

Université de Montréal

**PURIFICATION ET IDENTIFICATION D'UNE PROTÉINE DE LA  
MEMBRANE PLASMIQUE ENDOTHÉLIALE. MOLÉCULES D'ADHÉSION DE  
LA MICROVASCULARISATION PULMONAIRE DU RAT DIABÉTIQUE**

Par

Malika Oubaha

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Science (M.Sc.)

En biologie cellulaire

Juin, 2005

©Malika Oubaha, 2005



W

4

U58

2005

v. 108

## **AVIS**

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

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

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

## **NOTICE**

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

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

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

**IDENTIFICATION DU JURY**

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**PURIFICATION ET IDENTIFICATION D'UNE PROTÉINE DE LA  
MEMBRANE PLASMIQUE ENDOTHÉLIALE. MOLÉCULES D'ADHÉSION DE  
LA MICROVASCULARISATION PULMONAIRE DU RAT DIABÉTIQUE**

Présenté par

Malika Oubaha

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Moise Bendayan.....Président-rapporteur

Lucian D.Ghitescu.....Directeur de recherche

Maria Leiza Vitale.....Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le but de ce projet a été d'identifier une protéine de la surface de la cellule endothéliale, contre laquelle nous avons antérieurement obtenu un anticorps monoclonal. L'anticorps a été préparé contre une préparation de membrane plasmique (front sanguin) endothéliale provenant des capillaires alvéolaires de poumon de rat. Ce dernier reconnaît une protéine intégrale de la membrane plasmique, d'environ 85 kDa, N-glyquée et présentant une distribution pan-endothéliale. Nous avons purifié cette glycoprotéine en partant de l'homogénat totale de poumon de rat par solubilisation différentielle (pH élevé et haute concentration) saline. La fraction cellulaire obtenue riche en protéines membranaires intégrales a été solubilisée par un détergent non-ionique – Triton X-100n de détergent non ionique (TritonX-100), suivit ensuite par une série de séparations séquentielles par chromatographie (chromatographie d'échange ionique, chromatographie d'affinité sur Concanavalin A et chromatographie d'affinité sur anticorps immobilisés). L'analyse de la protéine purifiée par spectrométrie de masse et micro séquençage a identifié le polypeptide comme étant l'homologue de l'antigène CD34. Nous confirmons donc l'expression de cette protéine qui, chez le rat, existait jusqu'à date seulement sous la forme d'une séquence génomique. Cette protéine est synthétisée par une population restreinte de cellules progénitrices hématopoïétiques, mais également par l'endothélium vasculaire, où elle est supposée d'agir en ligand pour la L-sélectine et participer au recrutement et à la diapédèse des leucocytes. CD34 est une sialomucine qui appartient aux molécules d'adhésion cellulaire, nous avons alors étudié l'expression de cette protéine au niveau de l'homogénat total et à la surface de la membrane endothéliale pulmonaire lors du diabète expérimental (Streptozotocine) en comparaison avec d'autres

molécules d'adhésion appartenant aux trois familles de molécules d'adhésions : les immunoglobulines (ICAM1, VCAM1, CEACAM1 et PECAM1), les sélectines (P et E), et les intégrines (alpha v et bêta 5) et ceci par quantifications densitométriques et des immunobuvardages. Nous avons comparé l'expression de ces molécules d'adhésion chez les animaux normaux versus des rats diabétiques de même âge. Nos résultats démontrent que chez les animaux diabétiques le front luminal de l'endothélium alvéolaire exprime de manière chronique et à un niveau significativement élevé (2-4 fois) la P-sélectine, l'ICAM1 et la VCAM1. Par contre la présence des PECAM1, CEA-CAM1, et les intégrines  $\alpha v$  et  $\beta 5$  diminuent drastiquement (2-10 fois) par rapport aux animaux normaux. Ces altérations sont probablement à l'origine de la rétention sélective des leucocytes dans la microvascularisation pulmonaire des personnes diabétiques. Après le traitement des animaux diabétiques à l'insuline pendant trois semaines, une analyse de l'expression des molécules d'adhésion a été faite entre les animaux normaux versus animaux diabétiques traités à l'insuline de la même manière que la première étude comparative. Étonnamment toutes les molécules d'adhésions augmentent après traitement à l'insuline. Étant donné que l'insuline est un anti-inflammatoire, cette augmentation de l'expression des molécules d'adhésion peut être expliquée par le développement d'une résistance à l'insuline chez ces animaux, ou c'est une conséquence de l'action de l'insuline.

**Mots clés:** CD34, ICAM1, VCAM1, CEACAM1 et PECAM1, P-Sélectine et E-Sélectine, immunobuvardage, densitométrie, diabète, insuline

## SUMMARY

The goal of this project was to identify a protein of the endothelial cell surface, against which we obtained a monoclonal antibody. The antibody was raised against a preparation of endothelial plasma membrane (blood front) coming from the lung alveolar capillaries of the rat. This antibody recognizes an integral proteins of plasma membrane of approximately 85 kDa, N-glycated. We purified this glycoprotein starting from the total lung homogenate of the rat. A crude preparation of membranes was prepared and enriched in integral protein by differential solubilization (high pH and high salt concentration) of the peripheral polypeptides. The remaining integral proteins were solubilized in a non-ionic detergent (TritonX-100), and submitted to a series of sequential separations by ionic exchange chromatography, affinity chromatography on Concanavalin A and affinity chromatography on the immobilized antibody. The analysis of the purified protein by mass spectrometry and micro sequencing identified the polypeptide as being the rat homologue of the CD34 antigen. We confirm therefore the expression of this protein which, in the rat, existed so far as a genomic sequence only. This protein is expressed by a restricted population of hematopoietic cells but also by the vascular endothelium, where it is supposed to act as ligand for L-selectin and to take part of the recruitment and leucocytes diapedesis.

CD34 is a sialomucin which belongs to the family of cellular adhesion molecules. We then studied the expression of this protein at the level of the total lung homogenate and at the surface of the pulmonary endothelial membrane in experimental diabetes (streptozotocin-induced). Other adhesion molecules were also included in this study:

members of the immunoglobulin superfamily (ICAM1, VCAM1, CEACAM1 and PECAM1), the P and E selectins family, and the integrins alpha v and beta 5. The level of expression of these molecules was evaluated by western blotting and densitometry. Our results show that in diabetic animals, the amount of P-selectin, ICAM1 and VCAM1 increases significantly (2-4 times) at the luminal face of the alveolar endothelium. On the other hand the presence of the PECAM1, CEACAM, and the integrins  $\alpha v$  and  $\beta 5$  decrease drastically (2-10 times). The pattern of alterations is distinct from that encountered in various models of infection-induced pulmonary inflammation, and is probably at the origin of the leucocytes retention in the pulmonary microvasculature of diabetic people. Three weeks treatment with insulin did not return the expression of adhesion molecules to normal values; on the contrary, all of them increased after the administration of insulin. Since insulin is an anti-inflammatory drug, this increase in the expression of adhesion molecules can be explained by the development of insulin resistance in these animals, or it is a consequence of the insulin. action.

**Key Words:** CD34, ICAM1, VCAM1, CEACAM1 et PECAM1, P-selectin, E-selectin, western blot, densitometry, diabetes, insulin, lung, microvasculature



## TABLE DES MATIÈRES

<b>PAGE TITRE .....</b>	<b>I</b>
<b>IDENTIFICATION DU JURY.....</b>	<b>II</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>III</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTES DES FIGURES.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>DÉDICACES.....</b>	<b>XXVI</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>XXVII</b>
<b>Première partie .....</b>	<b>1</b>
<b>But du projet 1: .....</b>	<b>1</b>
<b>Purification de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 30B3.....</b>	<b>2</b>
1-Détermination des caractéristiques biochimiques de l'antigène reconnu par l'anticorps 30B3.....	2
A-Solubilisation des protéines membranaires.....	3
B-Purification de 30B3 par chromatographie.....	4
B-1 Chromatographie par échange anionique (DEAE Sephacel).....	4
- Électrophorèse bidimensionnelle .....	4

- Mise en évidence de 30B3 SUR GEL.....	7
B-2 Chromatographie d'affinité Concanavalin A-sepharose ou agarose	
Immobilisée.....	8
B-3 Chromatographie d'affinité Anticorps 30B3 fixé à la protéine G.....	10
-Immobilisation de l'anticorps 30B3 sur la protéine G-sepharose.....	11
B-4 Identification de la protéine 30B3.....	12
a-Microséquençage par dégradation Edman.....	12
b-Spéctrométrie de masse.....	14
2-Expression de CD34 au niveau des différents lits vasculaires.....	15
3-Déglycosylation enzymatique.....	16
A-Déglycosylation des résidus glucidiques N-liés .....	16
B-Déglycosylation des résidus glucidiques O-liés et N- liés .....	17

## Deuxième partie

<b>Introduction</b> .....	37
A-Inflammation.....	37
B-Endothélium.....	39
C-Propriétés générales des molécules d'adhérence .....	39
C-1 Principales familles des molécules d'adhérence qui interviennent	
dans l'adhésion leucocytes- endothélium.....	41
C-1-1 Les sélectines.....	41
a- L-sélectine.....	43
b- P-sélectine.....	44

c- E-sélectine.....	47
C-1-2 Les molécules d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines comprennent plusieurs familles .....	49
a-CD34.....	49
b-PECAM1.....	55
c- CEA-CAM.....	59
d-V-CAM1.....	63
e-ICAM1.....	65
C-1-3 Les intégrines.....	70
a- Les intégrines alpha v et les intégrines bêta 5.....	71
D- Description de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et de leur migration transendothéliale (diapédèse).....	75
a-Phase précoce et transitoire.....	75
b- Phase tardive et durable.....	75
c- La traversée active des parois vasculaires .....	76
- JAM.....	78
- CD99.....	79
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>82</b>
<b>Objectif.....</b>	<b>82</b>
1-Purification du front luminal de la membrane plasmique des cellules endothéliales pulmonaires.....	84
2-Contrôle par microscopie électronique de la pureté des membranes P2.....	85

3-Solubilisation des membranes P2.....	86
4-Séparation des protéines par électrophorèse et analyse par immunobuvardage.....	86
5-Quantification densitométrique.....	87
6-Proportionnalité des résultats de l'analyse densitométrique des « western blots » avec la quantité de protéines mises sur gel SDS PAGE.....	88
7-Validation de l'état diabétique des animaux .....	89
8-Étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion chez des rats normaux versus rats diabétiques.....	90
9-Étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion chez des rats normaux versus rats diabétiques traités à l'insuline.....	91
<b>Résultats.....</b>	<b>92</b>
A-Altération de l'expression des molécules d'adhésion au cours du diabète.....	92
. a- Les sélectines et leur ligand.....	92
b-La superfamille des immunoglobulines.....	93
c-Les intégrines.....	93
B-L'effet du traitement à l'insuline sur l'expression des molécules endothéliales d'adhésion .....	94
<b>Discussion.....</b>	<b>105</b>
A- Superfamille des immunoglobulines.....	108
B- Les sélectines et leurs ligands.....	115

C- Les intégrines.....118

D- L'effet du traitement à l'insuline sur l'expression  
des molécules d'adhésion chez les rats diabétiques .....119

**CONCLUSION.....127**

**BIBLIOGRAPHIE.....129**

**LISTE DES TABLEAUX**

	<b>PAGE</b>	
<b>Tableau I</b>	50	Différences de structure des deux isoformes de CD34
<b>Tableau II</b>	52	Différentes classes d'anticorps pour la protéine CD34
<b>Tableau III</b>	88	Différents anticorps primaires utilisés pour mettre en évidence les molécules d'adhésions étudiées

## LISTE DES FIGURES

	<b>PAGE</b>	
<b>Figure 1</b>	<b>20</b>	Extraction séquentielle des protéines périphériques des membranes plasmiques et aspect des membranes P2 et P3 purifiées
<b>Figure 2</b>	<b>21</b>	L'anticorps 30B3 reconnaît une Glycoprotéine clivée à l'endoglycosydase F
<b>Figure 3</b>	<b>22</b>	Focalisation isoélectrique de l'antigène 30B3 par électrophorèse à deux dimensions (2D)
<b>Figure 4</b>	<b>23</b>	Stratégie de purification de la protéine reconnue par l'antigène 30B3
<b>Figure 5</b>	<b>24</b>	Comparaison des différentes méthodes de concentration des protéines
<b>Figure 6</b>	<b>25</b>	Chromatographie d'échange anionique DEAE-Sephacel
<b>Figure 7</b>	<b>26</b>	Mise en évidence de l'antigène 30B3 par différents types de coloration du gel SDS-PAGE

- Figure 8** 27 Chromatographie d'affinité sur ConcanavaleineA
- Figure 9** 28 Chromatographie d'affinité sur les deux lectine : Griffonia  
Simplicifolia (GS) et Weat Germ Agglutinin (WGA).
- Figure 10** 29 Chromatographie d'affinité : Anticorps 30B3 fixé à protéineG
- Figure 11** 30 Microsequençage par dégradation d'Edman
- Figure 12** 31 Principe de la spectrométrie de masse LC-QCTOF  
(liquid chromatography-time of flight)
- Figure 13** 32-33 Spectrométrie de masse LC-QTOF
- Figure 14** 34 Expression de l'antigène 30B3 au niveaux de differents lits  
vasculaires (poumon, cœur, cerveau)
- Figure 15** 35 Clivage des résidus N-liés des membranes P2 purifiées de  
poumon et cœur de rat à l'endoglycosydase F
- Figure 16** 36 Déglycosylation complète de la protéine CD34
- Figure 17** 38 Résumé de principaux acteurs de la réponse inflammatoire



<b>Figure 18</b>	<b>40</b>	Principales molécules d'adhésions endothéliales et leurs ligands leucocytaires
<b>Figure 19</b>	<b>42</b>	Structure Générale des sélectines
<b>Figure 20</b>	<b>54</b>	Représentation schématique des deux isoformes de CD34
<b>Figure 21</b>	<b>58</b>	Séquence d'acides aminés de la forme complète de PECAM1
<b>Figure 22</b>	<b>60</b>	Structure des membres de la famille des CEA-CAM
<b>Figure 23</b>	<b>64</b>	Structure des deux isoformes de VCAM1
<b>Figure 24</b>	<b>69</b>	Activation de la transcription de ICAM-1 par régulation du Facteur de transcription NF- $\kappa$ B
<b>Figure 25</b>	<b>70</b>	Structure des intégrines
<b>Figure 26</b>	<b>74</b>	Signalisation "inside-out" et "outside-in" des intégrines
<b>Figure 27</b>	<b>77</b>	Cascade de transmigration endothéliale des leucocytes
<b>Figure 28</b>	<b>80</b>	Diapédèse au niveau des alvéoles pulmonaires

- Figure 29** 95 Contrôle de reproductibilité du signal d'immunobuvardage  
quantitatif
- Figure 30** 95 Une relation linéaire existe entre la quantité d'antigène et  
l'intensité du signal
- Figure 31** 96 L'état diabétique des animaux révélé par détection  
immunochimique des produits précoces de glycation dans les  
membranes endothéliales
- Figure 32** 97-98 Molécules d'adhésion dont l'expression au niveau des  
membranes endothéliales pulmonaires (P2) diminue au cours  
du diabète
- Figure 33** 99 Molécules d'adhésion dont l'expression au niveau des  
membranes endothéliales pulmonaires (P2) augmente au cours  
du diabète
- Figure 34** 100 Expression des molécules d'adhésion dans l'homogénat total  
101-102 de poumon des rats normaux et diabétiques

- Figure 35** 103-104 Étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion  
Entre des rats normaux versus des rats diabétiques traités à  
l'insuline.
- Figure 36** 122 La voie des Polyols
- Figure 37** 122 Glycation des protéines
- Figure 38** 123 Stress oxydatif
- Figure 39** 124 Régulation de l'expression E-Sélectine
- Figure 40** 125 Régulation de l'expression des molécules d'adhésion à la  
surface des cellules endothéliales lors du diabète
- Figure 41** 126 Effet anti-inflammatoire de l'insuline

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Bêta
$\gamma$	Gamma
$\kappa$	KAPPA
$\delta$	Teta
aa	Acides aminés
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin converting enzyme)
AGE	Produits de glycation avancés (Advanced glycosylation end product)
AP1	Activateur de protéine (Activator protein 1)
AP1	Adaptatine 1
AP 2	Adaptatine 2
ADP	Adénosine diphosphate
Ag II	Angiotensine II
AT1	Récepteur d'angiotensine de type 1 (Angiotensin type 1 receptor)
ARDS	Syndrome de détresse respiratoire aigue (Acute Respiratory Distress Syndrome)
bFGF	Facteur fibroblastique de croissance basique (basic fibroblast growth factor)

<b>BSA</b>	Albumine sérique bovine
<b>CAMs</b>	Molécules d'adhésion cellulaires (cell adhesion molecule)
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ion Calcium
<b>CD15</b>	Cluster of différenciation 15
<b>CD31</b>	Cluster of différenciation 31
<b>CD34</b>	Cluster of différenciation 34
<b>CD38</b>	Cluster of différenciation 38
<b>CD43</b>	Cluster of différenciation 43
<b>CD51</b>	Cluster of différenciation 51
<b>CD50</b>	Cluster of différenciation 50
<b>CD54</b>	Cluster of différenciation 54
<b>CD61</b>	Cluster of différenciation 61
<b>CD62E</b>	Cluster of différenciation 62E
<b>CD63</b>	Cluster of différenciation 63
<b>CD66</b>	Cluster of différenciation 66
<b>CD99</b>	Cluster of différenciation 99
<b>CD102</b>	Cluster of différenciation 102
<b>CD106</b>	Cluster of différenciation 106
<b>CD164</b>	Cluster of différenciation 164
<b>CEACAM</b>	Antigènes carcino-embryonnaire d'adhésion cellulaire (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion)

<b>CEACAM1-L</b>	CEACAM -Long
<b>CEACAM1-S</b>	CEACAM -court
<b>ConA</b>	Concanavalin A
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DNase</b>	Déoxyribonucléase
<b>ECL</b>	Enhanced Chemiluminescence (chemiluminescence avancée)
<b>DAB</b>	Diaminobenzamidine
<b>DEAE</b>	Diethyl Aminocethyl
<b>EDTA</b>	Ethylene-diamine-tetra-acetic
<b>EGF</b>	Facteur de croissance épidermique (Epidermic growth factor)
<b>ELAM1</b>	Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule1
<b>ERM</b>	Ezrin/Radixin/Moesin
<b>ERK</b>	Kinase régulée par des signaux extracellulaires (Extracellular signal-regulated kinase)
<b>E-Sélectine</b>	Sélectine endothéliale (Endothelial sélectine)
<b>ESL</b>	Ligand de la E-sélectine (E-sélectine-ligand )
<b>ET1</b>	l'endothéline1
<b>FAK</b>	Kinase des adhésions focales (Focal adhesion Kinase)
<b>FGF</b>	Facteur de croissance fibroblastique (Fibroblast growth factor)
<b>GATA</b>	Facteur de transcription Guanine-Adénosine-thimine-Adénosine
<b>Gi</b>	Proteine G i (Guanine nucleotide-binding proteins)

<b>Gly-Cam</b>	Glycosylation dependent cell adhesion molecule
<b>GPI</b>	Glycosyl phosphatidylinositol
<b>gpIIa</b>	Antigène plaquettaire deux a
<b>Grb2/SOS</b>	Growth factor receptor-bound protein 2/Son of sevenless protein
<b>GS</b>	Griffonia Simplifolia
<b>GTPases</b>	Guanosine tri-phosphatases
<b>GM- CSF</b>	facteur de stimulation des Granulocyte-macrophage (Granulocyte-macrophage colonystimulating factor)
<b>M-CSF</b>	facteur de stimulation des Macrophage (Macrophage colonystimulating factor)
<b>HEV</b>	endothélium hypertrophié (High endothelial venules)
<b>HUVEC</b>	Cellules de la veine ombilicale humaine (Human umbilical vein endothelial cells)
<b>H2O2</b>	Hydrogen Peroxide (Peroxyde d'hydrogène)
<b>ICAM</b>	Molécule d'adhésion intercellulaire (Intercellular adhesion Molecule)
<b>Ig</b>	Immunoglobulin
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G
<b>IgC</b>	Ig constants
<b>IgV</b>	Ig variable
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IκB</b>	Inhibiteur de kappaB (Inhibitor of kappaB)

