivées dans une atmosphère humide composée de 5 % de CO₂ et de 95 % d'air, à 37°C, dans du milieu OptiMEM-1 avec

Glutamax-1 (Invitrogen). Ce milieu est supplémenté avec 2 % de sérum de veau foetal, 0,2 % de fungizone et 0,4 % de gentamycine. Les cellules ont été cultivées pendant 48 heures puis décollées à l'aide de trypsine. Les ARN totaux ont été isolés en utilisant le kit « RNeasy Mini Kit » de QIAGEN. Trois extractions d'ARN totaux indépendantes ont été réalisées pour chacune des deux lignées. Pour éviter toute contamination par de l'ADN génomique, les ARN totaux ont été traités à la DNase I en utilisant le kit « Message Clean Kit » de GenHunter.

2- RT-PCR et électrophorèse

Pour la rétro-transcription, un mélange de 20 µl contenant :

- 0,2 µg d'ARN totaux issus de chaque extraction d'ARN de HECa10 ou de HECpp,
- 40 unités d'inhibiteur de RNase (Ambion),
- 10 mM de dithiothréitol,
- 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂,
- 20 µM de dNTPs,
- 0.2 µM d'amorces oligo(dT) et
- 200 unités de transcriptase inverse (Invitrogen),

a été incubé 1 h à 37°C, chauffé 5 minutes à 75°C et ensuite mis sur la glace.

Les amorces oligo(dT) (MWG-Biotech) utilisées pour la rétro-transcription étaient les suivantes :

- H-T11G (5'-AAG CTT TTT TTT TTT G-3'),
- H-T11A (5'-AAG CTT TTT TTT TTT A-3'),
- H-T11C (5'-AAG CTT TTT TTT TTT C-3').

Pour réaliser la PCR, 1 µl de la solution de rétro-transcription a été ajouté à 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,65 mM de MgCl₂, 0,2 µM de chaque amorce, 2 µM de dNTPs, 0,1 mCi de ³³P-dCTP et 0,05 unités de Taq polymérase (Invitrogen) dans un volume final de 20 µl. Les réactions de PCR ont été réalisées dans les conditions suivantes :

1 min à 95°C
 30 s à 94°C
 2 min à 40°C
 30 s à 72°C
 5 min à 72°C

} 40 cycles

Les amorces utilisées pour la réaction de PCR étaient une des trois amorces oligo(dT) (la même que celle utilisée pour la réaction de rétro-transcription) et une des amorces suivantes :

- H-AP1 (5'-AAG CTT GAT TGC C-3'),
- H-AP2 (5'-AAG CTT CGA CTG T-3'),
- H-AP3 (5'-AAG CTT TGG TCA G-3') ou
- H-AP4 (5'-AAG CTT TTA CCG C-3').

Cela représentait 12 combinaisons d'amorces différentes.

Les produits issus de la PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 6 % contenant de l'urée 7 M, pendant 2 à 3 heures à 2000 V, puis autoradiographiés.

3- Clonage et séquençage

Les fragments d'ADNc obtenus après RT-PCR sur les ARN totaux des cellules HECa10 et HECpp ont été comparés (figure 23).

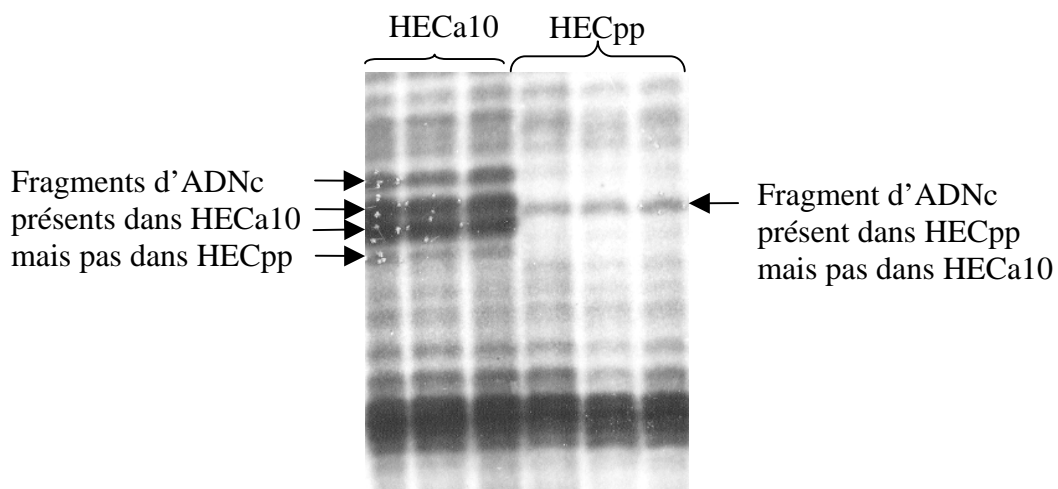


Figure 23 : extrait d'une autoradiographie de gel de polyacrylamide après migration des produits de PCR.

Les bandes d'ADNc uniquement présentes parmi les produits de PCR de HECa10 ou de HECpp ont été purifiées à partir du gel de polyacrylamide. Les ADNc ont été réamplifiés, dans les mêmes conditions qu'au préalable, et clonés en utilisant le kit « TA Cloning Kit » (Invitrogen). Les fragments ont ensuite été séquencés (MWG Biotech) et comparés dans les banques de données en utilisant principalement le programme Blastn.

C- Résultats

1- Identification des ADNc différemment exprimés entre les lignées HECa10 et HECpp

La technique du « differential display » nous a permis d'identifier six ADNc préférentiellement exprimés sur les HECpp (table 9A) et quatre ADNc préférentiellement exprimés sur les HECa10 (table 9B).

Table 9 : fragments d'ADNc identifiés par la méthode du « differential display ».

A) Fragments d'ADNc spécifiques de la lignée HECpp

Nom du fragment	Nombre de nucléotides (en pb)	Protéine homologue à l'ADNc identifié (numéro d'accension Genbank)	% d'homologie (pb/pb)
G1p1	201	ARM-1 (Adhesion Regulating Molecule 1) (AF225959)	100 % (201/201)
G2p1	203		
G4p2	185	Antigène de mélanome (D10049)	75 % (138/138)
G1p2	169	Clone BAC RP24-323K23 issu du chromosome 8 de la souris (AC127554)	88 % (148/148)
A2p1	75	SULT-X1 (protéine relative aux sulfotransférases) (AF026074)	71 % (53/74)
G4p1	227	Tm7sf1 (protéine à sept fragments transmembranaires) (AF154337)	89 % (201/208)

B) Fragments d'ADNc spécifiques de la lignée HECa10

Nom du fragment	Nombre de nucléotides (en pb)	Protéine homologue à l'ADNc identifié (numéro d'accension Genbank)	% d'homologie (pb/pb)
A2a1	79	Génome mitochondrial (CDS non caractérisé) (J01420)	80 % (63/69)
A2a3	74	Sialyltransférase Gal β 1,3GalNAc α 2,3- (X73523)	66 % (49/70)
A2a4	72	MLN51 (AJ 292072)	79 % (57/67)
A1a1	150	Clone RP-24-447P14 issu du chromosome 5 de la souris (AC120412)	48% (72/72)

Curieusement, deux fragments d'ADNc préférentiellement exprimés sur les HECpp, G1p1 et G2p1, ont montré une homologie de 100% avec l'ARNm d'une protéine nommée ARM-1 (« Adhesion Regulating Molecule 1 »), identifiée par Simins et collaborateurs (Simins *et al.*, 1999). G1p1 a été obtenu en utilisant les amorces H-T11G et H-AP1 et G2p1, en utilisant les amorces H-T11G et H-AP2.

Pour les autres fragments d'ADNc, des homologies partielles ont été observées car les fragments ne correspondaient pas à des extrémités 3' d'ADNc comme nous pouvions nous y attendre, ayant utilisé une amorce polydT pour la PCR. Les recherches d'homologies sur ces fragments ont révélé :

- soit des clones issus de banque d'ADNc, non annotés (pas de cadre ouvert de lecture identifié),
- soit des ADNc de protéines diverses.

Dans un premier temps, nous avons voulu confirmer l'expression différentielle de ces fragments d'ADNc.

2- Confirmation de l'expression différentielle des ADNc identifiés

Par une méthode de RT-PCR comparant les ARN des cellules HECa10 et HECpp, nous avons tenté de confirmer l'expression différentielle des ADNc identifiés par « differential display ». Pour cela, des amorces de PCR ont été recherchées sur les séquences des fragments identifiés, ou sur les séquences nucléotidiques des protéines présentant une forte homologie avec ces fragments (Table 9).

G4p1, G4p2 et G1p2 ont pu être réamplifiés mais leur présence a été observée sur les deux lignées de HEC (faux positifs du « differential display »).

Les fragments A2p1, A2a1, A2a3 et A2a4 ont des tailles inférieures à 80 pb : il n'a pas été possible de trouver des amorces correctes pour réamplifier ces fragments de façon spécifique.

A1a1 n'a pas pu être réamplifié. Il faut préciser que les fragments d'intérêt avaient des tailles relativement petites (inférieures à 200 bp) et qu'il a été, de ce fait, difficile de trouver des amorces idéales pour la PCR.

Nos essais d'amplification des ADNc des protéines homologues n'ont pas donné de résultats concluants.

Nous avons préféré centrer notre étude sur les fragments G1p1 et G2p1 présentant 100% d'homologie avec l'ARNm de la protéine ARM-1.

II- Confirmation de l'expression préférentielle d'ARM-1 dans la lignée HECpp

A- Matériels et méthodes

Pour confirmer l'expression différentielle d'ARM-1 entre les cellules HECa10 et HECpp, nous avons, de même que précédemment, utilisé une méthode de RT-PCR. L'extraction des ARN totaux et la RT-PCR ont été réalisées comme décrit précédemment. La rétro-transcription a été effectuée sur 1 µg d'ARN. Les amorces utilisées pour la PCR étaient les suivantes :

ARM-1 sens : 5'-AGG AAG CTT TAT ATG GTG GAG TTC CGG GCA GGA-3'

ARM-1 antisens : 5'-TAG CTC GAG GCC TCA TGG CCC TGC CGG-3'

permettant d'amplifier un fragment d'ARM-1 de 801 bp.

Les conditions de PCR étaient les suivantes :

3 min à 94°C	} 30 cycles
1 min à 94°C	
30 s à 60°C	
1 min à 72°C	
7 min à 72°C	

B- Résultats

Afin de confirmer l'expression préférentielle d'ARM-1 dans les cellules HECpp comparativement aux cellules HECa10, une RT-PCR a été réalisée en utilisant des amorces spécifiques d'ARM-1 (figure 24).

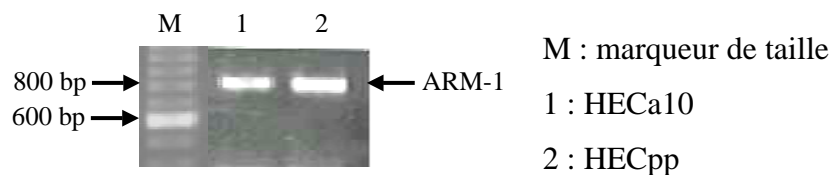


Figure 24 : expression d'ARM-1 dans les lignées HECa10 et HECpp, analysée par RT-PCR.

Comme nous pouvons l'observer sur la figure ci-dessus, l'ADNc d'ARM-1 est présent dans les cellules HECpp mais également dans les cellules HECa10. Il semblerait donc qu'ARM-1 ait été un faux positif de notre application du « differential display ». La comparaison a pourtant été faite sur trois extractions indépendantes d'ARN totaux, réalisées sur chaque lignée, mais de manière concomitante. Il aurait peut être été plus judicieux de décaler les extractions dans le temps. Bien que l'on travaille avec des lignées immortalisées, donc normalement homogènes, on sait que les cellules, suivant leur état physiologique, vont avoir des réponses variables dans leur amplitude pour un même traitement.

Malgré le fait qu'ARM-1 soit un faux positif, nous avons décidé de poursuivre l'étude de cette protéine au sein des cellules endothéliales. En effet, c'est la première fois que cette protéine est décrite dans ce type cellulaire. D'autre part, d'après Simins et collaborateurs, cette protéine semble avoir un rôle important dans l'adhésion cellulaire. Or ce phénomène nous intéresse particulièrement puisqu'il est très représentatif de l'organo-spécificité de l'endothélium.

III- Connaissances actuelles des propriétés d'ARM-1

A- Identification d'ARM-1

Simins et collaborateurs ont mis en évidence ARM-1 à partir d'une banque d'ADNc issus d'un lymphome LB (lymphome murin de cellules T) (Simins *et al.*, 1999). Les cellules LB sont fortement métastatiques et sont capables, lorsqu'elles sont injectées en sous-cutané ou en intraveineuse, de former des tumeurs secondaires dans la plupart des organes lymphoïdes, mais également dans des sites non lymphoïdes incluant le foie, le poumon et le rein (Gosslar *et al.*, 1996). Pour identifier les récepteurs cellulaires promouvant l'adhésion de ces cellules tumorales à l'endothélium, Simins et collaborateurs ont réalisé une banque d'ADNc issus du lymphome LB et ont recherché les clones induisant une adhésion cellulaire. Ils ont ainsi mis en évidence l'ADNc d'une molécule qu'ils ont nommée ARM-1 pour «Adhesion Regulating Molecule 1».

B- Etude de sa séquence protéique

ARM-1 est une protéine de 407 acides aminés avec une masse prédite de 42 kDa. Sa séquence est présentée en annexe 1. Des protéines homologues à ARM-1 sont présentes dans

d'autres organismes eucaryotes. Le pourcentage d'identité entre ces protéines est important (table 10). L'alignement multiple des séquences protéiques d'ARM-1 et de ses homologues montre également une forte conservation entre les espèces (figure 25). Cependant, au sein d'une même espèce, aucune homologie significative avec d'autres protéines n'a pu être observée. Il semble donc que ces protéines appartiennent à une nouvelle famille de molécules dont la fonction reste obscure.

Table 10 : protéines homologues à ARM-1.

Espèce	Numéro d'accès	Longueur	Pourcentage d'identité
Rat	Q9JMB5	407 aa	98,8
Homme	Q16186	407 aa	96,3
Poulet	Q98SH3	406 aa	88,7
Xénope	Q9PVQ2	404 aa	86,0
Drosophile	Q9V6V7	389 aa	36,6
Arabidopsis	O48726	300 aa	27,3
<i>C. elegans</i> (ver)	Q09289	374 aa	25,4
<i>S. pombe</i> (levure)	Q9USM1	388 aa	15,7
<i>D. discoideum</i> (amibe)	Q8T1K5	287 aa	14,6

Par sa séquence protéique, ARM-1 a été décrite comme une protéine transmembranaire (Simins *et al.*, 1999), de même pour son homologue humain (Shimada *et al.*, 1994). Aucun élément dans sa séquence ne permet de l'affirmer.

Nous avons observé pour cela :

- le graphique d'hydrophobicité d'ARM-1 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)
et
- son tracé HCA (« Hydrophobic Cluster Analysis ») (<http://smi.snv.jussieu.fr/hca/hca-form.html>).

La méthode HCA (littéralement « Analyse des Amas Hydrophobes ») est apparue en 1987 : c'est une méthode de prédiction de structures secondaires dont le principe repose sur les fondements du repliement protéique (Gaboriaud *et al.*, 1987).

Le tracé HCA (figure 26) et le graphique d'hydrophobicité (figure 27) d'ARM-1 ne révèlent aucun amas hydrophobe caractéristique d'un fragment transmembranaire.

Figure 25 : Alignement multiple des séquences protéiques d'ARM-1 et de ses homologues.

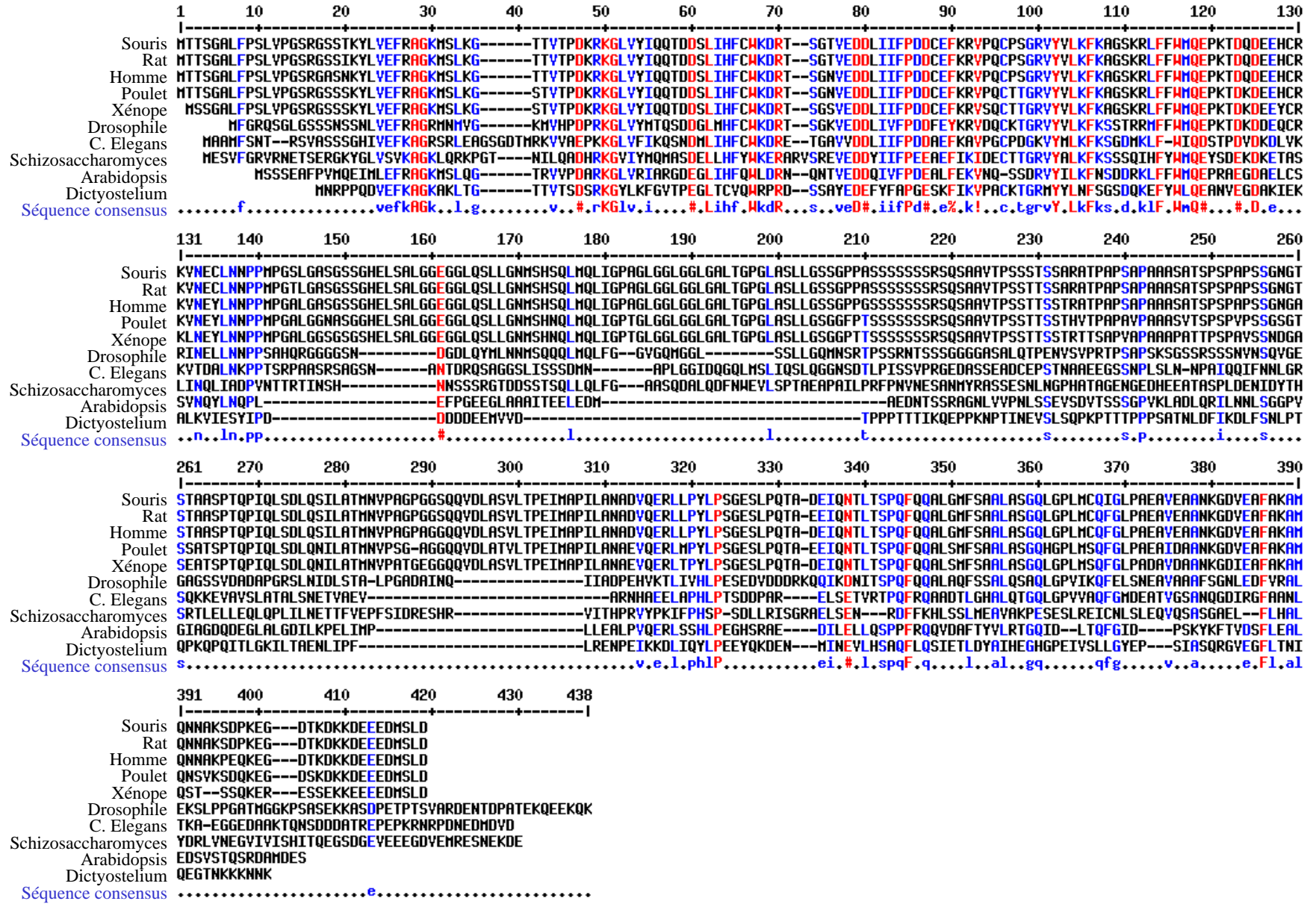


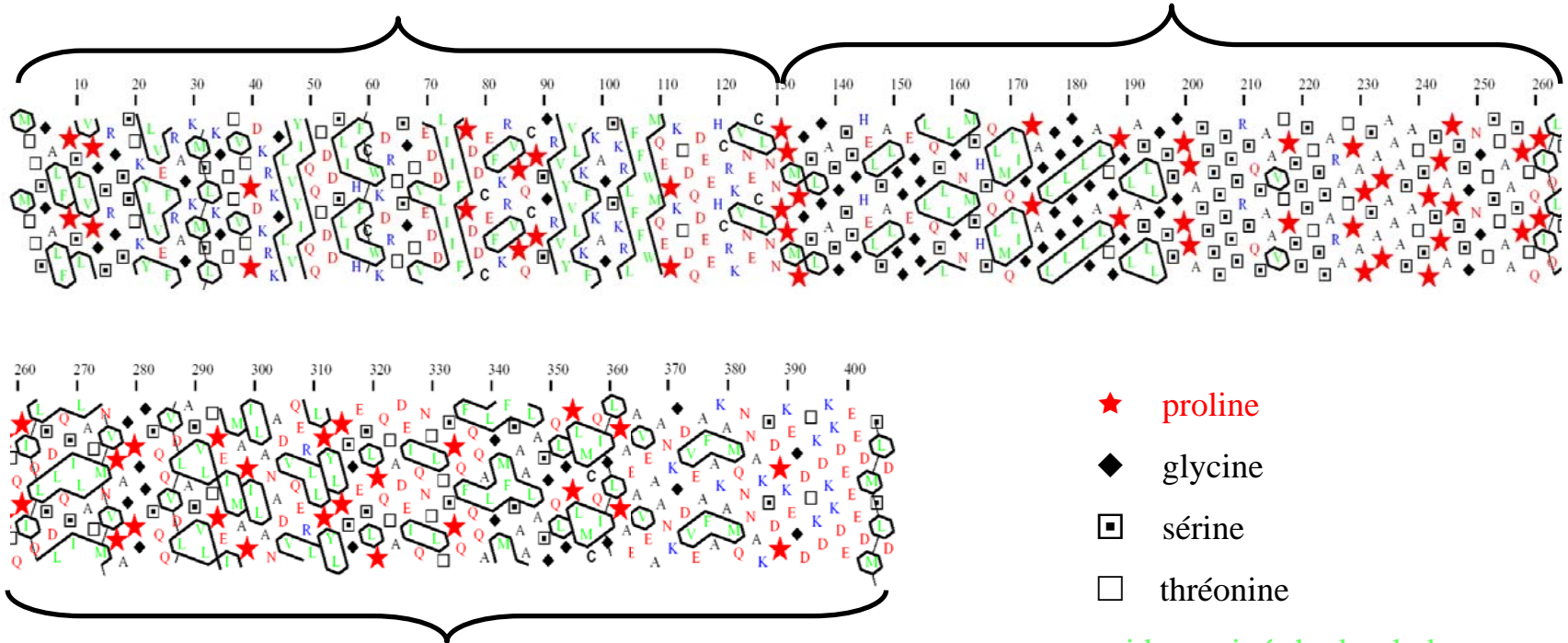
Figure 26 : tracé HCA d'ARM-1. Prédiction de structures secondaires.
<http://smi.snv.jussieu.fr/hca/hca-form.html>.

Domaine N-terminal (aa 1 à 130) :

- feuillets β
- plutôt basique

Domaine central (aa 131 à 260) :

- peu structuré
- nombreux sites potentiels de glycosylation
- plutôt basique



Domaine C-terminal (aa 261 à 407) :

- hélices α
- plutôt acide

★ proline

◆ glycine

■ sérine

□ thréonine

acides aminés hydrophobes

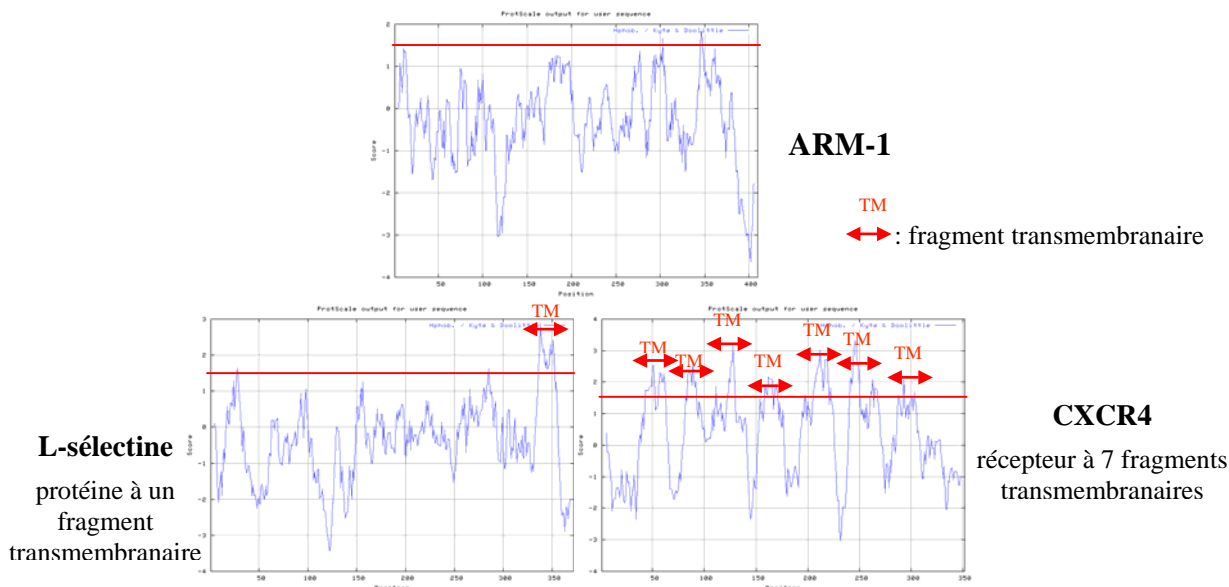


Figure 27 : représentation des profils d'hydrophobicité de différentes protéines (selon la méthode de Kyte et Doolittle) <http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>.

D'autre part, un peptide signal semble présent dans la séquence d'ARM-1. Il impliquerait les dix-sept premiers acides aminés (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La prédiction lui attribue cependant une valeur intermédiaire, c'est pourquoi ce peptide signal reste potentiel.

Le tracé HCA et différentes analyses bioinformatiques (disponibles sur le site d'Infobiogen, <http://www.infobiogen.fr/deambulom>) nous ont permis de faire quelques prédictions quant à l'organisation structurale potentielle d'ARM-1. Cette étude a été réalisée grâce à la participation de Christelle Breton (CNRS, Cermav, Grenoble). ARM-1 semble constituée de 3 domaines de taille équivalente (figure 26) :

1/ le domaine N-terminal semble assez bien structuré (prédictions de feuillets β) et s'étend des acides aminés 1 à 130. Ce domaine apparaît plutôt basique.

2/ le domaine central (aa 131 à 260) apparaît comme une région peu structurée, plutôt basique. Il peut être subdivisé en deux parties :

- la partie contenant les acides aminés 131 à 190 est riche en leucine et glycine. Elle apparaît comme la partie la plus structurée du domaine central avec des prédictions d'hélices α ,

- la partie contenant les acides aminés 191 à 260 ne présente aucune structure. Elle est riche en sérine/thréonine et proline/alanine, avec notamment une séquence de poly-sérine entre les acides aminés 203 et 213.

On observe également dans cette région centrale deux sites potentiels de N-glycosylation (position N162 et N250) et de nombreux sites potentiels de O-glycosylation (acides aminés 200 à 260) (figure 28).

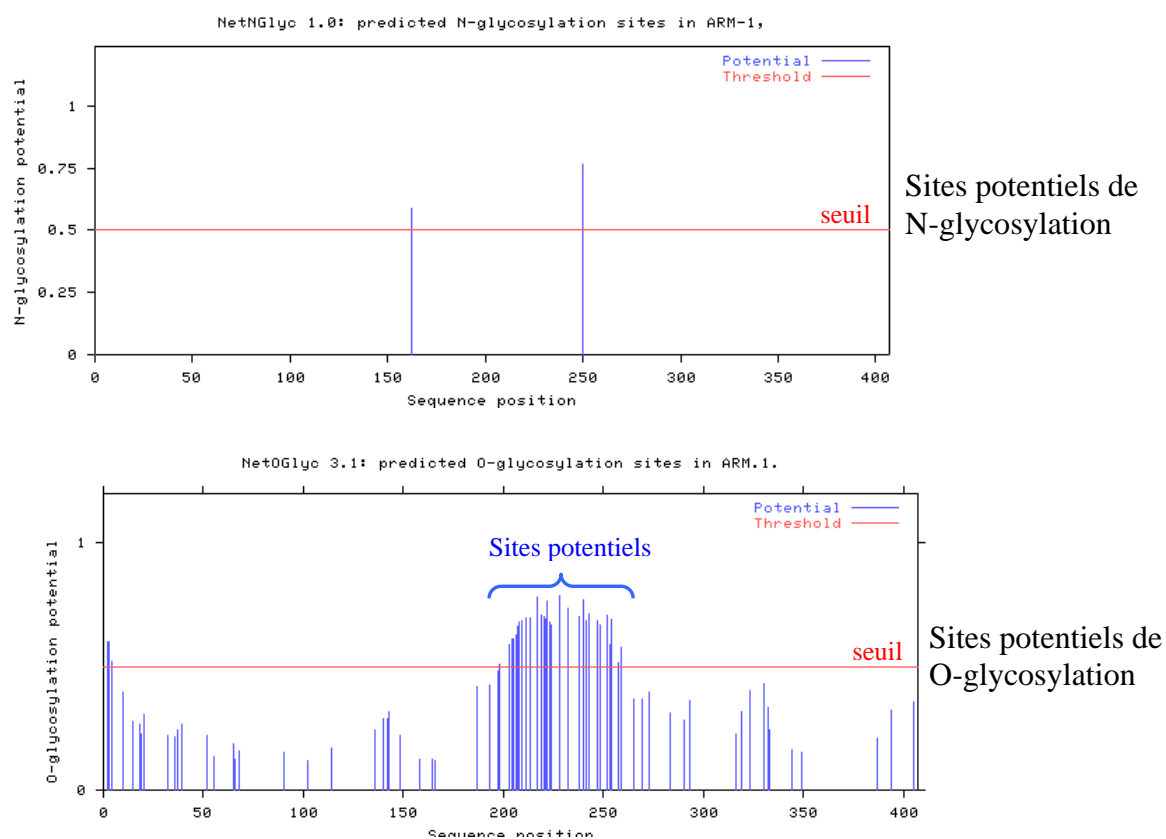


Figure 28 : sites potentiels de glycosylation d'ARM-1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>).

Ce domaine central semble être un domaine de liaison reliant les domaines N- et C-terminaux d'ARM-1. Dans les protéines homologues, cette région apparaît la plus variable, non seulement dans sa composition en acides aminés mais également en terme longueur.

3/ le domaine C-terminal semble un domaine assez bien structuré (prédictions d'hélices α) qui s'étend des acides aminés 261 à 407. Ce domaine apparaît plutôt acide.

Remarque : les prédictions de structures secondaires (hélice α , feuillet β) ont été réalisées à partir de la méthode JPred (<http://circinus.ebi.ac.uk:8081/>).

C- Fonctions d'ARM-1

Simins et collaborateurs ont montré que la surexpression d'ARM-1 dans des cellules embryonnaires humaines de rein (cellules 293T) augmentait de façon significative leur adhésion sur différentes lignées de cellules endothéliales (Simins *et al.*, 1999). D'autre part, des expériences de « northern blot » sur des lignées cancéreuses mammaires ont révélé des niveaux d'ARNm d'ARM-1 trois à cinq fois plus élevés dans les cellules métastatiques comparativement à celles non métastatiques. ARM-1 semble donc impliquée dans la régulation de l'adhésion cellulaire. Ceci est d'autant plus intéressant qu'ARM-1 n'appartient à aucune famille connue de molécules d'adhésion.

Concernant les protéines homologues :

- **l'homologue humain**, nommé **Mr110000**, a été identifié sur des cellules de carcinome gastrique suite à la réaction croisée de deux anticorps initialement dirigés contre des protéines de la famille des CEA (« carcinoembryonic antigen ») (Shimada *et al.*, 1991). Le CEA, glycoprotéine oncofoetale exprimée à la surface cellulaire ou sécrétée, est un marqueur tumoral très important dans les carcinomes. Il appartient à la superfamille des immunoglobulines et est exprimé sous différentes formes présentant des niveaux de glycosylation très hétérogènes. Le CEA intervient notamment dans les interactions cellulaires homo- ou hétérophylques. Dans l'étude de Shimada, Mr110000 était exprimée constitutivement par six des huit lignées cellulaires humaines de carcinome gastrique testées. Cette protéine est exprimée à la surface des cellules gastriques et son niveau d'expression y est fortement augmenté à la suite du traitement des cellules par l'interféron γ (Shimada *et al.*, 1991; Shimada *et al.*, 1994). Contrairement aux autres membres de la famille des CEA, l'expression en surface de Mr110000 n'est pas affectée par un traitement à la phospholipase C (PI-PLC) suggérant un autre type d'ancrage. Il semblerait que l'antigène Mr110000 représente une molécule particulière, présente dans les cellules de carcinome humain avec un très fort taux de glycosylation : en effet, en « western blot », cette protéine apparaît avec une masse moléculaire de 110 kDa, masse fortement supérieure à celle prédite de 42 kDa. Malgré la réaction croisée des anticorps reconnaissant les protéines CEA, Mr110000 ne présente aucune homologie avec les autres membres de la famille des CEA.

- **l'homologue chez le xénope**, nommé **Xoom**, a été identifié par la méthode du « differential display » dans l'embryon de xénope, suite à un traitement au lithium. Le rôle de Xoom a essentiellement été étudié au niveau du développement de l'embryon. Xoom semble participer au phénomène de gastrulation. Cette protéine se présente sous deux formes : une forme de 45 kDa, cytoplasmique et une forme de 44 kDa, associée à la membrane (Hasegawa *et al.*, 2001). Les deux formes de Xoom ont été détectées de façon ubiquitaire du stade de l'œuf non fertilisé à celui du tadpole, avec cependant un pic d'expression durant les stades de la blastula et de la gastrula. L'injection d'anticorps anti-Xoom dans un embryon au stade de 2 cellules ou au stade 7 de la blastula provoque des défauts de gastrulation d'une manière dose dépendante. De même, l'injection d'ARN messagers antisens Xoom provoque des défauts de gastrulation par une inhibition du mouvement épibolique, ceci du fait d'une désorganisation de l'actine F (Hasegawa et Kinoshita, 2000).

Concernant les autres protéines homologues à ARM-1, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée.

L'ensemble de ces éléments nous apporte différentes indications :

- aucun élément dans la séquence protéique d'ARM-1 n'indique de fragment transmembranaire mais plusieurs études, concernant ARM-1 ou ses homologues, montrent une expression de ces protéines à la surface cellulaire. ARM-1 est probablement une molécule associée à la membrane.
- ARM-1 joue très certainement un rôle dans l'adhésion cellulaire, comme l'ont montré les expériences de Simins et collaborateurs. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'ARM-1 est surexprimée dans des cellules métastatiques comparativement à des cellules non métastatiques.

La méthode du « differential display » nous a permis de mettre en évidence la présence de la protéine ARM-1 au sein des cellules endothéliales (CE). Nous avons étudié l'expression de cette protéine au sein des différentes lignées de CE dont nous disposions au laboratoire et dans différentes lignées lymphocytaires. Le rôle d'ARM-1 dans l'adhésion cellulaire a été examiné au niveau des CE, ainsi que sa localisation et la nature de ses glycosylations éventuelles. L'ensemble de ces résultats ont donné lieu à un article soumis à publication dans le journal « European Journal of Biochemistry : the FEBS Journal » (page 96).

I- Matériels et méthodes

Les techniques utilisées pour la réalisation de ces études sont décrites dans l'article. Seuls la construction des vecteurs d'expression et le tri par cytométrie en flux des cellules HSkMEC transfectées seront développés dans cette partie.

A- Les vecteurs d'expression utilisés

Trois vecteurs d'expression ont été utilisés (figure 29 et 30). Le détail des constructions est donné dans l'annexe 2.

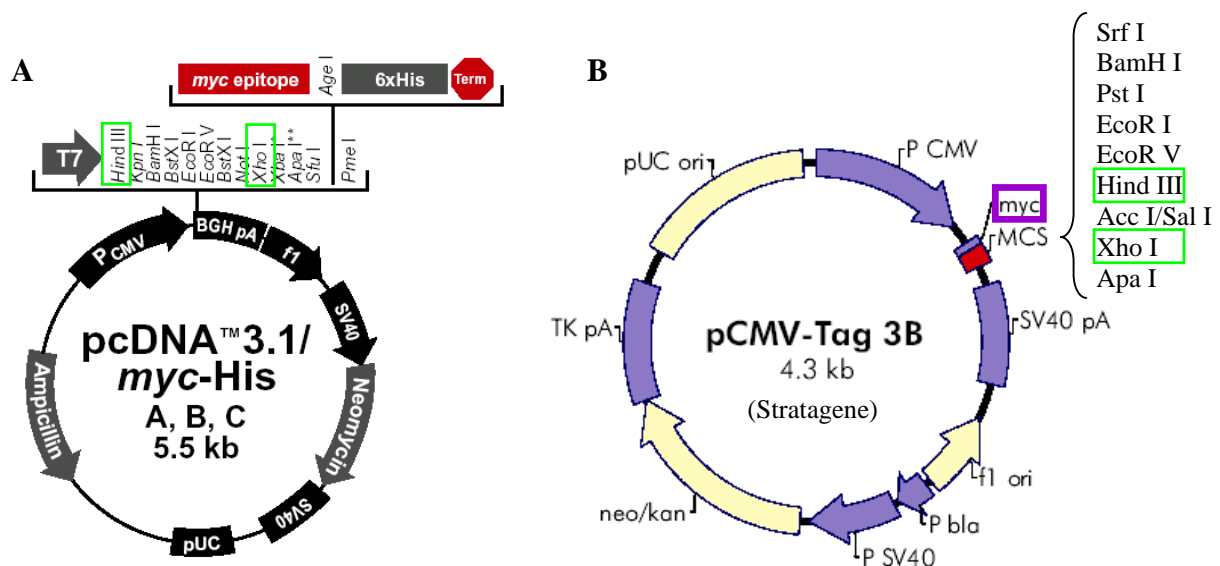


Figure 29 : plasmides permettant l'expression d'ARM-1 avec un épitope Myc en C-terminal (A) ou en N-terminal (B). (: sites de restriction utilisés pour insérer l'ADNc d'ARM-1).

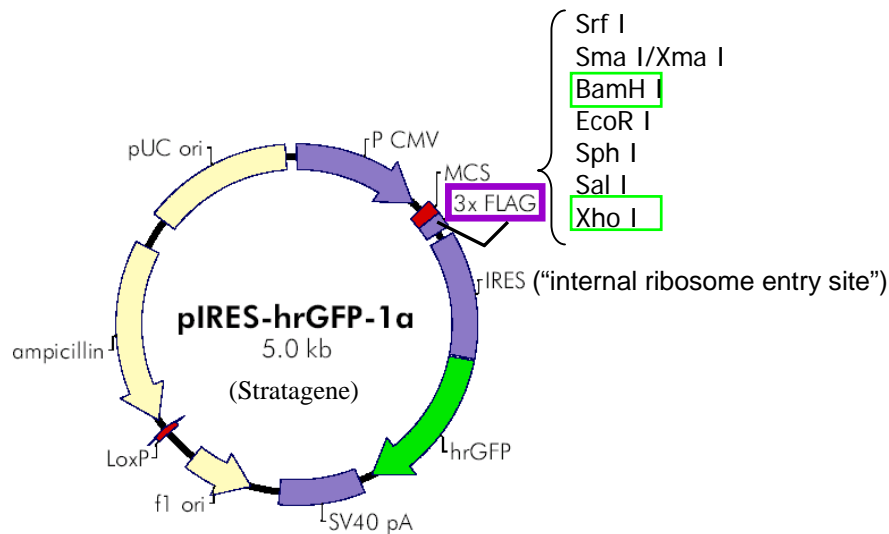


Figure 30 : plasmide permettant la coexpression d'ARM-1 avec la protéine hrGFP (□ : sites de restriction utilisés pour insérer l'ADNc d'ARM-1).

Ces différentes constructions nous ont permis d'exprimer la protéine ARM-1 dans des cellules eucaryotes, avec :

- un épitope Myc en C-terminal (pcDNA3.1) ou en N-terminal (pCMV Tag3B) (figure 29). Ces plasmides ont été utilisés pour l'étude de la localisation d'ARM-1. Le plasmide pcDNA3.1-ARM-1 (comportant la séquence entière d'ARM-1, annexe 2) a également été utilisé pour transfecter de façon transitoire des cellules COS, sur lesquelles ont ensuite été réalisées des expériences d'adhésion. Le taux de transfection des cellules COS avec ce plasmide a atteint 25 à 30%.
- un épitope 3xFLAG en C-terminal (figure 30). Le vecteur d'expression pIRES-hrGFP-1a permet la co-expression de la protéine d'intérêt avec la protéine hrGFP (« humanized recombinant GFP ») : les ADNc des deux protéines sont présents sur un même transcrit mais les protéines ne sont pas exprimées en fusion. Ce plasmide a été utilisé pour transfecter des cellules endothéliales de peau : par la suite, ces cellules ont pu être triées par cytométrie en flux grâce à l'expression de la GFP.

B- Tri par cytométrie en flux des cellules endothéliales de peau transfectées, exprimant ARM-1

Les cellules endothéliales de peau (HskMEC), qui n'expriment pas ARM-1, ont été transfectées par le plasmide pIRES-hrGFP-ARM-1, contenant la séquence entière d'ARM-1 (annexe 2). Des lipides cationiques ont été utilisés comme agent de transfection (réactif « Lipofectin » d'Invitrogen). L'efficacité de celle-ci a été mesurée par cytométrie en flux en observant le pourcentage de cellules exprimant la GFP (donc exprimant ARM-1) : celui-ci atteignait généralement 8 à 10 % (figure 31). Avant de réaliser des expériences d'adhésion sur ces cellules ainsi transfectées, nous avons voulu dans un premier temps enrichir la population de cellules HskMEC exprimant ARM-1. En utilisant un cytomètre trieur de cellules (FACS Diva, Becton Dickinson), nous avons pu séparer la population de cellules transfectées (exprimant la GFP et ARM-1) de celle non transfectée (n'exprimant ni la GFP, ni ARM-1) (figure 31).

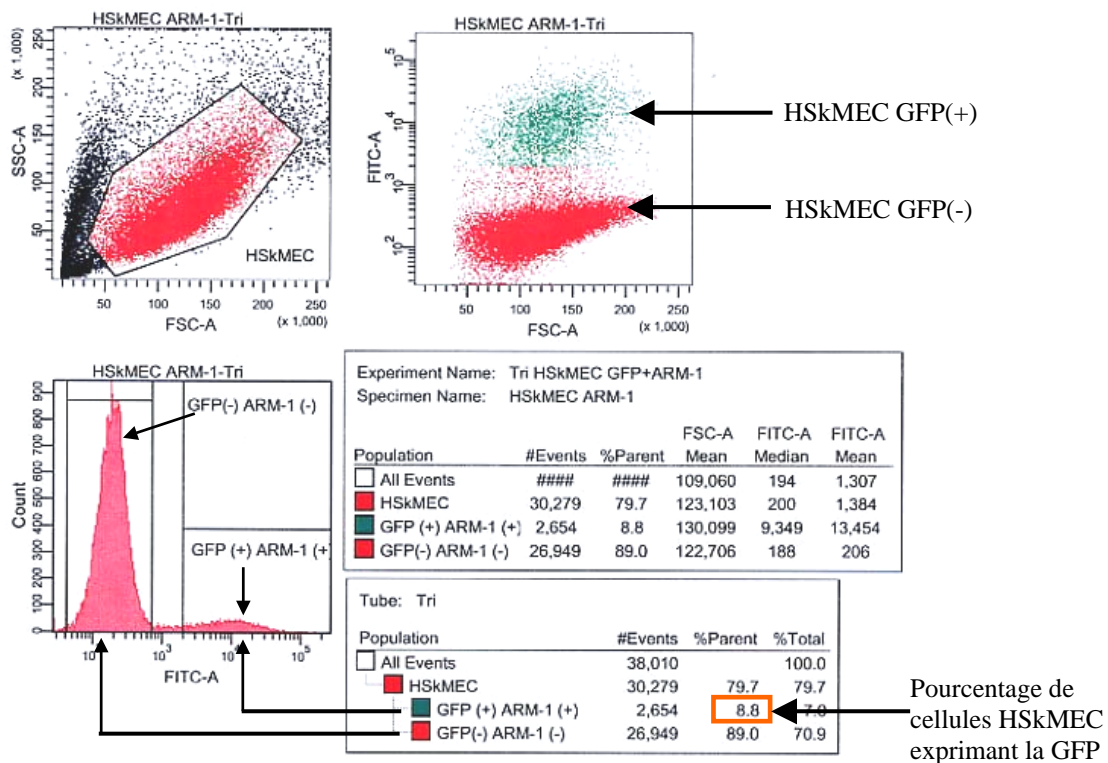


Figure 31 : profils de cytométrie des cellules HskMEC transfectées par le vecteur pIRES-hrGFP-ARM-1 (avant le tri).

Une population de cellules non transfectées et trois populations de cellules transfectées ont été triées à partir d'une transfection transitoire de cellules HskMEC, selon les critères décrits

dans la figure 31. Les populations triées ont été remises en culture pendant quatre semaines afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour réaliser les expériences d'adhésion décrites dans l'article. Bien qu'ayant été triées, les cellules transfectées n'ont pas maintenu de façon stable l'expression d'ARM-1 et de la GFP : au cours du temps, nous avons observé une diminution du pourcentage de cellules transfectées. Les expériences d'adhésion ont été réalisées sur une population de cellules HSkMEC non transfectées (triées) et sur trois populations de cellules HSkMEC transfectées (triées). Ces dernières présentaient des pourcentages différents de cellules exprimant ARM-1 (et la GFP) (figure 32).

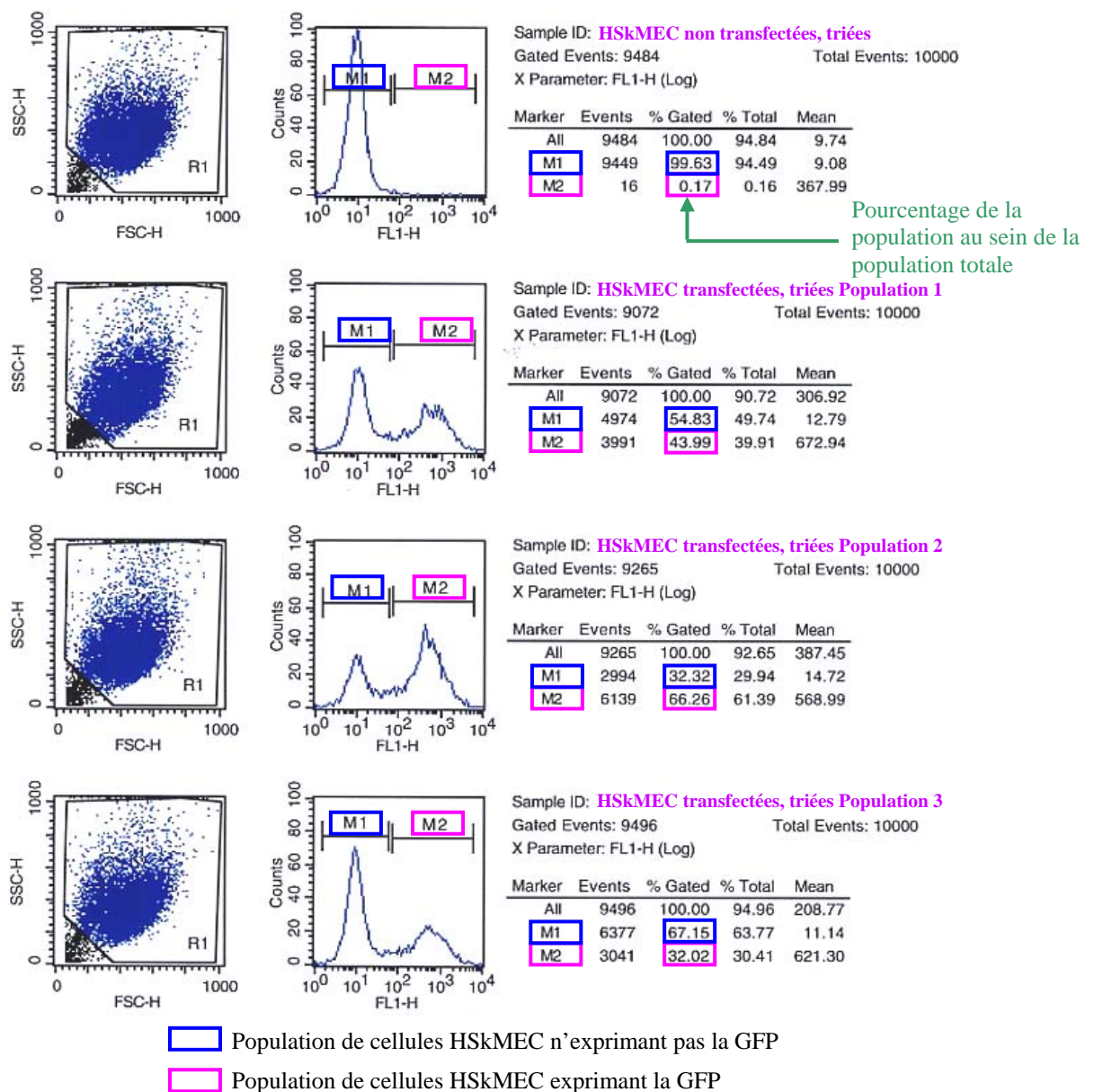


Figure 32 : profils de cytométrie des différentes populations de cellules HSkMEC utilisées pour les expériences d'adhésion cellulaire (quatre semaines après le tri).

La population 1 de HSkMEC transfectées présentait 44 % de cellules GFP(+) ARM-1(+), la population 2, 66 % et la population 3, 32%. La présence d'ARM-1 sur les différentes populations de cellules HSkMEC triées a été vérifiée par un immuno-marquage à l'aide d'un anticorps anti-Flag révélé par un anticorps secondaire couplé au TRITC. Deux exemples de ces marquages sont donnés sur la figure 33.

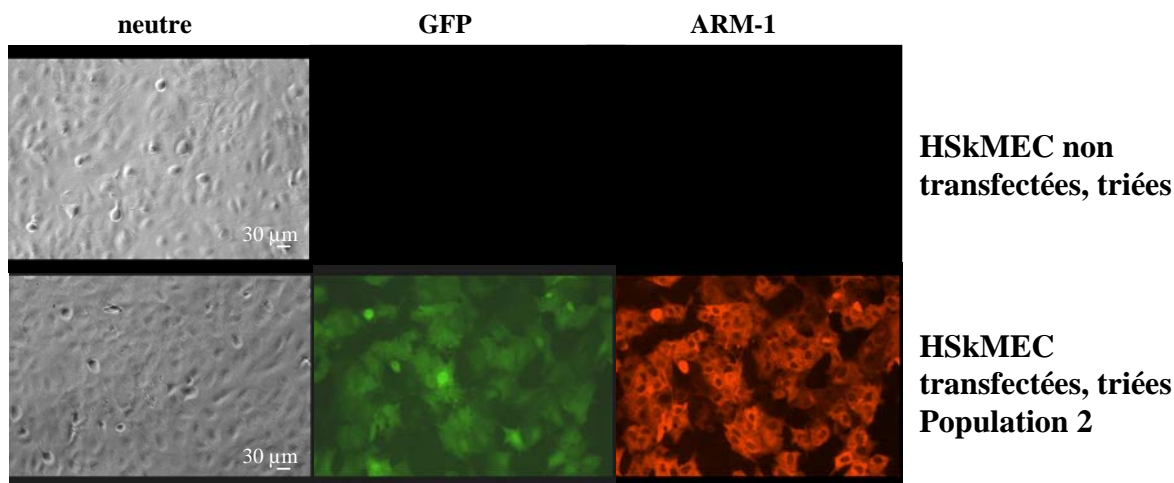


Figure 33 : marquage des cellules HSkMEC, transfectées ou non par le vecteur pIRES-hrGFP-ARM-1, utilisant des anticorps anti-FLAG.

II- Résultats

Les différentes études que nous avons menées sur la protéine ARM-1 sont présentées dans l'article soumis à publication, intitulé « Adhesion properties of ARM-1 protein on endothelial cells » (page 96).

Résumé des résultats décrits dans l'article :

- ARM-1 est différemment exprimée suivant l'origine tissulaire des cellules endothéliales (figure 1*). ARM-1 est absente de la lignée endothéliale de peau HSkMEC. Cette observation a été confirmée sur des cellules primaires (figure 2A*). ARM-1 présente également un profil d'expression très spécifique sur les différentes lignées de lymphocytes testées (figure 2B*).

* les N° de figures correspondent aux N° se trouvant dans l'article

- La lignée HSkMEC montre une faible capacité à promouvoir l'adhésion de lymphocytes T activés CEMT4 (figure 3*). ARM-1 ayant été décrite comme une molécule régulant l'adhésion, nous avons émis l'hypothèse d'un lien possible entre la faible capacité d'adhésion de ces cellules et l'absence d'expression d'ARM-1.
- ARM-1, exprimée dans les cellules endothéliales de peau, apparaît avec une masse moléculaire proche de 50 kDa, soit légèrement supérieure à sa masse prédite de 42 kDa (figure 4*).
- La surexpression d'ARM-1 dans des cellules COS induit une augmentation de l'adhésion de lymphocytes CEMT4 (figure 5*).
- La surexpression d'ARM-1 dans les cellules HSkMEC induit une augmentation significative de l'adhésion des cellules NKL1 (figure 6C*), une augmentation plus modérée des cellules CEMT4 (figure 6B*) et aucune modification de l'adhésion des cellules NKL2 (figure 6D*). Les cellules NKL-1 expriment constitutivement ARM-1, contrairement aux cellules CEMT4 et NKL-2 (figure 2B*). Ces observations tendent à suggérer une action d'ARM-1 dans l'adhésion cellulaire par un mécanisme d'interaction homotypique.
- Pour élucider la voie empruntée par ARM-1 pour réguler l'adhésion, nous avons étudié la localisation cellulaire de cette protéine. Une étude de fractionnement cellulaire a révélé la présence d'ARM-1 dans les fractions membranaire et cytosolique (figure 7B*). Cette localisation cellulaire a été confirmée par des études en microscopie : ARM-1 est fortement exprimée au niveau du cytosol (figure 8B*), avec parfois une expression préférentielle en dessous de la membrane plasmique (figure 8C*). Cependant, aucune expression d'ARM-1 n'a pu être mise en évidence à la surface cellulaire (figure 8D*). Il semble donc qu'ARM-1 puisse être associée à la membrane plasmique. ARM-1 a également été observée comme une protéine pouvant être sécrétée (figure 7A*).

* les N° de figures correspondent aux N° se trouvant dans l'article

- ARM-1 possède dans sa séquence deux sites potentiels de N-glycosylation et de nombreux sites potentiels de O-glycosylation. Différentes études visant à élucider la nature de ces éventuelles modifications post-traductionnelles nous ont permis de conclure sur une probable absence de N-glycosylation (figure 9A et 9B*). Il semblerait également qu'ARM-1 ne présente pas de structures complexes de O-glycane.

* les N° de figures correspondent aux N° se trouvant dans l'article

Adhesion properties of ARM-1 protein on endothelial cells

Nathalie Lamerant and Claudine Kieda¹

Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301 Rue Charles Sadron 45071 Orléans
Cedex 02 France

Tel/Fax. : 00-332-38-25-55-61

E-mail : lamerant@cnrs-orleans.fr

Running title : ARM-1 expression in endothelial cells

Keywords : ARM-1, endothelium, organo-specificity, cell adhesion

¹ To whom correspondence should be addressed (kieda@cnrs-orleans.fr, Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301 Rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 02 France Tel/Fax. : 00-332-38-25-55-61)

Summary

Numerous adhesion molecules have been already described and the molecular mechanisms of the lymphocyte trafficking specificity across endothelium start to be elucidated. Identify the molecules involved in the organo-selectivity of this process would give keys to target drug therapy in specific tissues.

ARM-1 is an adhesion regulating molecule previously identified on T cell lymphoma. It does not belong to any known families of adhesion molecules. In this study, we showed the presence of ARM-1 in endothelial cells, the lymphocytes adhesion partners. ARM-1 mRNA was found to be differentially expressed among endothelial cell lines from various tissue origins and lymphocyte cell lines. Interestingly, ARM-1 is absent from the skin endothelial cells. In our assay, skin endothelial cells display a distinct capacity to mediate adhesion of activated T lymphocytes. Overexpression of ARM-1 in skin endothelial cells increased adhesion of CEMT4 and NK lymphocytes, proving that ARM-1 also regulates adhesion in endothelial cells. We also showed that ARM-1 was a cytosolic protein that can be associated to the plasma membrane. However, no cell surface expression of the protein was observed. These results suggest an indirect role of ARM-1 in adhesion rather than a direct role as an adhesion molecule by itself.

Introduction

In order to fight infection, lymphocytes must continuously circulate through the body in order to maximize the opportunity to recognize their cognate antigen. So they circulate from the blood into tissues. Unlike naive cells which circulate through secondary lymphoid organs (e.g., spleen, lymph nodes and Peyer's patches), activated lymphocytes also circulate in non lymphoid tissues and show a remarkable selectivity in their homing [1-3]. Homing is a highly regulated and tissue-specific mechanism. A multistep model has been proposed for this process [4, 5] and numerous adhesion molecules implied in this cascade have been identified, such as selectins, integrins and more recently, chemokines [6-8]. The molecular mechanisms behind the selectivity start to be characterized. Chemokines differential expression probably play a key role in this selectivity [9-12] but our hypothesis is the existence of additional adhesion molecules involved in the very first steps of the cascade and allowing the specificity of the recognition between lymphocytes and endothelial cells.

As a tool to access to the molecular basis of endothelium selectivity, microvascular endothelial cell lines of distinct tissue origin were established [13-15]. Endothelial cells (EC) isolated from lymphoid tissues (lymph nodes and appendix) and from non-lymphoid immune sites were immortalized. Their general endothelial characteristics, such as the presence of von Willebrand factor (vWF), angiotensin-converting enzyme (ACE), VE-cadherin and the intracellular E-selectin, were preserved. These cell lines display phenotypic characteristics related to their tissue origin [15].

Previously, we showed the existence of surface glycoconjugated receptors (endogenous lectins) on lymphoid organ-derived endothelial cells [13], different from selectins and promoting lymphoid cell adhesion [14]. These lectins were studied cytochemically using neoglycoproteins and it was shown that the specificity of sugar receptors depends upon endothelial cell origin. These studies demonstrated a real specificity of the high endothelial cells (HEC) according to their tissue origin.

Consequently, to better characterize the molecules responsible for the EC specificity, we have used the differential display method [16] to compare genes expression between two endothelial cell lines from lymphoid organs, more precisely peripheral lymph nodes (PLNHEC) as compared to mucosal (Peyer's patches) tissues (PPHEC). By this way, we highlighted the ARM-1 protein, an adhesion-regulating molecule previously identified on T cell lymphoma [17]. We found ARM-1 as a protein widely expressed among endothelial cells

from various tissue origins except from the skin. This was interesting as skin endothelial cells, in our assay, showed a weak capacity to mediate adhesion of activated T lymphocytes (CEMT4 cells). ARM-1 was also found differentially expressed in various lymphocyte cell lines, independently of their T or B lineage. In the present study, we also attempted to elucidate the role of ARM-1 in the lymphocyte homing mechanism. We found that ARM-1 was a secreted, probably not glycosylated protein, which could be associated to the cell membrane. We also showed that ARM-1 overexpression in skin endothelial cells increased lymphocytes adhesion.

Results

Differential expression of ARM-1, analyzed by semi-quantitative RT-PCR

To identify new molecules responsible for EC specificity, differential display method was used to compare two immortalized endothelial cell lines. By this way, we highlighted the ARM-1 protein, an adhesion regulating molecule. This protein has no sequence homology with previously known families of adhesion molecules and was originally discovered on murine T cell lymphoma [17], whereas we identified ARM-1 on endothelial cells.

To study the ARM-1 mRNA expression on various endothelial and lymphocyte cell lines, semi-quantitative RT-PCR was used. The cDNA of interest was coamplified with an actin cDNA fragment as an internal control. ARM-1 is differentially expressed in endothelial cells from various organs according to their tissue origin (Fig. 1).

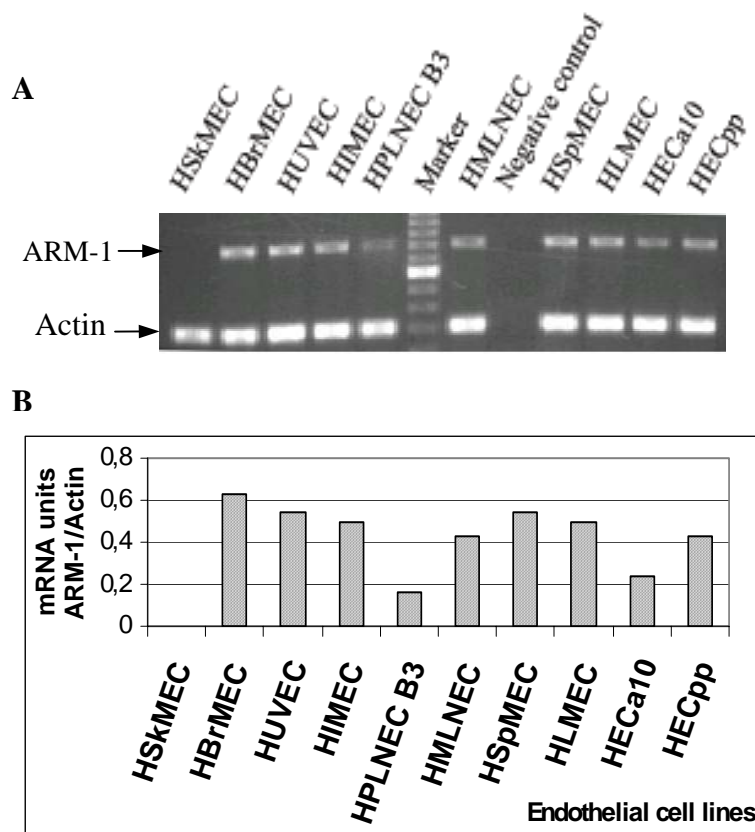


Fig. 1. Differential expression of ARM-1 mRNA in endothelial cell lines from various tissues, analyzed by semi-quantitative RT-PCR (HSkMEC : Human Skin Microvascular Endothelial Cells, HBrMEC : Human Brain Microvascular Endothelial Cells, HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HIMEC : Human Intestine Mucosal Endothelial Cells, HPLNEC B3 : Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells clone B3, HMLNEC : Human Mesenteric Lymph Nodes Endothelial Cells, HSpMEC : Human Spleen Microvascular Endothelial Cells, HLMEC : Human Lung Microvascular Endothelial Cells, HECa10 : Mouse peripheral lymph nodes High Endothelial Cells clone a10, HECpp : Mouse Peyer's patches High Endothelial Cells). ARM-1 cDNA was coamplified by RT-PCR with an actin cDNA fragment as an internal control. Reaction products were resolved on a 1% agarose gel (A) and quantified using the ImageQuant 5.1 program (Molecular Dynamics). The mRNA units represent signal intensity as assessed by densitometric analysis after normalization with actin (B).

We noticed the absence of ARM-1 mRNA in endothelial cells from skin (HskMEC). To confirm this result, primary endothelial cells from human skin were isolated as described previously [13]. No ARM-1 mRNA was detected in skin primary endothelial cells (Fig. 2A). The mRNA expression of ARM-1 was also studied in different mouse and human lymphocyte cell lines (Fig. 2B). The ARM-1 expression pattern was very different according to the cell line. It seems there is no linkage with T- or B-lineage of the cells as ARM-1 mRNA was present in the NKL1, EL4 and EL4-IL2 T cells and the Raw 8.1 B cells but neither in CEMT4 nor NKL2 T cells.

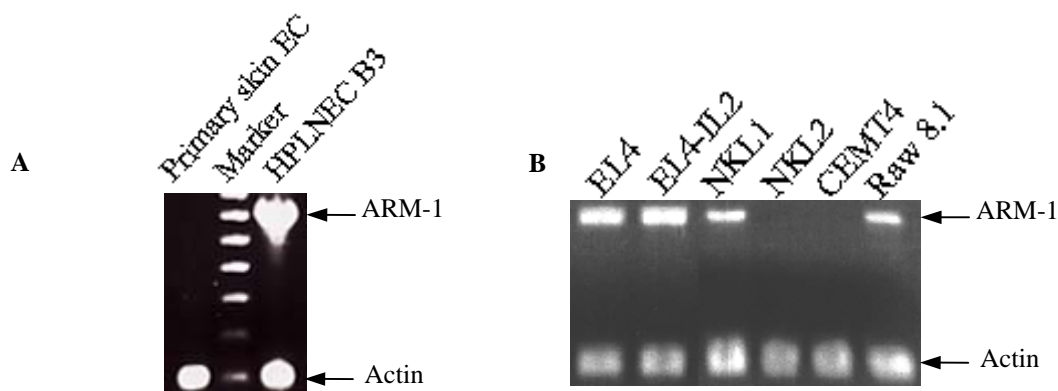


Fig. 2. ARM-1 mRNA expression in primary skin endothelial cells (A) and in various lymphocyte cell lines (B), analyzed by semi-quantitative RT-PCR. (A) HPLNEC B3 (Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells clone B3) was used as a positive control for the PCR amplification of ARM-1 in primary skin endothelial cells. (B) EL4 and EL4-IL2 are activated T lymphocytes, NKL1 and NKL2 are natural killer cells, CEMT4 are CD4+ T-cell line and Raw 8.1 are B lymphocytes.

The skin endothelial cells showed a weak capacity to mediate adhesion of CEMT4 lymphocyte cell line (Fig. 3). A correlation between the absence of ARM-1 in skin endothelial cells and their weak adhesion activity for CEMT4 lymphocytes could be suggested. When ARM-1 is overexpressed in 293T human embryonic kidney cells, it promotes 293T cells adhesion on endothelial cells [17]. At that point, we don't know if ARM-1 can play the same role in endothelial cells.

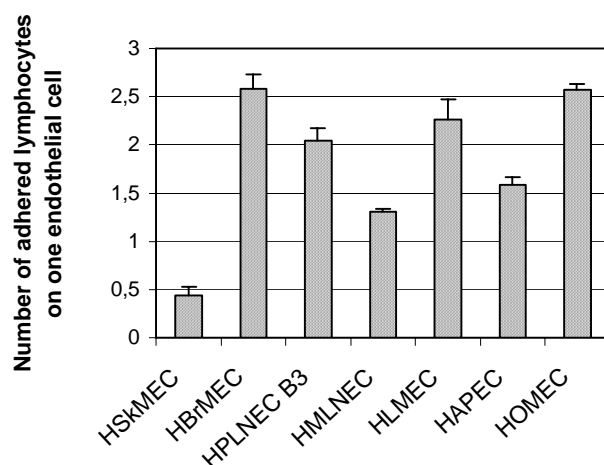


Fig. 3. Adhesion of CEMT4 lymphocytes on endothelial cell lines from various tissues (HSkMEC : Human Skin Microvascular Endothelial Cells, HBrMEC : Human Brain Microvascular Endothelial Cells, HPLNEC B3 : Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells clone B3, HMLNEC : Human Mesenteric Lymph Nodes Endothelial Cells, HLMEC : Human Lung Microvascular Endothelial Cells, HAPEC : Human Appendix Endothelial Cells, HOMECEC : Human Ovary Microvascular Endothelial Cells). CEMT4 lymphocytes adhesion on endothelial cells was analyzed after a 20 minutes incubation at room temperature with a 5/1 lymphocytes/endothelial cells ratio. Lymphocytes adhesion was determined as described in materials and methods. Values represent the average of triplicate measurements.

ARM-1 promotes lymphocyte adhesion

The potential role of ARM-1 in lymphocyte adhesion was studied by comparing adhesion properties of ARM-1 non-expressing cells before and after transfection by the ARM-1 cDNA. The assays were done with transiently transfected COS cells, which do not possess the mRNA for ARM-1 (data not shown) and transfected HSkMEC after sorting by flow cytometry. The adhesion assays were quantified by flow cytometry analysis.

Western blot analysis of COS and HSkMEC cells transiently transfected with the pcDNA-ARM-1 and the pIRES-hrGFP-ARM-1 vectors respectively, showed a single protein band around 50 kDa (Fig. 4) which is comparable to the size of 54 kDa reported by Simins *et al.*. Just below this band, another weaker protein band was observed which could correspond to the 42 kDa predicted size of ARM-1 protein prior post-translational modifications.

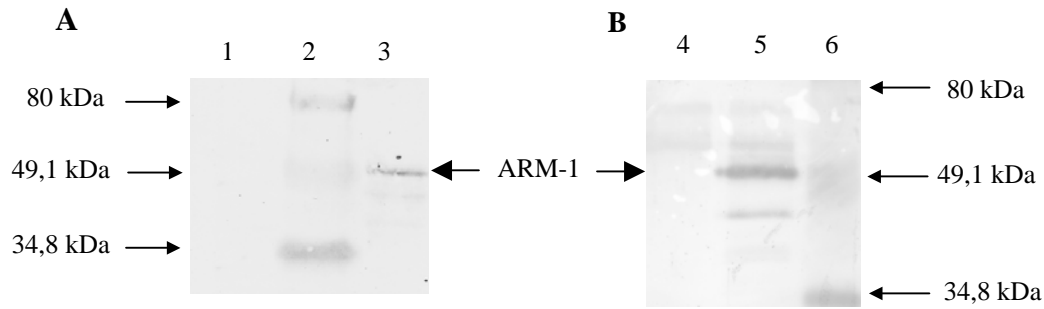


Fig. 4. Expression of ARM-1 protein in transfected COS and skin endothelial cells. A) transfected COS cells. B) transfected skin endothelial cells. COS cells (lane 3) and skin endothelial cells (lane 5) were transfected by the pIRES-hrGFP-ARM-1 vector. As negative control, COS cells (lane 1) and skin endothelial cells (lane 4) were transfected by the empty vector. ARM-1 was immunoprecipitated 48 hours after transfection and detected by Western blotting using anti-Flag antibodies and the Western blue[®] stabilized substrate for alkaline phosphatase (Promega). Size marker is represented on lanes 2 and 6.

Static adhesion assays on transiently transfected COS cells were realized under various conditions of temperature, incubation time and lymphocyte/adherent cells ratio. Results are shown in figure 5. Whatever conditions, we observed an increase of the CEMT4 lymphocyte adhesion on transfected COS cells. The largest relative increase was obtained after a 40 minutes incubation between lymphocytes and transfected COS cells (10/1 ratio) at 4°C.

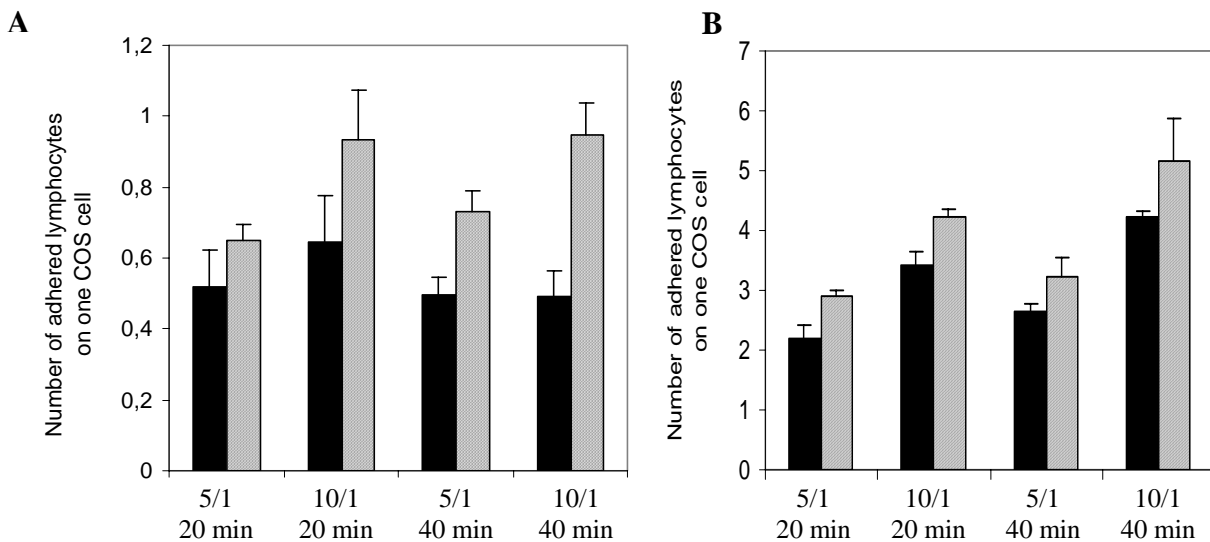


Fig. 5. CEMT4 lymphocytes adhesion induced by ARM-1 overexpression in COS cells. COS cells were transiently transfected with the pcDNA-ARM-1 vector (hatched bars) or with the pcDNA3.1/Myc-His empty vector (filled bars). CEMT4 lymphocytes adhesion on transfected COS cells was analyzed at 4°C (A) or 37°C (B) with two different lymphocytes/COS cell ratios (5/1 or 10/1) and two different incubation times (20 or 40 minutes). Lymphocytes adhesion was determined as described in materials and methods, 48 hours after transfection. Values represent the average of triplicate measurements.

The adhesion increase obtained at 37°C is not so large as compared to mocks transfected COS cells which are more efficiently binding CEMT4 than at 4°C. Indeed, at 37°C, various adhesion molecules are induced, thus elevating the background level.

After transfection of skin endothelial cells with the pIRES-hrGFP-ARM-1 vector, non transfected and transfected HSkMEC cells were sorted by FACS Diva cytometer (Becton Dickinson). Static adhesion assays with various lymphocyte cell lines were realized on the sorted skin endothelial cells populations. Results are shown in figure 6.