<b>IKK<sup>3</sup></b>	IkappaB kinase
<b>IL-1</b>	Interleukine 1
<b>IL-6</b>	Interleukine 6
<b>IL-8</b>	Interleukine 8
<b>IRF-1</b>	Interferon regulatory factor 1 Facteur régulateur de l'interféron
<b>JAM</b>	Junctional adhesion molecule Molécule d'adhésion jonctionnelle
<b>LFA</b>	Antigène des fonctions de lymphocytes Lymphocyte Function-Associated Antigen
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotriène C4
<b>L-sélectine</b>	Sélectine leucocytaire
<b>Mad-Cam</b>	Mucosal addressin cell adhesion molecule
<b>Mac1</b>	Macrophage-1 antigen
<b>MBS</b>	MES buffer saline
<b>MDCK</b>	Madin-Darby canine kidney
<b>MES</b>	Morpholino-ethanesulfonic acid
<b>mRNA</b>	Acide ribonucleique messenger (Messenger ribonucleic acid) Acide ribonucléique messenger ou ARN messenger
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>NAD(P)H</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit



<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Facteur nucléaire kappaB (Nuclear factor-kappaB)
<b>NO</b>	Oxyde nitrique (Nitric oxide)
<b>NSF</b>	N-ethylmaleimide-sensitive factor
<b>PARs</b>	Protéinase activatrice receptor
<b>pb</b>	Paires de bases
<b>PBS</b>	Phosphate buffer saline, Tampon phosphate salin
<b>PECAM</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule
<b>PGE2</b>	Prostaglandine E2,
<b>PMSF</b>	Phenyl Methyl Sulfonyl
<b>PI3k</b>	Phosphoinositides 3 kinase
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PSG</b>	Pregnancy-specific glycoprotein
<b>PSGL1</b>	P-sélectine Glycoprotéine Ligand
<b>p38 kinase</b>	Proteine 38 kinase
<b>LCK</b>	Tyrosine kinase spécifique pour les lymphocyte (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)
<b>p56<sup>lck</sup></b>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase LCK
<b>P50/p65</b>	Sous unités de NF- $\kappa$ B protéine50/protéine65
<b>P-Sélectine</b>	Sélectine plaquettaire (Platelet selectin)

<b>Rab, Rac1, Rac2,</b>	} Petites protéines G
<b>RhoA, Rap1, Ras</b>	
<b>RAGE</b>	Recepteur des produits de glycation avancés (Advanced glycosylation end product receptor)
<b>RAS</b>	Système rénine/angiotensine (Renin/angiotensin system)
<b>RNase</b>	Ribonucléase
<b>ROS</b>	Radicaux libres d'oxygène (reactifs oxygen species)
<b>Rpm</b>	Rotation par minute
<b>RTK</b>	Récepteurs à activité tyrosine kinase
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS
<b>SH</b>	Domaine d'homology Src (Src homology domaine)
<b>SHP-2</b>	Tyrosine phosphatase à domaine SH
<b>sLe<sup>x</sup></b>	Sialyl lewis x
<b>sL-Sélectine</b>	L-sélectine soluble
<b>STAT</b>	Traducteur du signal et activateur de la transcription (Signal transducer and activator of transcription)
<b>STK1</b>	Spleen tyrosine kinase
<b>STZ</b>	Streptozotocin
<b>TBS</b>	Tris buffer saline
<b>TBST</b>	TBS-Tween

<b>TCA</b>	Trichloracétique acide
<b>TEM</b>	Migration transendothéliale (Transendothéliale Migration)
<b>TGN</b>	Réseau de trans-golgi (Trans-Golgi Network)
<b>TGF</b>	Facteur de croissance transformant (Transforming growth factor)
<b>TLR 4</b>	Toll-like receptor 4
<b>TNF</b>	Facteur nécrosant des tumeurs (Tumor necrosis factor)
<b>VCAM</b>	Molécules d'adhésion des cellules vasculaires (Vascular cell adhesion molecule)
<b>Wf</b>	Facteur de von Willebrand (Von Willebrand Factor)
<b>VE-cadhérine</b>	Cadhérine endothéliale Vasculaire (Vascular endothelial cadherin)
<b>WGA</b>	Agglutinine du germe de blé (Weat Germ agglutinin)
<b>WPB</b>	les corps de Weibel-Palade (Weibel-Palade bodies)

**DÉDICACES**

À mon cher Papa **Driss**, le plus adorable papa du monde et à ma chère Maman **Fatima** la plus douce et sage maman du monde, vous m'avez accompagné dans toutes mes démarches même celles avec lesquelles vous n'étiez pas tout à fait d'accord, vous étiez toujours là et vous continuer à m'épauler et à être le bon exemple pour moi sur tous les plans. Je vous aime.

À ma merveilleuse sœur **Fouzia**, quoique je fasse, je n'arriverais pas à te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi dans les moments les plus difficiles. Tout simplement je t'aime ma belle.

À mes deux adorables frères **Karim** et **Kamal**, vous m'avez soutenu par votre manière de s'accrocher aux petites choses de la vie, votre nature à la fois calme et fofolle m'a appris beaucoup de choses.

Je vous dédie ce travail en guise de remerciement pour tous ce que vous avez fait pour moi. Je n'arriverais jamais à vous remercier assez pour votre encouragement, votre patience avec moi et votre précieuse aide. Je vous adore.

## REMERCIEMENTS

Un grand merci qui ne sera jamais assez pour mon directeur de recherche Dr Lucian Ghitescu. Merci pour le temps que vous m'avez accordé pour mener à terme ce travail. Merci pour vos précieux conseils. Chaque jour que j'ai passé dans votre laboratoire, j'apprenais de vous et de votre passion pour la recherche qui rendait le travail plus stimulant et intéressant. Les deux années de travail avec vous étaient vraiment enrichissantes. Merci du fond du cœur.

Un merci bien particulier pour toi Mirela, pour ton aide précieuse durant ces deux années, merci pour ton amitié et tes conseils qui m'ont aidé aussi bien dans ma partie académique (mes cours) que dans mon projet de recherche dans le laboratoire. J'ai tant appris avec toi entre autre la minutie et la précision au travail. Ton caractère à la fois sérieux et plein d'humour vont beaucoup me manquer.

Merci à vous Dr Bendayan et à tout le personnel accueillant de votre laboratoire de m'avoir ouvert les portes et de m'avoir aidé quand il le fallait.

Merci à vous, Diane et Irène, pour votre aide et votre sens de l'humour. Merci à toi Isabelle pour tes magnifiques coupes au microtome.

Je n'oublie surtout pas de remercier la charmante Dr Roxana Antanasiu. Je vous suis réellement reconnaissante pour votre aide qui était d'un apport considérable.

Merci pour toutes les personnes qui m'ont aidé de prêt ou de loin pour mener à bon train ce mémoire.

## **Première partie**

### **But du projet 1:**

Mon projet de recherche est divisé en deux parties, la première est axée sur l'identification et la purification d'une protéine de la surface de la cellule endothéliale, contre laquelle un anticorps monoclonal a été préparé antérieurement au sein du laboratoire (Ghitescu et al, 1999). Au cours des dernières années, trois anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines de la surface luminale des cellules endothéliales provenant des capillaires alvéolaires de poumon de rat ont été préparés dans notre laboratoire:

- (a) l'anticorps 21D5 qui reconnaît la gp68 ou PV-1, une nouvelle protéine associée avec les stomata des cavéoles (Stan et al, 1997);
- (b) l'anticorps 28D5 qui reconnaît l'isoforme de PECAM-1 de rat (Ghitescu, 1997),
- (c) l'anticorps 30B3 qui reconnaît une protéine intégrale de la membrane plasmique endothéliale non identifiée.

Le but de mon projet était d'extraire cette dernière protéine, de la purifier et de l'identifier.

Pour purifier l'antigène 30B3 nous avons suivi une stratégie de travail qui repose sur quelques caractéristiques biochimiques de cette protéine, découverte au cours des études antérieures. Celles-ci sont :

- (a) L'antigène 30B3 est une protéine fortement enrichie dans les membranes plasmiques des cellules endothéliales du poumon (Figure1-B-C).

(b) Si les membranes plasmiques des cellules endothéliales du poumon sont soumises à des conditions qui solubilisent de manière différentielle les protéines périphériques des membranes (tampons de haut pH et haute concentration saline) (Figure 1-A), la protéine reconnue par l'anticorps 30B3 reste avec la fraction membranaire qui garde seulement les protéines intégrales (Figure 2-A).

(c) La protéine 30B3 est une protéine anionique qui se trouve à l'extrémité acide du spectre usuel des points isoélectriques des protéines cellulaires (Figure 3). Cette caractéristique indique que la chromatographie d'échange ionique pourrait représenter une approche efficace d'enrichissement de la protéine d'intérêt.

(d) La protéine 30B3 est une glycoprotéine sensible à la digestion par l'endoglycosidase F (Figure 2-B). Ceci suggère qu'elle possède une structure complexe des oligosaccharides qui rend la protéine susceptible à la liaison par des lectines (Concanavalline A, l'Agglutinine de Germe de Blé -WGA, Griffonia Simplicifolia-GS).

### **Purification de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 30B3 :**

#### **1-Détermination des caractéristiques biochimiques de l'antigène reconnu par l'anticorps 30B3 :**

Model animal utilisé : des rats males Sprague Dawley 125g, (Charles River Inc.St Laurent Québec, Canada) sont utilisés dans toutes les expériences.

À partir de l'homogénat de poumon de rat nous avons préparé, comme matériel de départ, une fraction brute de membranes totales, que nous avons ensuite soumise à une étape de solubilisation de protéines périphériques par un tampon à pH élevé (carbonate de sodium

pH 11). Nous avons aboutit ainsi à une fraction cellulaire riche en protéines membranaires intégrales que nous avons solubilisées par un détergent non-ionique – Triton X-100. Les protéines membranaires solubilisées, ont été ensuite soumises à une série de séparations séquentielles par chromatographie (Figure 4).

#### A- Solubilisation des protéines membranaires:

Le poumon a été découpé en petits morceaux ensuite un homogénéisateur à piston (Potter Eveljehm) a permis de briser les cellules dans une solution tampon contenant 50 mM de carbonate de sodium à pH élevé (pH 11) et 5 mM de benzamidine et 1mM de Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, Chemical, Co, St Louis, MO) pour bloquer toutes les sérine protéases (trypsine, thrombine, chymotrypsine, papaïne etc.). L'homogénéisation dans un tampon alcalin permet de se débarrasser par simple centrifugation (100.000 g, 30 min, 4°C) de toutes les protéines cytosoliques et périphériques des membranes en récupérant dans le culot les membranes plasmiques enrichies en protéines intégrales. Celles-ci ont été solubilisées avec 1% Triton dans un tampon contenant 10 mM Hepès à (PH 7.2) (Tampon de solubilisation). Le matériel solubilisé a été sédimenté par une deuxième centrifugation aux mêmes paramètres que la première. Le surnageant a été récupéré et filtré à travers un filtre (0.45µm).



## B-Purification de 30B3 par chromatographie :

La fraction des protéines membranaires intégrales a été ensuite soumise à différents types de chromatographies.

### B-1 Chromatographie par échange anionique (DEAE Sephacel) :

Nous avons le choix entre les deux types de chromatographie d'échange d'ions (anionique et cationique). Afin de déterminer le type de chromatographie le plus propice pour extraire la protéine d'intérêt, une électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée pour définir si la protéine reconnue par l'anticorps 30B3 est acide ou basique (Figure 4-B).

#### -Électrophorèse bidimensionnelle :

La séparation des protéines membranaires intégrales par électrophorèse bidimensionnelle a été effectuée en parallèle, sur deux gels, selon la méthode de Rabilloud, (1998). Soixante microgrammes de protéines (pour chaque gel) de membranes intégrales endothéliales pulmonaires, (purifiées à la méthode de silice cationique colloïdale) (page 84) ont été solubilisés dans 135  $\mu$ l de solution d'hydratation (8M Urée, 2M Thiourée, 4%CHAPS, 40mM DTE, 2% de mélange d'ampholytes (tampon IPG) pH 3-10, (Amersham Bioscience AB, Uppsala, Suède) et 0.5 % de Bromophénol). Le mélange a été traité aux ultrasons et vortexé pendant 2 heures avant d'être centrifugé (micro Centrifugeuse) pendant 10 minutes à 12,000 rpm. Le surnageant a été mis dans les sillons de la chambre de réhydratation avant

d'y mettre les languettes de gel 7 cm (Immobilin Dry Strip, pH 3-10, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Suède). Ensuite les languettes ont été recouvertes avec de l'huile minérale toute la nuit.

La focalisation isoélectrique a été faite par le système Multiphor 2 Electrophoresis System (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) selon le programme suivant : 0-200 V pour une durée de 30 min, 1000 V pour 20 min, 1000-3500V pour 1 h 30 min, 3500 V pour 6 h. Après la focalisation isoélectrique, une électrophorèse sur gel (10 cm) SDS-PAGE a été effectuée par le système Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BIO-Rad Laboratoires, USA) selon la méthode décrite par Laemmli, (1970). Les deux gels ont été équilibrés d'abord pour 15 minutes dans une solution permettant la réduction des protéines (6 M Urée, 2 % SDS, 30 % Glycérol, 0.1M Tampon Tris-HCL, pH 6.8, 12.5mM DTT), ensuite dans une solution permettant l'alkylation des protéines contenant 6 M Urée, 2 % SDS, 30 % Glycérol, 0.1 M Tampon Tris-HCL pH 6.8, 12.5 mM Iodoacetamide pour une durée 15 minutes. L'un des gels de polyacrylamide a été coloré à l'argent (Figure 4-A), l'autre a été transféré sur une membrane de nitrocellulose avec le système Mini Trans-blot Electrophoresis transfert cell (Bio-Rad Laboratories USA) selon la méthode de Towbin, (1979). La membrane de nitrocellulose a été incubée avec l'anticorps 30B3 et la protéine d'intérêt a été révélée (par chemiluminescence ECL) à un point isoélectrique aux environs de  $pI=3$  témoignant du caractère anionique de la protéine (Figure 4-B). Par conséquent, la chromatographie qui a été utilisée pour extraire la protéine 30B3 est la chromatographie anionique ou "échangeuse d'anions" sur DEAE-Sephacel (sigma –Aldrich Co, St Louis MO). Le support chromatographique est constitué de billes de polymères insolubles sur lesquels des groupements Diethyl AminoEthyl (DEAE) chargés positivement sont liés.

La résine DEAE-Sephacel a de l'affinité envers les résidus chargés négativement qui collent par affinité électrostatique.

Les billes de la résine DEAE Sephacel ont été utilisées au fond d'un tube plutôt que la résine en colonne ce qui est pratique dans les premières étapes d'une purification surtout dans le cas de très grands volumes de matériel. Le gel de DEAE Sephacel est d'abord équilibré trois fois avec le tampon de solubilisation additionné de 0.1% du Triton X-100 avant d'ajouter l'extrait cellulaire (E). Après une incubation de 2h à la température de la pièce, l'ensemble des protéines acides a été capable de s'adsorber aux billes de DEAE-Sephacel par des liaisons électrostatiques. La résine a été centrifugée afin d'éliminer le matériel non lié, l'ensemble est ensuite lavé avant de procéder à une élution des protéines acides collées à la résine. L'élution est faite avec le tampon de solubilisation additionné de chlorure de sodium (NaCl) à gradient croissant allant de faible force ionique à la plus forte (100 mM-200 mM-300 mM-400 mM-500 mM et 1 M NaCl) permettant l'élution des fractions de protéines selon leur degré de charges négatives.

Avant de mettre les fractions éluées à différentes concentrations de NaCl sur gels (10 cm) SDS-PAGE, une quantification des protéines de chaque fraction a été établie selon la méthode d'Amidoblack (Sigma, Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (Schaffer et al, 1973). Ensuite une précipitation à la méthode de TCA/Acétone a été effectuée mais des pertes considérables de l'antigène 30B3 ont été notées comparativement à la méthode de précipitation au Chloroforme/Éthanol (Weissel et al, 1984) qui était sensiblement de meilleur rendement que la précédente, encore un meilleur résultat a été obtenu suite à une concentration des protéines avec une évaporation sous vide (Speed Vac, Savant Instruments Inc, Farmingham, NY). Cette perte suite à la précipitation des protéines est applicable juste

pour la protéine 30B3, tandis que l'actine ne montre pas de différence de signal suite aux différentes méthodes de concentration des protéines avant l'électrophorèse (Figure 5).

Le premier gel issu de l'électrophorèse sur gel SDS-PAGE sur lequel les fractions éluées de la DEAE-Sephacel à différentes concentrations de NaCl ont été mises, a été coloré au Bleu de Coomassie qui laisse la bande correspondante à l'antigène 30B3 incolore (Figure 6-A\*) sans doute à cause de sa forte acidité. Le deuxième gel contenant les mêmes fractions que le premier a été transféré sur membrane de nitrocellulose pour un immunobuvardage à l'anticorps 30B3. Notre antigène d'intérêt a été entièrement révélé dans la fraction liée à la résine (forte affinité=forte charge négative), et il a été élué de la colonne DEAE Sephacel à une concentration de 500mM NaCl (Fr500Mm) (Figure 6-B). C'est donc une protéine hautement acide (probablement sialylée). L'acidité assez forte de cet antigène fait qu'on ne peut le visualiser sur un profil électrophorétique suite aux méthodes standards de coloration à l'argent (Figure 7-C) ou au Bleu de Coomassie (Figure 7-D).

#### -Mise en évidence de 30B3 sur gel :

Étant donné que nous n'arrivions pas à visualiser la bande correspondante à l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal de 30B3 sur gel coloré selon la méthode standard à l'argent et au Bleu de Coomassie (Figure 7-C-D) comme plusieurs autres protéines fortement acides, comme celles trouvées dans l'os ou la dentine.

Le colorant cationique bleu, le « Stains all » permet la visualisation et l'identification de ses protéines: les protéines hautement acides sont colorés en bleu et les protéoglycans intacts sont colorés en violet, alors que celles moins acides apparaissent légèrement roses. Nous

avons donc opté pour la coloration au « Stains all » (Goldberg et al, 1997). Le protocole se déroule en 3 étapes :

1-Se débarrasser du SDS

2-Coloration au « Stains all »

3- Amplification à l'argent

La bande de 30B3 apparaît de couleur bleue violette témoignant de la forte acidité de cet antigène (Figure 7-A). Cependant l'utilisation du « Stains all » est relativement limitée par la faible sensibilité de ce colorant et l'instabilité à la lumière. Pour remédier à ces anomalies la coloration au « Stains all » est suivit par une incubation et un développement dans le nitrate d'argent (Figure 7-B). Par étude densitométrique, il a été démontré que l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité de protéine acide sur le gel et de ce fait elle peut même être utilisée pour la quantification (Goldberg et al, 1997).

#### B-2 Chromatographie d'affinité sur une lectine immobilisée (Concanavaleine A-Sepharose) :

L'antigène 30B3 est une glycoprotéine transmembranaire avec des attachements glucidiques N-liés sur des résidus Asparagine (Figure2-B). Il est fortement probable qu'elle contient donc des oligosaccharides de type complexe qui pourront servir de critère de séparation par la chromatographie d'affinité avec des lectines. L'affinité de trois types de lectine pour l'antigène 30B3 a été testée afin de trouver laquelle des trois serait le meilleur moyen de lier et séparer cette protéine.