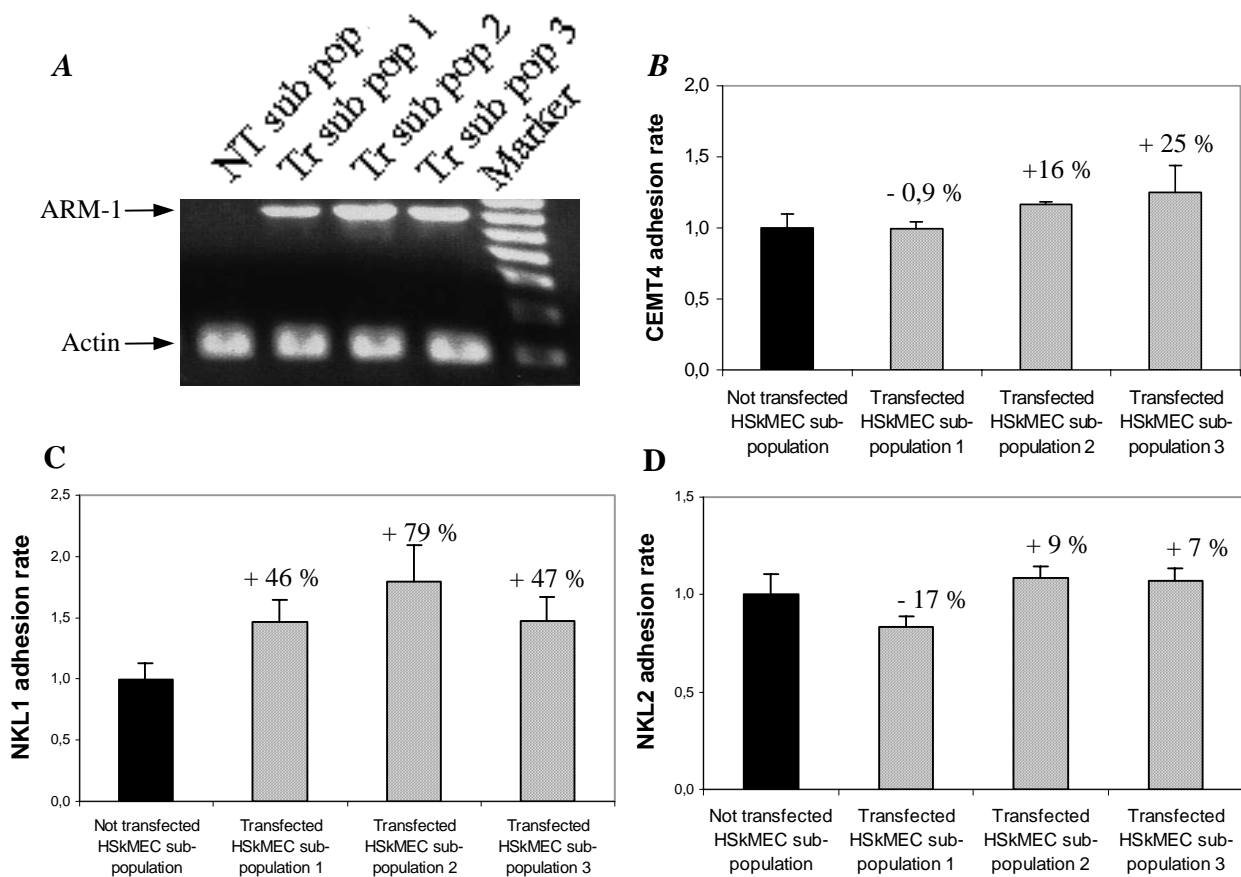


Fig. 6. Lymphocytes adhesion induced by ARM-1 overexpression in skin endothelial cells. Skin endothelial cells (HSkMEC) were transiently transfected with the pIRES-hrGFP-ARM-1 vector. After transfection, non transfected and transfected HSkMEC cells have been sorted by FACS Diva cytometer (Becton Dickinson). Expression of ARM-1 mRNA in the sorted populations was tested by semi-quantitative RT-PCR (A) (NT sub pop : non transfected sorted subpopulation, Tr sub pop : transfected sorted subpopulation). Non transfected cells (filled bars) and transfected cells (hatched bars) were submitted to static adhesion assays with CEMT4 (B), NKL1 (C) or NKL2 (D) cells. Lymphocytes adhesion was analyzed at 37°C, for 30 minutes and with a 5/1 lymphocytes/endothelial cell ratio. Adhesion rate was determined as described in materials and methods. Values for adhesion on transfected cells were normalized with the value for non transfected cells and are representative of two independently experiments.

A RT-PCR analysis confirmed the absence of ARM-1 mRNA in the subpopulation of non-transfected HSkMEC and its presence in the different subpopulations of transfected HSkMEC (Fig 6A). A slight increase of CEMT4 lymphocytes adhesion was observed on transfected cells as compared to non-transfected cells (Fig. 6B). Overexpression of ARM-1 in HSkMEC significantly increases adhesion of NKL1 lymphocytes (Fig. 6C) but not of NKL2 lymphocytes of which adhesion level didn't change (Fig. 6D). These results are interesting as NKL1 constitutively express ARM-1 mRNA as opposed to CEMT4 or NKL2 (Fig. 2B).

ARM-1 is a secreted and cell-associated protein

Because ARM-1 protein has a putative signal peptide at the amino terminus, we examined whether the ARM-1 protein was a secreted protein. For this purpose, sorted skin endothelial cells expressing Flag-tagged ARM-1 proteins were used. Three days after seeding, the culture supernatant was collected and the cells were detached from dishes by scrapping. Samples collected from these two fractions were subjected to immunoprecipitation followed by Western blot analysis using anti-Flag antibodies. The ARM-1 protein was detected in cells (total cell lysate) and in the conditioned cell culture medium (medium) but was not detected in fractions from the mock vector transfected cells (Fig. 7A). These data demonstrate that the ARM-1 protein is a cell-associated protein that can be secreted

ARM-1 is a membrane-associated protein

Because the majority of expressed ARM-1 protein appears to be cell-associated (Fig. 7A), we next determined its subcellular distribution by biochemical fractionation. Sorted skin endothelial cells expressing Flag-tagged ARM-1 proteins were lysed in hypotonic buffer, and low and high-speed centrifugation were performed to obtain a membrane fraction and a cytoplasmic fraction. Subcellular distribution of ARM-1 protein was monitored by anti-Flag immunoprecipitation and immunoblotting. As shown in figure 7B, ARM-1 protein was partitioned into the membrane and the cytosolic fractions.

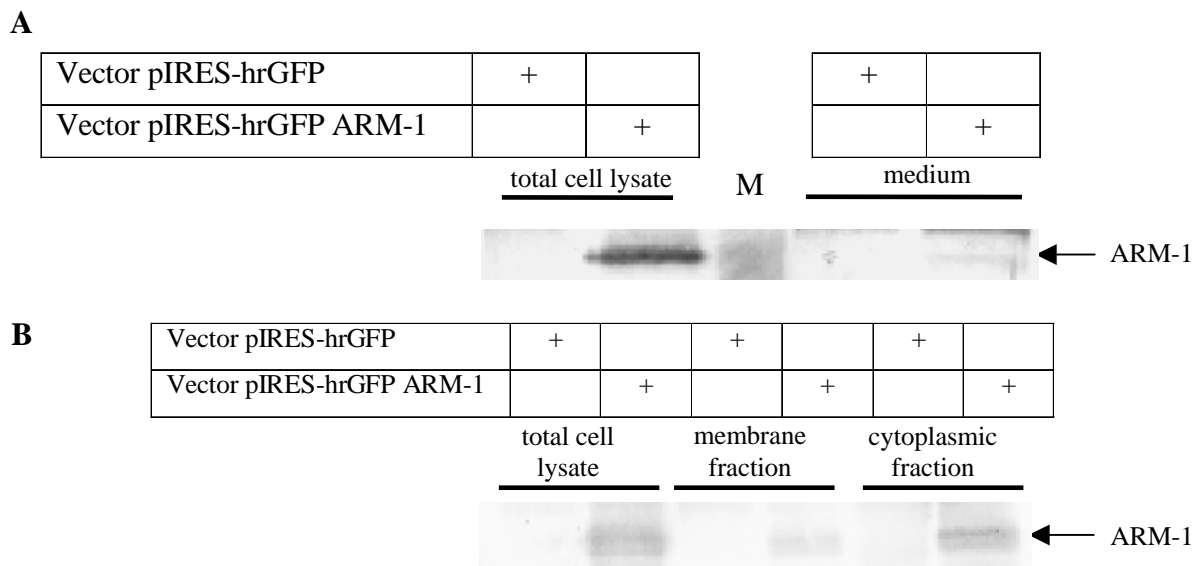


Fig. 7. ARM-1 is a secreted protein and can be associated to the membrane. Skin endothelial cells were transiently transfected with the pIRES-hrGFP or the pIRES-hrGFP ARM-1 vector. 48 hours after transfection, ARM-1 protein was immunoprecipitated and its expression was analyzed by Western blotting in the conditioned culture mediums compared to the total cell lysates (A) and in the different cellular parts obtained after subcellular fractionation (B). M : size marker.

The ARM-1 distribution analysis was completed by immunofluorescence microscopy observations. Skin endothelial cells were transiently transfected with the pires-hrGFP-ARM-1 vector. ARM-1 expression was followed 48 hours after cells transfection, by immunofluorescence detection using anti-Flag antibodies (Fig. 8).

Fluorescence confocal microscopy analyses on permeabilized transfected cells revealed ARM-1 as a cytosolic protein (Fig. 8B). Sometimes, a preferential localization could be evidenced underneath the plasma membrane (Fig. 8C), probably as a membrane associated protein. In non activating conditions, no ARM-1 molecules were expressed on the plasma membrane surface as observed on non permeabilized transfected cells (Fig. 8D). The absence of ARM-1 expression on the cell surface was confirmed by transiently transfected COS cells with the pires-hrGFP-ARM-1 or the pCMV-ARM-1 vector encoding the ARM-1 protein in fusion with a Flag tag in the C-terminus and a Myc tag in the N-terminus, respectively. In the same way, ARM-1 failed to be observed on the plasma membrane surface of COS cells, transfected with the C-terminus Flag tag or the N-terminus Myc tag plasmid (data not shown).

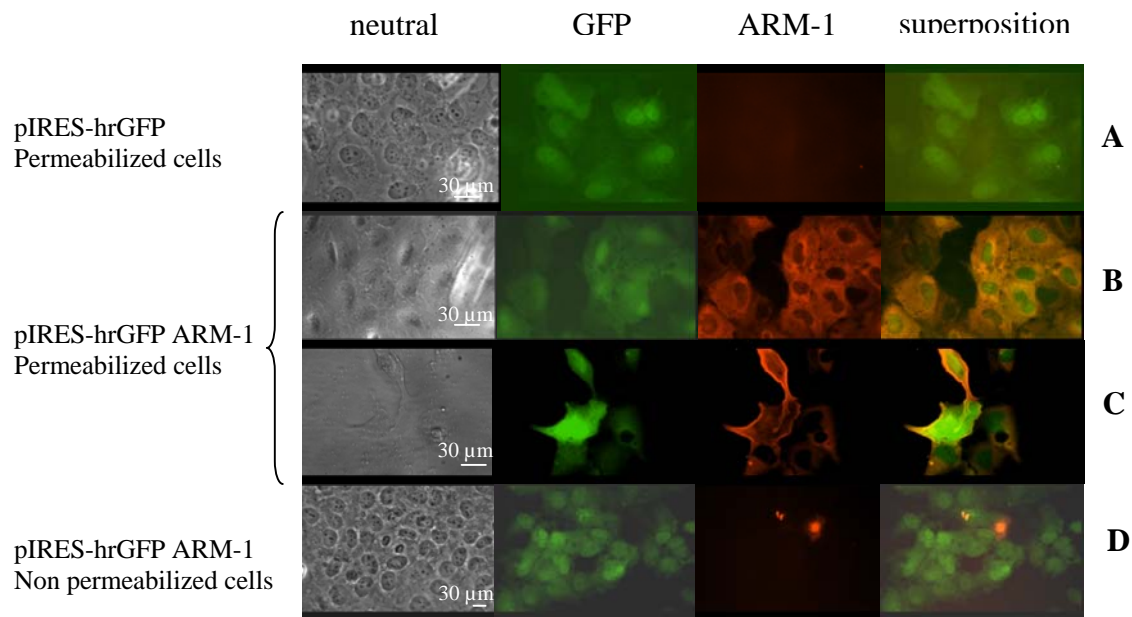


Fig. 8. ARM-1 is a cytosolic protein that can be associated to the plasma membrane. Skin endothelial cells were transiently transfected with the pIRES-hrGFP (A) or the pIRES-hrGFP ARM-1 (B, C, D) vector. 48 hours after transfection, ARM-1 protein expression was analyzed by immunofluorescence microscopy using mouse anti-Flag antibodies and anti-mouse TRITC conjugated secondary antibodies. The green fluorescence observed was due to the GFP protein coexpressed with the ARM-1 protein in the transfected cells. ARM-1 expression studies were realized on permeabilized (A, B, C) and non permeabilized cells (D).

ARM-1 is not N-glycosylated

The molecular size of expressed ARM-1 in skin endothelial cells appears about 50 kDa, slightly larger than the 42 kDa predicted size of the full-length ARM-1 protein. Because ARM-1 possesses two putative N-linked glycosylation motifs and several putative O-linked glycosylation motifs [17], we hypothesized that ARM-1 was subject to post-translational modification by glycosylation. Thus, we examined whether a cell treatment with tunicamycin, an inhibitor of N-glycosylation or with α -benzyl-GalNAc, an inhibitor of O-glycosylation, affected the molecular size of the protein (Fig. 9A). Tunicamycin treatment of cells didn't modify the molecular size of ARM-1, indicating that ARM-1 is not N-glycosylated. In the same way, α -benzyl-GalNAc treatment didn't affect ARM-1 molecular size but we cannot conclude on the absence of O-glycosylated motifs, as α -benzyl-GalNAc is not a total inhibitor of the O-glycosylation. Furthermore, α -benzyl-GalNAc was highly toxic for the endothelial cells cultures, which prevented a long-term culture.

Direct enzymatic deglycosylation treatment was applied to the immunoprecipitated ARM-1 protein, using N-glycanase, sialidase A, $\beta(1-4)$ galactosidase, β -N-acetylglucosaminidase and O-glycanase enzymes. These enzymes remove the most common N- and O-linked oligosaccharides. The global treatment of ARM-1 with these enzymes didn't affect its molecular size after migration on polyacrylamide gel (Fig. 9B).

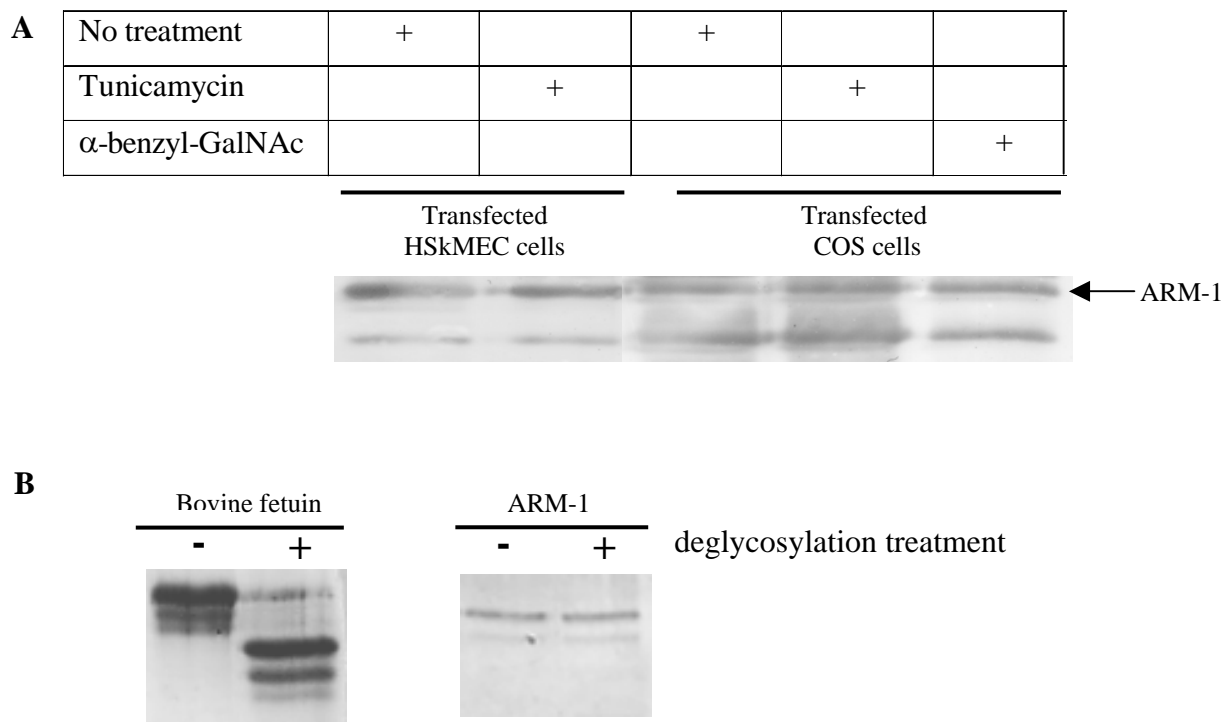


Fig. 9. ARM-1 is not a N-glycosylated protein. (A) COS cells and skin endothelial cells were transiently transfected with the pIRES-hrGFP ARM-1 vector and cultured for 48 h in the presence of 10 μ g/ml of tunicamycin as N- glycosylation inhibitor or 3 mM α -benzyl-GalNAc as O-glycosylation inhibitor. Glycosylation inhibitors were added to the cells 6 h after transfection. ARM-1 was then immunoprecipitated and analyzed by Western blotting. (B) Enzymatic deglycosylation treatment was performed on the ARM-1 protein, immunoprecipitated from transiently transfected skin endothelial cells. Bovine fetuin was used as a positive control for the enzymatic treatment.

N-glycanase removes almost all N-linked oligosaccharides so we can conclude on the probable absence of N-glycosylation on ARM-1, confirming the tunicamycin treatment result. Enzymatic treatments to remove O-glycosylated structures are less global and need to use several enzymes. Nevertheless, sialidase A, $\beta(1-4)$ galactosidase, β -N-acetylglucosaminidase and O-glycanase treatment didn't modify the molecular size of ARM-1. Some particular O-linked structures are resistant to these enzymes so we cannot conclude on the absence of O-glycosylation on ARM-1.

Discussion

Lymphocytes trafficking is a highly regulated and tissue specific mechanism where endothelium plays a critical role. Identify the molecules involved in the endothelium organo-selectivity would give keys to target drug therapy in specific tissues, particularly anti-tumoral therapies.

To identify new molecules involved in EC specificity, we used the differential display method of gene expression to compare two immortalized high endothelial cell lines, one from mouse peripheral lymph nodes and the other from mouse Peyer's patches. In this way, we highlighted the ARM-1 protein. Simins *et al.* described the ARM-1 protein as a novel cell adhesion-promoting receptor, identified on T cell lymphoma and whose expression is up regulated in metastatic cancer cells [17]. This protein does not belong to any of the known families of cell adhesion molecules. Homologous proteins are present in different species as in human (Mr 110000 antigen, isolated from gastric carcinoma cells) [18, 19], rat [20], chicken, *Xenopus laevis* [21, 22], *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* or *C. elegans*.

In this study, we demonstrated for the first time the presence of ARM-1 in endothelial cells. ARM-1 was found to be differentially expressed in endothelial cell lines according to their tissue origin. Interestingly, ARM-1 is absent in endothelial cells from skin. This result was confirmed by the same analysis on primary skin endothelial cells.

Skin endothelial cells, in our assay, showed a weak capacity to mediate adhesion of CEMT4 lymphocytes. To study the potential link between the absence of ARM-1 in skin endothelial cells and their weak adhesion activity for CEMT4 lymphocytes, ARM-1 was expressed in COS cells (which don't express this protein) and in skin endothelial cells. CEMT4 lymphocytes adhesion on ARM-1 transfected COS cells was increased up to a factor two. Overexpression of ARM-1 in skin endothelial cells significantly increased NKL-1 lymphocytes adhesion and more weakly CEMT4 lymphocytes adhesion. On the contrary, no change of NKL2 adhesion was observed. Simins *et al.* showed that ARM-1 promoted cell adhesion when overexpressed in endothelial cell's adhesion partners. Here, we showed that ARM-1 promoted cell adhesion when overexpressed in endothelial cells, and moreover in a selective way. This last observation and the specific expression pattern of ARM-1 suggest a very selective role of this protein. We showed in particular the presence of ARM-1 in NKL1

cells and its absence in NKL2 cells. NKL1 and NKL2 cells were established from the peripheral blood of two different patients with large granular lymphocyte (LGL) leukemia. NKL2 clone as opposed to NKL1 require IL2 to grow but IL2 treatment didn't influence ARM-1 expression (data not shown). The differences between the two NK clones in terms of susceptibility to IL2 activation and IL2 dependency for growth and killing activity (Bielawska-Pohl *et al.*, in submission) reflect the differences of genes expression during the tumor clonal selection and progression. In the same way, Simins *et al.* showed an overexpression of ARM-1 in metastatic cancer cells compared to non metastatic ones [17], leading us to the hypothesis that ARM-1 expression could be in relation with tumor dissemination.

In this study, we also observed the cellular localization of ARM-1. The analysis of the ARM-1 amino-acid sequence with separate algorithms didn't reveal any transmembrane region. However, subcellular fractionation analysis showed the presence of ARM-1 both in the cytosolic and the membrane fractions. The same observation was made for Xoom, the xenopus homologous protein of ARM-1 [22]. Probably, ARM-1 can be associated to the plasma membrane. We also demonstrated that ARM-1 could be secreted.

Tunicamycin treatment of cell culture and N-glycanase treatment of ARM-1 failed to show any N-glycosylated oligosaccharides on ARM-1, despite the presence of two potential N-glycosylation sites on its sequence. In most cases, cytosolic proteins, as ARM-1 was mainly observed, are not N-glycosylated but can present or not O-glycosylations [23]. Enzymatic treatment didn't reveal any O-glycans on ARM-1, despite numerous potential O-glycosylation sites particularly in the central part of its sequence. However, we cannot conclude to their absence, as they appear more complex to remove than N-glycans. ARM-1 could also present only O-linked β -N-acetylglucosamine motifs that are very abundant modifications on cytosolic proteins [24, 25] and that don't change so much the molecular weight of proteins compared to complex glycans. Interestingly, Mr110000, the human homologous protein of ARM-1, appears with a molecular weight of 110 kDa, very higher than the predicted one of 42 kDa [18, 19]. The Mr110000 expression was studied in human gastric carcinoma cells. Abnormal glycosylation is often observed in pathological context, in particular in cancer [26]. If the glycosylation state of ARM-1 is changed in a tumoral context, this could suggest again an important role of ARM-1 in disease progression.

To summarize, these results give us new insights about ARM-1 function. The fact that ARM-1 is specifically present in particular cell lines and absent from others and that its overexpression in endothelial cells mediate lymphocyte adhesion with preferential activity for some lymphocyte cell lines underlie a specific role of this protein in lymphocyte homing. At this time, the way taken by ARM-1 to mediate adhesion in endothelial cells is not known. ARM-1 is mainly expressed in cytosol but appears also as a membrane associated protein. This result suggests an indirect role of ARM-1 in adhesion as a signal transducing molecule rather than a direct role as an adhesion molecule by itself.

For sure, ARM-1 plays an important role in cell adhesion as confirmed by the up regulation of ARM-1 in metastatic mammary tumors [17]. To precise the function of ARM-1, it would be highly interesting to know whether ARM-1 is involved or not in the classical adhesion cascade [4, 5].

Materials and methods

Cell culture and RNA isolation

The murine and human endothelial cells (EC) were cultured at 37°C in a 5% CO₂/95% air atmosphere, in OptiMEM-1 medium with Glutamax-1 (Invitrogen) supplemented with 2% fetal bovine serum, 0.2% fungizone and 0.4% gentamycin.

The human CEMT4 (leukemic CD4+ T-cell line, provided by Dr. P. Olivier, Institut Pasteur, Paris, France), NKL1, NKL2 and the mouse EL4 (ATCC TIB-39), EL4-IL2 (ATCC TIB-181), Raw 8.1 (ATCC TIB-50) lymphoid cell lines were cultured in the same conditions than EC. NKL1 and NKL2 cell lines were established from the peripheral blood of two different patients with large granular lymphocyte (LGL) leukemia, as described elsewhere [27]. NKL2 clone as opposed to NKL1 require IL2 to grow (200 U/mL human rIL2).

COS-7 cells (ATCC CRL-1651) were grown in DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM GlutaMAXTM-I (Invitrogen), 1 mM sodium pyruvate, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit from QIAGEN. To remove any trace of DNA, RNA was treated with DNase I using the Message Clean Kit from GenHunter.

Semi quantitative RT-PCR

Semi-quantitative RT-PCR was performed with the Quantum RNA β-actin Internal Standards Kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions. In order to amplify the control target (actin) at a level roughly similar to our gene of interest (ARM-1), the ratio of actin primers/competimers was 2:8. The primer used for the RT reaction was an oligo(dT)₁₅ and the primers used to amplify ARM-1 in the PCR reaction were PPDD1F (5'-AGG AAG CTT TAT ATG GTG GAG TTC CGG GCA GGA-3') and PPDD1R (5'-TAG CTC GAG GCC TCA TGG CCC TGC CGG-3') giving a PCR product of 801 bp. Twenty amplification cycles were performed. Reaction products were resolved on a 1% agarose gel and quantified using the ImageQuant 5.1 program (Molecular Dynamics).

Plasmid construction

The full length ARM-1 cDNA was obtained by RT-PCR from murine Peyer's patches high endothelial cells RNA and introduced in the pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen) expression vector. PCR was carried out with the following sense oligonucleotide carrying an HindIII site, 5'-ATC AAG CTT ATG ACG ACT TCA GGC GCT CTG-3', and the following antisense oligonucleotide carrying a XhoI site, 5'-ATG CTC GAG GTC TAG ACT CAT ATC TTC TTC TTC-3'.

PCR product was sequenced by the MWG Biotech company (Germany) confirming that no error has been introduced.

The pcDNA-ARM-1 vector was used to introduce the ARM-1 cDNA in the pCMV Tag 3B vector (Stratagene), using the HindIII and XhoI restriction sites, in order to express the ARM-1 protein with a N-terminus Myc tag. The pCMV-ARM-1 vector was used to introduce the ARM-1 cDNA in the pIRES-hrGFP-1a (Stratagene) by using the BamHI and XhoI restriction sites.

Transfections and glycosylation inhibition experiments

Cells were plated one day before transfection in 24-wells plates (Falcon, Becton Dickinson, Grenoble, France), for adhesion assays, or on round glass slides in 4-well plates, for immunofluorescence microscopy. Cells were transiently transfected with the pCMV-ARM-1 or the pIRES-hrGFP-ARM-1 expression vector using the Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen) for COS cells or the Lipofectin reagent (Invitrogen) for endothelial cells, according to the manufacturer's instructions. Adhesion assays and immunofluorescence detection were performed 48 hours after transfection.

Skin endothelial cells (HskMEC) transfected with the pIRES-hrGFP-ARM-1 vector were sorted by a FACS Diva cytometer (Becton Dickinson).

For glycosylation inhibition experiments, transfected cells were cultured for 48h in the presence of 10 µg/ml of tunicamycin (Sigma) as *N*-glycosylation inhibitor or 3 mM α -benzyl-GalNAc (Sigma) as *O*-glycosylation inhibitor. Glycosylation inhibitors were added to the cells 6 h after transfection. Enzymatic deglycosylation treatment was performed on the immunoprecipitated ARM-1 protein, by using the enzymatic deglycosylation and the pro-LINK ExtenderTM kits (PROzyme), according to the manufacturer's instructions.

Static adhesion assays

Quantitative adhesion assays were performed according to the method previously described by Paprocka *et al.* (unpublished data). Briefly, CEMT4 or NK lymphocytes were labeled by the PKH26 red fluorescent cell linker kit (Sigma), according to the manufacturer's instructions. PKH26 [28] is a non-toxic hydrophobic fluorescent dye, which stably labels cell membranes. ARM-1 transfected or mock transfected cells were washed once with PBSc (phosphate-buffered saline, supplemented with 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂) pH 7.4; then, 300 µl of labeled lymphocytes suspension were layered onto each transfected or mock transfected cells well at a 5 or 10 lymphocytes to one adhered cell ratio. After a 20, 30 or 40 minutes adhesion step (at 4°C or 37°C), non-adherent lymphoid cells were removed by three gentle washings with PBSc. Then, the cells were detached by a trypsin treatment, washed with PBS-BSA (bovine serum albumin) 0.5%, centrifuged and analyzed by flow cytometry (FACSsort apparatus, Becton Dickinson) which allowed to separate the lymphoid cells (labeled) from the non lymphoid cells (non labeled) and to express the number of lymphoid cells adhered per cell. Each assay was made in triplicate.

Immunoprecipitation and Immunoblotting

Transfected cells with the pcDNA-ARM-1 or the pIRES-hrGFP-ARM-1 vector were lysed in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8, containing 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 and protease inhibitors (2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A, 100 µM PMSF and 5 mM sodium tetrathionate). After centrifugation (10 minutes, 10.000 g, 4°C), supernatants were incubated with protein-G MicroBeads (Miltenyi Biotec) and anti-Myc (mouse monoclonal IgG₁, Invitrogen) or anti-Flag antibodies (mouse monoclonal IgG₁, Sigma) for 30 min at 4°C. Magnetic immunoprecipitation was realized according to the manufacturer's instructions.

Proteins samples were boiled for 5 minutes, separated by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels and transferred to Protran nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). Membranes were revealed with anti-Myc or anti-Flag antibody and a secondary alkaline phosphatase-conjugated antibody (anti-mouse goat polyvalent immunoglobulins, Sigma). Proteins were detected by Western blue[®] stabilized substrate for alkaline phosphatase (Promega).

Immunofluorescence microscopy

All incubations were conducted at room temperature. Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice with PBSc pH 7.4, fixed by paraformaldehyde (PFA) (30 min, PFA 2% in PBSc for permeabilized cells or 10 min, PFA 1% in PBSc for non permeabilized cells), washed twice with PBSc containing 20 mM glycine and, if necessary, permeabilized 30 minutes in PBSc containing 1 mg/ml saponin and 20 mM glycine. Then cells were washed once with PBSc, incubated for 45 minutes with the primary antibody, washed four times and incubated for 30 minutes with TRITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (Sigma). After extensive washing, cells were mounted on a microscope slide, in a PBS-glycerol mixture (1:1) per volume, containing 10 mg/ml of DABCO (1,4-diaza bicyclo[2,2,2]octane) as an antifading agent [29].

Fluorescence confocal microscopy analysis

Cells were observed with a fluorescence confocal imaging system MRC-1024 (Bio-Rad) equipped with a Nikon microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and a krypton/argon laser. Images were treated using Adobe Photoshop software (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA).

Subcellular fractionation

Transfected cells were washed with PBSc and lysed in hypotonic lysis buffer (10 mM Tris, pH 8, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 30 mM KCl, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin A, 100 µM PMSF and 5 mM sodium tetrathionate). After incubation for 30 min on ice, cells were homogenized with 80 strokes in a tight fitting Dounce homogenizer. The lysed cells were then centrifuged at 1,000 × g (5 min, 4°C), and the supernatant taken and further centrifuged at 100,000 × g (30 min, 4°C) in a SW 55 Ti rotor to obtain the cytosolic and the membrane fractions. An immunoprecipitation step and a Western blotting analysis were performed on each fraction.

Acknowledgements

We thank Dr Véronique Piller and Dr Friedrich Piller for their expert technical assistance in molecular biology experiments, Pr Jean Paul Soullou and Dr Béatrice Charreau (Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, INSERM U437, Nantes) for welcoming us in their team to learn the differential display method. We are grateful to Dr Bernhard Holzmann (Department of Surgery, Technische Universität, München) for his help. This work was supported by ARC grant 1117, INSERM progress grant 48009E, Jérôme Lejeune Foundation grants. NL was a recipient of a fellowship from La Fondation pour la Recherche Médicale and from La Ligue Nationale Contre le Cancer

References

1. Gowans, J. & Knight, E. (1964) The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **159**, 257-282.
2. Butcher, E. C., Scollay, R. G. & Weissman, I. L. (1980) Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol* **10**, 556-561.
3. Picker, L. J. & Butcher, E. C. (1992) Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* **10**, 561-591.
4. Butcher, E. C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**, 1033-1036.
5. Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
6. Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-568.
7. Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A. & Butcher, E. C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**, 381-384.
8. Cyster, J. G. (1999) Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* **286**, 2098-2102.
9. Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D. & Williams, L. T. (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.
10. Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E. & von Andrian, U. H. (2000) The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med* **191**, 61-76.
11. Tedla, N., Wang, H. W., McNeil, H. P., Di Girolamo, N., Hampartzoumian, T., Wakefield, D. & Lloyd, A. (1998) Regulation of T lymphocyte trafficking into lymph nodes during an immune response by the chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)- 1 alpha and MIP-1 beta. *J Immunol* **161**, 5663-5672.

12. Warnock, R. A., Campbell, J. J., Dorf, M. E., Matsuzawa, A., McEvoy, L. M. & Butcher, E. C. (2000) The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* **191**, 77-88.
13. Bizouarne, N., Denis, V., Legrand, A., Monsigny, M. & Kieda, C. (1993) A SV-40 immortalized murine endothelial cell line from peripheral lymph node high endothelium expresses a new alpha-L-fucose binding protein. *Biol Cell* **79**, 209-218.
14. Bizouarne, N., Mitterrand, M., Monsigny, M. & Kieda, C. (1993) Characterization of membrane sugar-specific receptors in cultured high endothelial cells from mouse peripheral lymph nodes. *Biol Cell* **79**, 27-35.
15. Kieda, C., Paprocka, M., Krawczenko, A., Zalecki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C. & Dus, D. (2002) New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium* **9**, 247-261.
16. Liang, P. & Pardee, A. B. (1998) Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol* **10**, 261-267.
17. Simins, A. B., Weighardt, H., Weidner, K. M., Weidle, U. H. & Holzmann, B. (1999) Functional cloning of ARM-1, an adhesion-regulating molecule upregulated in metastatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis* **17**, 641-648.
18. Shimada, S., Ogawa, M., Schlom, J. & Greiner, J. W. (1991) Identification of a novel tumor-associated Mr 110,000 gene product in human gastric carcinoma cells that is immunologically related to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* **51**, 5694-5703.
19. Shimada, S., Ogawa, M., Takahashi, M., Schlom, J. & Greiner, J. W. (1994) Molecular cloning and characterization of the complementary DNA of an M(r) 110,000 antigen expressed by human gastric carcinoma cells and upregulated by gamma-interferon. *Cancer Res* **54**, 3831-3836.
20. Nakane, T., Inada, Y., Itoh, F. & Chiba, S. (2000) Rat homologue of the human M(r) 110000 antigen is the protein that expresses widely in various tissues. *Biochim Biophys Acta* **1493**, 378-382.
21. Hasegawa, K. & Kinoshita, T. (2000) Xoom is required for epibolic movement of animal ectodermal cells in *Xenopus laevis* gastrulation. *Dev Growth Differ* **42**, 337-346.
22. Hasegawa, K., Sakurai, N. & Kinoshita, T. (2001) Xoom is maternally stored and functions as a transmembrane protein for gastrulation movement in *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ* **43**, 25-31.
23. Hart, G. W., Haltiwanger, R. S., Holt, G. D. & Kelly, W. G. (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem* **58**, 841-874.

24. Hart, G. W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem* **66**, 315-335.
25. Haltiwanger, R. S., Busby, S., Grove, K., Li, S., Mason, D., Medina, L., Moloney, D., Philipsberg, G. & Scartozzi, R. (1997) O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* **231**, 237-242.
26. Hakomori, S. (1996) Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* **56**, 5309-5318.
27. Robertson, M. J., Cochran, K. J., Cameron, C., Le, J. M., Tantravahi, R. & Ritz, J. (1996) Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol* **24**, 406-415.
28. Horan, P. K. & Slezak, S. E. (1989) Stable cell membrane labelling. *Nature* **340**, 167-168.
29. Johnson, G. D., Davidson, R. S., McNamee, K. C., Russell, G., Goodwin, D. & Holborow, E. J. (1982) Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J Immunol Methods* **55**, 231-242.

I- Etude de l'expression d'ARM-1 au niveau de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral

Plusieurs observations nous ont amenés à étudier l'expression d'ARM-1 au niveau de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral.

D'une part, Simins et collaborateurs ont montré que la protéine ARM-1 est surexprimée dans des cellules cancéreuses métastatiques comparativement à des cellules cancéreuses non métastatiques (Simins *et al.*, 1999). Ce résultat suggère un lien entre le niveau d'expression d'ARM-1 et le degré de malignité du cancer, du moins en ce qui concerne le cancer du sein sur lequel porte cette étude. Le niveau d'expression de nombreuses molécules est modifié au cours de la progression tumorale (Christofori, 2003) : c'est le cas des molécules d'adhésion (Drillenburg et Pals, 2000), et plus particulièrement des sélectines. Les cellules cancéreuses vont, dans un premier temps, diminuer le niveau d'expression de certaines protéines afin de pouvoir se détacher de la tumeur primaire et rejoindre la circulation sanguine. Ensuite, ces cellules devenues circulantes vont exprimer des molécules d'adhésion leur permettant d'être reconnues par l'endothélium de certains organes et d'envahir ainsi de nouveaux tissus.

D'autre part, ARM-1 est homologue à l'antigène humain associé aux tumeurs, Mr 110000 (Shimada *et al.*, 1991), dont l'expression a été observée dans de nombreuses lignées de carcinome gastrique. La protéine Mr 110000 y apparaît avec une masse moléculaire de 110 kDa, nettement supérieure à sa masse prédite de 42 kDa (Shimada *et al.*, 1991; Shimada *et al.*, 1994). Il est de même courant d'observer des glycosylations anormales de certaines protéines au cours de la progression tumorale. (Hakomori, 1996).

Ces observations indiquent un rôle pour ARM-1 dans le développement tumoral. De ce fait, il nous a paru intéressant d'étudier la modulation éventuelle de l'expression d'ARM-1 au sein de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral.

A- Matériels et méthodes

Quarante huit heures après leur ensemencement, les cellules endothéliales ont été incubées pendant 5 heures avec un milieu conditionné issu d'une culture de cellules tumorales. Nous avons utilisé les lignées cellulaires tumorales suivantes :

- MCF-7, lignée cellulaire humaine issue d'un cancer de sein,
- RCC-7, lignée cellulaire humaine issue d'un cancer de rein ,

- M10, lignée cellulaire humaine issue d'un mélanome malin,
- PubN, lignée cellulaire humaine issue d'un cancer de poumon.

Les lignées tumorales RCC-7, M10 et PubN sont un don du Dr. Salem Chouaib (IGR, Inserm U487, Villejuif).

Les cellules endothéliales utilisées pour cette expérience ont été choisies en fonction de l'origine tissulaire des lignées tumorales, de leurs sites de colonisations secondaires et des résultats de l'adhésion :

- HPLNEC B3 : hautes cellules endothéliales humaines de ganglions lymphatiques périphériques, clone B3,
- HMLNEC : hautes cellules endothéliales humaines de ganglions lymphatiques mésentériques,
- HSkMEC : cellules endothéliales microvasculaires humaines de peau et
- HLMCEC : cellules endothéliales microvasculaires humaines de poumon.

Des essais d'adhésion de lymphocytes ont été réalisés sur les cellules endothéliales activées par les milieux conditionnés, en utilisant le même protocole que celui décrit dans l'article (résultats partie II). L'adhésion a été réalisée pendant 30 minutes à 37°C, avec une suspension de lymphocytes dont la concentration était telle que la proportion finale de lymphocytes par cellule endothéliale était de 5.

Une extraction d'ARN a été effectuée sur les différentes lignées de cellules endothéliales activées par les milieux conditionnés. L'expression de l'ARNm d'ARM-1 a été étudiée par une méthode de RT-PCR semi-quantitative, suivant le même protocole que celui décrit dans l'article (résultats partie II).

B- Résultats

1- Adhésion cellulaire suite à l'activation des cellules endothéliales par les milieux conditionnés

Nous ne verrons dans cette partie qu'un exemple des résultats d'adhésion. La figure 34 nous montre l'adhésion de cellules NKL (« natural killer ») sur différentes lignées de cellules endothéliales, suite à leur activation par les milieux conditionnés issus de cultures tumorales. Les cellules NKL sont un don du Dr. Salem Chouaib (IGR, Inserm U487, Villejuif).

Des différences d'adhésion sont observées pour les cellules endothéliales incubées avec le milieu conditionné issu de la culture de cellules RCC7 : l'adhésion des cellules NKL est

augmentée de 366 % dans le cas des cellules endothéliales de ganglions lymphatiques périphériques, HPLNEC B3.

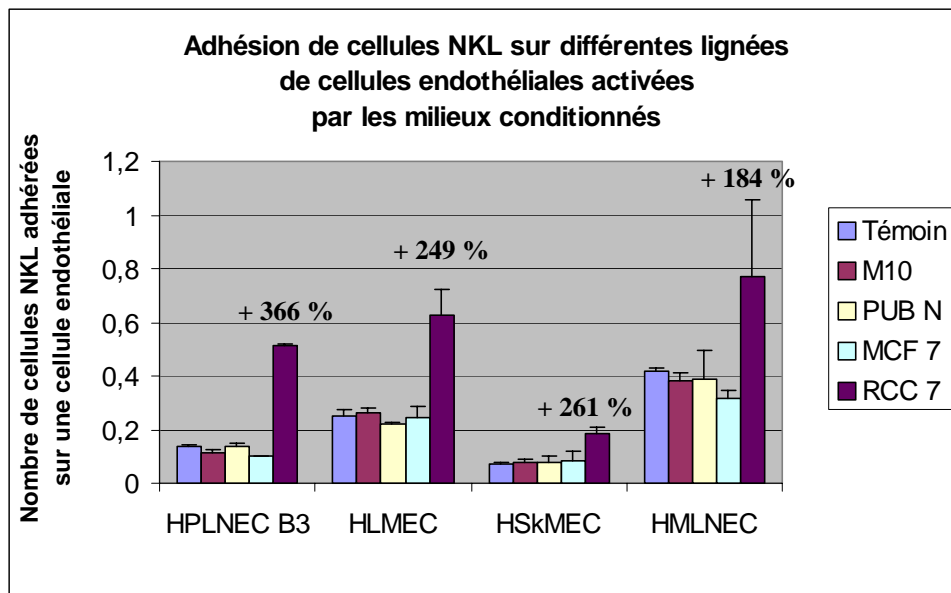


Figure 34 : adhésion de cellules NKL sur différentes lignées de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral.

Cette figure illustre clairement que les cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral présentent des propriétés d'adhésion fortement modifiées. Pour savoir si ARM-1 a un rôle à jouer dans l'adhésion cellulaire et dans le comportement des cellules endothéliales au sein d'un contexte tumoral, il nous a paru intéressant d'observer l'expression d'ARM-1 au sein des cellules endothéliales mises dans ce contexte.

2- Expression d'ARM-1 au sein de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral

L'expression d'ARM-1 dans les cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral a été analysée par une RT-PCR semi-quantitative, permettant la co-amplification des ADNc d'ARM-1 et d'actine (figure 35). L'intensité des bandes d'ADNc a été quantifiée par le programme ImageQuant 5.1 (Molecular Dynamics). Le rapport des intensités (RI) ARM-1/actine a été représenté sur le graphique de la figure 35.

Aucune différence dans l'expression d'ARM-1 n'a pu être mise en évidence quelle que soit la lignée endothéliale et quel que soit le milieu conditionné utilisés. Cependant, l'analyse n'a été

réalisée qu'avec un temps unique d'activation de 5 h. Une activation suit toujours une cinétique et le temps que nous avons choisi, bien que donnant de bons résultats en adhésion, n'est peut-être pas le meilleur pour observer une différence dans l'expression d'ARM-1. De plus, ce type d'analyse ne nous renseigne que sur l'aspect quantitatif de l'expression de la protéine ARM-1. On ne peut exclure que les cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral ne redistribuent différemment ARM-1 au sein de la cellule, favorisant ainsi son rôle dans l'adhésion cellulaire.

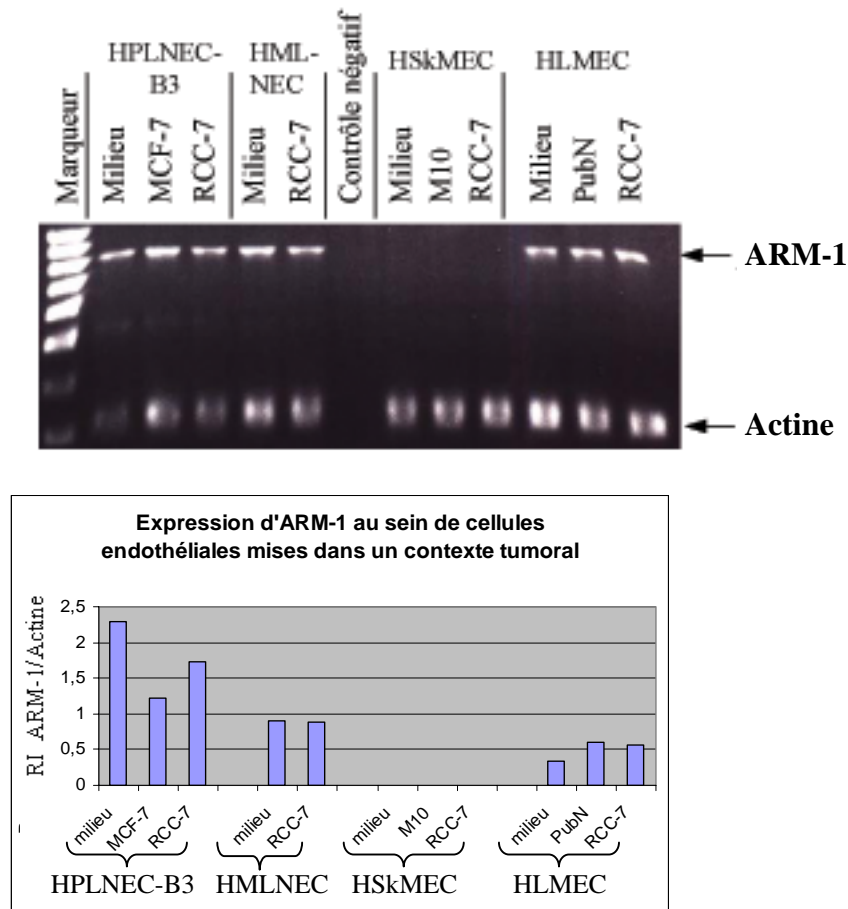


Figure 35 : expression d'ARM-1 au sein de cellules endothéliales mises dans un contexte tumoral.

II- Essai d'activation des cellules endothéliales afin de favoriser une éventuelle expression d'ARM-1 à la surface cellulaire

Une étude par microscopie nous a indiqué deux types de localisation cellulaire pour ARM-1 (voir article, Résultats partie II). ARM-1 est apparue majoritairement exprimée dans l'ensemble du cytoplasme de la cellule, avec parfois une expression préférentielle en dessous de la membrane plasmique. Aucune expression d'ARM-1 n'a pu être détectée à la surface

cellulaire. Le fait qu'ARM-1 soit parfois localisée en dessous de la membrane plasmique, attendant peut-être un signal pour être exprimée à la surface de la cellule, nous a conduit à tester différentes activations. Des cellules endothéliales de peau transfectées transitoirement par le vecteur pIRES-hrGFP-ARM-1 ont été soumises à différents agents d'activation :

- histamine à 10^{-5} M pendant 5 min, 10 min et 30 min,
- TNF α à 10 ng/ml pendant 5h, 12h et 24h,
- LPS à 1 μ g/ml pendant 1h, 5h, 12h et 24h.

Ces agents sont des médiateurs classiques de l'inflammation.

Suite à cette activation, les cellules perméabilisées ou non perméabilisées ont été marquées par des anticorps anti-Flag, suivant le même protocole que celui décrit dans l'article (Résultats partie II). Au niveau des cellules non perméabilisées, aucune de ces activations ne nous a permis d'observer une expression d'ARM-1 à la surface cellulaire. Au niveau des cellules perméabilisées, aucun changement dans la distribution cellulaire d'ARM-1 n'a pu être détecté. Il faut cependant préciser que l'on travaille avec la protéine recombinante et que, de ce fait, les séquences potentielles de régulation au niveau de l'ARNm sont absentes.

Pour étudier de façon plus approfondie la modulation de l'expression d'ARM-1 et pour caractériser davantage la fonction de cette protéine dans l'adhésion, il nous a paru essentiel d'obtenir des anticorps dirigés contre la protéine elle-même.

III- Essai d'obtention d'anticorps dirigés contre la protéine ARM-1

A- Obtention d'anticorps anti-ARM-1 par immunisation génique

1- L'immunisation génique

La voie classique d'obtention d'anticorps contre une protéine d'intérêt est l'injection de cette protéine à un animal hôte qui va développer des anticorps polyclonaux dirigés contre différents épitopes de cette protéine exogène. Cependant, pour obtenir une réponse immunitaire optimale, il est nécessaire, d'une part, de préparer la protéine en quantité suffisante, et d'autre part, dans un état de pureté aussi parfait que possible pour ne pas obtenir un mélange d'anticorps dirigés à la fois contre la protéine d'intérêt et contre les impuretés. Ces étapes préliminaires de la préparation de la protéine sont coûteuses en temps et en matériel et peuvent être difficiles à mettre en œuvre.

Afin de contourner ces difficultés, une autre voie d'immunisation s'est développée au cours des quinze dernières années : l'immunisation génique. Il ne s'agit plus d'immuniser des animaux avec la protéine d'intérêt mais avec le gène correspondant, c'est à dire le plasmide portant la séquence codant la protéine d'intérêt. La capacité d'un ADN plasmidique à s'exprimer dans des cellules de mammifère a été démontrée *in vivo*, pour la première fois, par Wolff et collaborateurs (Wolff *et al.*, 1990). Les avantages d'une telle méthode devenaient alors évidents : l'antigène était produit par l'hôte lui-même, mimant une véritable infection. L'étude de l'immunisation génique allait alors connaître un grand engouement et est toujours d'actualité. De nombreuses expériences ont été effectuées afin de mieux cerner les différents aspects de cette méthode, qu'il s'agisse de la nature des plasmides utilisés, du type d'immunisation, du site d'immunisation ou encore de la réponse immunitaire provoquée par une telle immunisation (Tighe *et al.*, 1998).

L'immunisation par ADN présente des aspects très intéressants. Les ADN plasmidiques sont très stables, faciles à injecter et d'un faible coût de production. Contrairement à l'immunisation à l'aide de protéines, l'immunisation génique permet à la fois une réponse cellulaire et humorale. Ceci est dû à la capacité des protéines qui sont synthétisées dans les cellules de l'animal hôte de pouvoir accéder aux deux voies de présentation des antigènes impliquant les complexes majeurs d'histocompatibilité de type I et II (CMH I et CMH II) (Robinson et Torres, 1997).

Nous avons donc utilisé cette méthode pour tenter d'obtenir des anticorps dirigés contre ARM-1.

2- Immunisation génique chez le rat et chez la poule

2.1- Matériels et méthodes

Disposant de l'ADNc de la protéine ARM-1, nous l'avons introduit dans des vecteurs d'expression classiques, permettant l'expression de la protéine dans des cellules eucaryotes. Ces vecteurs contiennent des promoteurs forts, adaptés à l'hôte choisi pour l'immunisation génique.

Le vecteur utilisé pour l'immunisation génique chez le rat était le vecteur pcDNA3.1/Myc-His comportant le promoteur du cytomégalovirus (CMV) (Figure 36A). Simins et collaborateurs décrivant ARM-1 comme une protéine transmembranaire, nous n'avons introduit dans ce

vecteur que la partie supposée extracellulaire d’ARM-1 (nucléotides 86 à 858, correspondant aux acides aminés 23 à 280). Ce vecteur a été nommé pcDNA3.1 ARM-1²³⁻²⁸⁰.

Le vecteur utilisé pour l’immunisation génique chez la poule était le vecteur pRc/RSV comportant le promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV) (Figure 36B). La séquence entière de l’ADNc d’ARM-1 a été introduite dans ce vecteur.

L’annexe 2 présente les combinaisons d’amorces PCR utilisées pour la construction des différents vecteurs d’expression. Concernant la construction dans le vecteur pcDNA3.1, un codon STOP a été inséré dans l’amorce antisens utilisée pour la PCR : cela a évité l’expression du fragment de la protéine ARM-1 avec les épitopes Myc et 6-histidines qui auraient certainement été très immunogènes.

L’immunisation génique des animaux et le prélèvement des antisérums ont été réalisés par la société AgroBio (La Ferté Saint Aubin). Les protocoles d’immunisation sont décrits dans les annexes 3 et 4.

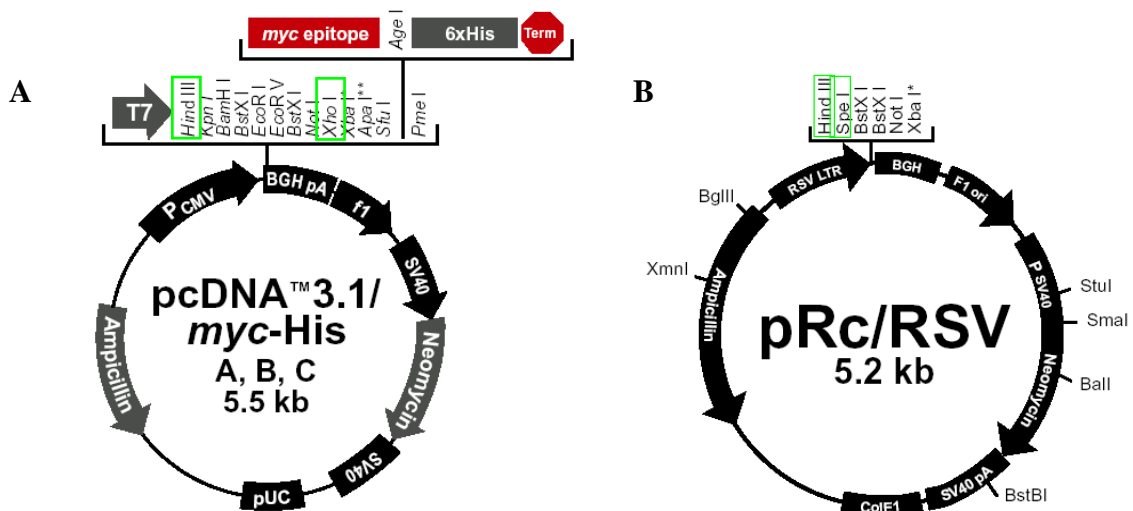


Figure 36 : vecteurs d’expression utilisés pour l’immunisation génique chez le rat (A) ou chez la poule (B) (: sites de restriction utilisés pour insérer l’ADNc d’intérêt).

Le test des antisérums a été réalisé sur des cellules COS transfectées transitoirement par le vecteur pcDNA3.1 ARM-1²³⁻²⁸⁰ ou par le vecteur contrôle pcDNA3.1/Myc-His. Les antisérums ont également été testés sur différentes lignées de cellules endothéliales exprimant ARM-1, en comparaison avec la lignée de cellules endothéliales de peau, ne l’exprimant pas.

L'ensemble de ces analyses ont été réalisées par cytométrie en flux sur des cellules perméabilisées ou non, en utilisant le protocole suivant :

les cellules, cultivées en monocouche, ont été lavées avec du PBSc-SAB 0,5 % additionné d'azide de sodium à 0,1 %, puis décollées à la collagénase (0,5 mg/ml) dans du PBSc-SAB 0,5 %. Pour la détection intracellulaire, les cellules ont été perméabilisées par une solution de PBSc contenant 0,2 % de saponine et 2 % de PFA, pendant 10 minutes à 37°C, puis lavées une fois avec du PBSc-SAB 0,1 % et incubées avec une solution de PBS-urée 0,2 M (l'urée permet de bloquer les fonctions aldéhydes libres). Pour la détection en surface, les cellules ont été fixées par une solution de PBSc-PFA 1 %, 10 min à température ambiante, puis lavées une fois avec du PBSc-SAB 0,1 % et incubées avec une solution de PBS-urée 0,2 M. Les cellules, perméabilisées ou non, ont alors été lavées deux fois avec du PBSc-SAB 0,1 %, puis incubées pendant 30 minutes à 37°C avec les différents antisérums dilués au 20^{ème}, au 50^{ème}, au 100^{ème}, au 500^{ème} ou au 1000^{ème} dans du PBSc (contenant 0,1 % de saponine pour les cellules perméabilisées). Les cellules ont été lavées deux fois en PBSc-SAB 0,1 % et incubées 30 minutes à 4°C avec des anticorps secondaires couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (anticorps anti-IgG et anti-IgM de rat ou anticorps anti-IgY de poule), dilués dans du PBSc (+/- saponine 0,1 %). Enfin, après un dernier lavage au PBSc, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux.

2.2- Résultats

Nous avons tenté d'obtenir des anticorps dirigés contre ARM-1 par immunisation génique intradermique chez le rat et chez la poule. Différents prélèvements d'antisérums ont été réalisés sur les animaux immunisés (voir annexe 3 et 4). Les antisérums ont été testés par cytométrie en flux sur des cellules COS transfectées transitoirement par le vecteur pcDNA3.1 ARM-1²³⁻²⁸⁰ ou le vecteur contrôle pcDNA3.1 Myc-His, comparativement au sérum pré-immun. Les sérums ont également été testés sur plusieurs lignées de cellules endothéliales exprimant, ou non, ARM-1.

Malgré de nombreuses analyses, aucun des antisérums obtenus dans le rat ou dans la poule n'a montré de spécificité envers la protéine ARM-1.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer l'absence apparente d'anticorps dirigés contre la protéine ARM-1, notamment au vu des identités de séquences de

cette molécule avec ses protéines homologues. ARM-1 possède 98,8 % d'identité avec l'homologue présent dans le rat et 88,7 % d'identité avec celui présent dans le poulet : ces taux d'identité sont très élevés et peuvent expliquer une réponse immunitaire fortement diminuée.

N'ayant pas réussi à obtenir d'anticorps dirigés contre ARM-1 par la méthode d'immunisation génique, nous nous sommes réorientés sur une méthode plus classique, consistant à produire la protéine dans un système bactérien pour ensuite l'injecter à l'animal.

B- Expression de la protéine ARM-1 dans un système *E. coli*

1- Matériels et méthodes

L'ADNc codant pour la protéine ARM-1 entière a été introduit dans les vecteurs d'expression procaryote pTrcHis et pET-22b(+) (figure 37)

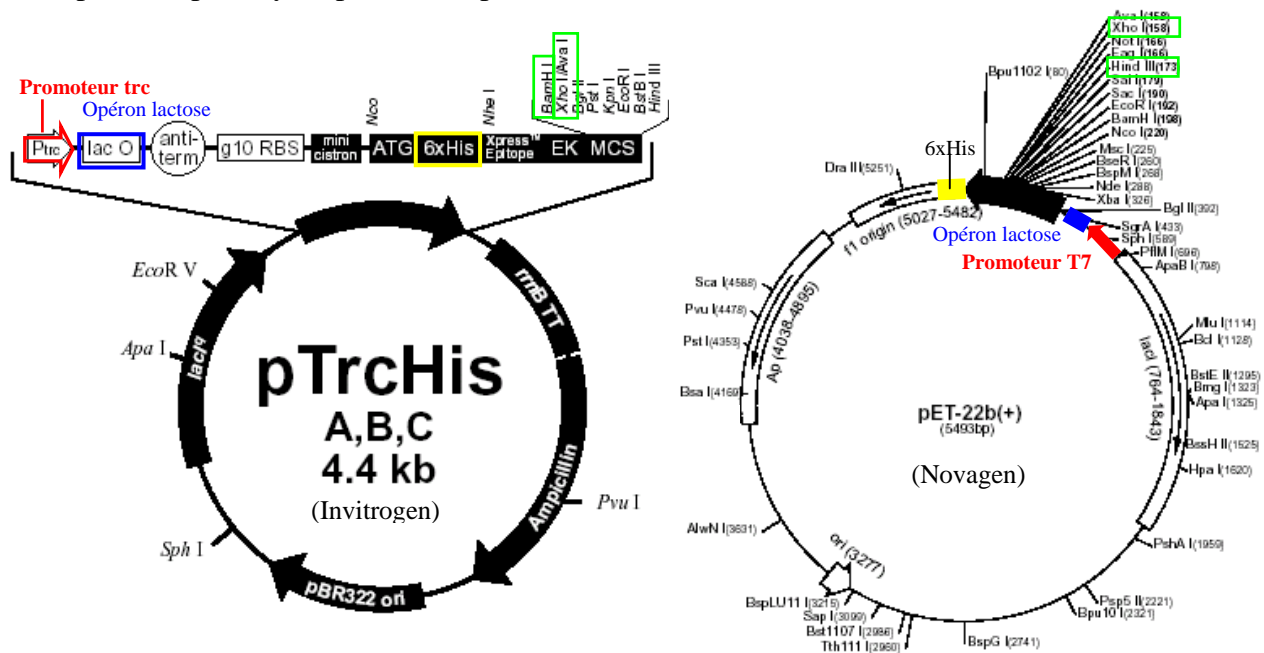


Figure 37 : vecteurs utilisés pour l'expression d'ARM-1 dans *Escherichia coli* (□ : sites de restriction utilisés pour insérer l'ADNc d'ARM-1).

L'annexe 2 présente la méthodologie utilisée pour la construction de ces vecteurs d'expression.

Ces vecteurs permettent d'exprimer la protéine d'intérêt en fusion avec une séquence de six histidines à l'extrémité N-terminale pour le vecteur pTrcHisA et à l'extrémité C-terminale

pour le vecteur pET-22b(+). La séquence polyhistidine permet la purification sur colonne de nickel de la protéine produite.

Ces vecteurs ont été introduits, par la méthode utilisant le chlorure de calcium, dans les souches d'*Escherichia coli* suivantes :

Vecteurs	Souches d' <i>E. coli</i> utilisées
pTrcHisA-ARM-1	Top10, Rosetta(DE3)
pET22b-ARM-1	BL21(DE3), Rosetta(DE3)

Description des souches :

- Top 10 (Invitrogen) : souche classique pour l'expression de gènes sous contrôle du promoteur *lac*, *trc* ou *trp*.
- BL21(DE3) (Novagen) : souche classique pour l'expression de gènes sous contrôle du promoteur *T7* (ou autres).
- Rosetta(DE3) (Novagen) : souche pour l'expression de gènes sous contrôle du promoteur *T7* (ou autres) et permettant d'augmenter l'expression de protéines eucaryotes contenant des codons rarement utilisés par *Escherichia coli*.

Les bactéries fraîchement transformées ont été mises en culture dans du milieu LB (annexe 5). Lorsque la culture a atteint une densité optique (DO) de 0,6, l'expression d'ARM-1 a été induite dans les différentes cultures de bactéries par ajout d'IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) dans les conditions suivantes :

Température d'induction	Durée de l'induction	Concentrations d'IPTG utilisées
37°C	3 heures	0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM et 1 mM
30°C	5 heures	0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM et 1 mM
20°C	la nuit	0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM et 1 mM

La surexpression de la protéine ARM-1 a été contrôlée dans les lysats bactériens et dans les surnageants de culture : les protéines ont été séparées sur gel de polyacrylamide puis colorées au bleu de Coomassie.

2- Résultats

Différentes souches d'*E. coli* ainsi que deux types de vecteur d'expression et différentes conditions d'induction à l'IPTG ont été testés pour obtenir une expression de la protéine ARM-1. Quelles que soient les conditions utilisées, nous n'avons jamais observé de surexpression de la protéine et, de ce fait, nous n'avons pas tenté de la purifier.

N'ayant pas réussi à produire la protéine ARM-1 dans *E. coli*, nous nous sommes intéressés à un autre système d'expression bactérien utilisant la bactérie *Caulobacter crescentus*.

C- Expression de la protéine ARM-1 dans un système *Caulobacter*

1- Description du système d'expression dans *Caulobacter*

Caulobacter crescentus est une bactérie gram -, non pathogène, que l'on trouve dans les eaux froides. Cette bactérie est recouverte d'une membrane appelée « couche S », composée uniquement de l'assemblage d'une protéine nommée RsaA (Smit *et al.*, 1992) (figure 38).

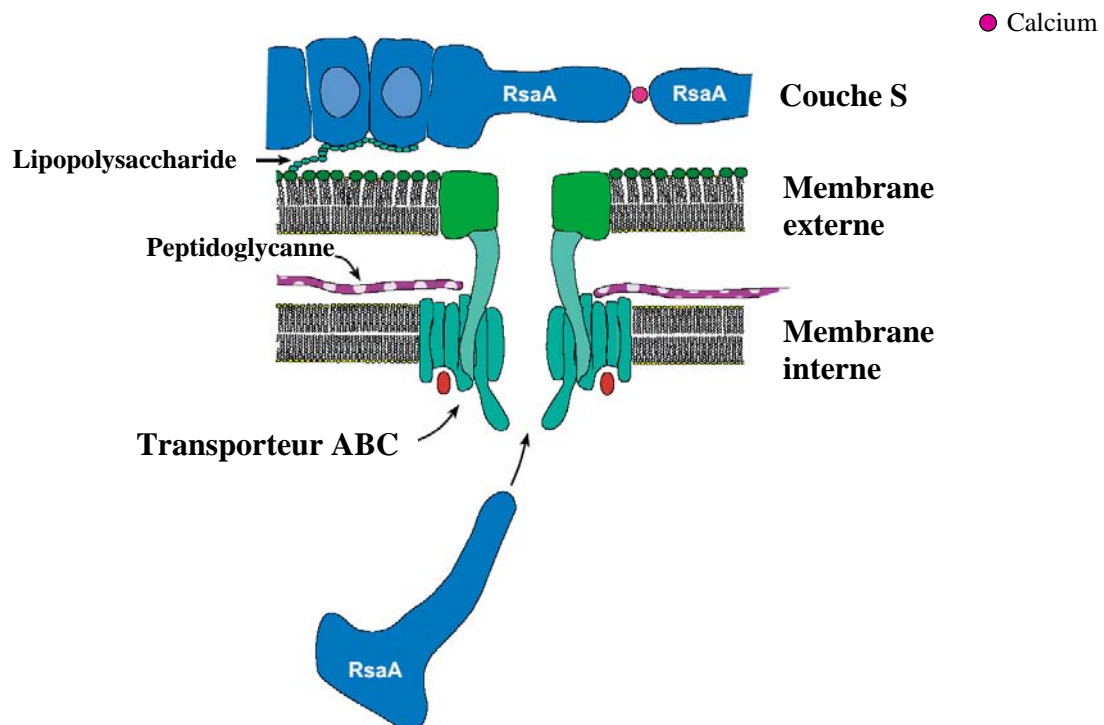


Figure 38 : structure de la paroi de la bactérie *Caulobacter crescentus* (d'après John Smit, University of British Columbia, Canada, http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/caulobactersystem_man.pdf).

La couche S est ancrée à la surface bactérienne *via* une interaction non covalente entre la protéine RsaA et un composé de lipopolysaccharide de la membrane externe. La couche S est une barrière physique contre l'attaque de parasites et d'enzymes lytiques.

La protéine RsaA possède une séquence de 1026 acides aminés et une masse moléculaire de 98 kDa. Elle est exprimée à un très fort taux dans la bactérie *Caulobacter crescentus* puisqu'elle représente à elle seule 10 à 12 % des protéines totales.

Son domaine N-terminal (aa 1 à 200) permet l'ancrage de la protéine à la membrane externe et son domaine C-terminal (aa 944 à 1026) est nécessaire à la sécrétion de la protéine (figure 39). Dans la partie C-terminale de RsaA, se trouve également une région riche en glycine, contenant des motifs RTX (aa 860 à 905) nécessaires à la liaison au calcium, le calcium permettant de stabiliser la structure de la couche S.

Le kit PurePro d'Invitrogen (développé par des scientifiques de l'UBC, The University of British Columbia, Canada) a tiré parti des caractéristiques de la partie C-terminale de RsaA :

- celle-ci dirige la sécrétion et l'aggrégation de la protéine RsaA,
- elle permet une sécrétion autonome et peut s'auto-aggréger et
- elle dirige la sécrétion et l'aggrégation de protéines de fusion hétérologues (Bingle *et al.*, 2000).

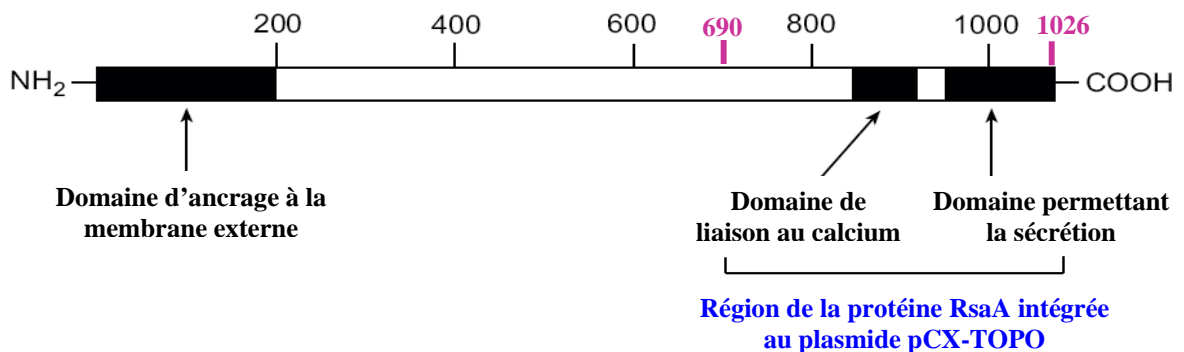


Figure 39 : structure de la protéine RsaA

(http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/caulobactersystem_man.pdf).

En utilisant le kit d'Invitrogen, la protéine d'intérêt est exprimée en fusion avec la protéine RsaA tronquée comprenant les acides aminés 690 à 1026, incluant le signal de sécrétion et les motifs RTX. Seuls les 82 derniers acides aminés sont nécessaires à la sécrétion mais il semble que la forme tronquée de RsaA comprenant les 336 derniers acides aminés donne de meilleurs niveaux d'expression des protéines hétérologues.

Du fait des propriétés uniques de la partie C-terminale de la protéine RsaA, les protéines hétérologues, exprimées en fusion avec celle-ci, peuvent être produites en forte quantité dans *Caulobacter crescentus* et être sécrétées dans le milieu. Une fois sécrétées, les protéines de fusion forment des agrégats ressemblant à un gel hydraté. Les protéines recombinantes peuvent alors être purifiées par une simple filtration au travers d'une membrane de nylon, avec une pureté pouvant atteindre 90 %. Les rendements obtenus sont très dépendants de la protéine de fusion et varient de 7 à 150 mg de protéines par litre de culture. Il semblerait cependant que le rendement diminue lorsque la taille de la protéine de fusion augmente et qu'il ne faille pas excéder 500 acides aminés pour la protéine d'intérêt.

Une fois purifiée, la protéine d'intérêt, en fusion avec la protéine RsaA tronquée, peut être utilisée pour immuniser un animal et obtenir des anticorps. La réaction immunitaire de l'animal va être dirigée à la fois contre la protéine d'intérêt et la protéine RsaA tronquée : les anticorps anti-Rsa⁶⁹⁰⁻¹⁰²⁶, présents dans les antisérums, peuvent être simplement éliminés par chromatographie d'affinité sur un gel porteur de la protéine RsaA⁶⁹⁰⁻¹⁰²⁶.

2- Matériels et méthodes

Le vecteur utilisé pour l'expression dans *Caulobacter crescentus* est représenté sur la figure 40. Nous avons décidé d'exprimer en fusion avec la protéine RsaA tronquée :

- le domaine N-terminal d'ARM-1 (acides aminés 23 à 167) ou
- le domaine C-terminal d'ARM-1 (acides aminés 258 à 392).

Les domaines N- et C-terminaux sont ceux déterminés par le tracé HCA (figure 26, page 83).

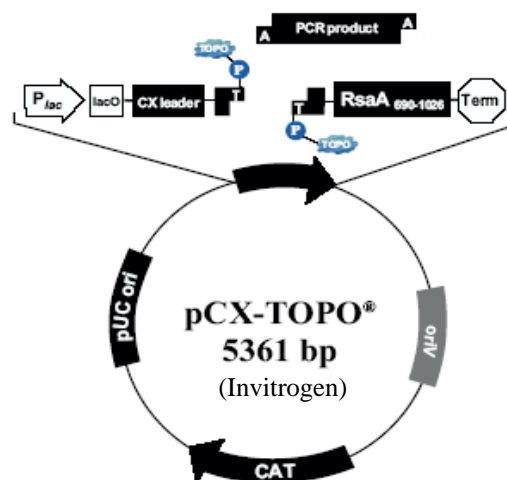


Figure 40 : plasmide utilisé pour l'expression de protéines dans le système *C. crescentus*.

L'annexe 2 décrit les amorces utilisées pour l'amplification par PCR de ces deux fragments d'ARM-1.

La souche utilisée pour l'expression de la protéine de fusion est la souche B5 BAC (Invitrogen), dérivée de la souche *Caulobacter* JS4000 et contenant une mutation l'empêchant d'exprimer la protéine RsaA native.

Les plasmides pCX/ARM-1 R1 et pCX/ARM-1 R3 (annexe 2) ont été introduits dans la souche B5 BAC par électroporation (voltage 2,5 kV, capacitance 25µF et résistance 200 ohms). Les bactéries transformées ont été cultivées à 30°C sur des boîtes de milieu PYE contenant 2 µg/ml de chloramphénicol (antibiotique de sélection) (annexe 5). Après trois jours d'incubation, une colonie a été repiquée dans 5 ml de milieu PYE (+ chloramphénicol) et cultivée 16 à 18 heures, à 30°C, sous agitation (150 à 200 rpm). Cette préculture a été utilisée pour ensemercer 50 ml de milieu M11 contenant 2 µg/ml de chloramphénicol. Le milieu M11 (Invitrogen) est un milieu complexe, présentant une forte osmolarité. Il permet d'obtenir de forte densité cellulaire (DO pouvant atteindre 5 unités) favorisant l'agrégation de la protéine RsaA tronquée. La culture en milieu M11 a été incubée pendant 2 à 3 jours, à 30°C sous une agitation plus douce (80 à 100 rpm). Au cours de cette culture, les protéines de fusion sont sécrétées et s'agrègent dans le milieu en formant un gel. Lorsque les agrégats sont formés, la protéine de fusion peut être facilement purifiée en passant la culture sur un filtre de nylon (taille des pores de 100 à 150 µm) : le filtre va laisser passer les bactéries pour ne retenir que le gel de protéines. Ce gel est ensuite lavé plusieurs fois à l'eau puis conservé à –20 ou –80°C.

3- Résultats

Nous avons réalisé la construction de deux vecteurs d'expression, contenant les domaines N-terminal (pCX-ARM1/R1) et C-terminal (pCX-ARM1/R3) d'ARM-1, chacun en fusion avec la protéine RsaA tronquée. Ces constructions ont été introduites dans la souche de *Caulobacter crescentus* par électroporation. La culture des bactéries transformées contenant le plasmide pCX-ARM1/R1, pCX-ARM1/R3 ou pCX-RsaA⁶⁹⁰⁻¹⁰³⁶ a été réalisée dans le milieu M11 avec une agitation de 90 rpm : aucun agrégat ne s'est formé. Le plasmide pCX-RsaA⁶⁹⁰⁻¹⁰³⁶ est un plasmide contrôle ne contenant que l'ADNc de la protéine RsaA tronquée.

L'agitation de la culture est un paramètre extrêmement important. L'agitation doit être suffisante pour permettre une bonne croissance des bactéries mais ne doit pas être trop élevée

au risque de casser les agrégats ou d'empêcher leur formation. Après différents essais sur des bactéries B5 BAC transformées par le plasmide pCX-RsaA⁶⁹⁰⁻¹⁰³⁶, de bonnes conditions d'agrégation ont été déterminées : 50 ml de milieu M11 dans un Erlenmeyer de 250 ml, sous une agitation de 75 rpm (figure 41).