(1)- L'Agglutinine de Germe de Blé (WGA) immobilisée sur Sepharose-6MB (Amersham Pharmacia Biotech AB, Suède) est une lectine qui se lie spécifiquement aux résidus N-Acétyl-Glucosamine.

(2)- Griffonia Simplicifolia (GS-Agarose) (EY Laboratories, INC, SAN MATEO) qui possède une grande affinité pour les résidus D-Galactose.

L'éluion à partir de ces deux colonnes de lectine (1) et (2) a été faite avec le N-Acétyl-glucosamine et le N-Acétyl-D-Galactose (Sigma Chemical CO St Louis MO) respectivement.

(3)- La troisième lectine est la Concanavaleine A (ConA) qui est une protéine isolée de la graine de *Canavalia Ensiformis* (Jack bean) et qui réagit spécifiquement avec l'alpha D Mannose. Cette lectine existe comme tétramère de sous unités identiques d'approximativement 26,000 daltons; chacune d'elles exige des ions de calcium ou de manganèse à chacun de ses accepteurs de saccharides.

Les procédures pour purifier les protéines intégrales membranaires, requièrent l'utilisation des détergents. L'inconvénient de ceux-ci est qu'ils peuvent inactiver les lectines et entraîner une éluion des sous unités de la lectine. Pour contourner ce problème, nous avons stabilisé les lectine utilisées selon la méthode de Scher et al, (1989), qui forme des ponts covalents entre les sous unités de la Concanavaleine A par traitement à la glutaraldehyde. Cette procédure n'altère pas la capacité de liaison (affinité) de la lectine immobilisée. Ainsi stabilisée, la lectine immobilisée a été empaquetée par centrifugation et équilibrée avec le tampon de solubilisation additionné de 1% TritonX-100 et 100 mM MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub>. La fraction (Fr500mM) obtenue par chromatographie d'échange ionique (DEAE-Sepacel) a été incubée avec la ConA-Sepharose pendant 12 h à 4°C. Suite à une centrifugation, on

s'est débarrassé des protéines non liées à la colonne. Le sédiment obtenu a été lavé 3 fois au même tampon, avant d'éluer les glycoprotéines liées avec 0.4 M méthyle-  $\alpha$ -D-mannopyranoside (incubation de 12 h, 4<sup>0</sup>C). Après une centrifugation à 12000 rpm, 10 min, on récupère le surnageant contenant les protéines éluées de la ConA, c'est la fraction F2. Une électrophorèse sur deux gels SDS-PAGE (20 cm) a été préparée, contenant chacun la fraction Fr500mM issue de la chromatographie anionique, la fraction non liée à la colonne(ConA-Sepharose) et la fraction F2 (liée à ConA-Sepharose). Le premier gel est transféré sur membrane de nitrocellulose pour un immunobuvardage à l'anticorps 30B3 (Figure 8-B). Le deuxième gel est coloré au Stains-all (Figure 8-A).

Le même protocole a été suivi pour les deux autres lectine, GS (Figure 9-A) et WGA (Figure 9-B) qui présentent une affinité beaucoup moindre pour l'antigène 30B3 comparée à la ConA qui présente une forte affinité envers cet antigène. Ceci atteste encore une fois que cet antigène est une glycoprotéine riche en résidus mannose.

### B-3 Chromatographie d'immunoaffinité sur l'anticorps 30B3 fixé à la protéine G :

Les étapes antérieures de purification nous ont fourni une fraction F2, riche en glycoprotéines mannosylés hautement acides, parmi lesquelles se trouve l'antigène 30B3. Le profile électrophorétique de cette fraction est toujours trop complexe pour déclarer la réussite de l'approche et, par conséquent, nous avons décidé d'insérer une étape de purification supplémentaire par immunoaffinité. L' anticorps 30B3 a été immobilisé sur une matrice de protéine G-Sepharose. La protéine G lie seulement les portions Fc des immunoglobulines G; l'anticorps sera ainsi fixé à la matrice insoluble avec ses portions Fab

orientées vers le milieu liquide où se trouve l'antigène. On a obtenu donc une résine d'immunoaffinité d'efficacité maximale.

-Immobilisation de l'anticorps 30B3 sur la protéine G-Sepharose :

Les billes de protéine G-Sepharose (Gamma binding G Sepharose) (Amersham Biosciences, Suède) ont été incubées pendant 1 heure à la température ambiante avec l' anticorps 30B3 sous forme de liquide d'ascite dilué dans le tampon de liaison contenant 20 mM de phosphate sodium, pH 7,0. Les billes de Sepharose ont été lavées extensivement et récupérées par centrifugation à faible vitesse. Les liaisons entre l' anticorps et la protéine G ont été stabilisées par des ponts covalents en incubant la résine à la température ambiante, pour une heure, dans un tampon 50 mM borate de sodium pH 8,2 contenant 13.2 mg de Dimethylpimelimidate (DMP) et 0.2M de triéthanolamine. Après un lavage au tampon de liaison, un lavage de 10 minutes a été effectué avec le tampon de blocage contenant 0.1 M de triéthanolamine pH = 8.2. Finalement la colonne (protéine G-Anticorps 30B3) est lavée avec le tampon d'élution contenant 0.1M Glycine-HCl, pH 2.7 et 1% Triton X-100 et re-équilibrée en 20 mM tampon phosphate pH 7.0 contenant la même concentration de détergent. La fraction F2 issue de la chromatographie d'affinité sur ConA-Sepharose a été chargée sur la colonne et incubée pour une durée de 12 h à 4°C. Pour se débarrasser des protéines non liées une centrifugation a été effectuée, le culot est lavé avec un tampon contenant 0.2 M de triéthanolamine pH = 8.2 avant d'éluer la fraction liée à la colonne avec le tampon d'élution à pH 2.7. La fraction éluee contenant l'antigène d'intérêt a été solubilisée en tampon Laemmli et chargée sur un grand gel SDS-PAGE (20cm) pour



obtenir une résolution supérieure de séparation. Le gel est ensuite coloré au «Stains all». Cette fois-ci le profil électrophorétique ne montre pas de contamination, sauf pour les immunoglobulines éluées de la colonne avec l'antigène 30B3 (Figure10\*\*). Leur présence sur le profil électrophorétique n'affecte pas la détection de la bande qui correspond à notre protéine d'intérêt.

#### B-4 Identification de la protéine 30B3 :

Nous avons décidé d'utiliser en parallèle deux méthodes pour identifier la nature biochimique de la protéine purifiée, qui est reconnue par l'anticorps 30B3.

##### a- Microséquençage par dégradation Edman :

La protéine éluée de la colonne d'immunoaffinité a été solubilisée en tampon Laemmli, chargée sur un gel de polyacrylamide (10%, 20 cm) et ensuite transférée sur une ProBlott polyvinyle fluorure (PVDF) membrane dans un tampon 3-cyclohexylamino-1-propanesulfonate (Matsudaira, 1987). Étant donné que l'antigène 30B3 ne se colore que par le «Stains all», colorant inutilisable sur les membranes de nitrocellulose ou PVDF, nous avons suivi la stratégie suivante pour localiser la bande d'intérêt. Un échantillon latéral de la membrane PVDF a été soumis à une immunodétection par immunobuvardage de l'antigène 30B3 tandis que le reste a été légèrement coloré par Bleu de Coomassie R-250 pour mettre en évidence les éventuels contaminants (Figure10-a). L'alignement des deux parties a permis de découper la portion de membrane contenant seulement la protéine

recherchée et de la soumettre à une analyse de séquence N-terminale d'acides aminés par dégradation Edman ; celle-ci a été effectuée dans un séquenceur automatique 494-cLC-Procise HS à l'Institut de Biotechnologie, Montréal. L'analyse de la structure primaire d'une protéine par dégradation Edman est un processus cyclique par lequel les acides aminés sont clivés un par un, à partir du N-terminal de la protéine. C'est un procédé classique qui comporte des étapes de marquage de l'acide aminé N-terminal, clivage sélectif et unique de celui-ci, l'identification du résidu libéré et la répétition du cycle pour détecter les acides aminés suivants.

Une séquence N-terminale de 15 acides aminés a été trouvée par cette méthode: **ENSTQGVFPPVPTNE**. Par comparaison avec les structures primaires de protéines dans les banques de données (système Blast, NCBI), nous avons trouvé que cette séquence identifie l'homologue de rat de la protéine CD34 (Figure 11). Chez le rat, cette protéine n'existait que sous la forme d'une séquence génomique; nous serions donc les premiers à confirmer sa présence sous la forme de traduction chez cet animal.

Il est intéressant de remarquer que, dans la structure complète, dérivée de l'analyse génomique du précurseur de CD34, la séquence trouvée par nous ne se trouve pas à l'extrémité N-terminale, mais 36 acides aminés plus à l'intérieur. Chez la souris, deux isoformes de la protéine CD34 ont été décrites, issues d'un épissage alternatif : une forme longue, ayant 57 acides aminés de plus dans sa partie intra-cytoplasmique que l'autre, plus courte (Suda et al, 1992) (Figure 20). Les mêmes auteurs montrent que le niveau d'expression de chacune des deux isoformes varie d'un organe à l'autre.

### b-Spectrométrie de masse :

Pour valider l'identification antérieure de notre protéine cible nous avons fait appel à une méthode alternative – la spectrométrie de masse. La fraction issue de la chromatographie d'immunoaffinité a été chargée sur un gel SDS-PAGE (10% acrylamide, 20 cm). La bande correspondant à l'antigène 30B3 a été mise en évidence par coloration au "Stains-all", découpée du gel et digérée à la trypsine. Les fragments résultants ont été injectés dans une micro-colonne de chromatographie en phase inverse couplée à un spectromètre de masse (LC-QTOF). Cette analyse a été effectuée au Centre de Spectrométrie de Masse, Génome Québec, Montréal.

Le principe général de la variante de spectrométrie de masse utilisée (LC-QTOF or liquid chromatography-time of flight) par nous repose sur une fragmentation préalable de la protéine analysée par digestion enzymatique (habituellement à la trypsine). Les fragments triptyques générés sont séparés par une chromatographie sur des colonnes capillaires ayant quelques micromètres en diamètre. Au fur et à mesure que les peptides triptyques quittent la colonne, ils sont ionisés et injectés dans le champ électrique accélérateur d'un spectromètre capable de mesurer de manière extrêmement précise leur masse. Ceci se fait par le temps que mettent les fragments ionisés pour parcourir le chemin entre la colonne et le détecteur (Figure12). Les gros ions mettent plus de temps que les plus petits. Au cours de ce voyage les peptides peuvent être soumis à des collisions ioniques supplémentaires qui vont briser, de manière aléatoire, les liaisons peptidiques entre les acides aminés du peptide étudié et générer une foule de fragments de différentes tailles. L'analyse combinatoire des masses de ces fragments permet de reconstituer la séquence du peptide original.

Pour la bande correspondant à l'antigène 30B3 purifié, l'analyse par la spectrométrie de masse nous a fourni 5 peptides uniques caractéristiques à la protéine CD34 (Figure 13). Le score élevé de ces peptides démontre la crédibilité du résultat. De nouveau, aucun des peptides ne se retrouve dans la partie N-terminale de la séquence intégrale du CD34 de rat. Les deux méthodes d'analyse – le microséquençage par dégradation Edman et la spectrométrie de masse identifient donc, de manière irréfutable, notre protéine comme étant l'homologue de rat de la protéine CD34. Une présentation détaillée de cette protéine se trouve dans la deuxième partie de ce mémoire (pages 49-54).

## **2-Expression de CD34 au niveau des différents lits vasculaires :**

L'expression comparative de CD34 à la surface de la membrane endothéliale (front luminale) purifiée par utilisation de la silice cationique colloïdale (Chaney et Jacobson, 1983) au niveau des trois lits vasculaires : poumon, cœur et cerveau a été effectuée par immunobuvardage à l'anticorps 30B3. Le CD34 s'est révélé inexistant au niveau de l'endothélium du cerveau ou l'épitope reconnu par notre anticorps monoclonal (30B3) fait défaut dans la vascularisation cérébrale (Figure 14). Le même résultat a été trouvé par Fina et al, (1990) qui suite à des études immunohistochimiques, n'a pas réussi à trouver le CD34 dans le foie foetal et le système nerveux central adulte.

Au niveau des membranes endothéliales du cœur, l'immunobuvardage à l'anticorps monoclonal 30B3 met en évidence une bande qui correspond à un poids moléculaire plus élevé (100-119KDa) que celle au niveau des membranes endothéliales du poumon (85-99 KDa) (Figure 14). Pour voir si cette différence de poids moléculaire traduirait une

spécificité de glycosylation de CD34 pour chaque tissu, une série de réactions de déglycosylation enzymatique de la protéine CD34 a été effectuée.

### **3-Déglycosylation enzymatique :**

#### **A-Déglycosylation des résidus glucidiques N-liés :**

La déglycosylation des glycoprotéines peut se faire de deux manières : clivage enzymatique ou chimique. Nous avons opté pour le premier type de déglycosylation étant donné que la déglycosylation chimique affecte la structure de la protéine et elle n'est pas spécifique pour un type de résidus glucidiques.

L'endoglycosydase F (endo F) est une enzyme capable de débarrasser les glycoprotéines de leurs résidus glucidiques N-liés. Nous avons suivi le même protocole de déglycosylation à l'endoF fait par Ghitescu et al, (1999) sur des membranes endothéliales P2 de poumons et de cœur. Le résultat du clivage des résidus N-liés par la digestion à l'endoglysidase F a abouti à une diminution du poids moléculaire la protéine CD34 dans les deux lits vasculaires (poumon et cœur) (Figure 15). Nous avons noté aussi une amplification du signal après le clivage des résidus glucidiques N-liés dans les deux tissus. L'intensité du signal de la bande correspondante à la protéine CD34 est plus importante au niveau du cœur après le clivage des résidus N-liés (Figure 15-A). Ce qui peut être expliqué par le dégagement des épitopes reconnus par l'anticorps monoclonal 30B3 qui se trouvaient masquer par les résidus glucidiques attachés sur l'asparagine.

Même après le clivage à l'endoF, la différence de poids moléculaire entre les deux isoformes membranaires de CD34 cardiaque et pulmonaire persiste. Ce qui présume que la différence de poids moléculaires ne résident pas dans la glycosylation de type N-lié de cette protéine. Pour trancher si c'est le type de glycosylation qui est à l'origine de cette différence de poids moléculaire, une déglycosylation complète de cette protéine a été effectuée.

#### B-Déglycosylation des résidus glucidiques O-liés et N- liés :

La O-glycosylation est caractérisée par l'addition de N-acétylglucosamine (O-GlcNac) sur des sérines et thréonines proches de prolines (Sites Ser-Pro ou Thr-Pro) (Lefebvre et al, 2003). Pour voir si c'est la partie glucidique liée sur les résidus serine et /ou thréonine de la protéine (O-lié) qui diffère dans les deux lits vasculaires, l'endo F a été utilisée en combinaison avec la O-Glycosidase et Neuraminidase (enzymes utilisées dans l'ablation des carbohydrates O-liés à la serine ou thréonine). Des membranes endothéliales P2 purifiées de poumon et de cœur de rat ont été solubilisées dans le SDS et dénaturées à 100°C. Ensuite, elles ont été incubées avec un mélange de : endo F, O-glycosidase et neuraminidase (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany) dans 40 mM tampon phosphate de sodium e pH 7.2, 20 mM EDTA, 1% Octylglucoside). L'incubation est faite à la température ambiante pendant 24 heures. Un contrôle positif avec la glycoprotéine fetuine atteste de l'efficacité du clivage (Figure 16-A). Deux autres contrôles ont été préparés en parallèle, contenant la même quantité de protéines des membranes endothéliales P2 purifiées de poumon et cœur de rat mais sans l'ajout d'enzymes. Les

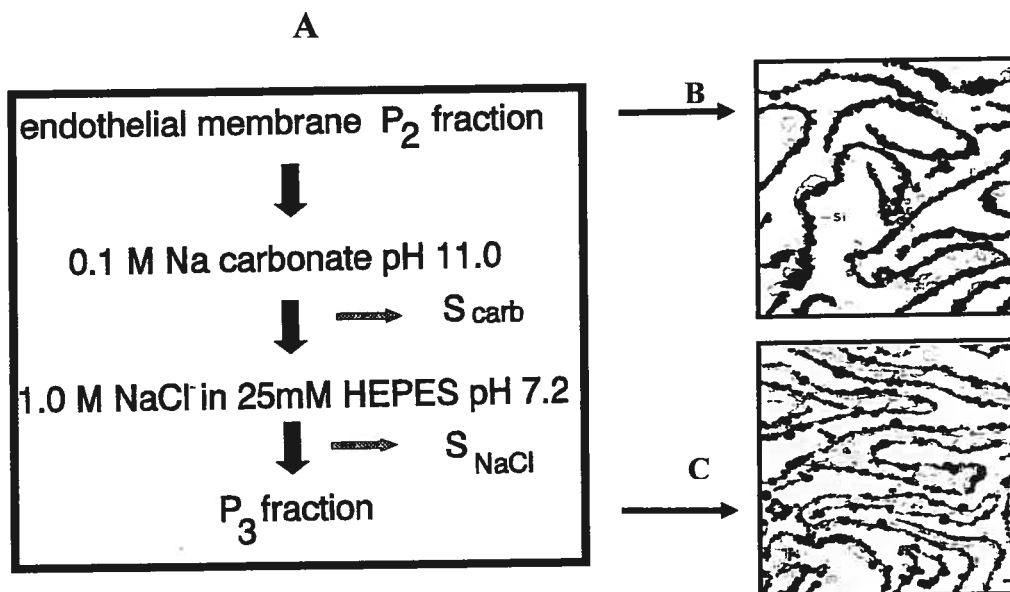
mêmes étapes de préparation des échantillons que dans le cas du clivage enzymatique à l'endoF ont été suivit jusqu'à l'électrophorèse sur gel SDS PAGE de 20cm. Après le transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose, un immunobuvardage à l'anticorps monoclonal 30B3 a été effectué. Ce dernier est incapable de reconnaître son antigène spécifique après la déglycosylation des résidus O-liés de la protéine (Figure 16-B). Ceci suggère que l'anticorps 30B3 est dirigé contre des épitopes sensibles à la neuraminidase et/ou la O-glycosidase. Ce résultat classe notre anticorps monoclonal 30B3 parmi les anticorps de l'antigène CD34 de classe I ou I a (Tableau II) qui reconnaissent des épitopes hautement ou partiellement sensibles à la Neuraminidase (Sutherland et al, 1992). Pour déterminer si les deux isoformes après déglycosylation complète se trouvent au même poids moléculaire il a fallu mettre en évidence la protéine CD34 par un autre anticorps de classe III qui reconnaît les épitopes résistants à la digestion par la Neuraminidase et Glycoprotease. L'anticorps CD34 (C-18.sc 7045, Santa Cruz Biothecnology, inc) appartient à la classe III et a de l'affinité pour un peptide de 12-20 acides aminés correspondant aux derniers 50 acides aminés du domaine cytoplasmique terminal de la forme complète de la molécule. Cet anticorps ne reconnaît pas la forme tronquée de CD34 qui a un domaine cytoplasmique très court de seulement 10 acides aminés.

Avec cet anticorps nous avons pu mettre en évidence la protéine CD34 au niveau du poumon après la déglycosylation complète de la protéine mais au niveau de l'endothélium de cœur cet anticorps n'est pas capable de mettre en évidence la bande correspondante à la protéine CD34 (Figure 16-C).