Figure 41 : obtention d'agrégats protéiques après filtration sur membrane de nylon d'une culture de 72 heures de bactéries B5 BAC, transformées par le plasmide pCX-RsaA⁶⁹⁰⁻¹⁰³⁶ (diamètre des pores de la membrane de nylon : 100 µm).

Ces conditions vont maintenant être appliquées aux cultures de bactéries transformées par le plasmide pCX-ARM1/R1 ou pCX-ARM1/R3. Les essais sont en cours.

ආචාර්ය ජී. ආර්. ජයවර්ධන

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

ආචාර්ය ජී. ආර්. ජයවර්ධන

Dans le but d'identifier de nouvelles molécules impliquées dans l'organo-spécificité de l'endothélium, nous avons comparé, par la méthode du « differential display », l'expression de gènes entre deux lignées murines de hautes cellules endothéliales, issues d'organes lymphoïdes. L'une de ces lignées provenait de ganglions lymphatiques périphériques (HECa10) et l'autre, de plaques de Peyer (HECpp). Ces deux organes représentent deux voies distinctes de recirculation des lymphocytes, ne recrutant pas les mêmes types de cellules circulantes. L'étude de l'expression différentielle de gènes entre ces deux lignées nous a permis de mettre en évidence 10 fragments d'ADNc. Dans la plupart des cas, il ne nous a pas été possible de réamplifier ces fragments et de confirmer leur expression préférentielle dans l'une des deux lignées. Dans d'autres cas, il s'agissait de faux positifs. Deux fragments d'ADNc préférentiellement exprimés dans les cellules HECpp présentaient 100% d'homologie avec l'ADNc d'une protéine nommée ARM-1 (Adhesion Regulating Molecule 1). Bien que ces deux fragments se soient également révélés de faux positifs de notre application du « differential display », nous avons décidé de poursuivre l'étude d'ARM-1 au sein des cellules endothéliales. En effet, cette protéine présentait des caractéristiques intéressantes. Simins et collaborateurs, en surexprimant ARM-1 au niveau de cellules embryonnaires humaines de rein (cellules 293T), ont montré que cette protéine régula l'adhésion de ces cellules à l'endothélium (Simins *et al.*, 1999). Ils ont également montré qu'ARM-1 était surexprimée dans des cellules cancéreuses métastatiques comparativement à des cellules cancéreuses non métastatiques. ARM-1 n'appartient à aucune famille connue de molécules d'adhésion. Des protéines homologues sont présentes dans d'autres espèces (homme, rat, poulet, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* et *C. elegans*). Au sein d'une même espèce, aucune homologie significative avec d'autres protéines n'a pu être mise en évidence. Il semblerait donc que ces molécules appartiennent à une nouvelle famille de protéines.

Dans ce travail de thèse, nous avons montré, pour la première fois, la présence d'ARM-1 au sein de cellules endothéliales. ARM-1 est différemment exprimée suivant l'origine tissulaire de ces cellules : ARM-1 est absente de la lignée endothéliale de peau, HSkMEC. Ce résultat a été confirmé par la même analyse réalisée sur des cellules primaires de peau.

Les cellules HSkMEC se démarquent des autres lignées de CE dont nous disposons au laboratoire par leur faible capacité à promouvoir l'adhésion de cellules T activées (cellules CEMT4). Nous avons voulu savoir si le fait d'exprimer ARM-1 dans ces cellules pouvait

augmenter leur capacité à promouvoir l'adhésion cellulaire. N'ayant pas réussi dans un premier temps à transfecter efficacement des cellules endothéliales, nous avons transfecté des cellules COS et montré qu'une surexpression d'ARM-1 dans ces cellules augmentait l'adhésion de lymphocytes CEMT4.

Par la suite, nous avons transfecté des cellules endothéliales de peau par un plasmide permettant la co-expression des protéines ARM-1 et GFP : nous avons enrichi la population transfectée en utilisant un cytomètre trieur de cellules. Des expériences d'adhésion ont été réalisées sur les cellules triées. La surexpression d'ARM-1 dans les cellules HSkMEC a permis d'augmenter l'adhésion de différentes lignées de lymphocytes. La modulation de l'adhésion était différente suivant la lignée lymphocytaire utilisée. Nous avons observé une augmentation significative de l'adhésion des cellules NKL1, exprimant naturellement ARM-1, et une augmentation plus modérée pour les cellules CEMT4. Par contre, aucun effet sur l'adhésion des cellules NKL2 n'a été détecté, les cellules NKL2 comme les cellules CEMT4 n'exprimant pas ARM-1. Ces observations nous ont amenés à l'hypothèse qu'ARM-1 pourrait être une molécule d'adhésion agissant par interaction homotypique, comme le font de nombreuses molécules (exemple des protéines PECAM-1, JAMs...).

Alors que Simins et collaborateurs ont montré qu'ARM-1 régule l'adhésion cellulaire au niveau de partenaires d'adhésion des cellules endothéliales, nous avons montré que cette protéine pouvait avoir le même rôle au sein des cellules endothéliales elles-mêmes, et ceci, d'une manière sélective. Cette dernière observation et l'expression très spécifique d'ARM-1 dans certaines lignées cellulaires suggèrent un rôle très particulier de cette protéine.

Afin d'identifier la voie empruntée par ARM-1 pour réguler l'adhésion, nous nous sommes intéressés à sa localisation cellulaire au sein des cellules endothéliales. Simins et collaborateurs ont décrit ARM-1 comme une protéine transmembranaire, or aucun élément dans sa séquence protéique ne semble l'indiquer. Dans notre étude, ARM-1 est apparue principalement au niveau du cytoplasme avec parfois une expression préférentielle en dessous de la membrane plasmique. Aucune expression en surface n'a pu être démontrée. Cette dernière observation avait également été faite par Simins et collaborateurs, en utilisant une construction permettant d'exprimer la protéine ARM-1 avec un épitope Myc en C-terminal et en réalisant des expériences de cytométrie en flux. A l'inverse, les protéines Mr110000 (Shimada *et al.*, 1991) et Xoom (Hasegawa *et al.*, 2001), les homologues d'ARM-1 chez

l'homme et le xénope, respectivement, ont été montrées comme étant largement exprimées à la surface cellulaire. Cependant, ces homologues ont été étudiés dans des contextes particuliers, un contexte tumoral pour la protéine Mr110000 et un contexte embryonnaire pour la protéine Xoom, ce qui peut ne pas révéler la réalité biologique normale. Il serait particulièrement intéressant de comparer le statut de la protéine ARM-1 entre des cellules normales et des cellules transformées et/ou dédifférenciées. Pouvant être considérée comme une cellule dédifférenciée, une cellule cancéreuse se rapproche par conséquent d'une cellule embryonnaire. Il conviendrait d'observer l'expression d'ARM-1 dans des lignées de cellules endothéliales à différents stades de transformation et de rechercher à quel niveau de dédifférenciation, cette molécule serait capable de passer d'une forme membranaire à une forme sécrétée.

La localisation intracellulaire d'ARM-1 suggérerait que cette protéine puisse agir en tant que molécule de transduction du signal, subissant une translocation vers la membrane plasmique sous l'effet d'un stimulus. L'activation par différents médiateurs de l'inflammation (thrombine, LPS...) de cellules HSkMEC transfectées n'a pas permis de mettre en évidence cette éventuelle translocation. De même, cette activation n'a pas favorisé l'expression de la protéine à la surface cellulaire. Ne disposant pas d'anticorps anti-ARM-1, les études ont été réalisées sur la protéine recombinante or il est possible que la modulation de l'expression d'ARM-1 nécessite des éléments régulateurs présents au niveau de l'ARN messager. Il est également possible que le processus d'adhésion, en lui-même, soit nécessaire à un changement de localisation d'ARM-1.

Une étude de fractionnement cellulaire a confirmé la présence d'ARM-1 dans les parties cytosolique et membranaire de la cellule. Xoom, l'homologue d'ARM-1 chez le xénope, présente également cette distribution (Hasegawa *et al.*, 2001). ARM-1 peut donc être associée à la membrane mais son type d'ancrage demeure inconnu. Pour l'homologue humain Mr110000, également présent à la surface cellulaire, l'hypothèse d'un ancrage par un GPI avait été écarté (Shimada *et al.*, 1991).

Si la localisation cellulaire d'ARM-1 favorise l'hypothèse d'une protéine de signalisation, cela n'explique pas la présence de la protéine dans le surnageant de culture. ARM-1 a sans doute un rôle plus complexe : le relargage de la protéine dans le milieu peut constituer une voie de modulation de son activité, comme il a été souvent démontré pour les protéines impliquées dans l'adhésion (ex : E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1,...).

Concernant la glycosylation d'ARM-1, nous avons montré que la protéine ne possédait pas de N-glycosylation malgré la présence de deux sites potentiels dans sa séquence. De nombreux sites potentiels de O-glycosylation sont également présents, regroupés dans la partie centrale de sa séquence. Il semblerait que la protéine ne présente pas de O-glycane mais il est difficile d'être affirmatif. Ce type de structure est plus complexe à retirer par traitement enzymatique que les N-glycannes. Il est également possible que la protéine ne présente que des structures β -N-acétyl glucosamine O liées (O-GlcNAc), qui sont des modifications très courantes sur les protéines cytosoliques (Hart, 1997; Hart *et al.*, 1989), ne modifiant pas significativement la masse moléculaire de la protéine, comme c'est le cas pour des structures complexes de O-glycannes. Des anticorps anti-O-GlcNAc nous permettront de vérifier cette hypothèse. Il est intéressant de noter que l'homologue humain d'ARM-1, Mr110000, est apparu avec une masse moléculaire de 110 kDa, nettement supérieure à celle prédite de 42 kDa. Une glycosylation anormale des protéines apparaît souvent dans les cellules cancéreuses, or la protéine Mr110000 a été étudiée au sein de cellules de carcinome gastrique. Si cela se vérifie pour ARM-1, cela signifierait que cette protéine joue très certainement un rôle dans le développement tumoral. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'ARM-1 est surexprimée dans les cellules cancéreuses métastatiques comparativement aux cellules cancéreuses non métastatiques.

L'étude d'ARM-1 nécessite d'être approfondie. En effet, au terme de ce travail de thèse, nous avons pu montrer la capacité d'ARM-1 à moduler l'adhésion au sein des cellules endothéliales. Pour appuyer cette observation, il serait intéressant de réaliser des expériences de perte de fonction de la protéine ARM-1 au sein de cellules endothéliales en utilisant des ARN interférents, ceci afin d'observer l'effet de cette perte de fonction sur l'adhésion cellulaire, en particulier, mais également sur la survie cellulaire. De plus, ce type d'expérience nous permettrait de travailler sur des lignées endothéliales exprimant naturellement ARM-1 contrairement aux cellules endothéliales de peau avec lesquelles nous avons travaillé pour observer l'effet sur l'adhésion d'une surexpression d'ARM-1. Nous serions ainsi dans un contexte plus pertinent pour étudier la fonction de cette protéine.

Pour poursuivre l'étude, il semble indispensable de produire la protéine recombinante. Nos essais de production dans un système *E. coli* ont été infructueux. Il serait nécessaire de tester d'autres systèmes d'expression tels que la levure ou la cellule d'insecte. La protéine recombinante nous permettrait de réaliser des essais d'adhésion sur la molécule elle-même

ainsi que des tests d'inhibition de l'adhésion, tranchant ainsi la question d'un rôle direct ou indirect de la protéine dans ce processus.

Les mécanismes moléculaires empruntés par ARM-1 pour réguler l'adhésion demeurent inconnus. Nos observations laissent la place à de nombreuses hypothèses. De par sa localisation majoritairement intracellulaire, il semblerait que la protéine ARM-1 n'agisse pas directement en tant que molécule d'adhésion mais davantage en tant que molécule transductrice du signal. Les mécanismes de transduction du signal sont des étapes clés dans le processus d'adhésion cellulaire, permettant l'activation de nombreuses molécules d'adhésion telles que les intégrines. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de savoir si ARM-1 peut être phosphorylée : sa séquence en acides aminés comporte de nombreux résidus sérine et thréonine, qui peuvent réguler l'activité biologique de protéines intracellulaires, ces résidus étant tour à tour phosphorylés ou substitués par des motifs O-GlcNAc (Hart, 1997). Dans la même optique, nous pourrions observer une éventuelle colocalisation d'ARM-1 avec certaines protéines du cytosquelette, ayant elles aussi un rôle clé dans la transduction du signal.

Il paraît également indispensable d'obtenir des anticorps dirigés contre ARM-1 afin d'étudier plus spécifiquement la modulation de son expression. Nous pourrions également suivre la localisation de la protéine lors du processus d'adhésion, ceci pouvant nous fournir des indications précieuses quant à son mode d'action.

Il faudra également mettre en évidence la voie empruntée par ARM-1 pour moduler l'adhésion et connaître, notamment, si elle implique la cascade décrite classiquement.

Enfin, plusieurs observations suggèrent un rôle d'ARM-1 dans le développement tumoral : il serait donc intéressant d'étudier son expression et son fonctionnement dans ce contexte particulier (étude notamment de sa glycosylation). Cela peut se révéler très utile quant au diagnostic, mais aussi quant aux gènes signalant pour cette éventuelle dérégulation.

Cette thèse avait pour but d'illustrer la spécificité des cellules endothéliales suivant leur tissu d'origine. D'autres travaux réalisés au laboratoire y ont participé, notamment par l'étude de l'action des chimiokines sur les cellules endothéliales. Il a ainsi été montré que les chimiokines et leurs récepteurs agissaient de façon spécifique sur certaines lignées de CE et

ceci bien qu'étant exprimés de façon ubiquitaire sur chacune de celles-ci. Un article concernant ces travaux a été soumis à publication dans le journal « Experimental Cell Research » : celui-ci est présenté à la fin de ce manuscrit, dans les travaux complémentaires à mon travail de thèse (partie II, page 177).

D'autres travaux sont actuellement envisagés suite aux résultats d'adhésion obtenus après l'activation des cellules endothéliales par le milieu conditionné issu de la culture de cellules tumorales RCC-7 (lignée cellulaire humaine issue d'un cancer de rein). L'augmentation de l'adhésion de cellules NKL sur les CE ainsi activées était générale, quelle que soit l'origine tissulaire de la lignée endothéliale : une augmentation de 366 % a été observée sur les CE de ganglions lymphatiques périphériques. Nous planifions actuellement de comparer l'expression de gènes entre trois ou quatre lignées de CE, avant et après leur activation par le milieu conditionné RCC-7, ceci par une technique de puces à ADN. Ayant observé, suite à cette stimulation, une augmentation de l'adhésion sur chaque lignée de CE testées, nous voudrions savoir si elle implique les mêmes voies de régulation suivant l'organe considéré.

ආචාර්ය ජනරාල් ජයවර්ධන විජේසේන

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

ආචාර්ය ජනරාල් ජයවර්ධන විජේසේන

- Ager, A. (1997) Regulation of lymphocyte migration into lymph nodes by high endothelial venules. *Biochem Soc Trans*, **25**, 421-428.
- Alexander, S.R., Kishimoto, T.K. et Walcheck, B. (2000) Effects of selective protein kinase C inhibitors on the proteolytic down-regulation of L-selectin from chemoattractant-activated neutrophils. *J Leukoc Biol*, **67**, 415-422.
- Allport, J.R., Muller, W.A. et Luscinskas, F.W. (2000) Monocytes induce reversible focal changes in vascular endothelial cadherin complex during transendothelial migration under flow. *J Cell Biol*, **148**, 203-216.
- Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E. et Springer, T.A. (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*, **128**, 1243-1253.
- Arap, W., Pasqualini, R. et Ruoslahti, E. (1998) Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, **279**, 377-380.
- Arvilommi, A.M., Salmi, M. et Jalkanen, S. (1997) Organ-selective regulation of vascular adhesion protein-1 expression in man. *Eur J Immunol*, **27**, 1794-1800.
- Augustin, H.G., Kozian, D.H. et Johnson, R.C. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*, **16**, 901-906.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L. et Imhof, B.A. (2001) Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood*, **98**, 3699-3707.
- Baggiolini, M. (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, **250**, 91-104.
- Baggiolini, M., Dewald, B. et Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol*, **15**, 675-705.
- Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S. et Schettini, G. (2002) Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem*, **82**, 1311-1329.
- Bargatze, R.F., Jutila, M.A. et Butcher, E.C. (1995) Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity*, **3**, 99-108.
- Barinaga, M. (1997) Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science*, **275**, 482-484.

- Bartolazzi, A., Nocks, A., Aruffo, A., Spring, F. et Stamenkovic, I. (1996) Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol*, **132**, 1199-1208.
- Baumhater, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D. et Lasky, L.A. (1993) Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, **262**, 436-438.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A. et Schall, T.J. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, **385**, 640-644.
- Berg, E.L., Goldstein, L.A., Jutila, M.A., Nakache, M., Picker, L.J., Streeter, P.R., Wu, N.W., Zhou, D. et Butcher, E.C. (1989) Homing receptors and vascular addressins: cell adhesion molecules that direct lymphocyte traffic. *Immunol Rev*, **108**, 5-18.
- Berg, E.L., Yoshino, T., Rott, L.S., Robinson, M.K., Warnock, R.A., Kishimoto, T.K., Picker, L.J. et Butcher, E.C. (1991) The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med*, **174**, 1461-1466.
- Berlin, C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L. et Butcher, E.C. (1995) alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, **80**, 413-422.
- Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A. et Butcher, E.C. (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, **74**, 185-185.
- Bingle, W.H., Nomellini, J.F. et Smit, J. (2000) Secretion of the *Caulobacter crescentus* S-layer protein: further localization of the C-terminal secretion signal and its use for secretion of recombinant proteins. *J Bacteriol*, **182**, 3298-3301.
- Binns, R.M., Whyte, A. et Licence, S.T. (1996) Constitutive and inflammatory lymphocyte trafficking. *Vet Immunol Immunopathol*, **54**, 97-104.
- Bizouarne, N., Denis, V., Legrand, A., Monsigny, M. et Kieda, C. (1993a) A SV-40 immortalized murine endothelial cell line from peripheral lymph node high endothelium expresses a new alpha-L-fucose binding protein. *Biol Cell*, **79**, 209-218.
- Bizouarne, N., Mitterrand, M., Monsigny, M. et Kieda, C. (1993b) Characterization of membrane sugar-specific receptors in cultured high endothelial cells from mouse peripheral lymph nodes. *Biol Cell*, **79**, 27-35.

- Bogen, S., Pak, J., Garifallou, M., Deng, X. et Muller, W.A. (1994) Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med*, **179**, 1059-1064.
- Boger, D.L., Goldberg, J., Silletti, S., Kessler, T. et Cheresh, D.A. (2001) Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial libraries which function by inhibiting the binding and localization of proteinase MMP2 to integrin alpha(V)beta(3). *J Am Chem Soc*, **123**, 1280-1288.
- Brooks, P.C., Clark, R.A. et Cheresh, D.A. (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, **264**, 569-571.
- Butcher, E.C. (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, **67**, 1033-1036.
- Butcher, E.C. et Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, **272**, 60-66.
- Butcher, E.C., Scollay, R.G. et Weissman, I.L. (1980) Organ specificity of lymphocyte migration: mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. *Eur J Immunol*, **10**, 556-561.
- Campbell, J.J. et Butcher, E.C. (2000) Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, **12**, 336-341.
- Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D.P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L. et Butcher, E.C. (1999) The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*, **400**, 776-780.
- Campbell, J.J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M.A., Thompson, D.A. et Butcher, E.C. (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, **279**, 381-384.
- Campbell, J.J., Qin, S., Bacon, K.B., Mackay, C.R. et Butcher, E.C. (1996) Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol*, **134**, 255-266.
- Carlos, T.M. et Harlan, J.M. (1990) Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev*, **114**, 5-28.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J. et Cybulsky, M.I. (2000) Alpha 4 beta 1 integrin/VCAM-1 interaction activates alpha L beta 2 integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J Immunol*, **164**, 746-753.

- Chan, J.R., Hyduk, S.J. et Cybulsky, M.I. (2001) Chemoattractants induce a rapid and transient upregulation of monocyte alpha4 integrin affinity for vascular cell adhesion molecule 1 which mediates arrest: an early step in the process of emigration. *J Exp Med*, **193**, 1149-1158.
- Chan, J.R., Hyduk, S.J. et Cybulsky, M.I. (2003) Detecting rapid and transient upregulation of leukocyte integrin affinity induced by chemokines and chemoattractants. *J Immunol Methods*, **273**, 43-52.
- Chavakis, T., Keiper, T., Matz-Westphal, R., Hersemeyer, K., Sachs, U.J., Nawroth, P.P., Preissner, K.T. et Santoso, S. (2004) The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Biol Chem*.
- Chen, C., Mobley, J.L., Dwir, O., Shimron, F., Grabovsky, V., Lobb, R.R., Shimizu, Y. et Alon, R. (1999) High affinity very late antigen-4 subsets expressed on T cells are mandatory for spontaneous adhesion strengthening but not for rolling on VCAM-1 in shear flow. *J Immunol*, **162**, 1084-1095.
- Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C. et Keller, G. (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, **125**, 725-732.
- Christofori, G. (2003) Changing neighbours, changing behaviour: cell adhesion molecule-mediated signalling during tumour progression. *Embo J*, **22**, 2318-2323.
- Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M. et Stern, D.M. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, **91**, 3527-3561.
- Clark, R.A., Alon, R. et Springer, T.A. (1996) CD44 and hyaluronan-dependent rolling interactions of lymphocytes on tonsillar stroma. *J Cell Biol*, **134**, 1075-1087.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C. et Laudanna, C. (2000) Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, **13**, 759-769.
- Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A. et Corti, A. (2000) Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). *Nat Biotechnol*, **18**, 1185-1190.
- Cyster, J.G. (1999) Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*, **286**, 2098-2102.

- De Boer, O.J., Horst, E., Pals, S.T., Bos, J.D. et Das, P.K. (1994) Functional evidence that the HECA-452 antigen is involved in the adhesion of human neutrophils and lymphocytes to tumour necrosis factor-alpha-stimulated endothelial cells. *Immunology*, **81**, 359-365.
- Dedhar, S. et Hannigan, G.E. (1996) Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 657-669.
- Dejana, E., Corada, M. et Lampugnani, M.G. (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J*, **9**, 910-918.
- Dejana, E., Zanetti, A. et Del Maschio, A. (1996) Adhesive proteins at endothelial cell-to-cell junctions and leukocyte extravasation. *Haemostasis*, **26 Suppl 4**, 210-219.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. et Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6025-6030.
- Drillenburg, P. et Pals, S.T. (2000) Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*, **95**, 1900-1910.
- Drillenburg, P., van der Voort, R., Koopman, G., Dragosics, B., van Krieken, J.H., Kluin, P., Meenan, J., Lazarovits, A.I., Radaszkiewicz, T. et Pals, S.T. (1997) Preferential expression of the mucosal homing receptor integrin alpha 4 beta 7 in gastrointestinal non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*, **150**, 919-927.
- Duijvestijn, A.M., Schreiber, A.B. et Butcher, E.C. (1986) Interferon-gamma regulates an antigen specific for endothelial cells involved in lymphocyte traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9114-9118.
- Ehrhardt, C., Kneuer, C. et Bakowsky, U. (2004) Selectins-an emerging target for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **56**, 527-549.
- Ellerby, H.M., Arap, W., Ellerby, L.M., Kain, R., Andrusiak, R., Rio, G.D., Krajewski, S., Lombardo, C.R., Rao, R., Ruoslahti, E., Bredesen, D.E. et Pasqualini, R. (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med*, **5**, 1032-1038.
- Essler, M. et Ruoslahti, E. (2002) Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 2252-2257.
- Etzioni, A. (1994) Adhesion molecule deficiencies and their clinical significance. *Cell Adhes Commun*, **2**, 257-260.

- Fajardo, L.F. (1989) The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol*, **92**, 241-250.
- Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Dvorak, H.F. et Dvorak, A.M. (1998) Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*, **187**, 903-915.
- Feng, L. (2000) Role of chemokines in inflammation and immunoregulation. *Immunol Res*, **21**, 203-210.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. et Berger, E.A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, **272**, 872-877.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, **285**, 1182-1186.
- Folkman, J. et Cotran, R. (1976) Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol*, **16**, 207-248.
- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. et Mornon, J.P. (1987) Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett*, **224**, 149-155.
- Garlanda, C. et Dejana, E. (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1193-1202.
- Gerritsen, M.E. (1987) Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, **36**, 2701-2711.
- Girard, J.P., Baekkevold, E.S., Yamanaka, T., Haraldsen, G., Brandtzaeg, P. et Amalric, F. (1999) Heterogeneity of endothelial cells: the specialized phenotype of human high endothelial venules characterized by suppression subtractive hybridization. *Am J Pathol*, **155**, 2043-2055.
- Girard, J.P. et Springer, T.A. (1995) High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*, **16**, 449-457.
- Gopalan, P.K., Smith, C.W., Lu, H., Berg, E.L., McIntire, L.V. et Simon, S.I. (1997) Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol*, **158**, 367-375.
- Gossler, U., Jonas, P., Luz, A., Lifka, A., Naor, D., Hamann, A. et Holzmann, B. (1996) Predominant role of alpha 4-integrins for distinct steps of lymphoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 4821-4826.

- Gowans, J. et Knight, E. (1964) The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **159**, 257-282.
- Grabovsky, V., Dwir, O. et Alon, R. (2002) Endothelial chemokines destabilize L-selectin-mediated lymphocyte rolling without inducing selectin shedding. *J Biol Chem*, **277**, 20640-20650.
- Grabovsky, V., Feigelson, S., Chen, C., Bleijs, D.A., Peled, A., Cinamon, G., Baleux, F., Arenzana-Seisdedos, F., Lapidot, T., van Kooyk, Y., Lobb, R.R. et Alon, R. (2000) Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med*, **192**, 495-506.
- Gunn, M.D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L.T. et Nakano, H. (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*, **189**, 451-460.
- Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D. et Williams, L.T. (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.
- Hakomori, S. (1996) Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res*, **56**, 5309-5318.
- Hart, G.W. (1997) Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev Biochem*, **66**, 315-335.
- Hart, G.W., Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. et Kelly, W.G. (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem*, **58**, 841-874.
- Hasegawa, K. et Kinoshita, T. (2000) Xoom is required for epibolic movement of animal ectodermal cells in *Xenopus laevis* gastrulation. *Dev Growth Differ*, **42**, 337-346.
- Hasegawa, K., Sakurai, N. et Kinoshita, T. (2001) Xoom is maternally stored and functions as a transmembrane protein for gastrulation movement in *Xenopus* embryos. *Dev Growth Differ*, **43**, 25-31.
- Havenaar, E.C., Axford, J.S., Brinkman-van der Linden, E.C., Alavi, A., Van Ommen, E.C., van het Hof, B., Spector, T., Mackiewicz, A. et Van Dijk, W. (1998) Severe rheumatoid arthritis prohibits the pregnancy-induced decrease in alpha3-fucosylation of alpha1-acid glycoprotein. *Glycoconj J*, **15**, 723-729.
- Henderson, R.B., Lim, L.H., Tessier, P.A., Gavins, F.N., Mathies, M., Perretti, M. et Hogg, N. (2001) The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice

- to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med*, **194**, 219-226.
- Hood, J.D. et Chersesh, D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, **2**, 91-100.
- Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A. et Wells, T.N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, **36**, 13570-13578.
- Horrevoets, A.J., Fontijn, R.D., van Zonneveld, A.J., de Vries, C.J., ten Cate, J.W. et Pannekoek, H. (1999) Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood*, **93**, 3418-3431.
- Horuk, R., Chitnis, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J. et Miller, L.H. (1993) A receptor for the malarial parasite Plasmodium vivax: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*, **261**, 1182-1184.
- Hu, Y., Kiely, J.M., Szente, B.E., Rosenzweig, A. et Gimbrone, M.A., Jr. (2000) E-selectin-dependent signaling via the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular endothelial cells. *J Immunol*, **165**, 2142-2148.
- Hwang, S.T., Singer, M.S., Giblin, P.A., Yednock, T.A., Bacon, K.B., Simon, S.I. et Rosen, S.D. (1996) GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med*, **184**, 1343-1348.
- Izawa, D., Tanaka, T., Saito, K., Ogihara, H., Usui, T., Kawamoto, S., Matsubara, K., Okubo, K. et Miyasaka, M. (1999) Expression profile of active genes in mouse lymph node high endothelial cells. *Int Immunol*, **11**, 1989-1998.
- Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. et Dieterlen-Lievre, F. (1998) Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, **125**, 4575-4583.
- Johns, M., George, A.J. et Ritter, M.A. (2000) In vivo selection of sFv from phage display libraries. *J Immunol Methods*, **239**, 137-151.
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M. et Imhof, B.A. (2000) The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci*, **113 (Pt 6)**, 921-933.
- Johnson-Leger, C.A., Aurrand-Lions, M., Beltraminelli, N., Fasel, N. et Imhof, B.A. (2002) Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration. *Blood*, **100**, 2479-2486.

- Johnston, B. et Butcher, E.C. (2002) Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol*, **14**, 83-92.
- Kieda, C. (2003) How endothelial cell organo-specificity mediates circulating cell homing. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, **51**, 81-89.
- Kieda, C. et Monsigny, M. (1986) Involvement of membrane sugar receptors and membrane glycoconjugates in the adhesion of 3LL cell subpopulations to cultured pulmonary cells. *Invasion Metastasis*, **6**, 347-366.
- Kieda, C., Paprocka, M., Krawczenko, A., Zalecki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C. et Dus, D. (2002) New human microvascular endothelial cell lines with specific adhesion molecules phenotypes. *Endothelium*, **9**, 247-261.
- Koivunen, E., Arap, W., Valtanen, H., Rainisalo, A., Medina, O.P., Heikkila, P., Kantor, C., Gahmberg, C.G., Salo, T., Konttinen, Y.T., Sorsa, T., Ruoslahti, E. et Pasqualini, R. (1999) Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol*, **17**, 768-774.
- Kozian, D.H. et Augustin, H.G. (1995) Rapid identification of differentially expressed endothelial cell genes by RNA display. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**, 1068-1075.
- Kunkel, E. et Butcher, E. (2002a) Homeostatic chemokines and the targeting of regional immunity. *Adv Exp Med Biol*, **512**, 65-72.
- Kunkel, E.J. et Butcher, E.C. (2002b) Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, **16**, 1-4.
- Kunkel, E.J., Dunne, J.L. et Ley, K. (2000) Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *J Immunol*, **164**, 3301-3308.
- Laudanna, C., Constantin, G., Baron, P., Scarpini, E., Scarlato, G., Cabrini, G., Dehecchi, C., Rossi, F., Cassatella, M.A. et Berton, G. (1994) Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem*, **269**, 4021-4026.
- Lesley, J. et Hyman, R. (1998) CD44 structure and function. *Front Biosci*, **3**, d616-630.
- Lesley, J., Hyman, R., English, N., Catterall, J.B. et Turner, G.A. (1997) CD44 in inflammation and metastasis. *Glycoconj J*, **14**, 611-622.
- Ley, K. (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*, **32**, 733-742.

- Li, Y., Wang, M.N., Li, H., King, K.D., Bassi, R., Sun, H., Santiago, A., Hooper, A.T., Bohlen, P. et Hicklin, D.J. (2002) Active immunization against the vascular endothelial growth factor receptor flk1 inhibits tumor angiogenesis and metastasis. *J Exp Med*, **195**, 1575-1584.
- Liang, P. et Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.
- Liang, P. et Pardee, A.B. (1995) Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol*, **7**, 274-280.
- Liang, P. et Pardee, A.B. (1998) Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol*, **10**, 261-267.
- Liao, F., Huynh, H.K., Eiroa, A., Greene, T., Polizzi, E. et Muller, W.A. (1995) Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med*, **182**, 1337-1343.
- Lorenzon, P., Vecile, E., Nardon, E., Ferrero, E., Harlan, J.M., Tedesco, F. et Dobrina, A. (1998) Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol*, **142**, 1381-1391.
- Luscinskas, F.W., Ma, S., Nusrat, A., Parkos, C.A. et Shaw, S.K. (2002) Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol*, **14**, 105-113.
- Luster, A.D. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, **338**, 436-445.
- Maiti, A., Maki, G. et Johnson, P. (1998) TNF-alpha induction of CD44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science*, **282**, 941-943.
- Mantovani, A., Bussolino, F. et Introna, M. (1997) Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today*, **18**, 231-240.
- Marchesi, V.T. (1961) The site of leucocyte emigration during inflammation. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, **46**, 115-118.
- Marchesi, V.T. et Gowans, J.L. (1964) The Migration of Lymphocytes through the Endothelium of Venules in Lymph Nodes: An Electron Microscope Study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **159**, 283-290.
- Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H. et Mori, M. (2002) Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res*, **62**, 2937-2941.

- McCarthy, S.A., Kuzu, I., Gatter, K.C. et Bicknell, R. (1991) Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. *Trends Pharmacol Sci*, **12**, 462-467.
- McNab, G., Reeves, J.L., Salmi, M., Hubscher, S., Jalkanen, S. et Adams, D.H. (1996) Vascular adhesion protein 1 mediates binding of T cells to human hepatic endothelium. *Gastroenterology*, **110**, 522-528.
- Mebius, R.E., Dowbenko, D., Williams, A., Fennie, C., Lasky, L.A. et Watson, S.R. (1993) Expression of GlyCAM-1, an endothelial ligand for L-selectin, is affected by afferent lymphatic flow. *J Immunol*, **151**, 6769-6776.
- Mebius, R.E., Streeter, P.R., Breve, J., Duijvestijn, A.M. et Kraal, G. (1991) The influence of afferent lymphatic vessel interruption on vascular addressin expression. *J Cell Biol*, **115**, 85-95.
- Meijer, C., Beljaards, F., Horst, E., Willemze, R., Van der Valk, P. et Pals, S. (1989) Differences in antigen expression between primary cutaneous- and node-based T-cell lymphomas. *J Invest Dermatol*, **92**, 479.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E. et Rot, A. (1997) Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, **91**, 385-395.
- Milici, A.J., Furie, M.B. et Carley, W.W. (1985) The formation of fenestrations and channels by capillary endothelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6181-6185.
- Minko, K., Bollerot, K., Drevon, C., Hallais, M.F. et Jaffredo, T. (2003) From mesoderm to blood islands: patterns of key molecules during yolk sac erythropoiesis. *Gene Expr Patterns*, **3**, 261-272.
- Monsigny, M., Roche, A.C. et Midoux, P. (1984) Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L1210 cells evidenced by quantitative flow cytometry and drug targeting. *Biol Cell*, **51**, 187-196.
- Morales, J., Homey, B., Vicari, A.P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., McEvoy, L.M. et Zlotnik, A. (1999) CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14470-14475.
- Moser, B. et Loetscher, P. (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*, **2**, 123-128.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A. et Loetscher, P. (2004) Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, **25**, 75-84.

- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E. et Zlotnik, A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, **410**, 50-56.
- Muller, W.A. (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*, **24**, 327-334.
- Muller, W.A., Ratti, C.M., McDonnell, S.L. et Cohn, Z.A. (1989) A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, **170**, 399-414.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X. et Phillips, D.M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, **178**, 449-460.
- Murai, T., Sougawa, N., Kawashima, H., Yamaguchi, K. et Miyasaka, M. (2004) CD44-chondroitin sulfate interactions mediate leukocyte rolling under physiological flow conditions. *Immunol Lett*, **93**, 163-170.
- Murphy, P.M. (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol*, **12**, 593-633.
- Murphy, P.M. (2002) International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, **54**, 227-229.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J. et Power, C.A. (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, **52**, 145-176.
- Nibbs, R.J., Wylie, S.M., Pragnell, I.B. et Graham, G.J. (1997) Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. *J Biol Chem*, **272**, 12495-12504.
- Nicolson, G.L. (1993) Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, **12**, 325-343.
- Ostermann, G., Weber, K.S., Zerneck, A., Schroder, A. et Weber, C. (2002) JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol*, **3**, 151-158.
- Pachynski, R.K., Wu, S.W., Gunn, M.D. et Erle, D.J. (1998) Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) stimulates integrin alpha 4 beta 7-mediated adhesion of

- lymphocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) under flow. *J Immunol*, **161**, 952-956.
- Palmeri, D., van Zante, A., Huang, C.C., Hemmerich, S. et Rosen, S.D. (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem*, **275**, 19139-19145.
- Pan, J., Kunkel, E.J., Gossler, U., Lazarus, N., Langdon, P., Broadwell, K., Vierra, M.A., Genovese, M.C., Butcher, E.C. et Soler, D. (2000) A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol*, **165**, 2943-2949.
- Pasqualini, R. et Ruoslahti, E. (1996) Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*, **380**, 364-366.
- Patel, K.D., Cuvelier, S.L. et Wiehler, S. (2002) Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*, **14**, 73-81.
- Pauli, B.U., Augustin-Voss, H.G., el-Sabban, M.E., Johnson, R.C. et Hammer, D.A. (1990) Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev*, **9**, 175-189.
- Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D. et Imhof, B.A. (1995) CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol*, **130**, 451-460.
- Picker, L.J. (1994) Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*, **6**, 394-406.
- Picker, L.J. et Butcher, E.C. (1992) Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol*, **10**, 561-591.
- Picker, L.J., Michie, S.A., Rott, L.S. et Butcher, E.C. (1990) A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*, **136**, 1053-1068.
- Picker, L.J., Warnock, R.A., Burns, A.R., Doerschuk, C.M., Berg, E.L. et Butcher, E.C. (1991) The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*, **66**, 921-933.
- Reilly, P.L., Woska, J.R., Jr., Jeanfavre, D.D., McNally, E., Rothlein, R. et Bormann, B.J. (1995) The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol*, **155**, 529-532.
- Robinson, H.L. et Torres, C.A. (1997) DNA vaccines. *Semin Immunol*, **9**, 271-283.

- Rossi, D. et Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, **18**, 217-242.
- Ruegg, C., Dormond, O. et Mariotti, A. (2004) Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1654**, 51-67.
- Salmi, M. et Jalkanen, S. (1992) A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science*, **257**, 1407-1409.
- Salmi, M., Kalimo, K. et Jalkanen, S. (1993) Induction and function of vascular adhesion protein-1 at sites of inflammation. *J Exp Med*, **178**, 2255-2260.
- Salmi, M., Tohka, S., Berg, E.L., Butcher, E.C. et Jalkanen, S. (1997) Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) mediates lymphocyte subtype-specific, selectin-independent recognition of vascular endothelium in human lymph nodes. *J Exp Med*, **186**, 589-600.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M. et Muller, W.A. (2002) CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol*, **3**, 143-150.
- Schnitzer, J.E. (1998) Vascular targeting as a strategy for cancer therapy. *N Engl J Med*, **339**, 472-474.
- Shimada, S., Ogawa, M., Schlom, J. et Greiner, J.W. (1991) Identification of a novel tumor-associated Mr 110,000 gene product in human gastric carcinoma cells that is immunologically related to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res*, **51**, 5694-5703.
- Shimada, S., Ogawa, M., Takahashi, M., Schlom, J. et Greiner, J.W. (1994) Molecular cloning and characterization of the complementary DNA of an M(r) 110,000 antigen expressed by human gastric carcinoma cells and upregulated by gamma-interferon. *Cancer Res*, **54**, 3831-3836.
- Siegelman, M.H., Stanescu, D. et Estess, P. (2000) The CD44-initiated pathway of T-cell extravasation uses VLA-4 but not LFA-1 for firm adhesion. *J Clin Invest*, **105**, 683-691.
- Sigal, A., Bleijs, D.A., Grabovsky, V., van Vliet, S.J., Dwir, O., Figdor, C.G., van Kooyk, Y. et Alon, R. (2000) The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. *J Immunol*, **165**, 442-452.
- Silvestre, J.S. et Levy, B.I. (2002) Angiogenesis therapy in ischemic disease. *Arch Mal Coeur Vaiss*, **95**, 189-196.

- Simins, A.B., Weighardt, H., Weidner, K.M., Weidle, U.H. et Holzmann, B. (1999) Functional cloning of ARM-1, an adhesion-regulating molecule upregulated in metastatic tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 641-648.
- Simon, S.I., Burns, A.R., Taylor, A.D., Gopalan, P.K., Lynam, E.B., Sklar, L.A. et Smith, C.W. (1995) L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol*, **155**, 1502-1514.
- Smit, J., Engelhardt, H., Volker, S., Smith, S.H. et Baumeister, W. (1992) The S-layer of *Caulobacter crescentus*: three-dimensional image reconstruction and structure analysis by electron microscopy. *J Bacteriol*, **174**, 6527-6538.
- Smith, C.W., Kishimoto, T.K., Abbassi, O., Hughes, B., Rothlein, R., McIntire, L.V., Butcher, E., Anderson, D.C. et Abbass, O. (1991) Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest*, **87**, 609-618.
- Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, **76**, 301-314.
- Springer, T.A. (1995) Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, **57**, 827-872.
- St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K.E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G.J., Lengauer, C., Vogelstein, B. et Kinzler, K.W. (2000) Genes expressed in human tumor endothelium [see comments]. *Science*, **289**, 1197-1202.
- Stein, J.V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M.D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E.J., Dorf, M.E. et von Andrian, U.H. (2000) The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *J Exp Med*, **191**, 61-76.
- Stevens, S.K., Weissman, I.L. et Butcher, E.C. (1982) Differences in the migration of B and T lymphocytes: organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition. *J Immunol*, **128**, 844-851.
- Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A. et Marriott, D. (1995) The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, **270**, 27348-27357.

- Sumpio, B.E., Riley, J.T. et Dardik, A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1508-1512.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A. et Engel, P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J*, **9**, 866-873.
- Tighe, H., Corr, M., Roman, M. et Raz, E. (1998) Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today*, **19**, 89-97.
- Van Den Heuvel, M.M., Poland, D.C., De Graaff, C.S., Hoefsmit, E.C., Postmus, P.E., Beelen, R.H. et Van Dijk, W. (2000) The degree of branching of the glycans of alpha(1)-acid glycoprotein in asthma. A correlation with lung function and inflammatory parameters. *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, 1972-1978.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. et Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**, 484-487.
- Vestweber, D. (2000) Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol*, **190**, 281-291.
- Vicari, A.P., Figueroa, D.J., Hedrick, J.A., Foster, J.S., Singh, K.P., Menon, S., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Bacon, K.B. et Zlotnik, A. (1997) TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity*, **7**, 291-301.
- von Andrian, U.H. et Mackay, C.R. (2000) T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*, **343**, 1020-1034.
- Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E.J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K. et Muller, W. (1996) Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature*, **382**, 366-370.
- Wang, W., Soto, H., Oldham, E.R., Buchanan, M.E., Homey, B., Catron, D., Jenkins, N., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Nguyen, N., Abrams, J., Kershenovich, D., Smith, K., McClanahan, T., Vicari, A.P. et Zlotnik, A. (2000) Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem*, **275**, 22313-22323.
- Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C. et von Andrian, U.H. (1998) Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med*, **187**, 205-216.
- Warnock, R.A., Campbell, J.J., Dorf, M.E., Matsuzawa, A., McEvoy, L.M. et Butcher, E.C. (2000) The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med*, **191**, 77-88.

- Webb, L.M., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. et Rot, A. (1993) Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7158-7162.
- Weber, C., Kitayama, J. et Springer, T.A. (1996) Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10939-10944.
- Weber, C. et Springer, T.A. (1998) Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol*, **161**, 6825-6834.
- Weber, K.S., von Hundelshausen, P., Clark-Lewis, I., Weber, P.C. et Weber, C. (1999) Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol*, **29**, 700-712.
- Wei, Y.Q., Wang, Q.R., Zhao, X., Yang, L., Tian, L., Lu, Y., Kang, B., Lu, C.J., Huang, M.J., Lou, Y.Y., Xiao, F., He, Q.M., Shu, J.M., Xie, X.J., Mao, Y.Q., Lei, S., Luo, F., Zhou, L.Q., Liu, C.E., Zhou, H., Jiang, Y., Peng, F., Yuan, L.P., Li, Q., Wu, Y. et Liu, J.Y. (2000) Immunotherapy of tumors with xenogeneic endothelial cells as a vaccine. *Nat Med*, **6**, 1160-1166.
- White, S.J., Nicklin, S.A., Sawamura, T. et Baker, A.H. (2001) Identification of peptides that target the endothelial cell-specific LOX-1 receptor. *Hypertension*, **37**, 449-455.
- Wilbanks, A., Zondlo, S.C., Murphy, K., Mak, S., Soler, D., Langdon, P., Andrew, D.P., Wu, L. et Briskin, M. (2001) Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol*, **166**, 5145-5154.
- Wiley, H.E., Gonzalez, E.B., Maki, W., Wu, M.T. et Hwang, S.T. (2001) Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1638-1643.
- Witt, D.P. et Lander, A.D. (1994) Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations. *Curr Biol*, **4**, 394-400.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. et Felgner, P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**, 1465-1468.
- Worthylake, R.A. et Burridge, K. (2001) Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 569-577.

- Xia, H., Anderson, B., Mao, Q. et Davidson, B.L. (2000) Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J Virol*, **74**, 11359-11366.
- Zabel, B.A., Agace, W.W., Campbell, J.J., Heath, H.M., Parent, D., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G.J., Yang, L.L., Soler, D., Butcher, E.C., Ponath, P.D., Parker, C.M. et Andrew, D.P. (1999) Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med*, **190**, 1241-1256.

XX

TRAVAUX COMPLEMENTAIRES
A MON TRAVAIL DE THESE

XX

**Partie I : chapitre d'un livre intitulé « Cancer growth and progression »
(2^{ème} édition, éditeur Hans Kaiser, Kluwer Academic eds).**

Tumor and host endothelial cell selective interactions and modulation by
microenvironmental chemokines

Tumor-endothelial cell cross talk specificity

N. Lamerant-Fayel, C. Crola and C. Kieda

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS, Glycobiology of Cell Recognition, 45071, Orléans, France

E mail : kieda@cnrs-orleans.fr

Tumor and host endothelial cell selective interactions and modulation by microenvironmental chemokines

Tumor-endothelial cell cross talk specificity

N. Lamerant-Fayel, C. Crola and C. Kieda

Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS, Glycobiology of Cell Recognition, 45071, Orléans, France

E mail : kieda@cns-orleans.fr

Abstract

The variability and adaptability of tumor cells allow their tissue escape and dissemination through blood vessels, despite the efficient body defence. Tumor cells use vessels for various purposes 1) for nutrition 2) for routing through blood and lymph circulation and 3) to invade selected secondary sites. The molecular mechanisms that regulate both 1) endothelial cell growth under tumor induction and 2) reciprocal recognition between endothelial cells and blood borne tumor cells are crucial to elucidate.

Tumor cells use the normal lymphocyte homing process to be recognized by endothelial cells and enter into new tissues. Endothelium is highly organo specific and is further modulated by the microenvironmental factors, as it reflects the biological state. The tissue-specific tumor-endothelial cells recognition is critical for the metastasis sites determination.

This will be particularly illustrated by the adhesion/invasion molecules and the early signals of recruitment as achieved by the local expression and the presentation's ways of chemokines to actively attract circulating partners. Refined cell and molecular interactions are insured by sugar-mediated recognitions since glycosylation is the post-translational modification that confers to glycoconjugates their structural specific identity as recognitions signals. Advantage could be taken of such specific characters as a way to design targeted anti tumor therapy strategies.

Introduction

Vascular endothelial cells (ECs) play a key role in numerous physiological processes as lymphocyte trafficking, angiogenesis but also in pathological processes as inflammation (1), autoimmune diseases (2) or metastasis (3). Tumour cell migration and metastasis share many similarities with leukocyte trafficking : blood circulating cells are recognised by endothelial cells which allow them to enter in the surrounding tissue; this is achieved in a tissue-specific manner. For example, naive T cells extravasate better in peripheral lymph nodes and naive B cells, in Peyer's patches (4). In the same way, metastasis is not a random process and some tumors show specific metastatic sites (5). Breast cancer secondary localisation favours regional lymph nodes, bone marrow, lung and liver. Malignant melanoma has a similar pattern but also has a high incidence in skin metastasis. Prostate cancer metastases also favour the bone marrow.

A better understanding of the mechanisms which control the organo-selectivity would give keys to immunotherapy (6,7), targeted drug therapy (8) and cell therapy designs.

Although all vascular endothelial cells share certain common functions, it has become clear that considerable heterogeneity exists both structurally and functionally (9,10) along the length of the vascular tree and in the microvascular beds of various organs (11-14). The structural heterogeneity of ECs is a perfect example of their adaptation to the unique demands of the surrounding tissue (15). ECs can form a tight continuous monolayer in organs such as the brain or the lungs, where they perform important barrier functions. Alternatively, they can form a discontinuous layer with intercellular gaps or fenestrae in organs such as kidney, spleen, or bone marrow, where rapid exchange of fluid, particles, and cells takes place. According to this, secondary lymphoid organs (with the exception of spleen) have high endothelial cells (HECs) walled venules that are specialized postcapillaries supporting high levels of lymphocyte extravasation from the blood (16).

ECs from diverse tissues are also heterogeneous with respect to their surface phenotype and protein expression (13) (17) (18) (19). However, one of the clearest examples of EC heterogeneity lies in the expression of homing receptors involved in cell trafficking. As this process is used in a comparable way in pathological situations and, in particular, for the cancer cells dissemination, this chapter will review the normal homing selectivity conferred by the endothelium organospecificity and its microenvironment dependency provided by the chemokine modulation, presentation and activities.

1. The multiple steps of the homing process cooperate to provide specificity

Successful defense of the body against foreign invasion is critically dependent on the presence of lymphocyte clones with the right antigen specificity at the right position at the right time. For this, naive and mature T and B cells recirculate continuously through the body, going from blood to tissue and back to the bloodstream again (20). In contrast to naive lymphocytes, memory effector lymphocytes can access to non-lymphoid effector sites and display restricted, often tissue-selective, migration behaviour (21). Distinct subsets of memory-effector cells exist with tissue-selective patterns of migration (22) (23). The recirculation is guided by lymphocyte-endothelial cells recognition and subsequent diapedesis, directing lymphocyte homing (4) (21) (24). Thus, lymphocyte- endothelial cells interaction is a central regulatory point in the immune system, controlling the access of specialized lymphocyte subsets to particular tissues and influencing the nature of local immune and inflammatory responses. At the molecular level, this process is regulated by spatio-temporarily expressed adhesion molecules (25), present on both circulating leukocytes and on endothelial cells and in concert with chemokines.

A multi-step model of leukocyte adhesion to vascular endothelium was first provided (21) (26) (27) and is broadly applicable in different tissues, although the details of the signals involved differ. Recirculation begins with blood lymphocytes interacting transiently and reversibly with the vascular endothelium through villous-expressed adhesion receptors, in a process called rolling. These receptors can be either selectins (28), which interact with carbohydrate epitopes of addressins, or, less commonly, members of the immunoglobulin (Ig) superfamily, which bind leukocyte integrins (29) (30) (31). Rolling brings lymphocytes into contact with the endothelium, where they can sample the surface for activating factors. Activating factors (often chemokines for lymphocytes) bind to specific G protein-coupled receptors on the rolling lymphocytes (32) (33) and trigger rapid activation of integrin receptors on the leukocyte surface. These activated integrins promote the leukocytes arrest and firm adhesion by binding their Ig-family ligands on the endothelium (34) (35). In the presence of the appropriate migratory signals, the leukocyte will then migrate across the endothelium into tissue, where tissue-associated chemokine gradients may also direct localisation.

1.1 The adhesion molecules, selectins and addressins

The early decisive contact between circulating cell and microvascular endothelial cell is mediated by both inducible E-selectin and P-selectin on the endothelial cells (36) (37) (38,39) (40-43) and L-selectin on circulating cell (44).

The selectins : E-selectin and P-selectin are quite generally distributed among endothelial cells and consequently can participate to a regio selective reaction through the modulation of their degree and time of expression. This prompted the search for distinctive signals, that were evidenced by help of an *in vitro* model for endothelial cell comparisons (45) (9).

A particular E-selectin ligand is the cutaneous lymphocyte associated antigen (CLA) (46) (43). The CLA ligand defines a skin-associated population of memory T cells that preferentially extravasate at normal (47) and chronically inflamed cutaneous sites (48) and that has been shown to be involved in local immunity and inflammatory cutaneous reactions (49). The first evidence that a skin-homing subset exists came with the observation that a majority (40–90%) of the T lymphocytes in normal and inflammatory skin lesions express the CLA (48) (47) (50). In contrast, CLA T cells constitute only 10–15% of the pool of circulating T cells and never exceed 5% of lymphocytes within non-cutaneous inflamed sites (48) (51). CLA is a carbohydrate antigen that is closely related to the sialyl Lewis x antigen (sLex) (4) (52) (48). Interestingly, mycosis fungoides and other subtypes of cutaneous lymphomas express CLA (48) (53) (54) but not the mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$. The highly selective expression of CLA on cutaneous T-cell lymphomas suggests that CLA mediates the skin-specific dissemination of these lymphomas *in vivo*. However, CLA E-selectin binding cannot fully explain the skin-specific homing of CLA memory T cells. Neutrophils express CLA (55) but they do not preferentially migrate to skin and E-selectin is induced on inflamed endothelium in both cutaneous and non-cutaneous sites (28). As we will see later, another step in the homing cascade is necessary to reach the specificity of skin homing and implies the chemokines CTACK and TARC.

Specific recognitions due to the leukocyte L-selectin (56) (57) (58) gets to be regio-selective despite its large distribution. This is attributed to its ligands (vascular addressins) of which expression is restricted among endothelial cells according to the tissues and the vessels. Addressins are mucin-type or mixed mucin/immunoglobulin-type glycoproteins (59) (60) (61) (62) (63) (64).

The addressins provide the regio-selectivity to selectin recognition because they are differentially expressed on the endothelium, depending upon its tissue origin (65) (62,66,67). Furthermore, their structure is highly modulated by the microenvironment at the post-translational level (15). To become high affinity L-selectin ligands, they must undergo proper glycosylation, especially the most common sugar epitopes recognized by L-selectin : sialyl Lewis x (CD15s) and its sulphated form, presented by appropriate mucin-type proteins (GlyCAM-1, MadCAM-1 or CD34). In the mouse, typical peripheral lymph node addressins (PNAds) are GlyCAM-1 (65,68), CD34 and Sgp200 (sulphated glycoprotein of 200 kD) (25) (65,69). Typical mucosal addressin is MAdCAM-1, which has been found first in mouse (25) (15,70) (71) and further in human endothelial cells (72). MAdCAM-1 is almost completely confined to mucosal and related vessels and is thus one of the few examples of endothelial adhesion molecules that is restricted to a particular tissue.

In addition to being recognized by L-selectin through its sialomucin sugar residues (60,72,73), MAdCAM-1 molecule possesses an immunoglobulin-like domain which interacts with the $\alpha 4\beta 7$ -integrin homing receptor of lymphocytes (30) and thus can mediate both rolling and stable adhesion. Consequently, lymphocytes homing to gut is critically dependent on interaction between the lymphocyte $\alpha 4\beta 7$ -integrin and its receptor MAdCAM-1 expressed on mucosal vessels (30). Lymphocytes interactions with MAdCAM-1 are particularly complex, because they depend upon its glycosylation state. Thus, Peyer's patches HEC- MAdCAM-1 is decorated with unique oligosaccharide determinants that allow it to serve as a ligand for L-selectin and thereby to mediate rolling of naive lymphocytes. In contrast, in the lamina propria, initial rolling interactions between activated lymphocytes and endothelial cells are apparently mediated by binding of the $\alpha 4\beta 7$ -integrin to immunoglobulin-like domains of MAdCAM-1. At both locations, $\alpha 4\beta 7$ -integrin-MAdCAM1 interaction and possibly LFA-1 secure firm lymphocyte adhesion. The predominant role proposed for $\alpha 4\beta 7$ -integrin in mucosal homing has gained further support from the observation that cell trafficking to mucosal lymphatic tissues is dramatically reduced in $\beta 7$ -knockout animals (74). Moreover, gastrointestinal T-cell lymphomas express the mucosal homing receptor $\alpha 4\beta 7$ (75) but not CLA.

1.2 The chemokines

In the second step of the cascade, chemokines and their receptors also help to control the homing specificity.

The chemokines (*chemotactic cytokines*) are a large and growing family of nearly 50 6–14-kD proteins that mediate a wide range of biological functions (76). The chemokines are divided into four families (**CXC, CC, C and CX₃C**) based on the position of four cysteine residues that form two disulfide bonds. Chemokine receptors are consequently divided into four families based on the type of chemokine they bind, although no clear structural differences could be identified that would distinguish the receptor subfamilies (77). Chemokines play a vital role in leukocyte adhesion and extravasation. In various *in vitro* assays, chemokines support the chemotaxis or transendothelial migration of leukocytes (76), while *in vivo* injection (78) or over-expression of chemokines (79) results in leukocyte accumulation at the site of chemokine expression. Antagonists of chemokines prevent leukocyte trafficking (80) and have beneficial effects in several acute and chronic inflammatory models (81) (82). Chemokines also modulate angiogenesis (83), hematopoiesis (76), and T lymphocyte activation (84) (85), and several act as co-receptors with CD4 for entry of M-tropic and T-tropic HIV-1 (86) (87).

Interestingly, apart of their receptors, chemokines also interact with **glycosaminoglycans (GAGs)** on cell surfaces. Chemokines have been shown to bind to purified subfractions of heparin *in vitro* (88), as well as to naturally occurring GAGs such as heparan sulfate and chondroitin sulfate on the surface of endothelial cells both *in vitro* (89) (90) (91) and *in vivo* (92). The ability of chemokines to bind to GAGs is thought to be critical for chemokine biology.

It has been proposed that the immobilization of chemokines by GAGs forms stable, solid-phase chemokine foci and gradients necessary to direct leukocyte trafficking *in vivo* (93) (94). Binding of chemokines to cell surface GAGs may also serve to increase their effective local concentration, and consequently increase their binding to cell surface receptors (91). Additionally, GAG binding could potentially influence chemokine *t*_{1/2} *in vivo*. Chemokines display specific affinity according to GAGs families (88), consequently, a detailed understanding of chemokine-GAG interactions may be critical to appreciate functional distinctions among chemokines.

Recent studies have shown that certain constitutively expressed chemokines play, in conjunction with adhesion receptors, an important role in regulating homeostatic lymphocyte recirculation through secondary lymphoid organs, whereas others may help control tissue-specific targeting of lymphocytes to extralymphoid organs (34,95) (96) (97) (98) (99) (100).

2. Chemokines as regio-specific chemoattractants

One example is the **secondary lymphoid-tissue chemokine SLC, (6-CKine, CCL21)** which is expressed in the high endothelial venules (HEV) of lymph nodes and Peyer's patches, in the T cell areas of spleen, lymph nodes, and Peyer's patches, and in the lymphatic endothelium of multiple organs (101) (102). SLC acts through the receptor **CCR7** (103). SLC is a highly efficacious chemoattractant for lymphocytes with preferential activity toward naive T cells (101). Moreover, SLC induces firm adhesion of naive T lymphocytes via β 2-integrin binding to the counter receptor intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), a necessary step for lymphocyte recruitment. The only other molecule that has been demonstrated to activate lymphocyte β 2 integrin is GlyCAM-1, the L-selectin ligand expressed by endothelial cells in HEVs and secreted (104). It is possible that SLC and GlyCAM-1 act cooperatively to stimulate the firm adhesion of lymphocytes to HEV. The importance of SLC in T cell homing to secondary lymphoid organs is supported by the relative absence of T cells in the lymph nodes and Peyer's patches of *plt* mice (105) a spontaneous mutant strain deficient in the SLC gene expressed in high endothelium (106) (107). Interestingly, when SLC is injected subcutaneously into *plt* mice, afferent lymph apparently carries it into the draining node, where it is ultimately presented on the luminal surface of HEVs. In such reconstituted *plt* mice, the ability of T cells to adhere to HEVs and enter the organ is restored (96). Additionally, T cells homing *in vivo* in normal mice adhere almost exclusively to HEV sites presenting SLC protein (95).

Moreover as described in the later paragraphs, this chemokine is highly significant in cancer because CCR7 and its ligands CCL21 and CCL19 were shown recently to be involved in the metastasis process (108) (109) (110).

Another *tissue-selective chemokine is the thymus-expressed chemokine –TECK (CCL25)*. TECK is highly expressed in the small intestine (111-113) but not in other epithelia such as the digestive tract (including stomach and colon), skin, lung, or salivary gland (98). The TECK receptor, CCR9 is expressed by discrete subsets of circulating memory CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes expressing the intestinal homing receptor $\alpha 4\beta 7$, but not by other systemic memory lymphocyte subsets (111). This suggesting that CCR9 may be a receptor used preferentially by lymphocytes involved in aspects of gut immunity. Moreover, CCR9 is expressed on lymphocytes isolated from human small intestine (111). Together, this suggests a role for TECK and CCR9 in the intestinal immune compartment, but the extent to which this chemokine receptor–ligand pair is specifically associated with the intestinal versus other mucosal and epithelial sites remains to be deeper explored.

In the skin, two different chemokines play a critical part in homing specificity, *Thymus and activation-regulated chemokine TARC (CCL17)* and *Cutaneous T cell-attracting chemokine CTACK (CCL27)*. The CC-chemokine receptor CCR4 on T lymphocytes and its ligand, TARC are implicated in lymphocyte–endothelial cells interactions during lymphocyte recruitment to normal and inflamed cutaneous sites (99). Immunohistochemistry suggests that TARC is constitutively expressed and inducible on cutaneous venules and some other systemic venules, but is absent from vessels at sites of lymphocyte recruitment into the intestines. Moreover, its receptor CCR4 is highly expressed by CLA⁺ circulating skin memory lymphocytes, but not by the other memory cells, consistent with a role in tissue selective trafficking. In addition to lymphocyte arrest on endothelium, CCR4 supports diapedesis and chemotaxis. The CTACK chemokine is constitutively expressed by skin keratinocytes, also attracts cutaneous memory T cells (100). CTACK binds to the receptor CCR10 which is also specifically expressed on circulating skin-homing CLA⁺ T lymphocytes. CTACK may be transcytosed and presented on the endothelium (92). CTACK can be induced by the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β . CTACK and TARC can both support homing of T cells to skin, and either one or the other is required for lymphocyte recruitment in cutaneous delayed type hypersensitivity (114).

Malignancies (see below) as melanoma, which has a similar metastatic pattern as breast cancer but also a high incidence of skin metastases, show high expression levels of CCR10 in addition to CXCR4 and CCR7 (109).

The **mucosa-associated epithelial chemokine MEC (CCL28)** seems to have an important role in lymphocyte homing in extracutaneous epithelial tissues, including diverse mucosal organs. MEC mRNA is most abundant in salivary gland, with strong expression in other mucosal sites (colon, trachea, and mammary gland). Constitutively expressed by epithelial cells, MEC supports lymphocyte chemotaxis through CCR10 (97,115), a known CTACK receptor but also through CCR3 (97).

Consequently, CC chemokines are a family of locally produced molecules that can participate to define local specific characteristics, together with their receptors expression and modulation and due to the various presentations modes they use to anchor themselves to the cell surface.

3 Chemokine-mediated endothelium activation participate to tumor cell dissemination.

3.1 The angiogenic response

The vascular system formation is controlled by vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis is the vessel formation from angioblast, the progenitor of endothelial cell lineage (116). Angiogenesis is the development of a vascular system which requires degradation of basement membrane by proteases and invasion of the surrounding extracellular matrix by proliferation, migration and differentiation of ECs (117). In normal conditions, angiogenesis is a restricted phenomenon such as wound healing and menstruation. This process depends on the balance of proangiogenic and antiangiogenic factors (118,119). If the regulation of this balance is disrupted, angiogenesis can become a pathological process as it appears in cancers and/or in other diseases (120).

Some chemokines are angiogenic factors for ECs. Together with their receptors, chemokines regulate angiogenesis in physiopathological processes (121) such as cancer progression (122), atherosclerosis (123) and ischemia. Tumor cells produce angiogenic factors like VEGF (124,125) which is able to activate ECs by VEGF-receptor (126) to induce angiogenesis. The formation of new vessels to bring oxygen and nutrients is essential for tumor progression. Chemokines and their receptors act in cancer progression at several levels: by the regulation of tumor invasion and cancer metastasis, by activation/suppression of a host tumor-specific immunological response, by the stimulation of tumor cell proliferation in an autocrine fashion and by regulation of tumor-associated angiogenesis.

3.2 Chemokine and their receptors as determinants for tumor invasion and cancer metastasis

The angiogenesis/metastasis relationship and the importance of the balance of angiostatic/angiogenic factors are well documented (115,127,128).

In lymphocyte homing, chemokines partly control the good destination and non-random recirculation of lymphocytes (129). Tumor cells also use chemokines and their receptors to determine metastatic destination. The **CXCR4 and CCR7 receptors** are involved in breast cancer metastasis (109). Their respective ligands, **CXCL12/SDF-1 α (Stromal derived factor 1 α)** and **CCL21/SLC** are highly expressed in organs representing the main destinations of breast cancer metastases. CCR7 and its ligands CCL21 and CCL19/MIP-3 β were shown recently to be involved in metastasis (108-110).

The chemokine receptor CCR7 was found highly expressed in human breast cancer cells, malignant breast tumours and metastases (109). Breast cancer is characterized by a distinct metastatic pattern involving the regional lymph nodes, bone marrow, lung and liver. The CCR7 ligands, MIP-3 β and SLC, exhibit peak levels of expression in organs representing the first destinations of breast cancer metastasis. Wiley *et al.*, (110) showed that expression of CCR7 enhanced metastasis of murine melanoma cells to draining lymph nodes in mouse models and that inhibition of SLC blocked the metastasis to draining lymph nodes. Malignant melanoma, which have a similar metastatic pattern as breast cancer but also a high incidence of skin metastases, show high expression levels of CCR10 in addition to CXCR4 and CCR7 (109).

The **IL8** chemokine is up-regulated by inflammatory stimuli or by reduced microenvironmental oxygen pressure in glioblastomas and modulate different metastatic phenotypes associated with metastasis progression of colon carcinoma (130). The CXCR4 receptor is up-regulated by microenvironment of colon carcinoma and participate to proliferation and migration of micrometastasis (131).

In agreement with their organospecific properties (9,132), ECs express distinct chemokine receptors according to their tissue origin (133). The combination of chemokine/chemokine receptors distribution, and cross-talk could in part explain the organo-specificity and open new ways for antitumor therapy.

3.3 The glycosaminoglycans present and mediate the chemokine regio selective activity

The interaction of chemokines with glycosaminoglycans (GAGs) of the extracellular matrix proteoglycans is crucial for chemokine activities (134). A lot of studies showed the importance of this interaction, in particular to create the chemotactic gradient at the cellular surface. This interaction is not random but probably depends on the cellular surface GAGs composition which varies with the type and tissue location of endothelial cells (135). Heparan sulphate differ in structure and composition of sulphated domains among various tissues : this can explain the binding specificity of SDF-1 α on bone marrow endothelium (136).

A lot of studies deal with the chemokine-GAGs relationship (137,138), (139,140) (141-143). The understanding of chemokines-GAGS interactions can lead to new ways of therapeutic tools especially for HIV-1 infection (144,145).

3.4 Chemokines act as autocrine tumor growth factors

Some chemokines are able to stimulate proliferation of tumor cells by binding to cell surface specific receptors. IL8 is an autocrine factor in numerous types of cancers : malignant melanoma (146), colon carcinoma (147), neuroblastoma (148),... It was shown *in vitro* that the CXC **chemokine Growth regulated-oncogene GRO** is mitogenic for malignant melanoma cell lines (149,150).

Furthermore, they can act as angiogenic factors by interacting with specific receptors on ECs or by recruiting cells that produce angiogenic and mitogenic factors.

3.5 Chemokines in tumor angiogenesis

The presence of physiological and pathological angiogenesis is usually associated with inflammatory cell infiltrate. The relationship between angiogenesis and leukocyte infiltration in tumor growth, cardiovascular disease, chronic inflammation and wound healing is largely documented. The coordination of angiogenesis and inflammation is achieved by the ability of both ECs and leukocytes to respond to chemokines.

Chemokines are especially expressed by ECs in a timely and spatially restricted fashion (129) in order to regulate the recruitment of specific leukocytes and cell homing. Moreover, ECs express chemokine receptors.

The role of a specific chemokine/chemokine receptor couple in the modulation of angiogenesis has been illustrated (151).

Among the chemokine families, some CXC chemokines are identified as regulators of angiogenesis, acting either as angiogenic or angiostatic factors (152). It seems that the presence of the ELR motif correlates with an angiogenic activity (153,154). The CXC chemokines are divided in two groups : ELR+ and ELR- (Glu-Leu-Arg) chemokines. The involvement of this motif in angiogenesis was shown by mutagenesis experiments with an ELR+ chemokine, IL8 and an ELR- chemokine, Mig.

The Pro-angiogenic chemokines

The CXC chemokines :

-ELR+ chemokines as IL8 which was the first chemokine shown to stimulate endothelial cell chemotaxis, proliferation and *in vivo* angiogenesis (155).

-ELR – chemokines . SDF-1 α (CXCL12) and GRO- β (CXCL2) (156) are the few some exceptions which possess angiogenic activity without ELR motif.

The CC chemokines : CCL2 (MCP-1) is a positive mediator of angiogenesis and can directly contribute to tumor progression (157).

The CX3C chemokines : fractalkine has a positive effect on angiogenesis in rheumatoid arthritis (158).

The anti-angiogenic chemokines

The IP-10, Mig, PF4 chemokines inhibit endothelial cell proliferation and angiogenesis, by specific inhibition of growth factor-stimulated endothelial cell proliferation (159). SLC has an anti-tumoral effect by its angiostatic activity and chemoattraction of CD8⁺ T and NK cells.

Hypoxia is a prevalent parameter in many tumors. It contributes to aggressiveness and is one of the major reasons of therapeutic treatment failure. In the hypoxic tumoral environment, cells must adapt a strategy to activate expression of genes involved in oxygen delivery and metabolic adaptation. In this environment, the balance of angiogenic and angiostatic factors is disturbed and angiogenesis is highly stimulated. The cellular response to hypoxia is controlled in part by the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) transcription factor (160) : this factor is an important target for cancer chemotherapy (161).

Chemokine receptors and chemokines act in order to restore locally angiogenesis : low oxygen level induces high expression of the receptors. This was described for the CXCL12 receptor, CXCR4 (162), and RANTES chemokine (163).

4. Conclusion : Prospects for Cancer therapy designs

Activation/suppression of tumor-specific immunological response :

Immunotherapy research is developing tumor vaccines. Some chemokines, especially from the CC family, are able to activate a tumor-specific immune response because of their chemotactic properties towards monocytes, dendritic cells and T-cells, specific cells of immunity. Immuno-modulating factors produced in the microenvironment of a tumor could potentially determine whether or not an immune response can take place and what kind of immune cells will be recruited. Dendritic cells according to their maturation state, respond to different chemokines (164). So, the local production of one chemokine can influence the class of the immune response initiated : for example, CCL21/SLC was shown to mediate T-cell-dependent antitumor responses *in vivo* (165).

Inhibition of angiogenesis

A major focus of angiogenesis research has been the control of tumor growth in order to develop new therapeutic tools (166). One strategy consist to the asphyxiation of tumor by inhibiting the role of angiogenic factors. Some reviews discuss applications of angiogenesis inhibitors (167,168). An anti-cancer therapy is illustrated by the anti-tumor effect of some chemokines, acting as anti-angiogenic factors and attracting immune effector cells to the tumor site, as SLC and ELC (169,170).

Chemokine-chemokine receptor interaction jamming

A way is to inhibit the interaction of a chemokine receptor with its ligand with antibody or antagonist peptides. As such, CXCR4 antagonists inhibit primary brain tumor growth (171). Recent cancer immunotherapy uses cytokine-and chemokine-based gene therapy (172). Chemokine-cytokine fusion proteins are new therapeutic tools, designed to suppress growth and dissemination of metastases (173,174).

References

1. Duijvestijn, A. M., Kerkhove, M., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1987) *J Immunol* **138**, 713-719
2. Jalkanen, S., Steere, A. C., Fox, R. I., and Butcher, E. C. (1986) *Science* **233**, 556-558
3. Sher, B. T., Bargatze, R., Holzmann, B., Gallatin, W. M., Matthews, D., Wu, N., Picker, L., Butcher, E. C., and Weissman, I. L. (1988) *Adv Cancer Res* **51**, 361-390
4. Picker, L. J., and Butcher, E. C. (1992) *Annu Rev Immunol* **10**, 561-591
5. Nicolson, G. L. (1993) *Cancer Metastasis Rev* **12**, 325-343
6. Li, Y., Wang, M. N., Li, H., King, K. D., Bassi, R., Sun, H., Santiago, A., Hooper, A. T., Bohlen, P., and Hicklin, D. J. (2002) *J Exp Med* **195**, 1575-1584
7. Wei, Y. Q., Wang, Q. R., Zhao, X., Yang, L., Tian, L., Lu, Y., Kang, B., Lu, C. J., Huang, M. J., Lou, Y. Y., Xiao, F., He, Q. M., Shu, J. M., Xie, X. J., Mao, Y. Q., Lei, S., Luo, F., Zhou, L. Q., Liu, C. E., Zhou, H., Jiang, Y., Peng, F., Yuan, L. P., Li, Q., Wu, Y., and Liu, J. Y. (2000) *Nat Med* **6**, 1160-1166
8. Staroselsky, A. N., Mahlin, T., Savion, N., Klein, O., Nordenberg, J., Donin, N., Michowitz, M., and Leibovici, J. (1996) *J Exp Ther Oncol* **1**, 251-259
9. Kieda, C., Paprocka, M., Krawczenko, A., Zalecki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C., and Dus, D. (2002) *Endothelium* **9**, 247-261
10. Bizouarne, N., Mitterrand, M., Monsigny, M., and Kieda, C. (1993) *Biol Cell* **79**, 27-35
11. Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G. E. (1975) *J Cell Biol* **67**, 863-885
12. Risau, W. (1995) *Faseb J* **9**, 926-933.
13. Garlanda, C., and Dejana, E. (1997) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 1193-1202.
14. Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M., and Stern, D. M. (1998) *Blood* **91**, 3527-3561
15. Denis, V., Dupuis, P., Bizouarne, N., de, O. S. S., Hong, L., Leuret, M., Monsigny, M., Nakache, M., and Kieda, C. (1996) *J Leukoc Biol* **60**, 744-752
16. Girard, J. P., and Springer, T. A. (1995) *Immunol Today* **16**, 449-457.
17. Augustin, H. G., Kozian, D. H., and Johnson, R. C. (1994) *Bioessays* **16**, 901-906
18. Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M., Koivunen, E., Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1998) *J Clin Invest* **102**, 430-437.
19. Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1996) *Nature* **380**, 364-366.
20. Gowans, J., and Knight, E. (1964) *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **159**, 257-282
21. Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996) *Science* **272**, 60-66.
22. Picker, L. J., Martin, R. J., Trumble, A., Newman, L. S., Collins, P. A., Bergstresser, P. R., and Leung, D. Y. (1994) *Eur J Immunol* **24**, 1269-1277
23. Picker, L. J. (1994) *Curr Opin Immunol* **6**, 394-406
24. Salmi, M., and Jalkanen, S. (1997) *Adv Immunol* **64**, 139-218
25. Berg, E. L., Goldstein, L. A., Jutila, M. A., Nakache, M., Picker, L. J., Streeter, P. R., Wu, N. W., Zhou, D., and Butcher, E. C. (1989) *Immunol Rev* **108**, 5-18
26. Adams, D. H., and Shaw, S. (1994) *Lancet* **343**, 831-836
27. Springer, T. A. (1994) *Cell* **76**, 301-314.
28. Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A., and Engel, P. (1995) *Faseb J* **9**, 866-873
29. Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E., and Springer, T. A. (1995) *J Cell Biol* **128**, 1243-1253
30. Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., Nelson, R. D., Berg, E. L., Erlandsen, S. L., and Butcher, E. C. (1995) *Cell* **80**, 413-422
31. Lalor, P. F., Clements, J. M., Pigott, R., Humphries, M. J., Spragg, J. H., and Nash, G. B. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 1422-1426
32. Campbell, J. J., Qin, S., Bacon, K. B., Mackay, C. R., and Butcher, E. C. (1996) *J Cell Biol* **134**, 255-266
33. Luster, A. D. (1998) *N Engl J Med* **338**, 436-445
34. Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 336-341
35. Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998) *Science* **279**, 381-384.