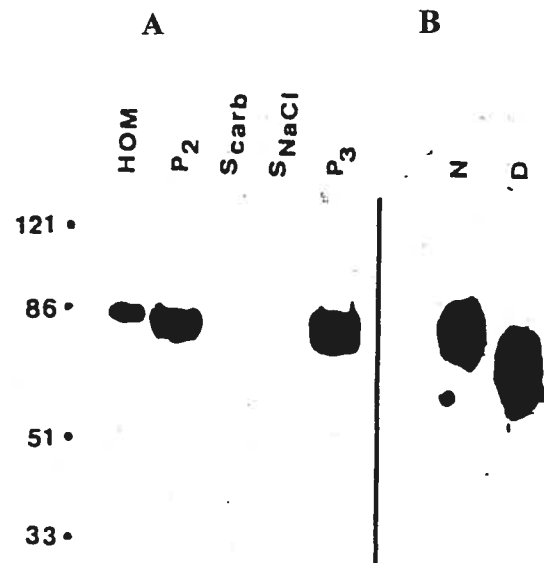
Ce résultat suggère qu'au niveau de la microvascularisation du cœur, seulement la forme tronquée de CD34 est exprimée, alors qu'au niveau de la vascularisation pulmonaire la

forme complète à domaine cytoplasmique long existe. Pour trancher dans la question de différence de poids moléculaire, il aura fallu faire appel à un troisième anticorps qui serait spécifique pour une séquence de la partie N-terminal peptidique dans le domaine extracellulaire de la protéine CD34 pour mettre en évidence l'isoforme CD34 au niveau de la vascularisation endothéliale du cœur après déglycosylation complète. Cet anticorps n'est pas disponible. Une autre approche pour résoudre ce problème serait de vérifier l'ARN messager dans les deux tissus (cœur et poumon) par un Northern blot. Mon projet de recherche a pris un autre virage depuis l'identification de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 30B3 comme étant la protéine CD34 qui est une molécule d'adhésion dont la fonction exacte est très peu étudiée. Nous avons par conséquent trouvé très intéressant de voir l'expression de cette molécule dans la vascularisation pulmonaire de rat au cours du diabète et après traitement à l'insuline en comparaison avec les autres molécules d'adhésion (PECAM1, CEA-CAM1, ICAM1, VCAM1, P-selectine, E-selectine, Intégrine  $\alpha v$  et Intégrine  $\beta 5$ ). Ces molécules d'adhésion endothéliales participent au phénomène d'adhésion, leucocytes- endothélium via les interactions avec leurs ligands leucocytaires. Ceci a fait le sujet du deuxième volet de mon projet de recherche.

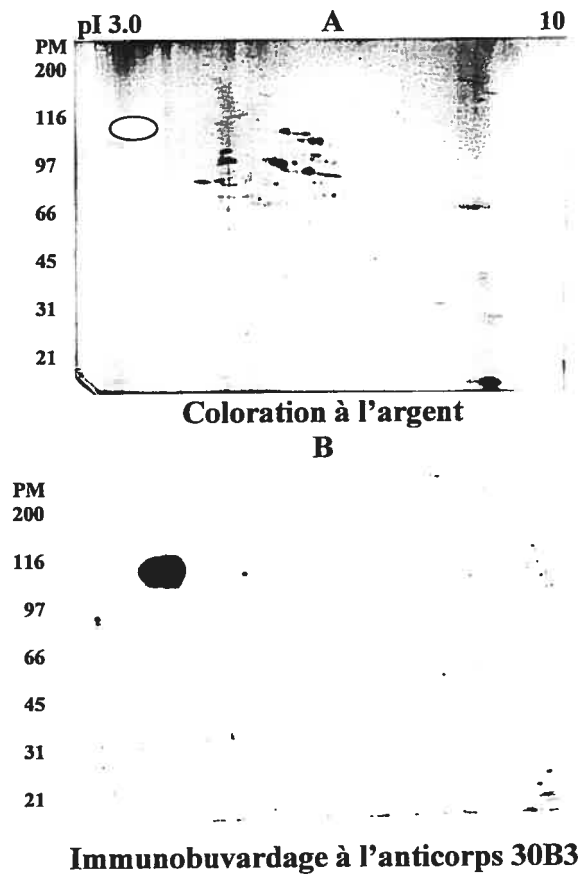




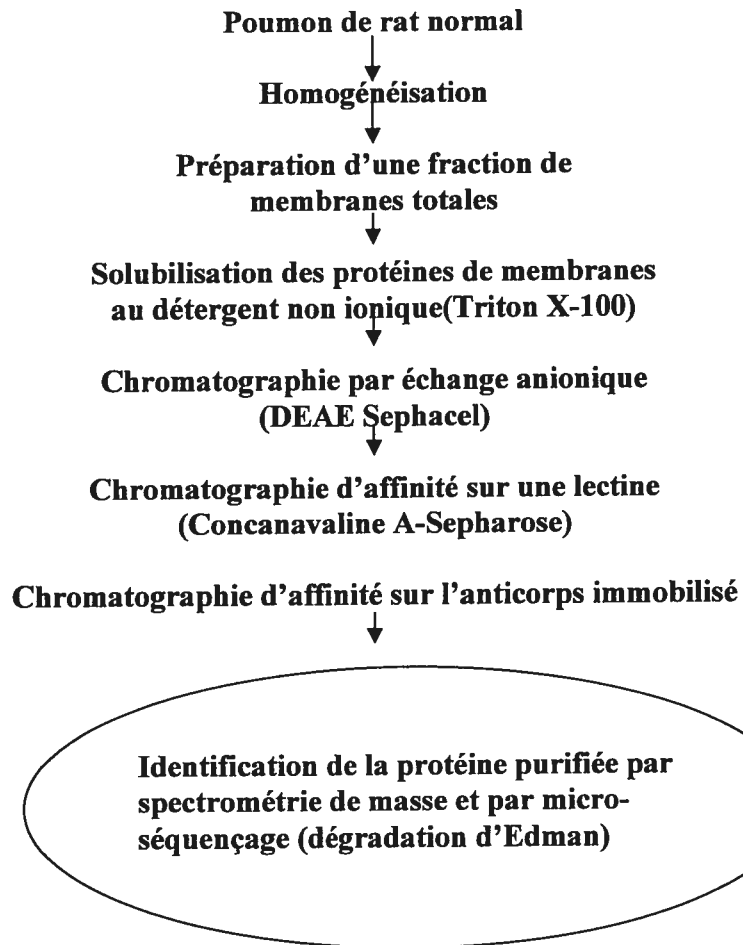
**Figure1 :** A-Présentation schématique de la méthode d'extraction séquentielle des protéines périphériques des membranes plasmiques lumineales des cellules endothéliales. Les protéines de la fraction P2 des membranes plasmiques lumineales isolées des cellules endothéliales sont solubilisées par traitement séquentiel à pH élevé (50 Mm Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11.0) et à haute concentration saline (1M NaCl, pH 7.2). (B) Aspect des membranes P2 purifiées (les billes de silice sont étroitement associées à la membrane plasmique lumineale) et des membranes P3 (C) après l'extraction sélective des protéines membranaires périphériques à partir des membranes P2. Les feuillettes de la fraction P3 décorées par les billes de silices ont l'aspect plus fragmenté que ceux de la fraction P2.



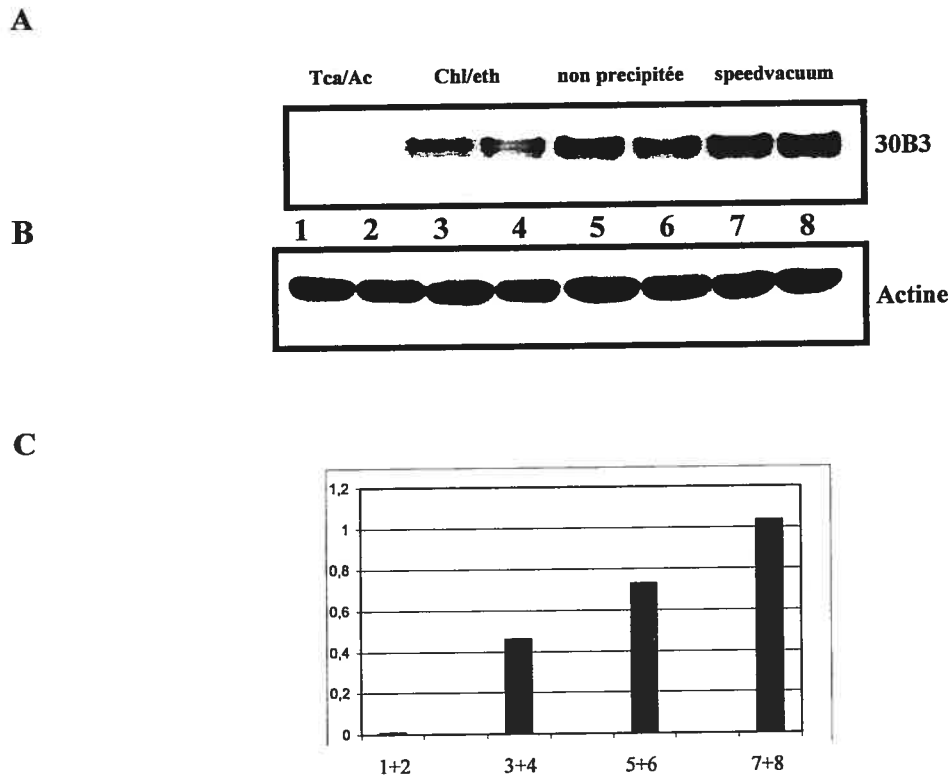
**Figure 2:** Les différentes fractions obtenues par purification séquentielle des membranes plasmiques endothéliales après électrophorèse sur gel SDS-PAGE suivit d'un immunobuvardage à l'anticorps 30B3 (A). Scarb et SNaCl constituent deux fractions de protéines périphériques extraites de P<sub>2</sub> par 50 mM de Na Carbonate pH 11.0 et 1 M NaCl respectivement. P<sub>3</sub> c'est fraction finale (riches en protéines intégrales) obtenue après extraction des deux fractions de protéines périphériques. (D) Digestion des glycoprotéines des membranes endothéliales lumineales P<sub>2</sub> à l'endoglycosydase F diminue nettement le poids moléculaire de l'antigène 30B3, comparativement au contrôle (N) (membranes P<sub>2</sub> non digérées à l'endoglycosydase F). (A) et (B)- Immunobuvardage à l'anticorps 30B3



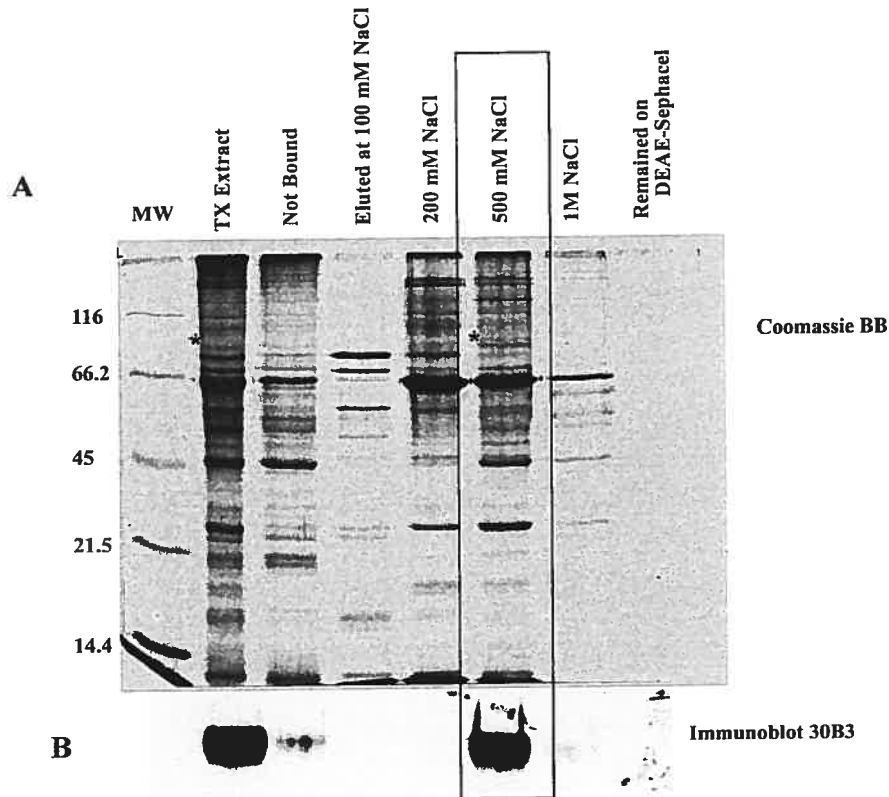
**Figure 3 :** Détermination de la charge (point isoélectrique) de l'antigène 30B3 par électrophorèse à deux dimensions (2D). Focalisation isoélectrique de 50 microgrammes des protéines qui ont été chargées dans languettes Immobiline de 7 cm de gradient de pH immobilisé linéaire 3-10 (IPG 3-10L), suivit par une séparation selon le poids moléculaire des protéines sur gel (10%) SDS-PAGE. (A) coloration à l'argent. (B) Immunobuvardage à l'anticorps 30B3 suite au transfert du gel sur membrane de nitrocellulose.



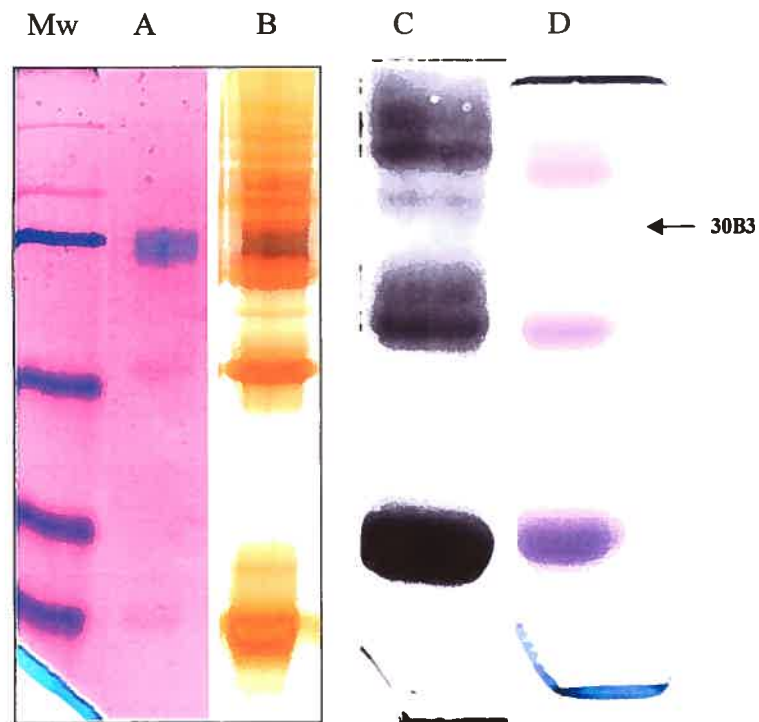
**Figure 4 :** Représentation schématique de la stratégie de purification de la protéine reconnue par l'antigène 30B3



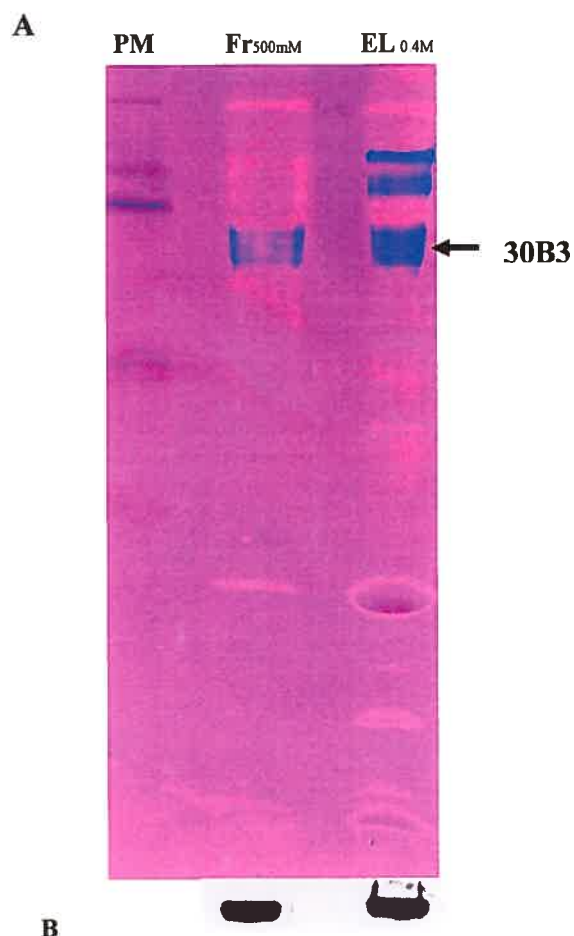
**Figure 5 :** Comparaison des différentes méthodes de concentration des protéines dans une solution. 40 $\mu$ g d'homogénat total de poumon sont soumis à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE après précipitation (1+2) au TCA/Acétone, (3+4) au chloroforme/éthanol, (5+6) homogénats non précipitée, (7+8) homogénats concentré avec une évaporation au -speed vacuum-. (A) Immunobuvardage à l'anticorps 30B3. L'intensité du signal détecté par ECL est très faible suite à la précipitation au TCA/Acétone et plus fort suite à l'évaporation sous vide. (B) Immunobuvardage à l'anticorps anti-actine qui montre une même intensité du signal pour tous les échantillons. (C) quantification densimétrique de l'intensité du signal détecté par l'anticorps 30B3 par rapport à celui détecté par l'anti-actine.



**Figure 6 :** Détection de l'antigène 30B3 au niveau des différentes fractions éluées à partir de la colonne de chromatographie d'échange anionique à des concentrations salines (NaCl) allant de 100 mM à 1M, (A) coloration au Bleu de Coomassie du gel SDS-PAGE (10cm) après électrophorèse, la bande correspondante à l'antigène 30B3 reste incolore(\*). (B) Immunobuvardage à l'anticorps 30B3 suite au transfert du gel sur membrane de nitrocellulose. À noter la forte acidité de 30B3 qui est éluée à 500mM NaCl.

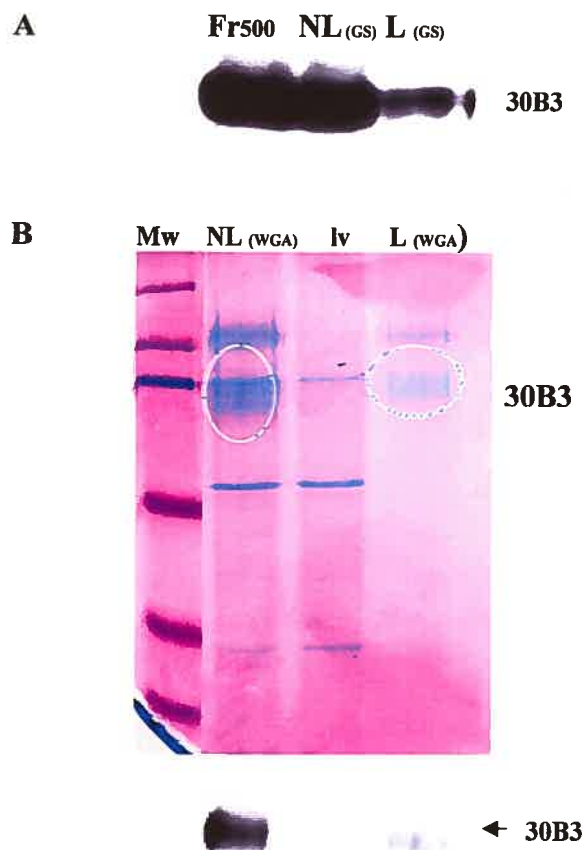


**Figure 7 :** Mise en évidence de l'antigène 30B3 par différents types de coloration du gel SDS-PAGE (A) au Stain-all, (B) amplification à l'argent après la coloration au Stains all, (C) coloration à l'argent, (D) coloration au Bleu Coomassie. La bande de la protéine 30B3 n'est colorée qu'avec le Stain-all, elle reste incolore avec le bleu de coomassie et le nitrate d'argent

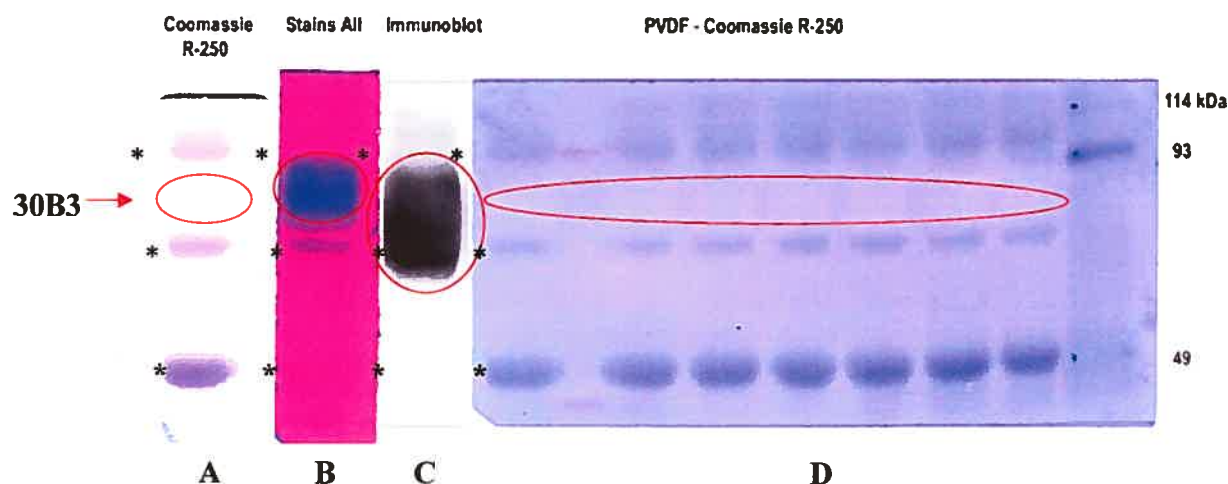


**Figure 8 :** Résultats de la chromatographie d'affinité sur ConA. (A) Coloration du gel SDS-PAGE (20cm) au Stains all, la bande correspondante à l'antigène 30B3 apparaît en bleu violet. (Fr<sup>500mM</sup>) c'est la fraction éluee de la chromatographie échangeuse d'anion (DEAE Sephacel) à 500mM NaCl, (EL 0.4M) c'est l'éluat de la colonne de ConA-Sepharose à 0.4 M alpha-D-mannopyranosyl. (B) Résultat de l'immunobuvardage avec l'anticorps 30B3 suite au transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose.