36. Berg, E. L., Magnani, J., Warnock, R. A., Robinson, M. K., and Butcher, E. C. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **184**, 1048-1055
37. Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., and Seed, B. (1989) *Science* **243**, 1160-1165
38. Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., and Briskin, M. (1999) *Adv Immunol* **72**, 209-253
39. Cummings, R. D., and Smith, D. F. (1992) *Bioessays* **14**, 849-856
40. Fieger, C. B., Emig-Vollmer, S., Petri, T., Grafe, M., Gohlke, M., Debus, N., Semmler, W., Tauber, R., and Volz, B. (2001) *Biochim Biophys Acta* **1524**, 75-85
41. Gulubova, M. V. (2002) *Histochem J* **34**, 67-77
42. Li, L., Short, H. J., Qian, K. X., Elhammer, A. P., and Geng, J. G. (2001) *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 637-644
43. Picker, L. J., Kishimoto, T. K., Smith, C. W., Warnock, R. A., and Butcher, E. C. (1991) *Nature* **349**, 796-799
44. Tedder, T. F., Penta, A. C., Levine, H. B., and Freedman, A. S. (1990) *J Immunol* **144**, 532-540
45. Bizouarne, N., Denis, V., Legrand, A., Monsigny, M., and Kieda, C. (1993) *Biol Cell* **79**, 209-218
46. Berg, E. L., Yoshino, T., Rott, L. S., Robinson, M. K., Warnock, R. A., Kishimoto, T. K., Picker, L. J., and Butcher, E. C. (1991) *J Exp Med* **174**, 1461-1466
47. Bos, J. D., de Boer, O. J., Tibosch, E., Das, P. K., and Pals, S. T. (1993) *Arch Dermatol Res* **285**, 179-183
48. Picker, L. J., Michie, S. A., Rott, L. S., and Butcher, E. C. (1990) *Am J Pathol* **136**, 1053-1068
49. Santamaria Babi, L. F., Perez Soler, M. T., Hauser, C., and Blaser, K. (1995) *Immunol Res* **14**, 317-324
50. de Boer, O. J., Wakelkamp, I. M., Pals, S. T., Claessen, N., Bos, J. D., and Das, P. K. (1994) *Arch Dermatol Res* **286**, 304-311
51. Schweighoffer, T., Tanaka, Y., Tidswell, M., Erle, D. J., Horgan, K. J., Luce, G. E., Lazarovits, A. I., Buck, D., and Shaw, S. (1993) *J Immunol* **151**, 717-729
52. Duijvestijn, A. M., Horst, E., Pals, S. T., Rouse, B. N., Steere, A. C., Picker, L. J., Meijer, C. J., and Butcher, E. C. (1988) *Am J Pathol* **130**, 147-155
53. Meijer, C., Beljaards, F., Horst, E., Willemze, R., Van der Valk, P., and Pals, S. (1989) *J Invest Dermatol* **92**, 479
54. Noorduy, L. A., Beljaards, R. C., Pals, S. T., van Heerde, P., Radaszkiewicz, T., Willemze, R., and Meijer, C. J. (1992) *Histopathology* **21**, 59-64
55. De Boer, O. J., Horst, E., Pals, S. T., Bos, J. D., and Das, P. K. (1994) *Immunology* **81**, 359-365
56. Bargatze, R. F., Kurk, S., Butcher, E. C., and Jutila, M. A. (1994) *J Exp Med* **180**, 1785-1792
57. Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993) *Nature* **366**, 695-698
58. Hasslen, S. R., von Andrian, U. H., Butcher, E. C., Nelson, R. D., and Erlandsen, S. L. (1995) *Histochem J* **27**, 547-554
59. Shimizu, Y., and Shaw, S. (1993) *Nature* **366**, 630-631
60. Berg, E. L., Mullowney, A. T., Andrew, D. P., Goldberg, J. E., and Butcher, E. C. (1998) *Am J Pathol* **152**, 469-477
61. Hemmerich, S., Butcher, E. C., and Rosen, S. D. (1994) *J Exp Med* **180**, 2219-2226
62. Michie, S. A., Streeter, P. R., Butcher, E. C., and Rouse, R. V. (1995) *Am J Pathol* **147**, 412-421
63. von Andrian, U. H., Chambers, J. D., Berg, E. L., Michie, S. A., Brown, D. A., Karolak, D., Ramezani, L., Berger, E. M., Arfors, K. E., and Butcher, E. C. (1993) *Blood* **82**, 182-191
64. Yednock, T. A., Butcher, E. C., Stoolman, L. M., and Rosen, S. D. (1987) *J Cell Biol* **104**, 725-731
65. Streeter, P. R., Berg, E. L., Rouse, B. T., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1988) *Nature* **331**, 41-46.
66. Michie, S. A., Streeter, P. R., Bolt, P. A., Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1993) *Am J Pathol* **143**, 1688-1698
67. Vestweber, D., and Blanks, J. E. (1999) *Physiol Rev* **79**, 181-213
68. Imai, Y., Lasky, L. A., and Rosen, S. D. (1992) *Glycobiology* **2**, 373-381
69. Berg, E. L., Robinson, M. K., Mansson, O., Butcher, E. C., and Magnani, J. L. (1991) *J Biol Chem* **266**, 14869-14872
70. Nakache, M., Berg, E. L., Streeter, P. R., and Butcher, E. C. (1989) *Nature* **337**, 179-181
71. Picker, L. J., Nakache, M., and Butcher, E. C. (1989) *J Cell Biol* **109**, 927-937
72. Briskin, M., Winsor-Hines, D., Shyjan, A., Cochran, N., Bloom, S., Wilson, J., McEvoy, L. M., Butcher, E. C., Kassam, N., Mackay, C. R., Newman, W., and Ringler, D. J. (1997) *Am J Pathol* **151**, 97-110

73. Morgan, S. M., Samulowitz, U., Darley, L., Simmons, D. L., and Vestweber, D. (1999) *Blood* **93**, 165-175
74. Wagner, N., Lohler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., Rajewsky, K., and Muller, W. (1996) *Nature* **382**, 366-370
75. Drilenburg, P., van der Voort, R., Koopman, G., Dragosics, B., van Krieken, J. H., Kluin, P., Meenan, J., Lazarovits, A. I., Radaszkiewicz, T., and Pals, S. T. (1997) *Am J Pathol* **150**, 919-927
76. Taub, D. D., and Oppenheim, J. J. (1994) *Ther Immunol* **1**, 229-246
77. Mackay, C. R. (1996) *J Exp Med* **184**, 799-802
78. Taub, D. D., Anver, M., Oppenheim, J. J., Longo, D. L., and Murphy, W. J. (1996) *J Clin Invest* **97**, 1931-1941
79. Fuentes, M. E., Durham, S. K., Swerdel, M. R., Lewin, A. C., Barton, D. S., Megill, J. R., Bravo, R., and Lira, S. A. (1995) *J Immunol* **155**, 5769-5776
80. Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. (1993) *J Exp Med* **178**, 367-372
81. Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., and Matsushima, K. (1993) *Nature* **365**, 654-657
82. Karpus, W. J., Lukacs, N. W., McRae, B. L., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., and Miller, S. D. (1995) *J Immunol* **155**, 5003-5010
83. Gupta, S. K., Hassel, T., and Singh, J. P. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7799-7803
84. Zhou, Z., Kim, Y. J., Pollok, K., Hurtado, J., Lee, J. K., Broxmeyer, H. E., and Kwon, B. S. (1993) *J Immunol* **151**, 4333-4341
85. Taub, D. D., Turcovski-Corrales, S. M., Key, M. L., Longo, D. L., and Murphy, W. J. (1996) *J Immunol* **156**, 2095-2103
86. Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996) *Cell* **85**, 1135-1148
87. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996) *Science* **272**, 872-877
88. Witt, D. P., and Lander, A. D. (1994) *Curr Biol* **4**, 394-400
89. Rybak, M. E., Gimbrone, M. A., Jr., Davies, P. F., and Handin, R. I. (1989) *Blood* **73**, 1534-1539
90. Luster, A. D., Greenberg, S. M., and Leder, P. (1995) *J Exp Med* **182**, 219-231
91. Hoogewerf, A. J., Kuschert, G. S., Proudfoot, A. E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C. A., and Wells, T. N. (1997) *Biochemistry* **36**, 13570-13578
92. Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997) *Cell* **91**, 385-395
93. Rot, A. (1992) *Immunol Today* **13**, 291-294
94. Tanaka, Y., Adams, D. H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993) *Nature* **361**, 79-82
95. Warnock, R. A., Campbell, J. J., Dorf, M. E., Matsuzawa, A., McEvoy, L. M., and Butcher, E. C. (2000) *J Exp Med* **191**, 77-88.
96. Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., Matsuzawa, A., Quackenbush, E. J., Dorf, M. E., and von Andrian, U. H. (2000) *J Exp Med* **191**, 61-76.
97. Pan, J., Kunkel, E. J., Gossler, U., Lazarus, N., Langdon, P., Broadwell, K., Vierra, M. A., Genovese, M. C., Butcher, E. C., and Soler, D. (2000) *J Immunol* **165**, 2943-2949
98. Kunkel, E. J., Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Vierra, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Greenberg, H. B., Parker, C. M., Butcher, E. C., Andrew, D. P., and Agace, W. W. (2000) *J Exp Med* **192**, 761-768
99. Campbell, J. J., Haraldsen, G., Pan, J., Rottman, J., Qin, S., Ponath, P., Andrew, D. P., Warnke, R., Ruffing, N., Kassam, N., Wu, L., and Butcher, E. C. (1999) *Nature* **400**, 776-780
100. Morales, J., Homey, B., Vicari, A. P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., McEvoy, L. M., and Zlotnik, A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14470-14475
101. Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., and Williams, L. T. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 258-263.
102. Nagira, M., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Ridanpaa, M., Takagi, S., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997) *J Biol Chem* **272**, 19518-19524
103. Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., and Yoshie, O. (1998) *J Biol Chem* **273**, 7118-7122
104. Hwang, S. T., Singer, M. S., Giblin, P. A., Yednock, T. A., Bacon, K. B., Simon, S. I., and Rosen, S. D. (1996) *J Exp Med* **184**, 1343-1348

105. Nakano, H., Tamura, T., Yoshimoto, T., Yagita, H., Miyasaka, M., Butcher, E. C., Nariuchi, H., Kakiuchi, T., and Matsuzawa, A. (1997) *Eur J Immunol* **27**, 215-221
106. Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999) *J Exp Med* **189**, 451-460
107. Vassileva, G., Soto, H., Zlotnik, A., Nakano, H., Kakiuchi, T., Hedrick, J. A., and Lira, S. A. (1999) *J Exp Med* **190**, 1183-1188
108. Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H., and Mori, M. (2002) *Cancer Res* **62**, 2937-2941
109. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A. (2001) *Nature* **410**, 50-56
110. Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T., and Hwang, S. T. (2001) *J Natl Cancer Inst* **93**, 1638-1643
111. Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., Ebert, E. C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G. J., Yang, L. L., Soler, D., Butcher, E. C., Ponath, P. D., Parker, C. M., and Andrew, D. P. (1999) *J Exp Med* **190**, 1241-1256
112. Vicari, A. P., Figueroa, D. J., Hedrick, J. A., Foster, J. S., Singh, K. P., Menon, S., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Bacon, K. B., and Zlotnik, A. (1997) *Immunity* **7**, 291-301
113. Wurbel, M. A., Philippe, J. M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M. G., Malissen, M., Jordan, B. R., Malissen, B., Carrier, A., and Naquet, P. (2000) *Eur J Immunol* **30**, 262-271
114. Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2001) *J Exp Med* **194**, 1541-1547
115. Wang, J. M., Deng, X., Gong, W., and Su, S. (1998) *J Immunol Methods* **220**, 1-17
116. Flamme, I., Frolich, T., and Risau, W. (1997) *J Cell Physiol* **173**, 206-210
117. Risau, W. (1997) *Nature* **386**, 671-674
118. Keane, M. P., Arenberg, D. A., Moore, B. B., Addison, C. L., and Strieter, R. M. (1998) *Proc Assoc Am Physicians* **110**, 288-296
119. Moore, B. B., Keane, M. P., Addison, C. L., Arenberg, D. A., and Strieter, R. M. (1998) *J Investig Med* **46**, 113-120
120. Folkman, J. (1995) *Nat Med* **1**, 27-31
121. Murdoch, C., and Finn, A. (2000) *Blood* **95**, 3032-3043
122. Frederick, M. J., and Clayman, G. L. (2001) *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1-18
123. Lucas, A. D., and Greaves, D. R. (2001) *Expert Rev Mol Med* **2001**, 1-18
124. Fidler, I. J., and Ellis, L. M. (1994) *Cell* **79**, 185-188
125. Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M., and Thorgeirsson, U. P. (1996) *Cancer Res* **56**, 2013-2016
126. Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., and Ullrich, A. (1993) *Cell* **72**, 835-846
127. Ellis, L. M., and Fidler, I. J. (1996) *Eur J Cancer* **32A**, 2451-2460
128. Moore, B. B., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Keane, M. P., and Strieter, R. M. (1998) *J Lab Clin Med* **132**, 97-103
129. Kunkel, E., and Butcher, E. (2002) *Adv Exp Med Biol* **512**, 65-72
130. Li, A., Varney, M. L., and Singh, R. K. (2001) *Clin Cancer Res* **7**, 3298-3304
131. Zeelenberg, I. S., Ruuls-Van Stalle, L., and Roos, E. (2003) *Cancer Res* **63**, 3833-3839
132. Kieda, C., and Dus, D. (2003) *Adv Exp Med Biol* **535**, 79-94
133. Horuk, R. (2001) *Cytokine Growth Factor Rev* **12**, 313-335
134. Proudfoot, A. E., Handel, T. M., Johnson, Z., Lau, E. K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T. N., and Kosco-Vilbois, M. H. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1885-1890
135. Kuschert, G. S., Coulin, F., Power, C. A., Proudfoot, A. E., Hubbard, R. E., Hoogewerf, A. J., and Wells, T. N. (1999) *Biochemistry* **38**, 12959-12968
136. Netelenbos, T., Drager, A. M., van het Hof, B., Kessler, F. L., Delouis, C., Huijgens, P. C., van den Born, J., and van Dijk, W. (2001) *Exp Hematol* **29**, 884-893
137. Goger, B., Halden, Y., Rek, A., Mosl, R., Pye, D., Gallagher, J., and Kungl, A. J. (2002) *Biochemistry* **41**, 1640-1646
138. Spillmann, D., Witt, D., and Lindahl, U. (1998) *J Biol Chem* **273**, 15487-15493
139. Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A., and Lortat-Jacob, H. (2001) *J Biol Chem* **276**, 8288-8296

140. Amara, A., Lorthioir, O., Valenzuela, A., Magerus, A., Thelen, M., Montes, M., Virelizier, J. L., Delepierre, M., Baleux, F., Lortat-Jacob, H., and Arenzana-Seisdedos, F. (1999) *J Biol Chem* **274**, 23916-23925
141. Stura, E. A., Martin, L., Lortat-Jacob, H., Vives, R., and Vita, C. (2002) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 1670-1673
142. Vives, R. R., Sadir, R., Imberty, A., Rencurosi, A., and Lortat-Jacob, H. (2002) *Biochemistry* **41**, 14779-14789
143. Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M., and Vita, C. (2001) *Biochemistry* **40**, 6303-6318
144. Trkola, A., Gordon, C., Matthews, J., Maxwell, E., Ketas, T., Czaplewski, L., Proudfoot, A. E., and Moore, J. P. (1999) *J Virol* **73**, 6370-6379
145. Burns, J. M., Gallo, R. C., DeVico, A. L., and Lewis, G. K. (1998) *J Exp Med* **188**, 1917-1927
146. Schadendorf, D., Moller, A., Algermissen, B., Worm, M., Sticherling, M., and Czarnetzki, B. M. (1993) *J Immunol* **151**, 2667-2675
147. Brew, R., Erikson, J. S., West, D. C., Kinsella, A. R., Slaviv, J., and Christmas, S. E. (2000) *Cytokine* **12**, 78-85
148. Ferrer, F. A., Pantschenko, A. G., Miller, L. J., Anderson, K., Grunnet, M., McKenna, P. H., and Kreuzer, D. (2000) *J Urol* **164**, 1016-1020
149. Luan, J., Shattuck-Brandt, R., Haghnegahdar, H., Owen, J. D., Strieter, R., Burdick, M., Nirodi, C., Beauchamp, D., Johnson, K. N., and Richmond, A. (1997) *J Leukoc Biol* **62**, 588-597
150. Fujisawa, N., Sakao, Y., Hayashi, S., Hadden, W. A., 3rd, Harmon, C. L., and Miller, E. J. (2000) *J Cancer Res Clin Oncol* **126**, 19-26
151. Bernardini, G., Ribatti, D., Spinetti, G., Morbidelli, L., Ziche, M., Santoni, A., Capogrossi, M. C., and Napolitano, M. (2003) *J Immunol Methods* **273**, 83-101
152. Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2000) *J Leukoc Biol* **68**, 1-8
153. Strieter, R. M., Polverini, P. J., Arenberg, D. A., and Kunkel, S. L. (1995) *Shock* **4**, 155-160
154. Strieter, R. M., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., and et al. (1995) *J Biol Chem* **270**, 27348-27357
155. Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G., and Strieter, R. M. (1992) *Science* **258**, 1798-1801
156. Salcedo, R., and Oppenheim, J. J. (2003) *Microcirculation* **10**, 359-370
157. Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., and Murphy, W. J. (2000) *Blood* **96**, 34-40
158. Volin, M. V., Woods, J. M., Amin, M. A., Connors, M. A., Harlow, L. A., and Koch, A. E. (2001) *Am J Pathol* **159**, 1521-1530
159. Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., and Sharpe, R. J. (1990) *Science* **247**, 77-79
160. Pugh, C. W. (2003) *Ann Med* **35**, 380-390
161. Welsh, S. J., and Powis, G. (2003) *Curr Cancer Drug Targets* **3**, 391-405
162. Schioppa, T., Uranchimeg, B., Saccani, A., Biswas, S. K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Saccani, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., and Sica, A. (2003) *J Exp Med* **198**, 1391-1402
163. Adler, E. P., Lemken, C. A., Katchen, N. S., and Kurt, R. A. (2003) *Immunol Lett* **90**, 187-194
164. Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M. C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., and Vicari, A. (2000) *Springer Semin Immunopathol* **22**, 345-369
165. Sharma, S., Stolina, M., Luo, J., Strieter, R. M., Burdick, M., Zhu, L. X., Batra, R. K., and Dubinett, S. M. (2000) *J Immunol* **164**, 4558-4563
166. Van Der Bilt, J. D., and Borel Rinkes, I. H. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1654**, 95-104
167. Voest, E. E. (1996) *Anticancer Drugs* **7**, 723-727
168. Folkman, J., and Ingber, D. (1992) *Semin Cancer Biol* **3**, 89-96
169. Nomura, T., and Hasegawa, H. (2000) *Anticancer Res* **20**, 4073-4080
170. Arenberg, D. A., Zlotnick, A., Strom, S. R., Burdick, M. D., and Strieter, R. M. (2001) *Cancer Immunol Immunother* **49**, 587-592
171. Rubin, J. B., Kung, A. L., Klein, R. S., Chan, J. A., Sun, Y., Schmidt, K., Kieran, M. W., Luster, A. D., and Segal, R. A. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13513-13518

172. Chada, S., Ramesh, R., and Mhashilkar, A. M. (2003) *Curr Opin Mol Ther* **5**, 463-474
173. Ruehlmann, J. M., Xiang, R., Niethammer, A. G., Ba, Y., Pertl, U., Dolman, C. S., Gillies, S. D., and Reisfeld, R. A. (2001) *Cancer Res* **61**, 8498-8503
174. Nakahara, K., and Sakata, T. (2003) *J Gene Med* **5**, 463-471

Partie II : Article soumis à publication dans le journal « Experimental Cell Research ».

« Original human endothelial cell lines as a proof of chemokines contribution to organospecificity »

Claire Crola¹, Nathalie Lamerant¹, Michèle Mitterrand¹, Maria Paprocka² and Claudine Kieda¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS affiliated to Orléans University, Rue Charles Sadron ,45071 Orléans Cedex 2, France

² IITD, PAN, Wroclaw, Poland

Original human endothelial cell lines as a proof of chemokines contribution to organospecificity

Claire Crola¹, Nathalie Lamerant¹, Michèle Mitterrand¹, Maria Paprocka² and Claudine Kieda¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS affiliated to Orléans University, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France

² IITD, PAN, Wroclaw, Poland

ABSTRACT

Organ- and tissue-characteristic endothelial cells (ECs) control leukocytes recruitment and receptor targeted molecules entry from blood into lymphoid organs or inflammation tissue sites. Activity of chemokines (CKs) and chemokine receptors (CKRs) expression according to EC origin and, as a function of the microenvironment participate to provide ECs their selectivity. This work aimed to elucidate the *in vivo* mechanisms by which CKs and their receptors refine ECs specific properties. The use of an original cellular model based on organospecific, immortalised and stabilised EC lines helped to argue CK organospecificity. Three EC lines derived from lymphoid organs significant for homing cell selection and, two lines derived from non lymphoid tissues were compared for the presence of CKRs and CK expression and presentation, as well as for their role in lymphocyte recruitment and activity in angiogenesis.

The results showed that the specificity did not correspond to CKR surface presence on ECs since CX3CR1, CXCR4, CCR5 and CCR7 were detectable in all the endothelial cell lines. The lack of correlation between CKR expression and their corresponding CK binding: fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6CKine, pointed out the importance of other regulation pathways. Moreover, we demonstrated for two of these CKs, that the biological activity, in terms of lymphocyte recruitment and angiogenesis was clearly EC line-restricted.

This new, original, cellular model, used in this work evidenced *in vitro* the role of chemokines as conferring a hallmark to endothelium organospecificity and targeting potentialities.

Keywords : chemokine . chemokine receptors . endothelium . adhesion . organo-specificity angiogenesis

INTRODUCTION

Response to tissue damages, infection or immune reactions require orchestrated molecular events as a result from a multistep process which controls the highly specific and regulated leukocyte recruitment. ECs activation upregulates (1) a number of inducible cell adhesion molecules such as selectins, integrins and soluble factors as cytokines and CKs contribute to this chronologically controlled cascade of events (2).

The homing selectivity of invasive cells, pathological or not, depends on the specificity of the receptors expressed and controlled on the endothelium by microenvironment. Among these molecules which confer the endothelium specificity, there are CKs and their receptors which participate to the adhesion cascade. It was reported that CKs play

an important role in making the recognition specific (3). They have complex properties such as chemoattractants (4), but also as adhesion molecules (5), as angiogenic factors (6) and viral infection-suppressive factors (7). They are often upregulated by environmental stimuli as during inflammation, cancer and other pathological situations. Their activity is described to be essentially mediated and signalled by their binding to seven-transmembrane-domain G protein-coupled receptors (8).

To elucidate the molecular mechanisms which confer the endothelium its organo selectivity and as such makes the endothelial cells the decision makers for cell and tissue invasion, we have designed an *in vitro* cellular model. We immortalised ECs from distinct organ- and vessel type- origins and stabilised their phenotype (9). To approach the lymphocyte homing molecular process, the model lines were

made from peripheral lymph nodes (HPLNEC.B3) as opposed to mucosal tissue-associated high endothelial cells (HAPEC) and to be compared mesenteric lymph nodes (HMLNEC). These represent the main secondary lymphoid organs where to lymphocytes subpopulations are routing and differentially homing (10). We compare them to non lymphoid endothelial cells from skin (HskMEC) and brain (HBrMEC) microvasculature because of their common embryonic lineage but distinct maturation and thus resulting in distinct biological behaviour.

To validate the hypothesis according to which cell homing specificity could partly result from CKs provided their expression and action are restricted in an organ-selective way, we investigated the distribution of CKRs and related to binding of their corresponding CK ligands.

This study concerns four CKRs (CX3CR1, CXCR4, CCR5 and CCR7) and their respective ligands (fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6Ckine) chosen because of their implication in lymphocyte homing. Indeed, it was reported that fractalkine (FKN), a transmembrane CK, is expressed in mucosal sites such as intestine or appendix. Fractalkine interacts with its receptor, CX3CR1 on leukocytes to induce firm adhesion (11), (5).

The 6Ckine CK, also called SLC (Secondary Lymphoid tissues Chemokine) and Exodus-2, is constitutively expressed in the secondary lymphoid tissues such as lymph nodes, appendix, spleen (12). It is the functional ligand for CCR7 (13), a receptor which is highly expressed in various lymphoid tissues and on blood T and B lymphocytes (14).

CKRs, such as CXCR4, CCR5 with their respective ligands SDF1 α and RANTES, are involved in various processes such as leukocyte recruitment (15), intercellular communication in brain and HIV infection for example (16).

This paper, demonstrates that CKR expression did not correlate with the level of binding of their respective ligands. Moreover, we showed that CK action is endothelial cell origin-selective. This could be evidenced and measured by their ability to activate the EC adhesion activity in a CK selective way as shown here by the clear cut action of the 6Ckine towards HPLNEC.B3 and of the fractalkine towards HAPEC, while RANTES displayed a non related but specific activity and SDF-1 α was not involved in adhesion activation.

Angiogenesis induced by the CKs activity towards endothelial cells confirmed the observed selectivity by which a CK acts in an EC type restricted way. As exemplified here by the fractalkine pro-angiogenic activity selective for mucosal and skin-derived EC line.

As such, these CKs and their receptors contributed to validate the endothelium organo-specificity hypothesis (9).

MATERIALS AND METHODS

Endothelial cell lines

Immortalized and stabilised endothelial cell lines concerned in this study are three lines from secondary lymphoid organs:

HAPEC.1 : Human Appendix Endothelial Cells

HPLNECB3 : Human Peripheral Lymph Nodes Endothelial Cells clone B3

HMLNEC : Human Mesenteric Lymph Nodes Endothelial Cells and two lines from non-lymphoid organs:

HBrMEC : Human Brain Microvascular Endothelial Cells

HskMEC : Human Skin Microvascular Endothelial Cells

Endothelial cell culture

Cells were cultured in OptiMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 2% fetal bovine serum (BioWest, AbCys, Paris, France), 40 μ g/mL gentamycin (Invitrogen), 50 ng/mL fungizone (Invitrogen). Cells were seeded at 2×10^4 cells/cm², 48 hours before the experiment. Cells were maintained at 37°C under a 5% CO₂/95% air atmosphere and after 24 hours, cells were placed in serum- and antibiotics-free medium.

Reagents and antibodies

Recombinant human CKs : fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6Ckine were from R&D systems (Abingdon, UK). Goat IgG anti-human CK polyclonal antibodies, i.e. anti-fractalkine, anti-SDF-1 α , anti-RANTES and anti-6Ckine, were from R&D system. Secondary antibody was FTC-rabbit IgGs anti-goat IgGs (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Rabbit polyclonal Igs anti-human CX3CR1 was from eBioscience (San Diego, CA). Mouse IgGs monoclonal antibodies anti-human CKRs i.e.: CXCR4, CCR5 were from BD Pharmingen (San Diego, CA). Mouse monoclonal IgGs anti-human CCR7 was from R&D systems. For flow cytometry analysis, secondary antibodies were FTC-goat Igs anti-mouse IgGs (Sigma-Aldrich) and FTC goat IgGs anti-rabbit IgGs (Pharmingen). For western blotting analysis, the secondary antibodies were AP (alkaline phosphatase) coupled goat Igs anti-mouse IgGs (Sigma-Aldrich) and AP-goat IgGs anti-rabbit IgGs (Biorad, Hercules, USA).

Detection of chemokine receptors and chemokines in endothelial cells

Chemokine receptors detection

About 5×10^6 cells were washed twice with c-PBS (complete Phosphate Buffered Saline) (1M CaCl₂, 0,5M MgCl₂)-0.5% BSA (bovine serum albumin) w/v (Sigma-Aldrich)-0.1% NaN₃ w/v (Merck-Eurolab, Strasbourg, France). ECs were detached from 75 cm² cultured plates by 0.5 mg/mL type-I collagenase (Invitrogen) in a c-PBS-0.5%BSA (w/v) solution. After washings with c-PBS, cells were incubated in the presence of 5µg/mL of primary antibody against human CKRs for 30 minutes at 37°C and then fixed by a 2% (w/v) PFA (paraformaldehyde, Merck-Eurolab) solution in c-PBS for 10 minutes at 37°C. Reaction was stopped by washings with c-PBS solution and cells were incubated with 0.2M urea (Merck-Eurolab) in c-PBS for 10 min at room temperature and washed, then incubated with FTC-goat Igs anti-mouse IgGs (20µl of a 1/100 dilution in c-PBS) for 30 minutes at 4°C. For total cell CKRs detection, cells were permeabilized with 1% (w/v) PFA-0.2% (w/v) saponine (Merck-Eurolab) in c-PBS before incubation with primary antibodies, the further washings and incubations were performed in 0.2 % saponine solution in c-PBS.

Chemokine binding and presentation by endothelial cells

Cells were prepared as described above for CKRs detection and then incubated v/v with the studied CK for 30 minutes at 37°C. Cells were washed and fixed as described before. Then, cells were incubated with

500ng/mL goat IgGs anti-human CK antibodies for 30 minutes at 37°C. Bound CK detection was achieved by a third incubation in the presence of FTC-rabbit IgGs anti-goat IgGs (20µl of 1/200 dilution) for 30 minutes at 4°C.

For total cell CK fixation, cells were permeabilized with 1% (w/v) PFA-0.2% (w/v) saponine (Merck-Eurolab) in c-PBS before incubation with the CKs.

Western blotting analyse

Cells were lysed with a 10mM Tris-1% SDS solution and protein concentration was normalized by determination of the total protein amount using BCA method. Per lane, 25µg of total protein extract was allowed to migrate in sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After migration, proteins were blotted to nitrocellulose membrane by electro-transfer. Proteins were detected by staining the membrane using specific AP-coupled antibodies against CKRs followed by colorimetric detection. Revelation was obtained by addition of the reaction substrate: NBT/BCIP: (Nitroblue Tetrazolium /Bromochlorylindolophosphate) mixture (Promega, Madison, USA).

Endothelial cell stimulation by chemokines and adhesion

ECs were seeded in 24 well-plates (Falcon, Grenoble, France) at 2×10^4 /cm². After 48 hours of culture ECs stimulated by increasing concentrations of CKs (fractalkine, SDF-1α, RANTES and 6CKine) for 90 minutes up to 5 hours. After stimulation, cells were washed twice with PBS and incubated (20 minutes at 4°C) with a previously PKH26-labeled CEMT4 lymphocytes suspension in a 5 lymphocytes to one EC1 proportion. After gentle washings, to protect the lymphocytes specifically bound to endothelial cells, cells were detached by a trypsin/EDTA solution, washed and analysed by flow cytometry as below described.

Flow cytometry analyses

The results were analysed by flow cytometry on a FACS Sort (BD, Sunnyvale, CA, USA). Data were collected on ten thousand cells (gated by forward and side scatters). Mean channels of fluorescence

intensity were calculated with the use of CellQuest software (Becton Dickinson).

For CK fixation and CKR detection, FTC antibodies (λ_{ex} : 488nm, λ_{em} : 520nm) permit to analyse the results in relative fluorescence intensity rFI.

For adhesion experiments: the ratio of PKH labeled-CEMT4 and non-labeled endothelial cells was evaluated after excitation at 488 nm and emission at 560 nm. The results were expressed as the number of CEMT4 per 100 ECs.

Angiogenesis : “*in vitro*” assay

Angiogenesis was performed on Matrigel™-coated 24-well plates (BD Biosciences). The matrigel contains extracellular matrix proteins and growth factors which permit to ECs to form spontaneously pseudo-vessels. After coating, cells were seeded at 5×10^4 cells per well. Once adhesion on the matrix was achieved, cells were incubated in the presence of CKs dissolved in OptiMEM at recommended concentrations. The rearrangement of the cells and pseudo-vessels formation were followed under the inverted microscope (Axiovert 200, Zeiss). The qualitative analysis consist into taking pictures at several time lapses and to compared them to the controls performed in the absence of CKs and thus evaluating the effect of the molecule towards vessel formation kinetics

RESULTS

This study concerns five endothelial cells lines. It has been shown (9) that the endothelial cell lines, immortalized *in vitro*, could conserve the general endothelial characteristics, as compared to *in vivo* endothelium phenotype, such as the presence of angiotensin converting enzyme (ACE), von Willebrand factor or VE-cadherin. So, they constitute a good *in vitro* model for the study of endothelium organospecificity. Here, we compare three lines from secondary lymphoid organs such as appendix, peripheral lymph nodes and mesenteric lymph nodes and two lines isolated from non lymphoid tissues such as brain and skin.

Endothelial cells express CX3CR1, CXCR4, CCR5 and CCR7.

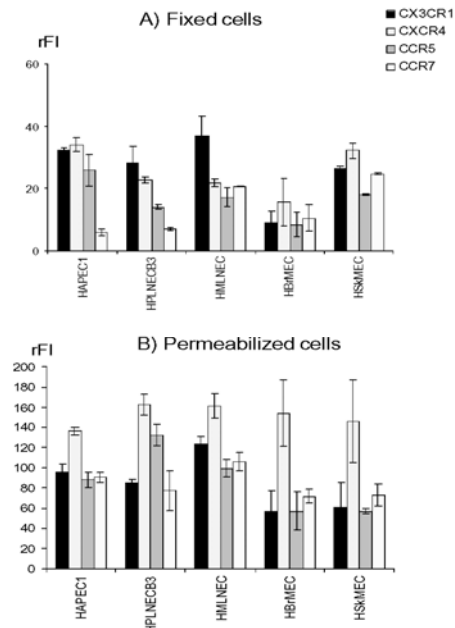


Figure 1. Endothelial chemokine receptors : distinct expression levels according to the endothelium origin. (A) cell surface detection of chemokine receptors on fixed HAPECI, HPLNECB3, HMLNEC, HBrMEC and HSkMEC. and (B) detection of global amount of chemokine receptors after permeabilization. The results were expressed in the relative fluorescence intensity (rFI), data are from a typical experiment in triplicate

CKRs on ECs were detected by specific antibodies on fixed and permeabilized ECs as shown on Figure 1 which reports data from cytochemical labeling and flow cytometry detection. Results are expressed as the relative fluorescence intensity calculated from the difference between the sample FI minus the isotopic control. All four receptors could be detected in every EC lines but their expression level varied according to the EC line origin. Figure 1 A represents the detection of CKRs on the cell surface (fixed cells), CX3CR1 was highly expressed on the three lymphoid organ derived cells and skin cells but poorly on brain EC. Figure 1 B confirms the poor expression of CX3CR1 in brain and its high expression on HMLNEC. CXCR4 was the main receptor detected in large quantities in all five lines. CCR5 is expressed in HPLNECB3 where it is more expressed than in mucosal and mesenteric ECs. It is poorly expressed in non lymphoid organs ECs (skin and brain). CCR7 was also expressed in the five lines but especially in the HMLNEC and on the HSkMEC surface, while it is mainly detected inside the lymphoid organ derived

ECs, the highest concentration of CCR7 was found in HMLNEC.

It has to be noticed that total receptors detection in ECs (Fig.1B) as obtained after saponine permeabilisation, indicated that the highest overall expression was observed for CXCR4 and the expression in the five EC lines appeared significantly more intense inside the cells than on the surface (from 3 to 10 times).

Chemokines bind to and are presented by endothelial cells

In order to establish the link between receptor expression and the binding capacity of CKs by ECs, we have studied the CKs corresponding to the selected receptors, i. e.: fractalkine, SDF-1 α , 6CKine, Rantes. The ability of CK molecules to bind ECs, was assessed after CKs had been incubated with ECs as described in materials and methods.