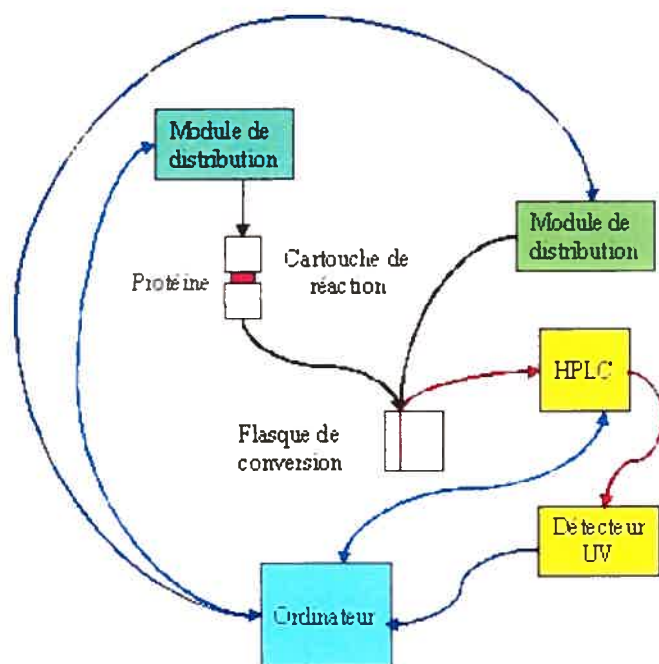
**Figure 9** : Résultats de la chromatographie d'affinité sur les deux lectine : (A) Griffonia Simplicifolia (GS) et (B) L'Agglutinine de Germe de Blé (WGA). (Fr500mM) c'est la fraction éluée de la chromatographie échangeuse d'anion (DEAE-Sephacel) à 500mM NaCl, L<sub>(GS)</sub> c'est l'éluât de la chromatographie d'affinité (GS-Sepharose) à 0.1 M alpha D galactose, L<sub>(WGA)</sub> c'est l'éluât de la chromatographie d'affinité (WGA-Sepahrose) à 0.2 M de N-Acétyle-glucosamine, (NL) les protéines non liée à la lectine, (Lv) c'est la fraction issue du lavage de la lectine avant l'élution.



**Figure 10** : Résultats de la chromatographie d'affinité (l'anticorps 30B3 fixé à la protéine G). La fraction éluée de la chromatographie d'affinité est mise sur gel SDS-PAGE (20cm). Après une électrophorèse, le gel est découpé en 3 parties (A) coloration au Bleu de Coomassie R-250, (B) coloration au Stain-all. (C) Immunobuvardage à l'anticorps 30B3 mis en évidence par diaminobenzamidine (DAB) suite à un transfert du gel sur membrane de nitrocellulose et (D) Coloration au Bleu de Coomassie R-250 de la membrane PVDF issue du transfert du gel SDS-PAGE. Les cercles entourent la bande correspondante à l'antigène reconnu par l'anticorps 30B3. La même quantité de la fraction éluée de la chromatographie d'affinité (protéine G-anticorps 30B3) a été chargée 7 fois sur le gel. La partie encerclée incolore sur la membrane PVDF colorée au Bleu de Coomassie a fait l'objet du microséquençage par dégradation d'Edman et la spectrométrie de masse.

1 MPVHRGARAG LLLPWGWVAL CLMSLLHLNN LTSVAS **ENSTQGVFPPVPTN**  
51 ESTEESITSS IPGSTSHYYL IGQDSNKTP ASETTVNFT ATPGTPSGSG  
101 TPHTFSQPQT YPTVTLPTTS DSTSTPEVEH STWNTSLPSV NVSDYSPNNV  
151 SSEMISTTEP CAHTSSSVPS IIKGDIKCSG IRGVPFTQGI CLELSEASSC  
201 EEFKK**ERGEELMQILCKKEE** TEADAGTSVC SLNLAQSEVR PECLLMVLAN  
251 STELSSKLQL MEKHQSDLRK **LGIQSFNK QD LGSHQSYSRK** TLIALVTSGV  
301 LLAILGTTGY FLMNRRSWSP TGERLGEDPY YTENGGGQGY SSGPGTSPET  
351 QGKANVTRGA QENGTGQATS RNGHSARQHV VADTEL

**Figure 11** : Résultat du micoséquençage par dégradation d'Edman. Un peptide à 15 acides aminés (**ENSTQGVFPPVPTNE**) au niveau du N-terminal a été identifié. Par comparaison avec les structures primaires de protéines dans les banques de données, la séquence génomique retrouvée correspond au précurseur de CD34 chez l'humain. Les 4 séquences de peptides en rouges déterminent les séquences de peptides qui vont être révélés par spectrométrie de masse.

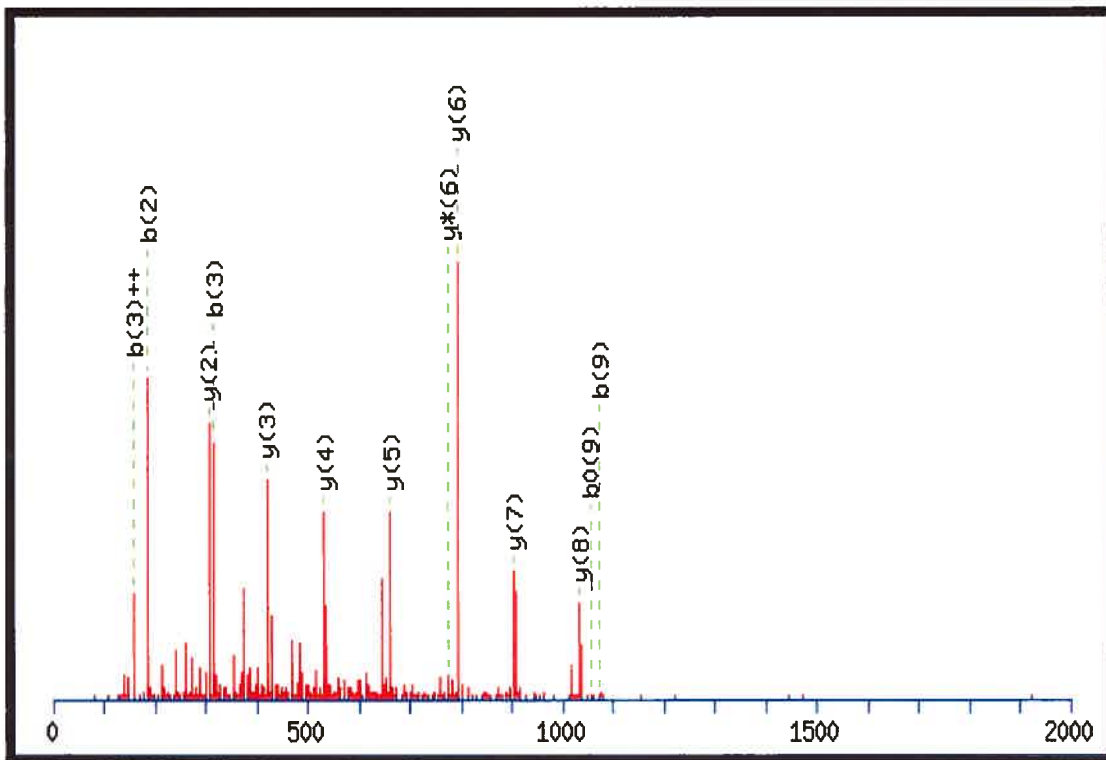


**Figure 12:** Représentation schématique du principe de la spectrométrie de masse LC - QTOF. [http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/spect\\_01.htm](http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/spect_01.htm).

A

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<a href="#">3</a>	453.69	905.37	905.50	-0.13	0	45	1	<b>LGIQSFNK</b>
<a href="#">12</a>	610.73	1219.44	1219.59	-0.15	0	60	1	<b>GEELMQILCK</b>
<a href="#">18</a>	639.21	1276.41	1276.58	-0.16	0	31	1	<b>QDLGSHQSYSR</b>
<a href="#">28</a>	761.28	1520.55	1520.73	-0.19	1	30	1	<b>ERGEELMQILCK</b>
<a href="#">14</a>	517.78	1033.54	1033.59	-0.05	1	2	1	<b>KLGIQSFNK</b>

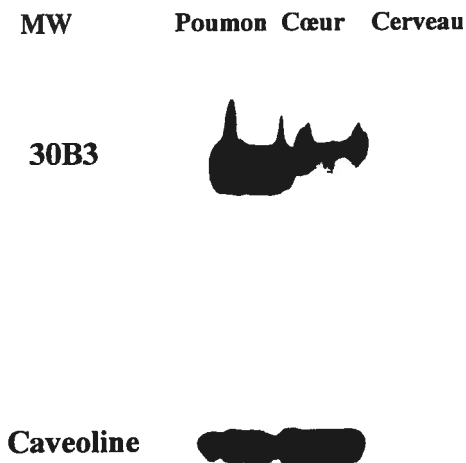
B



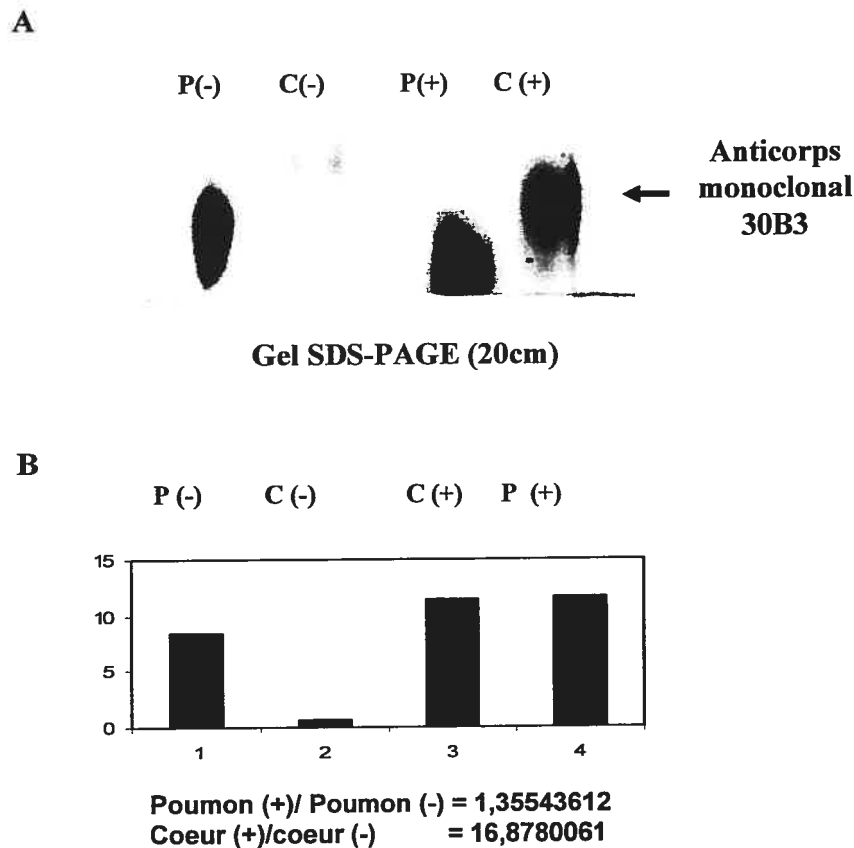
## C

#	b	b <sup>++</sup>	B*	b <sup>*++</sup>	b <sup>0</sup>	b <sup>0++</sup>	Seq.	y	y <sup>++</sup>	y*	y <sup>*++</sup>	y <sup>0</sup>	y <sup>0++</sup>	#
1	58.03	29.52					<b>G</b>							10
2	<b>187.07</b>	94.04			169.06	85.03	<b>E</b>	1163.58	582.29	1146.55	573.78	1145.57	573.29	9
3	<b>316.11</b>	<b>158.56</b>			298.10	149.56	<b>E</b>	<b>1034.54</b>	517.77	1017.51	509.26	1016.53	508.77	8
4	429.20	215.10			411.19	206.10	<b>L</b>	<b>905.50</b>	453.25	888.47	444.74			7
5	560.24	280.62			542.23	271.62	<b>M</b>	<b>792.41</b>	396.71	<b>775.38</b>	388.20			6
6	688.30	344.65	671.27	336.14	670.29	335.65	<b>Q</b>	<b>661.37</b>	331.19	644.34	322.68			5
7	801.38	401.19	784.36	392.68	783.37	392.19	<b>I</b>	<b>533.31</b>	267.16	516.29	258.65			4
8	914.47	457.74	897.44	449.22	896.46	448.73	<b>L</b>	<b>420.23</b>	210.62	403.20	202.10			3
9	<b>1074.50</b>	537.75	1057.47	529.24	<b>1056.49</b>	528.75	<b>C</b>	<b>307.14</b>	154.08	290.12	145.56			2
10							<b>K</b>	147.11	74.06	130.09	65.55			

**Figure 13** : Résultat de la spectrométrie de masse LC-QTOF (liquid chromatography-time of flight). 5 peptides (rouge) ont été mis en évidence par spectrométrie de masse dont les scores sont élevés en bleu (A) et les signaux sont très importants (B). Chaque acide aminé du «leading-peptide» **GEELMQILCK** présente un score élevé (C). Ceci démontre l'irréfutabilité du résultat obtenu.



**Figure 14 :** Expression de l'antigène 30B3 au niveau des membranes endothéliales purifiées de différents lits vasculaires : poumons, cœur et cerveau de rat. Immunobuvardage avec les anticorps 30B3 et anti-caveolin, à noter le faible signal de la bande correspondante à la protéine CD34 au niveau des membranes endothéliales plasmiques de cœur par rapport au poumon. Inversement la caveoline qui est un marqueur des cavéoles est plus exprimée au niveau des membranes endothéliales plasmiques du cœur que dans le poumon. Le CD34 n'est pas détecté au niveau du cerveau par l'anticorps monoclonal 30B3.



**Figure 15 :** Clivage des résidus N-liés suite à la digestion des membranes P2 purifiées de poumon et cœur de rat par l'endoglycosydase F. Immunobuvardage à l'anticorps 30B3 suite à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE 20cm (A). (B) Mesure densimétrique de l'intensité du signal de la bande correspondante à la protéine CD34 au niveau des membranes endothéliales de Poumon P (+) et de Cœur C (+) clivées à l'endoF par rapport aux contrôles P (-) et C (-) membranes endothéliales de Poumon et Cœur non clivés. À noter le faible signal de la bande de CD34 au niveau du cœur par rapport à son isoforme pulmonaire avant le clivage par l'endo-F et l'amplification du signal suite au clivage des résidus N-liés.





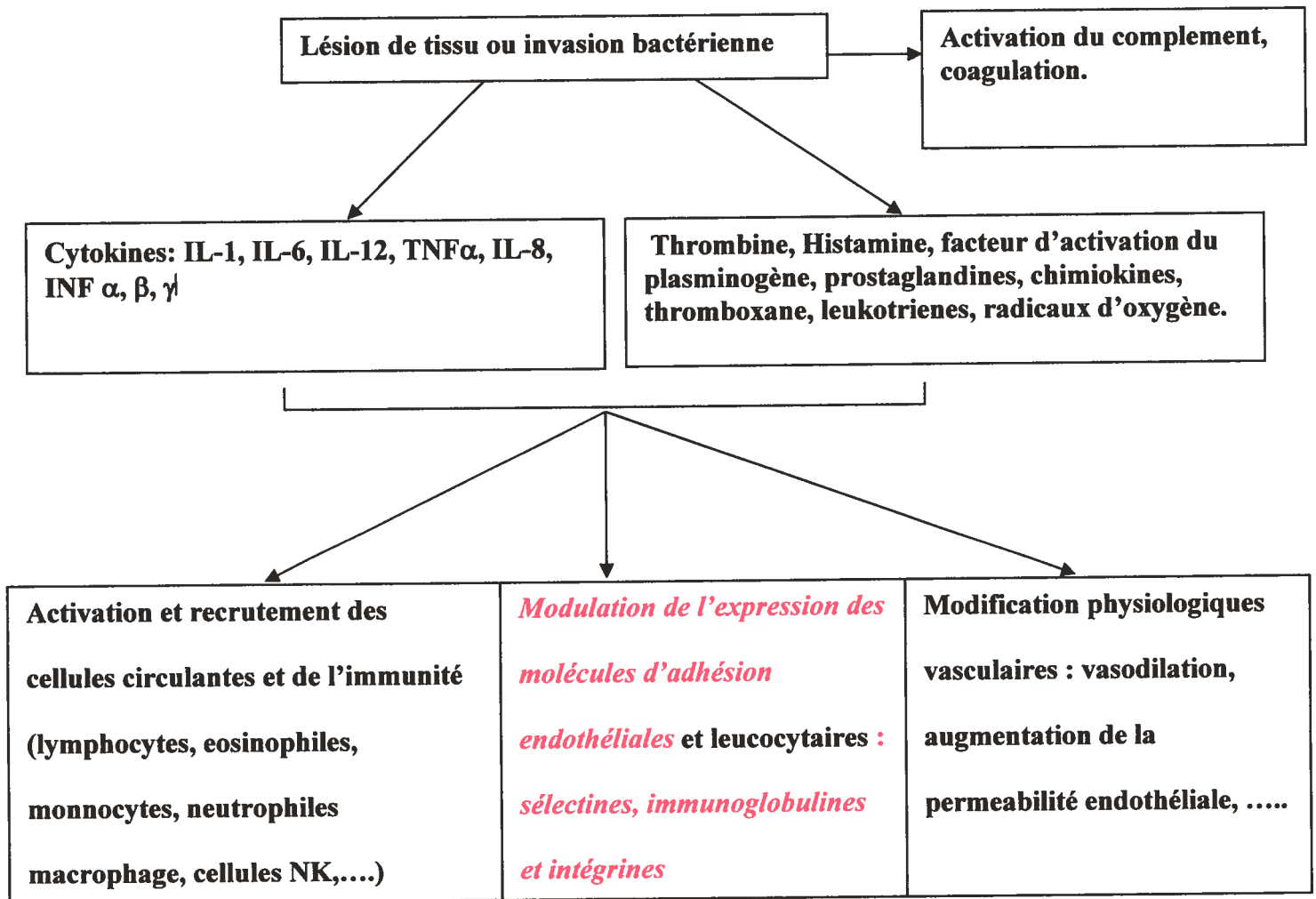
## **Introduction**

### **A-Inflammation :**

L'inflammation est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au sein d'un tissu suite à une lésion. La réaction inflammatoire représente une des réponses physiologiques de défense de l'organisme face à une agression. Cette dernière peut provenir de l'extérieur de l'organisme comme une infection ou un traumatisme ou bien de l'intérieur comme une maladie auto-immune qui se caractérise par un conflit entre des antigènes de l'organisme et des auto-anticorps dirigés contre ces antigènes. Une réaction inflammatoire est construite par l'individu agressé et dépend de la nature et de l'importance de l'agresseur. La conséquence de ce conflit sera la maladie inflammatoire qui peut se cantonner sur le site de l'agression (inflammation locale) ou qui peut diffuser à l'ensemble de l'organisme (inflammation générale).

Elle consiste en modifications de plusieurs paramètres biologiques (Figure 17) accompagnées par le déclenchement d'une réponse immunitaire compétente. De ce fait, immunité et inflammation sont deux phénomènes complémentaires. On peut distinguer deux types d'inflammation: aigue et chronique. La première est brève, durant seulement quelques jours. Si elle dure plus longtemps cependant, et elle est désignée sous le nom d'inflammation chronique.

Afin d'exercer leur fonction de défense de l'organisme, les cellules du système immunitaire accèdent aux sites de l'inflammation au niveau des tissus. Pour cela, ils doivent traverser la barrière endothéliale vasculaire.



**Figure 17:** Résumé de principaux acteurs de la réponse inflammatoire. L'altération de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales est l'un des principaux résultats de la réponse inflammatoire.

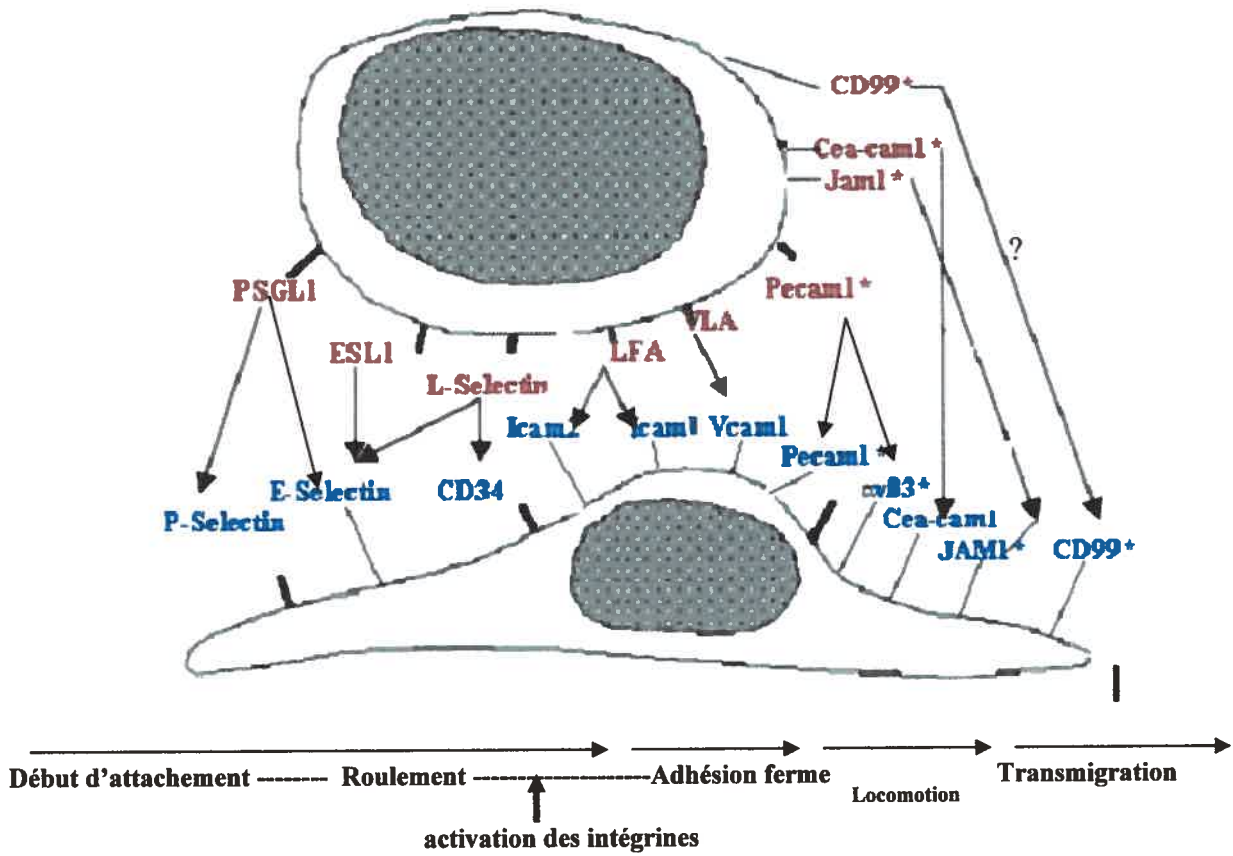
<http://faculty.virginia.edu/brashers/Handouts/Inflammation%20handout%20+%20referenc.es.doc> (Brashers V. L, 2005).

**B-Endothélium :**

L'endothélium sépare le sang de l'espace interstitiel. C'est une barrière qui est loin d'être inerte tel qu'elle a été considérée longtemps auparavant. Les cellules endothéliales jouent un rôle métabolique très important dans la régulation de l'homéostasie : transport de substances, régulation du tonus vasculaire, coagulation, croissance vasculaire et inflammation. L'endothélium intègre les différents signaux provenant de la circulation avec ceux de la paroi vasculaire permettant ainsi la coordination de la fonction vasculaire, dans le cas des vaisseaux sains et dans le cas de développement d'une pathologie vasculaire ou d'une inflammation. Une des fonctions importantes de l'endothélium vasculaire est de contrôler le trafic des leucocytes entre le sang et le tissu. Ce trafic implique dans ses étapes précoces une adhésion entre les leucocytes et l'endothélium; une panoplie de molécules de surface, leucocytaires et endothéliales, dites molécules d'adhésion cellulaire, participe à l'aboutissement de cette fonction cellulaire indispensable surtout au cours de l'inflammation (Figure 18).

**C-Propriétés générales des molécules d'adhérence :**

Les molécules d'adhérence sont des (glyco) protéines exprimées à la surface des membranes cellulaires. Elles sont capables d'assurer une adhésion spécifique entre 2 cellules ou entre une cellule et la matrice extracellulaire (membrane basale ou tissu de soutien). La sélectivité d'une molécule d'adhérence donnée repose sur sa capacité d'interagir avec un nombre limité de molécules appelées ligands.



**Figure 18:** Illustration des principales molécules d'adhésion endothéliales : P-sélectine, E-sélectine, CD34, ICAM1 ,ICAM2, VCAM1, PECAM1, Intégrine  $\alpha\beta_3$ , CEA-CAM1, JAM1, CD99 qui participent aux différentes étapes de la migration transendothéliale (début d'attachement, roulement, adhésion ferme, locomotion et transmigration) par interactions avec leurs ligands leucocytaires respectifs : PSGL1, ESL1, L-sélectine, LFA, VLA, PECAM1, CEA-CAM1, JAM1, CD99. À noter qu'il y a des molécules qui ont plus d'un ligand comme l'indique les flèches. Les différentes molécules marquées avec une étoile (\* \*) semblent être pertinentes pour la diapédèse leucocytaire.

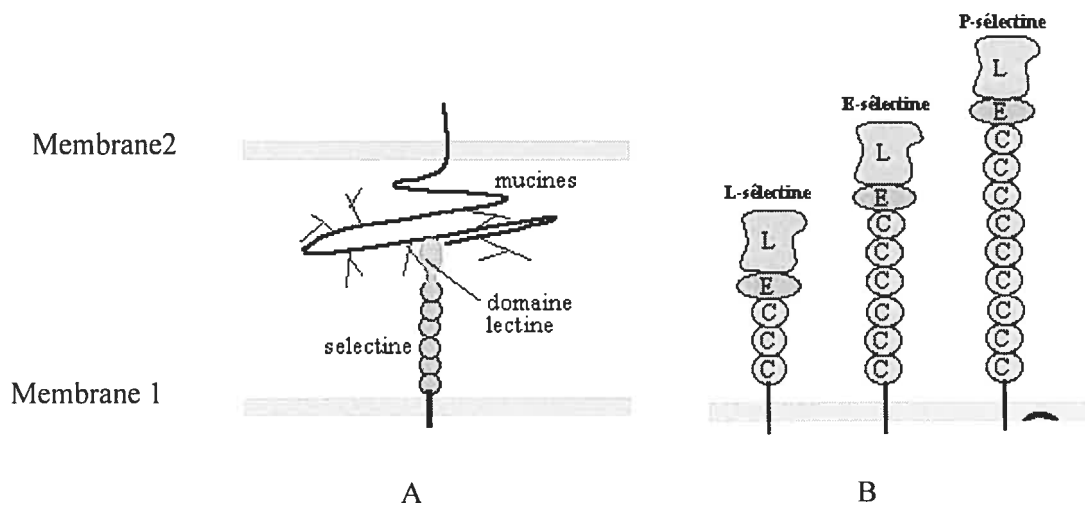
À part d'assurer la cohésion d'un tissu et maintenir son intégrité (rôle structurel) les molécules d'adhérence cellulaire permettent aux cellules d'exercer une fonction biologique donnée (rôle fonctionnel). Les deux rôles diffèrent du fait que l'adhérence fonctionnelle est transitoire et limitée au seul temps d'induction du processus biologique. Une fois la liaison de la molécule d'adhérence avec son ligand s'établit il y a production d'information destinée au reste de la cellule, susceptible de modifier la structure ou les fonctions de celle-ci. Cette propriété des molécules d'adhérence les rapproche des systèmes de transduction transmembranaire. Ces derniers qui permettent la transformation d'une information extracellulaire en un message intracellulaire (messagers intracellulaires) compréhensible par la cellule et vice versa (outside-in et inside-out signaling).

### **C-1 - Principales familles des molécules d'adhérence qui interviennent dans l'adhésion leucocytes-endothélium :**

Ces molécules d'adhérence sont partagées en trois familles principales: les sélectines, certains membres de la superfamille des immunoglobulines et les intégrines.

#### **C-1-1 Les sélectines :**

Elles comportent trois molécules. Deux d'entre elles sont exprimées par les cellules endothéliales, la E-sélectine et la P-sélectine. La troisième, la L-sélectine est spécifique pour les leucocytes. Ce sont des glycoprotéines monomériques transmembranaires dont le domaine extracellulaire N terminal possède un segment de type lectine qui reconnaît les résidus glucidiques sialylés et fucosylés, un domaine homologue aux protéines régulatrices du complément et un autre homologue au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) (Figure 19).



**Figure 19:** Structure des sélectines. (A) structure générale d'une molécule de sélectine (membrane 1) dont le domaine lectine reconnaît des motifs glucidiques portés par des mucines membranaires (membrane 2). (B) structure des trois molécules de sélectines (L-Sélectine, P-Sélectine, E-Sélectine) avec un domaine lectine (L), un domaine de type facteur de croissance epidermal (EGF) (E) et des domaines régulateurs du complément (C), un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. Dessin modifié de [http://www-smbh.univ-paris13.fr/smbh/pedago/resour\\_bilogie/charnaux/modules\\_bio\\_cel/adh\\_cell\\_famil.html](http://www-smbh.univ-paris13.fr/smbh/pedago/resour_bilogie/charnaux/modules_bio_cel/adh_cell_famil.html).

Les sélectines sont les premières molécules qui interviennent dans le recrutement et l'attachement des leucocytes à la surface de l'endothélium durant la phase du roulement leucocytaire.

**a-L-sélectine :**

C'est une molécule exprimée d'une façon constitutive à la surface des leucocytes permettant leur adhésion à l'endothélium via ses ligands (Gly-Cam, Mad-Cam, CD34 et la E-sélectine). Son domaine cytoplasmique est aussi important que ses domaines EGF et lectine, nécessaires pour la liaison des ligands lors du roulement des leucocytes sur l'endothélium (Kansas et al, 1993). En plus de l'adhésion cellulaire, la L-sélectine est un récepteur traducteur du signal. Sa liaison aux ligands sus-mentionnés produit quelques événements à l'intérieur des neutrophiles : l'augmentation de  $Ca^{2+}$  cytosolique, l'induction de l'expression des transcrits mRNA des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-8 (Laudana et al, 1994), ainsi que la production de  $H_2O_2$ . L'interaction de la L-sélectine avec un anticorps spécifique induit la phosphorylation de la tyrosine de plusieurs protéines incluant celles de la MAP kinase (Onrust, 1996). La cascade signalétique déclenchée à partir de la L-sélectine a été étudiée au niveau des lymphocytes où elle permet via des tyrosines kinase  $p56^{lck}$ , Grb2/SOS, Ras, et Rac2 l'activation des MAPK et la synthèse de  $O_2^-$  (Brenner et al, 1996). Il a été noté aussi une augmentation de la polymérisation des filaments d'actine via l'activation des petites protéines G Rac-2 (Brenner et al 1997), ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1( $\alpha_M \beta_2$ ) à la surface cellulaire (Crockett-Torabi et al, 1995).



Dans les organes lymphoïdes secondaires la L-sélectine a été identifiée essentiellement comme récepteur de localisation (« homing receptor ») des lymphocytes. Elle facilite leur adhésion à leur unique ligand carbohydrate, sialyl Lewis(x) sulfaté, qui est exprimé sur les veinules de l'endothélium hypertrophié HEV (high endothelial venules). La liaison de la L-sélectine avec son ligand endothélial lors du phénomène de roulement des leucocytes à l'endothélium induit son clivage de la surface leucocytaire et sa libération dans la circulation, ce qui explique la diminution de l'expression leucocytaire de la L-sélectine lors d'une réponse inflammatoire et l'augmentation de la L-sélectine soluble (sL-sélectine) qui joue un rôle anti-inflammatoire (diminution de la réponse inflammatoire) (Israël-Assayag et Cormier, 2002). Par contre, l'inhibition expérimentale du clivage de la L-sélectine augmente l'adhésion et la migration des leucocytes à travers l'endothélium (Hafezi-Moghadam et al, 2001). La L-sélectine soluble est présentement considérée comme un marqueur déterminant de l'inflammation; en effet une relation a été établie entre le développement du diabète et le taux de la L-sélectine dans le sérum des rats diabétiques (Tanaka et al, 2000).

#### **b- P-sélectine :**

C'est une sélectine synthétisée d'une manière constitutive par les plaquettes et stockée dans leurs granules alpha et par les cellules endothéliales où elle est conservée dans les corps de Weibel-Palade (WPB). Ces derniers sont des granules spécifiques de la cellule endothéliale qui contiennent en plus de la P-sélectine, le facteur von Willebrand (vWF), le CD63 (Wangner et al, 1993), l'endothelin1 (ET1) et l'interleukine 8 (IL8) (Russell et al, 1998). A l'état normal, le niveau d'expression de la P-sélectine à la surface endothéliale est faible mais une réponse inflammatoire ou une activation par des

agonistes entraîne une mobilisation rapide de la P-sélectine à la surface cellulaire. Cette mobilisation se fait, quelques secondes après la stimulation de l'endothélium par les cytokines et implique la dégranulation des WPB. Au cours de ce processus la phosphorylation au niveau des résidus thréonine, sérine et tyrosine du domaine cytoplasmique de la P-sélectine (Crovello et al, 1995) semble jouer un rôle important.

La libération du contenu des WPB est dépendante d'une voie faisant intervenir les petites protéines G (Rac1) (Lamaze et al, 1996), reconnues pour leur implication dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Cette voie est régulée par les radicaux libres d'oxygène (ROS). Ces derniers sont des messagers secondaires très importants générés en réponse à différents types de stress. Une fois à la surface cellulaire, la P-sélectine peut lier son ligand spécifique appelé P-selectin glycoprotein ligand (PSGL1) ou CD15 qu'elle partage avec la E-sélectine (voir paragraphe sur la E-sélectine). La P-sélectine et son ligand PSGL-1 forment alors des dimères qui augmentent la force et la durabilité de l'attache du leucocyte à la cellule endothéliale (Ramachandran et al, 2001). La P-sélectine est enlevée de la surface cellulaire par endocytose dans des vésicules de clathrine (von Asmuth et al, 1992; Setiadi et al, 1998). L'internalisation de la P-sélectine se fait d'une façon particulièrement rapide et constitutive (Setiadi et al, 1995) ne nécessitant pas un engagement du récepteur avec son ligand comme c'est le cas pour d'autres récepteurs comme les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et ceux couplés aux protéines G (McPherson et al, 2001). Rho et ses effecteurs les kinases de Rho sont des composants essentiels des vésicules de clathrine. Ils semblent être impliqués dans le trafic des vésicules par les deux voies d'endocytose et d'exocytose, leur activation réduit le roulement des leucocytes suite à la capture des agrégats de la P-sélectine dans les puits recouverts de clathrine (Setiadi et al, 2003).

Après son internalisation, la P-sélectine peut avoir trois destinées différentes :

- (a) dirigée vers les lysosomes pour la dégradation (Green et al, 1994),
- (b) recyclée à la surface cellulaire ou
- (c) dirigée à partir des endosomes vers le réseau de Trans-Golgi TGN (Trans-Golgi Network), où elle est incorporée dans de nouveaux corps de WPB (Subramaniam et al, 1993).

La régulation de l'expression de la P-sélectine permet d'initier et de limiter la réponse inflammatoire. Dans plusieurs maladies comme, le diabète et les maladies coronariennes, il y a une augmentation des enzymes de coagulation (les serines protéases) comme la thrombine (Gonzalez et al, 2003). Cette dernière stimule des récepteurs spécifiques appelés récepteurs activateurs des protéases (protéïnase activator receptors ou PARs) (Lindemann, et al, 2001) sur les cellules endothéliales assurant l'expression de la P-sélectine à leur surface. La signalisation issue de cette interaction (thrombine /PARs) (Ukropec et al, 2000) joue un rôle majeur dans la régulation de l'adhérence cellulaire entre les cellules endothéliales voisines. Elle contrôle la phosphorylation de la VE-cadhérine (la protéine des jonctions adhérentes inter endothéliales) en modulant la quantité de la phosphatase SHP2 associée avec cette protéine.

En plus, la stimulation par la thrombine retarde l'endocytose de la P-sélectine via les vésicules de clathrine, permettant ainsi à la P-sélectine, de jouer son rôle dans le recrutement et le roulement des leucocytes sur l'endothélium activé et aussi, l'activation de l'intégrines  $\beta_2$  (Elstad et al 1995, Lorant et al 1991, 1995). La liaison de la P-sélectine à son anticorps (mimant la liaison au ligand) induit un remodelage au niveau du cytosquelette (Kaplansky et al, 1994).