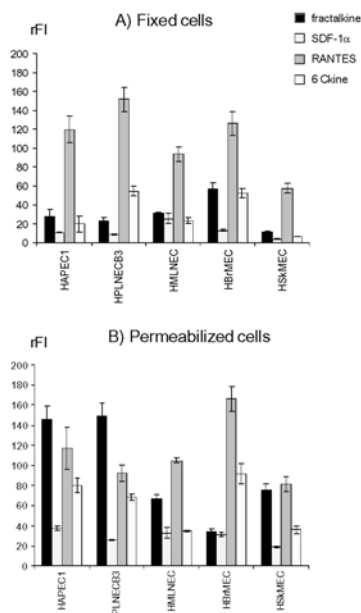


Figure 2. Chemokines are differently binding endothelial cells. Chemokine binding varies as a function of the endothelial cell origin, on fixed cells (A) and in permeabilized cells (B). Chemokine binding was detected by their specific antibodies analyzed by flow cytometry. Results give the relative fluorescence intensity (rFI), they are data from a typical experiment in triplicate.

Data shown on figure 2 express the rFI of ECs to which CKs have been allowed to bind and were then

detected on the cell surface (figure 2 A). The five EC lines bound mainly RANTES and poorly SDF-1 α , as opposed to the distribution expected from the receptor detection data. Lymphoid organ-derived cells bound differently the 6CKine which was mainly recognized by HPLNECB3. While HBrMEC was binding efficiently 6CKine on the cell surface (Figure 2A), permeabilized cells (Figure 2B) displayed high amounts of the bound cytokine in HPLNECB3, HAPEC and HBrMEC. Fractalkine was mainly evidenced to bind the brain derived cell surface while it was preferentially found to bind mucosal and peripheral lymphoid organ permeabilised ECs. In a general approach, CK binding was higher in permeabilized cell than in fixed cells. This was especially true for fractalkine (Fig 3B) and to a lesser extent, for 6CKine. RANTES presented approximately the same binding level on fixed cells and after cell permeabilization. SDF-1 α bound poorly to the surface and inside each EC line tested as well. Considering, the fact that CKs were detected in each EC line tested but with distinct binding profiles, the results compared to receptors expression data could not draw out any clear correlation.

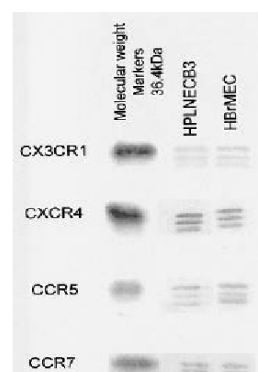


Figure 3. Western blotting for chemokine receptors. Chemokine receptors CX3CR1, CXCR4, CCR5, CCR7, were detected on HPLNECB3 and HBrMEC with specific antibodies and revealed by PA-colorimetric reaction from 25 μ g of total protein. A triple band was revealed around 36.4kD and corresponds to chemokine receptor Mr.

Western blotting for chemokine receptors

We completed flow cytometry analyses by biochemical detection of chemokine receptors. The results were illustrated by HPLNECB3 and HBrMEC and presented on the figure 3. As demonstrated here with these two lines, the four CKRs were detected as a triple band close to 36,4kDa. This triplicate can be attributed to the original form and the truncated forms of chemokine receptor. The four receptors were present in the five tested endothelial cell lines (data not shown) and this corroborates the results obtained by flow cytometry analyses.

Chemokine-mediated endothelial cell specific modulation of CEMT4 adhesion

The biological significance of CK selective distribution and expression as well as restricted binding to endothelial cells was assessed by estimation of their putative effect in the leukocyte to EC adhesion process. For this assay, ECs were submitted to CKs for various periods of time and this was followed by an adhesion test as described under materials and methods. We analysed the lymphocyte adhesive behaviour towards the three EC lines from lymphoid tissues: peripheral, mucosal, mesenteric and the two from non lymphoid organs, brain and skin. The results are shown in Figure 4. Upon stimulation by fractalkine, HAPEC (Fig 4A), displayed a significantly increased adhesion capacity for CEMT4 cells. This effect is restricted to fractalkine and is clearly enhanced by a five hours stimulation by the cytokine. Whereas 6Ckine provoked a very small increase, SDF-1 α and RANTES have no effect on the mucosal derived EC line (HAPEC). The lymphocyte recruitment increase was time and CK concentration-dependent : maximal effect was obtained after a 5 hours stimulation with a 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fractalkine solution. On Figure 4B, HPLNECB3 were shown to display a 6Ckine specificity. The highest effect on CEMT4 adhesion increase was obtained after 5 hours in the presence of 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 6Ckine solution. Although RANTES increased significantly the CEMT4 adhesion after 90 minutes, this effect disappeared by 5 hours. Fractalkine and SDF-1 α had no effect towards PLN derived ECs. In the case of HMLNEC (Fig 4C), we observed a mixed profile and a reduced activation effect of CKs as compared to peripheral lymphoid or mucosal derived ECs. Indeed, fractalkine, 6Ckine and RANTES were able to slightly increase the lymphocyte recruitment after a 90 minutes incubation with fractalkine (0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 6Ckine (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and, after a 5 hours incubation with RANTES (0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

An opposite effect was observed only with SDF-1 α , which reduced the adhesion in the three lymphoid cell lines tested, whatever concentrations and incubation times.

Interestingly, the EC lines from brain and skin, were not significantly affected by CK in their lymphocyte binding activity.

As exemplified in Figure 4 D, after a 90 minutes stimulation by fractalkine (at 0.001 and 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RANTES (at 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a decrease of the adhesion capacity could be shown for HBrMEC. No significant effect was seen for the other CKs except SDF-1 α (5 hours incubation, 0.009 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RANTES (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in which case a small increase of adhesion level could be observed. Similarly, HSkMEC (Figure 4E), submitted to a 90 minutes stimulation by fractalkine (at 0.001 and 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$), displayed a weak decrease of adhesion after treatment as observed above with HBrMEC. An increase could be noticed with SDF-1 α (at 0.003 and 0.006 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and RANTES (at the three tested concentrations) but no significant effect with 6Ckine. After, 5 hours of stimulation, there was no significant effect of CKs except a 6Ckine induced increase of the adhesion level.

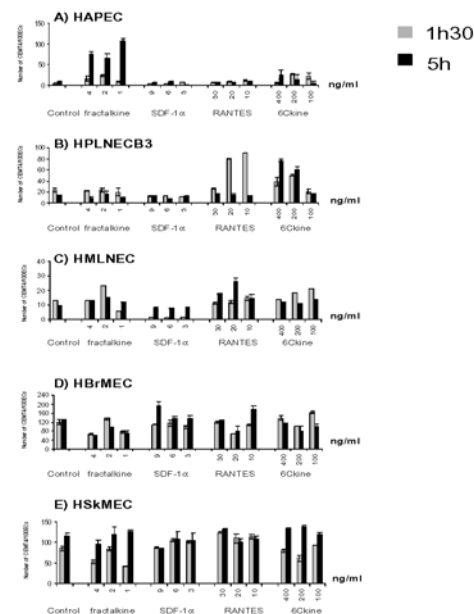


Figure 4. Chemokines selectively regulate endothelial cells adhesion capacity. Lymphocyte adhesion on HAPEC1 (A), HPLNECB3 (B), HMLNEC (C), HBrMEC (D) and HSkMEC (E) was estimated after stimulation by fractalkine, SDF-1 α , RANTES and 6Ckine. Endothelial cell adhesion-capacity towards CEMT4 lymphocytic cells was quantified by flow cytometry. Data are given as the number of PKH 26 labelled CEMT4 (FL2) bound per one endothelial cell. Data are from a typical experiment conducted in triplicate.

Fractalkine specifically modulate angiogenesis *in vitro*

We have realized a series of angiogenesis experiments conducted to assess for the eventual detection of CK pro or anti angiogenic properties as a function of the CK type as well as the EC type and origin. The results were illustrated here by fractalkine and its effect on the kinetics of endothelial cell angiogenesis (figure 5).

Compared to the control on matrigel without chemokine, the presence of fractalkine at 10pM favoured significantly the formation of pseudo-vessels for HAPEC and HSkMEC whereas there is no significant effect on HMLNEC. Fractalkine had no effect on HPLNECB3 but can weakly accelerate the rearrangement of HBrMEC (data not shown).

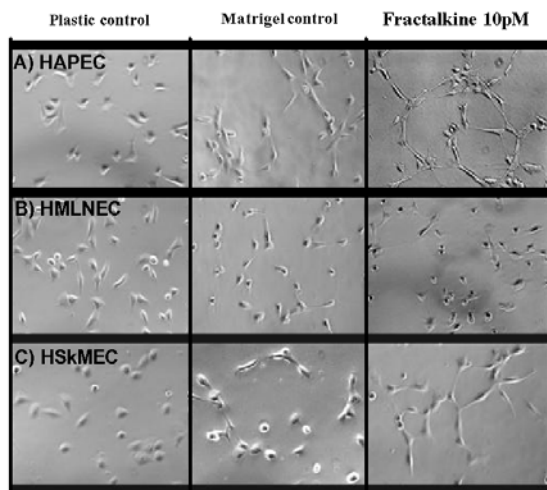


Figure 5 : *Fractalkine acts specifically on angiogenesis of HAPEC and HSkMEC. After 5 hours in the presence of fractalkine at 10pM, the rearrangement of cells and formation of pseudo-vessels of HAPEC (A), HMLNEC (B) and HSkMEC (C) were followed and compared to the control without chemokine.*

DISCUSSION

This work confirms that the expression of CKRs, the binding and activities of CKs towards ECs, bring news insights to explain the endothelium organospecificity and ultimately the cell homing specificity.

Flow cytometry experiments to detect CKRs showed that the presence or absence of CKRs on ECs cannot give the direct explanation of this specificity. Indeed, the CKRs investigated in this study, were

expressed in all EC lines even though the expression levels differed according to endothelium origin. The presence of the receptors in all endothelial cell lines was confirmed by western blotting analyses. CKs are able to dimerize in order to bind both EC and leukocyte CKRs (17). Consequently, their receptor can serve, in addition to signal transduction, as a mean to present CK active site to other cell surface receptors. Here, we observed that the measured amounts of bound CKs did not correlate with the level of expression of their corresponding receptors (for example, SDF-1 α poorly bound and CXCR4 was highly expressed) this rules out the dimerization mechanism for SDF-1 α to be a binder to both EC and leukocytes. This suggests that, while CK receptors could represent the signal transduction pathway, they might not the only means for CK presentation. Such a lack of correlation between receptors expression and CKs binding activity to EC lines was also observed for the fractalkine and CX3CR1, RANTES and the CCR5 as well as 6Ckine and CCR7. This, consequently, suggests the role of glycosaminoglycans (GAGs) in CKs presentation and action of CKs, which is under active investigation for its high significance during invasive processes. As cited above, the biological activity of CKs is mediated via seven transmembrane receptors (coupled to G-proteins) on ECs and other cell types (like leukocytes) but their activity is also influenced by their association with GAGs (18). Indeed, GAGs, are components of the extracellular matrix and cell surfaces. They can act as an antenna to concentrate the CKs close to the receptor thus, they participate to the formation of the cell surface chemotactic gradient. Moreover, GAGs help to present CKs to specific cell surface receptors and permit their protection from proteolytic degradation (19). As it was shown that composition of cell surface GAGs depend on the location and the type of endothelium, GAGs may contribute to the selectivity of leukocyte recruitment by controlling the type of CK which are able to bind on specific GAGs and as such participate to the selectivity of the microenvironment in organospecific endothelium. Their role in the biological CK activities must be investigate.

Chemokine stimulation data contributed to validate the endothelium organospecificity hypothesis because it clearly appeared to be a chemokine- and endothelial cell-specific response. Precisely, 6Ckine specifically acted on peripheral lymph node EC

(HPLNECB3) to increase the adhesion capacity towards CEMT4 lymphocytes ; fractalkine specifically acted on mucosal endothelial cells – HAPEC.1 – to produce a similar effect towards CEMT4 lymphocyte recruitment. HMLNEC, as representative EC line for mesenteric lymph nodes, showed an intermediate response to both fractalkine and 6Ckine while RANTES acted on both the peripheral node- and mesenteric node-derived EC. The two non lymphoid organ-derived lines, HSkMEC and HBrMEC, did not display any specificity for CKs. Indeed, the small extent of the CK effect observed on these endothelial cells is negligible comparatively to the high effect of the same CKs towards lymphoid derived-endothelial cells.

In term of angiogenesis, it seems that chemokines are able to accelerate the kinetics of the pseudo-vessels formation on specific endothelial cell lines. It was illustrated here by the specific action of fractalkine on HAPEC and HSkMEC which favour clearly the angiogenesis in this *in vitro* assay. Fractalkine is expressed in mucosal sites but its presence was detected in brain (20) and skin (21) where it can act like a signal molecule in intercellular communication within these organs.

These results suggested various possible mechanisms for CKs action. They could induce adhesion molecules expression (22) or CKRs as well as *de novo* CK secretion by endothelial cells (23). Moreover the CKs used in the assays could work as adhesion molecules by themselves (i.e fractalkine for example (24)). While fractalkine, RANTES and 6Ckine clearly increased the adhesion activity of distinct EC, the SDF1 α was only able to lower it. These various possibilities for CK binding and presentation suggest that CKs play a crucial role in the recognition of circulating cells by ECs. Although, the chronological sequence of events is not yet established, we know that EC activation by CEMT4 lymphocyte adhesion did not stimulate CKs themselves, nor CKR expression (data not shown). CKs and their receptors may act in early steps of the recognition process or control early adhesion signals (25). Further work will contribute to define the molecular cascade of events which intervene in the cell recognition process to approach the actors of the specificity to help defining site targeted therapies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a Biotechnocentre grant CK 2002; KNB grant 3P05A0625.

CC is CIFRE fellow (Solabia, Bioeurope, French ministry of education; NL is a fellow from the Ligue Nationale contre le Cancer; MM is AI CNRS; MP is an assistant PAN, Poland; CK is research director CNRS. Special thanks to Danuta Dus for her suggestions and remarks.

REFERENCES

1. Butcher, E. C., and Picker, L. J. (1996) *Science* **272**, 60-66.
2. Springer, T. A. (1994) *Cell* **76**, 301-314.
3. Rollins, B. J. (1997) *Blood* **90**, 909-928.
4. Nagira, M., Imai, T., Yoshida, R., Takagi, S., Iwasaki, M., Baba, M., Tabira, Y., Akagi, J., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1998) *Eur J Immunol* **28**, 1516-1523.
5. Fong, A. M., Robinson, L. A., Steeber, D. A., Tedder, T. F., Yoshie, O., Imai, T., and Patel, D. D. (1998) *J Exp Med* **188**, 1413-1419.
6. Volin, M. V., Woods, J. M., Amin, M. A., Connors, M. A., Harlow, L. A., and Koch, A. E. (2001) *Am J Pathol* **159**, 1521-1530.
7. Burns, J. M., Lewis, G. K., and DeVico, A. L. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14499-14504.
8. Gerard, C., and Gerard, N. P. (1994) *Curr Opin Immunol* **6**, 140-145.
9. Kieda, C., Paprocka, M., Krawczenko, A., Zalecki, P., Dupuis, P., Monsigny, M., Radzikowski, C., and Dus, D. (2002) *Endothelium* **9**, 247-261
10. Butcher, E. C., Scollay, R. G., and Weissman, I. L. (1980) *Eur J Immunol* **10**, 556-561.
11. Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T. J., and Yoshie, O. (1997) *Cell* **91**, 521-530.

12. Nagira, M., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Ridanpaa, M., Takagi, S., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997) *J Biol Chem* **272**, 19518-19524.
13. Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T., and Yoshie, O. (1998) *J Biol Chem* **273**, 7118-7122.
14. Schweickart, V. L., Raport, C. J., Godiska, R., Byers, M. G., Eddy, R. L., Jr., Shows, T. B., and Gray, P. W. (1994) *Genomics* **23**, 643-650.
15. Gupta, S. K., Lysko, P. G., Pillarisetti, K., Ohlstein, E., and Stadel, J. M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 4282-4287.
16. Minami, M., and Satoh, M. (2000) *Nippon Yakurigaku Zasshi* **115**, 193-200.
17. Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997) *Annu Rev Immunol* **15**, 675-705
18. Ali, S., Palmer, A. C., Banerjee, B., Fritchley, S. J., and Kirby, J. A. (2000) *J Biol Chem* **275**, 11721-11727.
19. Kuschert, G. S., Coulin, F., Power, C. A., Proudfoot, A. E., Hubbard, R. E., Hoogewerf, A. J., and Wells, T. N. (1999) *Biochemistry* **38**, 12959-12968.
20. Harrison, J. K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R. K., Streit, W. J., Salafranca, M. N., Adhikari, S., Thompson, D. A., Botti, P., Bacon, K. B., and Feng, L. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10896-10901
21. Sugaya, M., Nakamura, K., Mitsui, H., Takekoshi, T., Saeki, H., and Tamaki, K. (2003) *J Dermatol Sci* **31**, 179-187
22. Weber, C., Kitayama, J., and Springer, T. A. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10939-10944.
23. Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., and Butcher, E. C. (1998) *Science* **279**, 381-384.
24. Haskell, C. A., Cleary, M. D., and Charo, I. F. (2000) *J Biol Chem* **275**, 34183-34189.
25. Campbell, J. J., and Butcher, E. C. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 336-341.

ANNEXE 1

Séquences nucléotidique et protéique d'ARM-1 (numéros d'accès Genbank AF225959, Swiss-Prot Q9JKV1).

	EcoRII ~~~~~	AvaI ~~~~~
+1	Met Thr Thr Ser Gly Ala Leu Phe Pro Ser Leu Val Pro Gly Ser Arg Gly	
1	ATGACGACTT CAGGCGCTCT GTTCCCAAGC CTGGTGCCCG GCTCTCGGGG TACTGCTGAA GTCCGCGAGA CAAGGGTTCG GACCACGGGC CGAGAGCCCC	
+1	Gly Ser Ser Thr Lys Tyr Leu Val Glu Phe Arg Ala Gly Lys Met Ser Leu Lys	
51	GTCTTCTACC AAATATTTGG TGGAGTTCCG GGCAGGAAAA ATGTCATTAA CAGAAGATGG TTTATAAACC ACCTCAAGGC CCGTCCTTTT TACAGTAATT	
+1	Lys Gly Thr Thr Val Thr Pro Asp Lys Arg Lys Gly Leu Val Tyr Ile Gln	
101	AAGGAACTAC GGTCACCCCA GATAAACGGA AAGGTCTCGT GTACATCCAG TTCCTTGATG CCAGTGGGGT CTATTTGCCT TTCCAGAGCA CATGTAGGTC	
+1	Gln Thr Asp Asp Ser Leu Ile His Phe Cys Trp Lys Asp Arg Thr Ser Gly	
151	CAGACGGACG ACTCCCTTAT TCACTTCTGT TGGAAAAGACA GGACCTCTGG GTCTGCCTGC TGAGGGAATA AGTGAAGACA ACCTTTCTGT CCTGGAGACC	
+1	Gly Thr Val Glu Asp Asp Leu Ile Ile Phe Pro Asp Asp Cys Glu Phe Lys Arg	
201	GACCGTGGAG GATGACTTGA TTATCTTTCC TGATGACTGT GAGTTCAAGC CTGGCACCTC CTACTGAACT AATAGAAAAG ACTACTGACA CTCAAAGTTCG	
	KpnI ~~~~~	AccI ~~~~~
+1	Arg Val Pro Gln Cys Pro Ser Gly Arg Val Tyr Val Leu Lys Phe Lys Ala	
251	GGGTACCTCA GTGCCCCAGT GGGAGGGTCT ACGTGCTCAA GTTTAAGGCA CCCATGGAGT CACGGGGTCA CCCTCCCAGA TGCACGAGTT CAAATTCCGT	
+1	Gly Ser Lys Arg Leu Phe Phe Trp Met Gln Glu Pro Lys Thr Asp Gln Asp	
301	GGGTCCAAGC GGCTCTTCTT CTGGATGCAG GAGCCCAAGA CTGACCAAGA CCCAGGTTTC CCGAGAAGAA GACCTACGTC CTCGGGTTCT GACTGGTTCT	
		EcoRII ~~~~~
+1	Asp Glu Glu His Cys Arg Lys Val Asn Glu Cys Leu Asn Asn Pro Pro Met Pro	
351	TGAGGAGCAC TGCCGAAAAG TCAACGAATG TCTGAACAAC CCCCCATGC ACTCCTCGTG ACGGCCTTTC AGTTGCTTAC AGACTTGTTG GGGGGGTACG	
	EcoRII ~~~~~	PstI ~~~~~
+1	Gly Gly Glu Gly Gly Leu Gln Ser Leu Leu Gly Asn Met Ser His Ser Gln	
451	GGCGTGAGG GTGGCCTGCA GAGCCTGTTG GGGAACATGA GTCACAGCCA CCGCCACTCC CACCGGACGT CTCGGACAAC CCCTTGACT CAGTGTCCGT	
		EcoRII ~~~~~
+1	Gln Leu Met Gln Leu Ile Gly Pro Ala Gly Leu Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gly	
501	GCTTATGCAG CTCATCGGAC CAGCCGGCCT GGGAGGACTG GGTGGACTTG CGAATACGTC GAGTAGCCTG GTCGGCCGGA CCCTCCTGAC CCACCTGAAC	
		EcoRII ~~~~~ StuI ~~~~~
	ApaI ~~~~~	EcoRII ~~~~~
+1	Gly Ala Leu Thr Gly Pro Gly Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ser Ser Gly Pro	
551	GGGCCCTCAC TGGGCCAGGC CTGGCCAGCT TGCTGGGGAG CAGTGGACCT CCCGGGAGTG ACCCGGTCCG GACCGGTCGA ACGACCCCTC GTCACCTGGA	
+1	Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Arg Ser Gln Ser Ala Ala Val Thr	
601	CCAGCCAGCA GCTCTTCATC CAGCTCCCAG AGCCAGTCGG CAGCCGTCAC GGTCGGTTCG CGAGAAGTAG GTCGAGGGCC TCGGTCAGCC GTCGGCAGTG	
+1	Thr Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ala Arg Ala Thr Pro Ala Pro Ser Ala Pro	
651	CCCATCCTCC TCCACCTCTT CCGCTCGCGC CACCCAGCC CTTTCTGCCC GGTAGGAGG AAGTGGAGAA GGCGAGCGCG GTGGGGTCCG GGAAGACGGG	

PvuII
 ~~~~~  
 +1 Pro Ala Ala Ala Ser Ala Thr Ser Pro Ser Pro Ala Pro Ser Ser Gly Asn  
 701 CAGCAGCTGC CTCGGCAACC AGCCCAAGCC CCGCACCCAG CTCAGGTAAT  
 GTCGTCGACG GAGCCGTTGG TCGGGTTCGG GCGGTGGGTC GAGTCCATTA

---

PvuII  
 ~~~~~  
 +1 Gly Thr Ser Thr Ala Ala Ser Pro Thr Gln Pro Ile Gln Leu Ser Asp Leu
 751 GGAACCAGCA CAGCAGCCAG CCCGACCCAG CCCATCCAGC TGAGCGACCT
 CCTTGGTCGT GTCGTCGGTC GGGCTGGGTC GGGTAGGTCG ACTCGCTGGA

EcoRII
 ~~~~~  
 +1 Leu Gln Ser Ile Leu Ala Thr Met Asn Val Pro Ala Gly Pro Gly Gly Ser Gln  
 801 CCAGAGCATT CTGGCCACTA TGAACGTGCC GGCAGGGCCA GGAGGCAGCC  
 GGTCTCGTAA GACCGGTGAT ACTTGCACGG CCGTCCCAGT CCTCCGTCGG

---

XhoI  
 ~~~~~  
 +1 Gln Gln Val Asp Leu Ala Ser Val Leu Thr Pro Glu Ile Met Ala Pro Ile
 851 AGCAAGTGGG TCTGGCGAGT GTGCTGACCC CAGAGATCAT GGCTCCCATC
 TCGTTCACCT AGACCGCTCA CACGACTGGG GTCTCTAGTA CCGAGGGTAG

+1 Leu Ala Asn Ala Asp Val Gln Glu Arg Leu Leu Pro Tyr Leu Pro Ser Gly
 901 CTTGCCAATG CAGACGTTCA GGAGCGCCTG CTGCCCTACC TGCCCTCTGG
 GAACGGTTAC GTCTGCAAGT CCTCGCGGAC GACGGGATGG ACGGGAGACC

PstI XhoI
 ~~~~~  
 +1 Gly Glu Ser Leu Pro Gln Thr Ala Asp Glu Ile Gln Asn Thr Leu Thr Ser Pro  
 951 GGAGTCTCTG CCCAGACTG CAGATGAGAT CCAGAACACA TTAACCTCGC  
 CCTCAGAGAC GGGGTCTGAC GTCTACTCTA GGTCTGTGT AATTGGAGCG

---

EcoRII  
 ~~~~~  
 +1 Pro Srf I Gln Ala Leu Gly Met Phe Ser Ala Ala Leu Ala Ser Gly
 1001 CCCGATCCAG CAGAGCCCTG GGTATGTTCA GTGCGGCCTT GGCCTCAGGA
 GGGTCAAGGT CGTCCGGGAC CCATACAAAGT CACGCCGGAA CCGGAGTCCT

PstI
 ~~~~~  
 +1 Gln Leu Gly Pro Leu Met Cys Gln Ile Gly Leu Pro Ala Glu Ala Val Glu  
 1051 CAGCTTGGCC CTCTCATGTG CCAGATCGGC CTTCTGCAG AGGCTGTTGA  
 GTCGAACCGG GAGAGTACAC GGTCTAGCCG GAAGGACGTC TCCGACAACT

---

+1 Glu Ala Ala Asn Lys Gly Asp Val Glu Ala Phe Ala Lys Ala Met Gln Asn Asn  
 1101 GGCCGCCAAC AAAAGGTGATG TGGAAAGCATT TGCCAAAAGCC ATGCAGAACAA  
 CCGGCGGTTG TTTCCACTAC ACCTTCGTAA ACGGTTTCGG TACGTCTTGT

---

+1 Asn Ala Lys Ser Asp Pro Lys Glu Gly Asp Thr Lys Asp Lys Lys Asp Glu  
 1151 ATGCCAAATC GGACCCAAAAG GAGGGCGACA CAAAAGACAA GAAAAGACGAA  
 TACGGTTTAC CCTGGGTTTC CTCCCGCTGT GTTTCTGTCT CTTTCTGCTT

---

XbaI  
 ~~~~~  
 +1 Glu Glu Asp Met Ser Leu Asp ***
 1201 GAAGAAGATA TGAGTCTAGA CTAAATTATT CAGTGTCCTG CCCCAAGTTG
 CTTCTTCTAT ACTCAGATCT GATTTAATAA GTCACAGGCA GGGGTTCAAC

Nom du vecteur	Construction	Applications
<p>pcDNA3.1 ARM-1²³⁻²⁸⁰</p>	<p>Séquence tronquée d'ARM-1 (aa 23 à 280) clonée par RT-PCR à partir des ARN extraits de la lignée murine HECpp, avec les amorces suivantes : <i>Amorce sens</i> : 5'- AGGAAGCTTTATATGGTGGAGTTCCGGGCAGGA-3' (HindIII) <i>Amorce antisens</i> : 5'- TAGCTCGAGGCCTCATGGCCCTGCCGG-3' (XhoI) (codon STOP) amplifiant la séquence 68 à 840 pb (aa 23 à 280) Introduite dans le plasmide pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen) aux sites de restriction HindIII et XhoI</p>	<p>Immunisation génique chez le rat</p>
<p>pRc/RSV-ARM-1</p>	<p>Séquence entière d'ARM-1 amplifiée par PCR à partir du vecteur pSecTagB-ARM-1 avec les amorces suivantes : <i>Sens</i> : 5'-ATCAAGCTTATGACGACTTCAGGCGCTCTG-3' (HindIII) <i>Antisens</i> : 5'-TTGTTTCGGGCCACTAGTCTCTTAGTCTAGAC-3' (SpeI) (codon STOP) amplifiant la séquence 1 à 1224 pb (aa 1 à 407) Introduite dans le plasmide pRc/RSV (Invitrogen) aux sites de restriction HindIII et SpeI</p>	<p>Immunisation génique chez la poule</p>
<p>pSecTagB-ARM-1</p>	<p>Séquence entière d'ARM-1 clonée dans le vecteur pSecTagB (Invitrogen) Fourni aimablement par le Dr Holzamm (Allemagne)</p>	
<p>pcDNA3.1-ARM-1</p>	<p>Séquence entière d'ARM-1 clonée par RT-PCR, à partir des ARN extraits de la lignée murine HECpp, avec les amorces suivantes : <i>Amorce sens</i> : 5'-ATCAAGCTTATGACGACTTCAGGCGCTCTG-3' (HindIII) <i>Amorce antisens</i> : 5'-ATGCTCGAGGTCTAGACTCATATCTTCTTCTTC-3' (XhoI) amplifiant la séquence 1 à 1224 pb (aa 1 à 407) Introduite dans le plasmide pcDNA3.1/Myc-His (Invitrogen) aux sites de restriction HindIII et XhoI</p>	<p>Transfection de cellules COS et de cellules endothéliales pour des expériences d'adhésion et d'immunofluorescence ARM-1 exprimée avec un épitope Myc en C-terminal</p>

Nom du vecteur	Construction	Applications
pCMVTag3B-ARM-1	Séquence entière d'ARM-1 clonée à partir du plasmide pcDNA3.1-ARM-1 dans le plasmide pCMVTag3B (Stratagene) en utilisant les sites de restriction HindIII et XhoI	Transfection de cellules COS et de cellules endothéliales pour des expériences d'immunofluorescence ARM-1 exprimée avec un épitope Myc en N-terminal
pIRES-hrGFP-ARM-1	Séquence entière d'ARM-1 clonée à partir du plasmide pCMVTag3B-ARM-1 dans le plasmide pIRES-hrGFP1a (Stratagene) en utilisant les sites de restriction BamHI et XhoI	Transfection de cellules COS et de cellules endothéliales pour des expériences d'adhésion et d'immunofluorescence ARM-1 exprimée avec un épitope Flag en C-terminal Coexpression de la protéine GFP permettant le tri des cellules transfectées
pCX/ARM-1 R1	Séquence tronquée d'ARM-1 (aa 23 à 167) amplifiée à partir du vecteur pIRES-hrGFP-ARM-1 : <i>Amorce sens</i> : 5'- CATATGTTGGTGGAGTTCCGGGCAG-3' <i>Amorce antisens</i> : 5'- TAACTCGAGCTGGCTGTGACTCATGTT-3' amplifiant la séquence 67 à 503 pb (aa 23 à 167) Introduite dans le plasmide pCX/TOPO par la stratégie du « TOPO Cloning » (Invitrogen)	Expression d'un fragment d'ARM-1 (aa 23 à 167) dans des cellules <i>Caulobacter crescentus</i>

Nom du vecteur	Construction	Applications
pCX/ARM-1 R3	<p>Séquence tronquée d'ARM-1 (aa 258 à 392) amplifiée à partir du vecteur pIRES-hrGFP-ARM-1 :</p> <p><i>Amorce sens</i> :</p> <p>5'- CATATGCCGACCCAGCCCATCCAGCT-3'</p> <p><i>Amorce antisens</i> :</p> <p>5'- TAACTCGAGGCCCTCCTTTGGGTCCGATT-3'</p> <p>amplifiant la séquence 772 à 1176 pb (aa 258 à 392)</p> <p>Introduite dans le plasmide pCX/TOPO par la stratégie du « TOPO Cloning » (Invitrogen)</p>	<p>Expression d'un fragment d'ARM-1 (aa 258 à 392) dans des cellules <i>Caulobacter crescentus</i></p>
pTrcHisA-ARM-1	<p>Séquence entière d'ARM-1 clonée à partir du plasmide pCMVTag3B-ARM-1 dans le plasmide pTrcHis A (Invitrogen) en utilisant les sites de restriction BamHI et XhoI</p>	<p>Expression d'ARM-1 dans des cellules <i>E. coli</i></p>
pET22b-ARM-1	<p>Séquence entière d'ARM-1 clonée à partir du plasmide pCDNA3.1-ARM-1 dans le plasmide pET-22b(+) (Novagen) en utilisant les sites de restriction HindIII et XhoI</p>	<p>Expression d'ARM-1 dans des cellules <i>E. coli</i></p>

ANNEXE 3



AGRO-BIO
HSRM-CERVA

ESÈCE

Rats Lou élevés en environnement contrôlé

CONDITIONS

3 animaux

ANTIGÈNE

Vecteurs d'expression eucaryotiques possédant le gène d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur fort (CMV, RSV...).

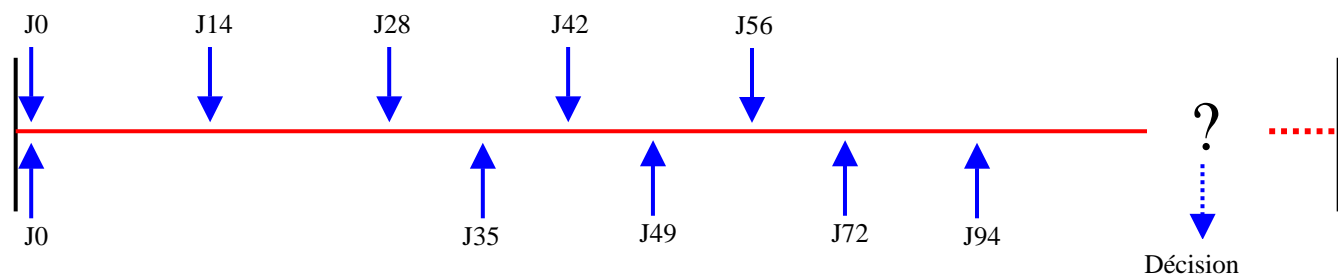
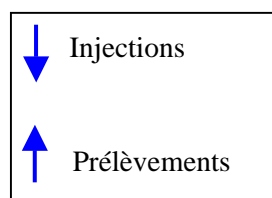
QUANTITÉ D'ANTIGÈNE

160 µg d'ADN par injection et par animal.

INJECTIONS

Sans adjuvant .
Voie intradermique.

CALENDRIER



ANNEXE 4

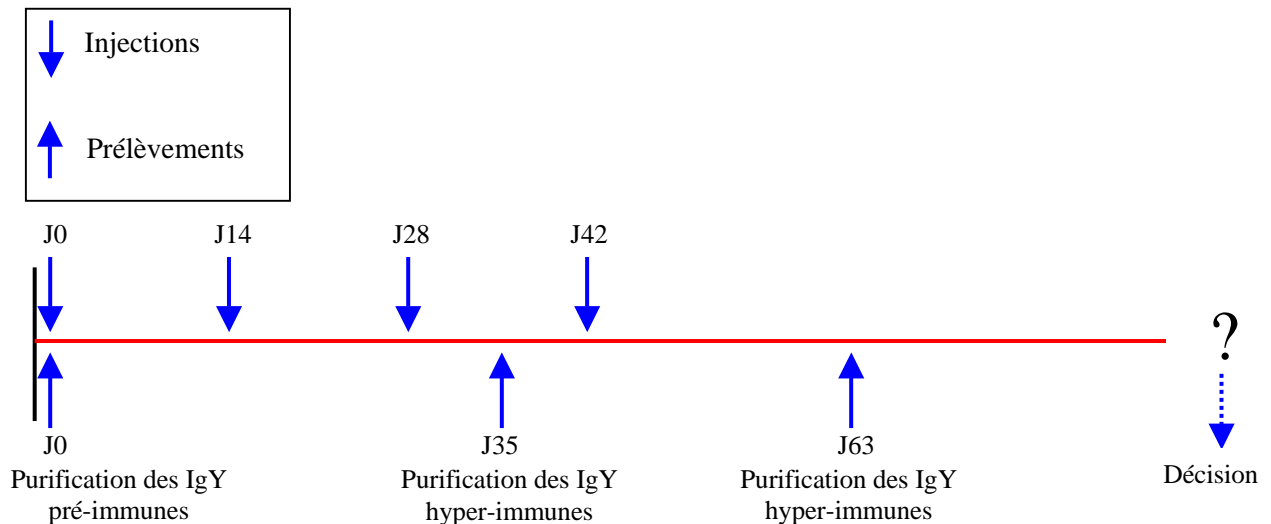


AGRO-BIO

PROTOCOLE DE PRODUCTION D'ANTICORPS DE POULE - ADN

ESPÈCE	Poulettes Lohmann élevées en environnement contrôlé.
CONDITIONS STANDARD	2 animaux minimum par protocole pour éviter la variabilité individuelle.
ANTIGÈNE	Vecteurs d'expression eucaryotiques possédant le gène d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur fort (CMV, RSV...).
QUANTITÉ D'ANTIGÈNE	100 µg d'ADN par injection et par animal.
INJECTIONS	Sans adjuvant . Voie intradermique.
PURIFICATION DES IgY	Les œufs pondus avant la 1 ^{ère} injection et ceux pondus après la dernière injection sont collectés afin d'en extraire les IgY pré-immunes et hyper-immunes correspondantes. Les IgY sont purifiées par précipitation à partir de 4 à 6 jaunes d'œufs par animal. Cette opération permet d'obtenir une solution (<u>10-15 ml</u>), contenant <u>5 à 20mg/ml d'IgY</u> .

CALENDRIER STANDARD



ANNEXE 5

Composition du milieu LB (Luria Bertani) :

- 1 % de tryptone
- 0,5 % d'extrait de levures
- 1 % de NaCl

Composition du milieu PYE :

- 0,2% de peptone
- 0,1% d'extrait de levures
- 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$