### **c- E-sélectine :**

La E-sélectine appelée aussi Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule1 (ELAM1) ou CD62E est une sélectine exprimée spécifiquement par l'endothélium. C'est une glycoprotéine intégrale de la membrane plasmique, de poids moléculaire de 94 KDa. Dans l'état normal le taux d'expression de la E-sélectine est très réduit, mais des cytokines inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'interleukine-1 induisent une augmentation transitoire de la synthèse de cette molécule. Elle est transportée directement à la surface cellulaire ou elle peut se lier à ses ligands leucocytaires : L-sélectine (Zöllner et al, 1997; Jutila et al, 2002) et PSGL1 (Asa et al, 1995; Lenter et al, 1994) qui sont décorés par des résidus sialylés et fucosylés (Patel et al, 1995). Ces deux ligands de la E-sélectine forment des structures en agrégats à travers des interactions avec des protéines du cytosquelette (la FAK, l' $\alpha$ -caténine, la vinculine, la paxilline et la filamine) (Yoshida et al, 1996). Ces interactions permettent de stabiliser le roulement des leucocytes sur l'endothélium (Dwir et al, 2001; Snapp et al, 2002). D'autres ligands potentiels de la E-sélectine sont la E-sélectine-ligand 1 (ESL) (Steegmaier et al, 1995) qui a été caractérisé sur les neutrophiles de rats (son homologue chez l'humain n'est pas encore identifié) (Levinovitz et al, 1993) et certains glycolipides (Alon et al, 1995). Le rôle de la E-sélectine comme celui de la P-selectine est de soutenir le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium. Il a même été démontré par microscopie intravitale (Hickey et al, 1999; Bullard et al, 1996; Kunkel et al, 1996) que ces deux sélectines ont des fonctions redondantes. La E-sélectine produit un ralentissement du roulement des leucocytes (de l'ordre du diamètre du leucocyte par seconde) (Alon, 1993) alors que la P-sélectine permet un roulement beaucoup plus rapide. Sous l'action des médiateurs inducteurs de la E-sélectine comme le leucotriène C4 (LTC<sub>4</sub>) et le facteur

nécrosant des tumeurs (TNF $\alpha$ ), une réduction de la vitesse de roulement prend place pour permettre à un leucocyte en roulement d'adhérer à l'endothélium. Ainsi des souris déficientes en E-sélectine présentent un roulement de leucocytes plus rapide (Kunkel et al, 1996) et elles ont un nombre réduit de leucocytes adhérents en réponse à une stimulation locale à des chimiokines (Ley et al, 1998) ou à des cytokines (Milstone et al., 1998). Ceci suggère que l'intervention de la E-sélectine est ultérieure à celle de la P-sélectine, plus vers l'étape de la formation d'une adhésion ferme entre l'endothélium et les leucocytes (Jung et al, 1998 ; Kunkel et Ley, 1996). La E-sélectine se caractérise donc par son rôle unique parmi les deux autres membres de cette familles (P- et L-sélectine) dans la conversion du roulement à l'adhésion ferme (Ley et al 1998) avec un prolongement du temps de transition entre les deux phases ce qui semble essentiel pour la continuité du processus de la transmigration leucocytaire (Zollner et al, 1997, Moore et al 1994). En plus, l'interaction de la E-sélectine avec son ligand déclenche dans les leucocytes une cascade de signalisation qui permettra une activation rapide de leurs intégrines  $\beta_2$  (Springer, 1994) ce qui pousse l'interaction leucocyte-endothélium vers une adhésion ferme. Du côté endothélial les voies de signalisation déclenchées suite à cette interaction ne sont pas connues. En absence des sélectines, mêmes sous des conditions normales, sans inflammation, les globules blancs du sang ne roulent pas et ne peuvent non plus adhérer à l'endothélium (Kubes et al, 2001).

**C-1-2 Les molécules d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines comprennent plusieurs familles :**

La famille des sialomucines (CD34, Glycam, MadCam,...).

La famille des carcino-embryonic-antigen-related cell adhesion molecule (antigènes carcino-embryonnaire) (CEACAM).

Famille des « platelet endothelial adhesion molecule » PECAM.

Famille des molécules d'adhésion intercellulaire ICAM (intercellular adhesion molecule).

Famille des molécules d'adhésion des cellules vasculaires VCAM (vascular cell adhesion molecule).

**$\alpha$ -CD34 :**

Est un membre de la famille des sialomucines qui comprend en plus du CD34, la podocalyxine, l'endoglycane, le CD43 ou leucosialine/sialophorine et le CD164. Leur ligand le plus connu est la L-selectine. Le CD34 est une glycoprotéine transmembranaire de type I dont le poids moléculaire varie d'un tissu à un autre (85-à 120 kDa). Cette variabilité peut être attribuée aux différences de glycosylation et/ou à une mobilité électrophorétique anormale, due aux fortes charges négatives (groupes sialyl O-liées) de cette molécule. En effet la séquence d'acides aminés déduite du gène humain de CD34 prédit un polypeptide de seulement 40 kDa.

Deux isoformes de CD34, résultant de l'épissage alternatif ont été identifiés (Nakamura et al, 1993) (Figure 20). La région extracellulaire, caractérisée par des répétitions riches en cystéine (domaines immunoglobulines) est identique dans les deux isoformes. Celles-ci diffèrent par la longueur de leurs domaines cytoplasmiques : l'isoforme à long domaine cytoplasmique contient des sites qui sont phosphorylés par la protéine kinase C (PKC), ou d'autres kinases qui ne sont pas encore identifiées. L'isoforme à domaine cytoplasmique court ou tronqué de CD34 résulte de l'insertion d'un exon additionnel (exon X, 194 bp) entre l'exon 7 et 8; ce qui introduit un codon stop transductionnel (Suda et al 1992) donnant lieu à un court domaine cytoplasmique qui, par rapport à la forme longue, manque plusieurs sites potentiels de phosphorylation. Cette différence de structure entre les deux isoformes (tableau I) leur donne des fonctions différentes (Fackler, et al, 1995) et peut être une distribution différente.

	Forme complète	forme Tronquée
séquence complète d'acides aminés	385	328
Domaine cytoplasmique	73	16
Domaine Transmembranaire	23	23
Domaine extracellulaire	258	258
séquence signal	31	31

**Tableau I :** Différences dans la structure des deux isoformes de CD34 (forme complète et forme tronquée).

L'analyse structurale détaillée et les études de clonage ont confirmé que le CD34 est une sialomucine, contenant 9 attachements glucidiques N-liés et un large

nombre de sites de O-glycosylation. La composition en carbohydrates de son domaine N-terminal est très importante dans la détermination de ses interactions avec une variété de différents ligands.

CD34 est exprimé dans un grand nombre de tissus hématopoïétiques, des cellules endothéliales de la microvascularisation, des fibroblastes embryonnaires et quelques types cellulaires dans le tissu nerveux foetal et adulte (Lin et al 1995). Les ligands de l'isoforme de l'antigène CD34 exprimé par les cellules endothéliales et l'isoforme exprimée par les précurseurs hématopoïétiques, ne sont pas connus. CD34 est un récepteur d'adhérence puisque des thymocytes murins exprimant le CD34 humain acquièrent la propriété d'adhérer spécifiquement au stroma médullaire humain. Il est aussi impliqué dans l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium (Etzioni, et al 1999) via ses ligands (epitopes sialylés et fucosylés) comme la L-sélectine ou encore le CD34 leucocytaire à travers une liaison homophilique (cette dernière reste spéculative parce que la forte charge négative de la molécule lui donnerait un caractère plutôt répulsif qu'attractif). Le CD34 est supposé d'avoir un rôle dans le contrôle de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques du fait qu'*in vivo* son expression disparaît dès que ces cellules atteignent un certain état différencié. *In vitro*, les cellules dendritiques CD34+, les fibroblastes, ainsi que les cellules endothéliales perdent l'expression de cet antigène après quelques passages et ceci constitue un véritable handicap pour l'étude de la biologie de CD34. À part son rôle dans l'adhésion cellulaire, le CD34 est connu comme une molécule de signalisation (Silverman, 1998), requise dans la maintenance d'un état phénotypique plastique des cellules indifférenciées. L'engagement de CD34 avec son contre-récepteur semble contrôler l'organisation du cytosquelette de ces cellules et par la suite leur adhésion (Gumbiner et al, 1996) et migration (Greaves et al, 1992). La



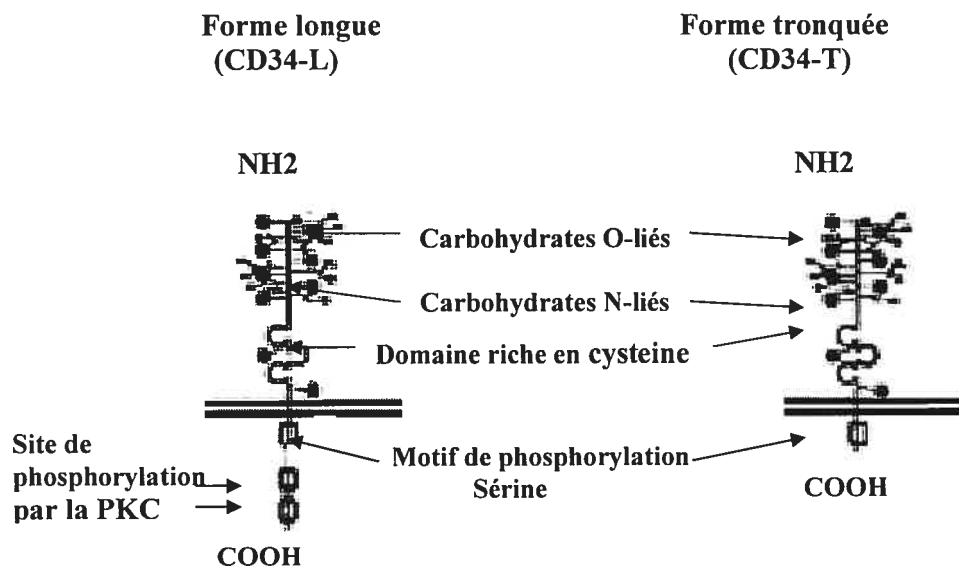
forme complète de CD34 (et non la forme tronquée) est impliquée dans l'arrêt de maturation et la différenciation. Le CD34 à domaine cytoplasmique long a un potentiel de régulation négatif dans la différenciation des cellules hématopoïétiques, ce qui peut expliquer aussi la perte de l'expression de CD34 au niveau des cellules endothéliales après quelques générations de culture *in vitro*. Le CD34 est utilisé dans plusieurs applications cliniques comme marqueur des cellules précurseurs hématopoïétiques (Krause et al, 1994) pour identifier et caractériser des leucémies. C'est une molécule associée à plusieurs pathologies : maladies vasculaires, l'Alzheimer et Parkinson (Allen, et al 1996). Un mécanisme d'internalisation du CD34 de la surface cellulaire via des vésicules de clathrine a été décrit dans les cellules hématopoïétiques. Une panoplie d'anticorps monoclonaux dirigés contre divers épitopes de cette molécule a permis de démontrer qu'il y a de différences notables entre les portions oligosaccharidiques de CD34 localisé dans de divers tissus. Trois types d'épitopes ont pu être définis en se basant sur leur susceptibilité à la digestion par des glycosydases (Tableau III).

<b>Classes d'épitopes (Anticorps)</b>	<b>Sensibilité au clivage enzymatique</b>
<b>Classe Ia</b>	Haute Sensibilité à la Neuraminidase et glycoprotease
<b>Classe I</b>	Sensibilité partielle à la Neuraminidase et glycoprotease
<b>Classe II</b>	Résistance à la Neuraminidase et Sensibilité à la glycoprotease
<b>Classe III</b>	Résistance à la Neuraminidase et Sensibilité à la glycoprotease

**Tableau II :** Différentes classes d'anticorps CD34 spécifiques pour chaque classe d'épitopes qui sont partagés selon leur sensibilité aux clivages enzymatiques.

- (a) Les épitopes de classe I sensibles au clivage par la neuraminidase et la chymopapaine et une glycoprotéase de *Pasteurella haemolytica*.
- (b) Les épitopes de classe II sensibles au clivage par la chymopapaine et la glycoprotéase, mais résistants à la neuraminidase.
- (c) Les épitopes de classe III, résistants au clivage par tous les trois enzymes.

Peu d'études ont été faites dans le but d'évaluer la distribution de ces différents épitopes sur les types cellulaires exprimant CD34. Les classes II et III, mais pas la classe I sont exprimées sur les HEV avec quelques différences entre les cellules hématopoïétiques immatures et plus matures (Lin et al 1995). Selon nos résultats originaux présentés dans la première partie de ce mémoire, dans la microvascularisation pulmonaire, au moins l'isoforme de CD34 à long domaine cytoplasmique existe. Alors qu'au niveau des capillaires cardiaques, c'est plutôt l'isoforme à domaine cytoplasmique court qui existe. Au niveau de la vascularisation cérébrale le CD34 est absent ou il existe sous une forme non reconnue par l'anticorps utilisé (Barrande et al, 1993) (Voir première partie de ce mémoire).



**Figure 20 :** Représentation schématique des deux isoformes de CD34. Le domaine cytoplasmique de CD34-L et CD34-T comprend 73 et 16 acides aminés, respectivement. (Figure modifiée de Fehse et al, 2000).

**b- PECAM1 :**

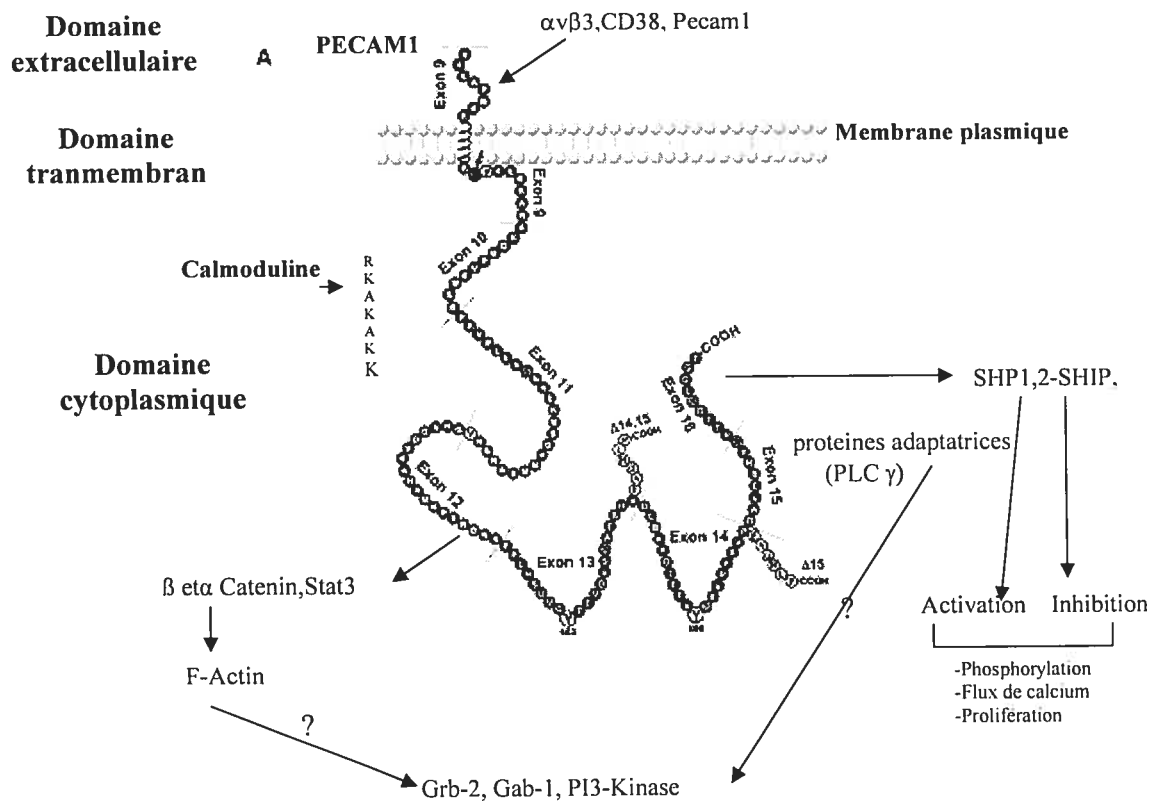
Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) ou CD31 est aussi connu sous le nom de gpIIa (antigène plaquettaire). Cette protéine de surface de 130-140 kDa appartient à la famille des immunoglobulines contenant plusieurs domaines fonctionnels (et probablement, plusieurs ligands potentiels). Elle est exprimée par les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales et elle est présente à faible taux sur les leucocytes et les plaquettes. Trois isoformes de PECAM-1 (isoforme manquant l'exon 15, un autre manquant les exons 14 et 15 et la forme complète) issues de l'épissage alternatif ont été documentées chez l'humain (Goldberger et al, 1994) ainsi que chez la souris (Baldwin et al 1994). La régulation et le rôle de ces différentes isoformes restent encore inconnus et la plus documentée des isoformes est la forme complète qui a des propriétés adhésives aussi bien homotypiques qu'hétérotypiques. Dans le premier type de liaison le PECAM1 se lie à lui-même sur d'autres cellules (leucocytes ou autres cellules endothéliales). Ce type de liaison est très important pour l'adhésion cellule-cellule et pour la traduction du signal. Dans le deuxième type de liaison le PECAM1 se lie à CD38, appelé aussi ADP-ribosyl cyclase, une molécule de surface exprimée par les lymphocytes activés T et B et les monocytes (Musso, 2001). Un deuxième type de liaisons hétérotypiques caractérisé pour le PECAM1 et son contre récepteur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (CD51/CD61) qui lie en même temps des molécules de la matrice extracellulaire tel que la vitronectine, la fibronectine et la laminine. Une étude faite par Buckley, (1996) suggère que la transmigration des leucocytes permet une activation de  $\alpha_v\beta_3$ . PECAM1 et  $\alpha_v\beta_3$  sont également impliqués dans la transduction de signaux permettant la prolifération et la différenciation endothéliale ainsi que la diapédèse leucocytaire (Thompson et al,

2000). Le PECAM1 montre une forte distribution au niveau des jonctions cellulaires où il facilite la transmigration des neutrophiles en accord avec d'autres molécules situées au niveau des jonctions cellulaires comme JAM1 (Ostermann et al, 2002) et CD99 (Schenkel et al, 2002) qui peuvent avoir des fonctions redondantes avec le PECAM1 durant la diapédèse. La jonction adhérente responsable de l'intégrité de la barrière endothéliale comporte un type de molécule transmembranaire, la VE cadhérine qui, par des liens homophiles, ancre les cellules voisines les unes aux autres. Du côté cytoplasmique, la VE cadhérine se lie, par l'entremise de la  $\beta$  caténine au cytosquelette de la cellule endothéliale. Le complexe jonctionnel est une structure dynamique. Il peut se désassembler et se reformer en réponse à de divers stimuli. Le désassemblage de la jonction implique une phosphorylation de la  $\beta$  caténine qui se sépare de la VE-cadhérine. Le PECAM-1 intervient dans ce jeu comme un facteur stabilisant de la jonction. Il lie la  $\beta$  caténine phosphorylée et l'amène ainsi dans la proximité de la phosphatase SHP-2 aussi liée au PECAM-1. La déphosphorylation subséquente de la  $\beta$  caténine rend cette molécule de nouveau disponible pour remplir son rôle de pont entre les VE-cadhérines et le cytosquelette.

PECAM-1 a une propriété bien particulière, c'est une molécule qui peut être stimulée juste par une perturbation mécanique de la membrane endothéliale comme un simple changement osmotique, ou l'accentuation du débit sanguin. Différentes formes de réponse mécano-signalétique sont ainsi déclenchées incluant la phosphorylation de ERK (extracellular signal-regulated kinase), et la phosphorylation rapide d'une tyrosine au niveau du domaine cytoplasmique de PECAM-1. PECAM-1 fonctionne également comme une protéine d'échafaudage régulant la phosphorylation des traducteurs du signal et activateurs de la transcription des molécules de signalisation de la famille (STAT)

particulièrement STAT3 et STAT5 (Carrithers et al, 2005). Ces derniers se trouvent attachés au domaine cytoplasmique de PECAM-1 facilitant sa phosphorylation par une kinase qui reste encore inconnue (Ilan et al, 2003). STAT3 phosphorylé se dissocie du complexe d'échafaudage et regagne le noyau où il régule la transcription des gènes. PECAM-1 peut donc fonctionner comme un site de liaison, de séquestration, d'activation, et de phosphorylation/déphosphorylation des molécules comme : la  $\beta$ -caténine, la FAK, la SHP-2, et la STAT3 (Gratzinger et al, 2003) (Figure 21). Ce cycle de phosphorylation /déphosphorylation est très important pour la liaison et l'activation mais comment cela s'effectue dans le temps après une stimulation au cours d'une réponse inflammatoire n'est pas tout à fait clair (Ilan et al, 2001).

Un modèle de participation du PECAM-1 à la migration transendothéliale des leucocytes a été récemment proposé (Mamdouh et al, 2003). Ce modèle se base sur des données qui montrent que le PECAM-1 se trouve concentré au niveau des contacts latéraux inter-endothéliaux, dans des invaginations de la membrane plasmique. Cette réserve de PECAM refait surface juste au moment de la diapédèse, afin d'interagir avec le PECAM leucocytaire, interaction critique pour la migration transendothéliale de globules blancs.



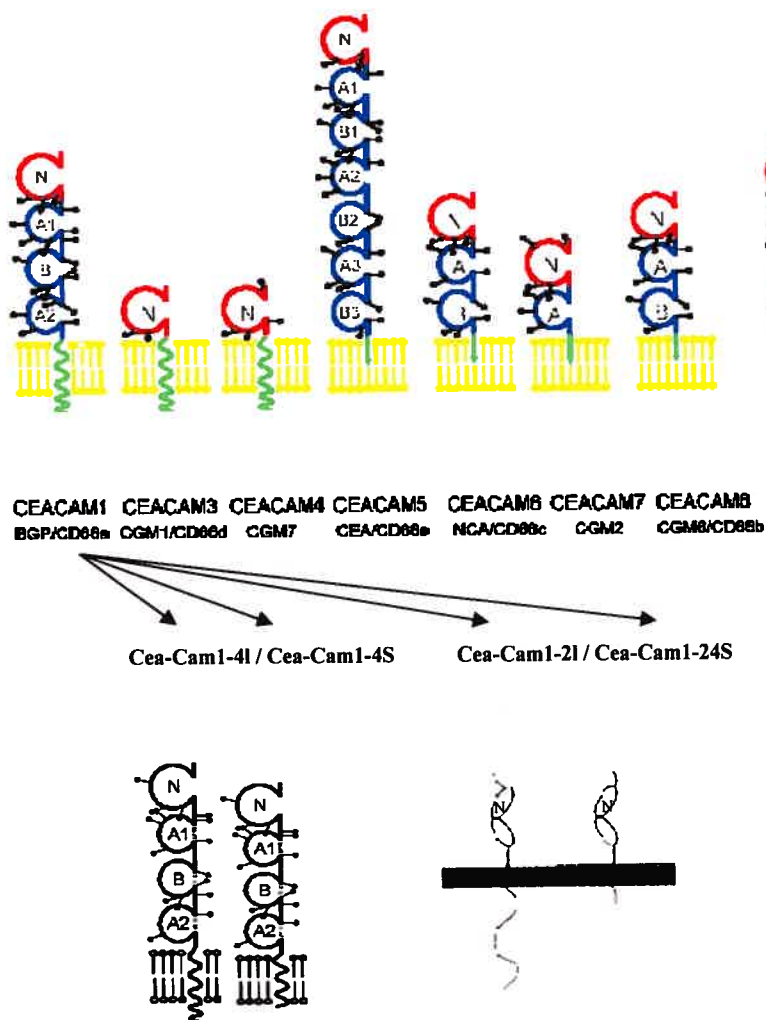
**Figure 21:** Le schéma montre la séquence d'acides aminés de la forme complète (domaine cytoplasmique long) de PECAM1. Les deux autres isoformes de PECAM1 proviennent de l'épissage alternatif du mRNA (suppression de l'exon 14 et/ou 15). Les ligands de PECAM1 sont :  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , CD38, Pecam1. Différentes molécules interagissent avec le domaine cytoplasmique de PECAM1 et qui interviennent dans plusieurs voies de signalisation cellulaire : phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ , Src homology domain SH2, phosphatase à domaine SH (SHP), inhibiteur de phosphatase SHP (SHIP). Schéma modifié de Newman et al, (2003).

### c- CEA-CAM :

La famille des molécules d'adhésion apparentées à l'antigène carcinoembryonnaire ou carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule (CEA-CAM) appartient également à la super-famille des immunoglobulines (Ig) (Öbrink, 1997). Les membres de cette famille de CEA sont composés d'un domaine immunoglobuline variable (IgV) (N1, N2, N3) et un nombre de 0 à 6 domaines Ig constants (IgC) (Figure 22). Ce sont des molécules fortement glycosylées avec 28 sites consensus de liaison de carbohydrates à l'asparagine (N-glycosylation). Les membres de cette famille peuvent être partagés en deux sous groupes :

- 1- CEA-CAM1 et CEA-CAM3 à CEA-CAM8 sont des glycoprotéines liées à la membrane par un domaine transmembranaire ou par une attache glycosyl phosphatidylinositol (GPI).
- 2- Pregnancy-specific glycoprotein ou (PSG ou encore CD66) qui comprend 11 isoformes (PSG1 à PSG11) chez l'humain. Se sont des glycoprotéines secrétées. Cette sous-classe de la famille CEA-CAM n'existe pas chez le rat.





**Figure 22** : Schéma illustratif de l'organisation de la famille des antigènes carcino-embryonnaires qui consiste en deux groupes : CEACAM qui sont des molécules membranaires attachées à la membrane par un domaine transmembranaire ou une ancre GPI (en vert) alors que les PSGs sont des glycoprotéines sécrétées. Les domaines Igv (immunoglobuline variable) sont marqués en rouge, IgC (immunoglobuline constant) en bleu, et les sites de glycosylation N-liés en noir. Les quatre formes de CEACAM1 :CEACAM1-4L/CEACAM1-4S et CEACAM1-2L/CEACAM1-2S sont présentées en bas. Figure modifiée de [http://cea.klinikum.uni-muenchen.de/rat/ceacam/ceacam1a/data\\_sheets/data\\_sheet\\_ceacam1a-4s.htm](http://cea.klinikum.uni-muenchen.de/rat/ceacam/ceacam1a/data_sheets/data_sheet_ceacam1a-4s.htm).

CEA-CAM1 est l'isoforme la plus étudiée. Elle est abondamment exprimée à la surface des cellules endothéliales et épithéliales de plusieurs organes (le foie, le poumon, l'intestin, avec un taux faible au niveau du système nerveux (Sawa et al, 1994). CEA-CAM1 est exprimé aussi dans la plupart des cellules du système immunitaire: leucocytes, cellules hématopoïétiques, cellules T activées, lymphocytes B, macrophages, monocytes, plaquettes sanguines (Coutelier et al, 1994, Odin et al, 1988, Sawa et al, 1997). Le CEA-CAM1 joue un rôle clé dans la croissance et la différenciation cellulaire (Ocklind et al, 1982, Prall et al, 1996, Boulton et Gray-Owen, 2002; Kammerer et al, 1998; 2001; Markel et al, 2002).

Son rôle le plus étudié est dans le domaine du cancer, du fait que c'est une molécule qui diminue son expression dans plusieurs types de cancer tel que le carcinome du colon, du foie et de la prostate (Luo et al, 1998).

Le CEA-CAM1 est une molécule multifonctionnelle. Elle joue un rôle dans l'adhésion intercellulaire (Stanners et al, 1998, Thompson et al, 1991), et il sert de récepteur pour différents pathogènes viraux et bactériens comme les coronavirus murins, virus de l'hépatite de souris (MHV) (Dveksler et al, 1991) et *Haemophilus influenza* (Virji et al, 2000). Il est aussi un facteur angiogénique très important (Ergün et al, 2000).

CEA-CAM1 peut lier ses ligands de façon hétérophilique (Oikawa et al, 1991, Zhou et al, 1993) ou homophilique (Oikawa et al, 1989). Ce dernier type de liaison semble intéressant dans l'activation des lymphocyte T (Boulton et Gray-Owen, 2002; Kammerer et al, 1998; 2001; Greicius et al, 2003), dans la prolifération des cellules B et la régulation de l'activité cytotoxique des cellules NK (natural killer) (Greicius et al, 2003; Donda et al, 2000; Markel et al, 2002).

CEA-CAM1 existe sous deux isoformes CEA-CAM1-L à domaine cytoplasmique long de 73 acides aminés et CEA-CAM1-S à domaine cytoplasmique court à seulement 10 acides aminés. Dans la plupart des tissus il y a une expression simultanée des deux isoformes (Baum et al, 1996) Chacun des deux peut avoir à son bout N-terminal 4 domaines immunoglobulines (CEA-CAM1-4L/ CEA-CAM1-4S) ou seulement 2 (CEA-CAM1-2L et CEA-CAM1-2S) (Figure 22). L'expression des deux isoformes semble être régulée indépendamment l'une de l'autre (Hunter et al, 1994).

La distribution de ces deux isoformes CEA-CAM1-L et CEA-CAM1-S est faite d'une façon inéquitable à la surface des cellules épithéliales (MDCK) (Sundberg et al, 2004). L'isoforme CEA-CAM1-S est exclusivement apicale alors que CEA-CAM1-L est plutôt sur les deux flancs (apical et basolatéral) de la surface cellulaire. La présence de l'isoforme CEA-CAM1-L au niveau des jonctions adhérentes et son association avec les « adaptines » AP1 et AP2 des vésicules mantelées indiquent que le CEA-CAM1-L est sujet d'un trafic intracellulaire continu. Il est trié dans des vésicules contenant AP1 dans le réseau du trans-Golgi et internalisé dans les vésicules contenant l'AP-2 à partir de la membrane plasmique.

Les deux isoformes (CEA-CAM1-S et CEA-CAM1-L) interviennent dans l'adhésion cellulaire mais seule le CEA-CAM1-L dont le domaine cytoplasmique présente une grande homologie de séquence entre différentes espèces (Öbrink, 1997) est considéré comme une molécule de signalisation. Son domaine cytoplasmique est phosphorylé sur les résidus tyrosines (Afar et al, 1992). Il peut se lier aussi aux tyrosines kinases de la famille src (Beauchemin et al, 1997) et les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Brümmer et al, 1995), ce qui supporte la notion de protéine traductrice et régulatrice du signal. C'est une molécule qui se trouve également liée aux filaments d'actines (Hunter et

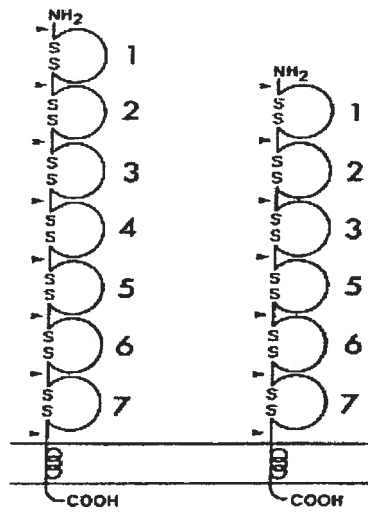
al, 1994). Le CEA-CAM1-L et CEA-CAM1-S comme le PECAM1 lient la calmoduline dans leur partie intra cytoplasmique juxtamembranaire (Da Silva-Azevedo et al, 1991) dès qu'il y a augmentation de la concentration du calcium intracellulaire; ceci provoque sa dimérisation (Edlund et al, 1996 et Hunter et al, 1996.). Les rôles les plus intéressants de cette classe de molécules et qui reçoivent actuellement beaucoup d'attention sont dans le domaine du cancer (Kunath et al, 1995), de l'angiogenèse (Ergün et al, 2000), et dernièrement, dans l'internalisation du récepteur d'insuline (Poy et al, 2002).

#### **d-V-CAM 1 :**

Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ou CD106 est une glycoprotéine de 739 acides aminés d'un poids moléculaire de 110-kDa. Exprimée à la surface de l'endothélium vasculaire dans une variété de conditions inflammatoires, elle permet le recrutement de leucocytes à partir du courant sanguin vers les tissus. VCAM-1 est constitutivement exprimée sur les cellules endothéliales et dendritiques.

Deux différents précurseurs de VCAM-1 peuvent être générés du gène humain comme résultat de l'épissage alternatif de son mRNA, qui inclut ou exclut l'exon5 (Figure 23) (Cybulsky et al, 1991). La forme dominante exprimée par les cellules endothéliales est celle à 7 domaines immunoglobulines (Poke et al, 1991).

VCAM-1 forme des liens avec le cytosquelette d'actine. Son ligand leucocytaire est une intégrine qui peut être  $\alpha_4\beta_1$  (very late antigen 4 ou VLA4) ou  $\alpha_4\beta_7$  (Springer. et al, 1994).



**Figure 23** : Illustration schématique des deux isoformes de VCAM1 générés par épissage alternatif. Les boucles 1-2-3-4-5-6-7 représentent les différents domaines immunoglobulines .(Cybulsky et al, 1991).

Le promoteur du gène VCAM1 contient des sites consensus de liaison pour NF- $\kappa$ B, les facteurs de transcription de la famille GATA, et le facteur de transcription AP1 (Cybulsky et al, 2001). La transcription du gène de VCAM-1 dans les cellules endothéliales est induite par les lipopolysaccharides (LPS) et les cytokines inflammatoires (interleukine-1 $\beta$  et le facteur nécrosant des tumeurs alpha) (TNF $\alpha$ ). Neish et al, (1995) ont démontré que l'accumulation de transcrits de la forme complète de VCAM1 (7 domaines immunoglobulines) suite à l'induction par des cytokine nécessite la liaison du facteur régulateur de l'interféron (IRF-1) (interferon regulatory factor1) à la sous unité p50 du complexe NF- $\kappa$  B (p50/p65) (Neish et al, 1995), ce qui va faciliter la liaison de ce complexe au site régulateur du promoteur de VCAM1. Cette synergie dans la liaison au promoteur de VCAM1 de ces deux facteurs de transcription (IRF1 et NF-  $\kappa$  B) permet d'activer la transcription du gène VCAM1 dépendamment de la voie de signalisation PKCdelta-p38 kinase au niveau de l'épithélium pulmonaire en réponse à TNF- $\alpha$  (Woo et al, 2005).

#### **e- ICAM1 :**

Les molécules d'adhésion intercellulaire ICAM (Intercellular adhesion molecules) forment une famille de trois membres : ICAM1 ou CD54, ICAM2 ou CD102 et ICAM3 ou CD50). Les trois sont des glycoprotéines de la surface cellulaire, membres de la superfamille des immunoglobulines (Hayflick et al, 1998). ICAM1 et ICAM3 comportent 5 domaines immunoglobulines (Ig) dans leur domaine extracellulaire (Vazeux et al, 1992) alors que ICAM2 comporte seulement deux domaines Ig. Quant au segment transmembranaire et le court domaine cytoplasmique, ils sont tous les deux communs aux

trois molécules ICAM (Simmons et al, 1988). Celles-ci partagent le même ligand aussi, l'intégrine  $\alpha_L\beta_2$  ou l'antigène des fonctions de lymphocytes (LFA) (de Fougerolles et al, 1991). En plus, l' ICAM1 peut lier une autre intégrine leucocytaire  $\alpha_M\beta_2$  ou MAC1.

Les trois molécules n'ont pas des fonctions redondantes et elles présentent des profils d'expression et de distribution variables. Chez l'homme et le cochon ICAM3 est constitutivement et abondamment exprimée par tous les leucocytes (Leeb et al, 2004). Les deux autres membres de cette famille: ICAM1 et ICAM2 sont exprimés au niveau des cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques et à très faibles taux par les leucocytes (Simmons et al, 1995, Dougherty et al, 1988).

En plus ICAM1 est largement exprimée par d'autres types cellulaires : les fibroblastes (Kelly et al, 1992) et les cellules épithéliales. L'expression abondante d'ICAM1 par les cellules endothéliales permet à celles-ci d'interagir avec les leucocytes au cours du processus inflammatoire. La liaison entre l'ICAM1 endothélial et les intégrines leucocytaires  $\alpha_L\beta_2$  et  $\alpha_M\beta_2$  joue un rôle crucial dans la capture et la transmigration des leucocytes (Springer, 1990, 1994). Plusieurs études ont affirmé que le trafic des neutrophiles est perturbé chez les souris déficientes de ICAM-1, et par conséquent ces animaux présentent une réduction de la réponse inflammatoire (Sligh et al, 1993). Le même effet est enregistré suite au ciblage d'ICAM-1 endothélial par des oligonucléotides antisens (Rijcken et al, 2002). ICAM1 est très rapprochée de point de vue structure et fonction de la molécule VCAM-1. Les deux peuvent participer à l'atherogénèse par accumulation des monocytes dans l'intima des artères (Iiyama et al, 1999).

ICAM1 peut compenser pour VCAM-1 ou coopérer avec cette molécule au cours de la réponse inflammatoire, de la même manière que la P- et la E-Sélectine le font au cours du roulement du leucocyte sur l'endothélium (Dong et al, 1998).

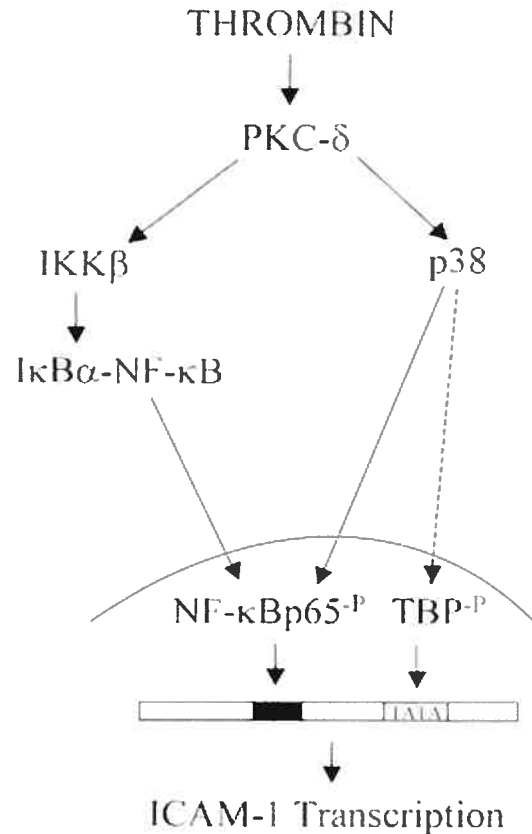
En plus de son rôle dans l'adhésion proprement dite (rôle structurel), l'ICAM1 est une molécule traductrice du signal. Elle se trouve liée au cytosquelette d'actine à la surface cytoplasmique de la membrane endothéliale par l'intermédiaire des molécules de la famille ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) et forme avec celles-ci une structure d'amarrage pour d'autres molécules impliquées dans des cascades de signalisation comme les phosphoinositides (voie de PI3k) et Rho kinase (Wojciak-Stothard et al, 1999, Heiska et al, 1998, Hopkins et al, 2004). Quant à l'ICAM-2, elle a des connections au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des protéines :  $\alpha$ -actinine (Heiska et al, 1996, Helander et al, 1996) et ezrin (Yonemura et al, 1998).

ICAM-1 est une molécule exprimée de manière constitutive par l'endothélium mais son expression augmente drastiquement suite à l'exposition aux cytokines pro inflammatoires : l'IFN $\gamma$ , le TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (Kaiserlian et al, 1991) ou produits bactériens (LPS par exemple) (Dietrich et al, 2002, Hubbard et Rothlein, 2000). Par contre ICAM-2 est réfractaire à la stimulation par des cytokines inflammatoires (Nortamo et al, 1991).

En ce qui concerne la vascularisation pulmonaire, notre objet d'étude, l'adhérence des neutrophiles suite à un traitement au TNF $\alpha$  est ICAM1-dépendante. Un changement important dans le réarrangement du cytosquelette endothélial d'actine par activation de la voie p38 MAP kinase qui finit par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été démontré dans ces cellules. En effet Rahman et al, (2001) confirment que l'adhésion des PMN leucocytes à des cellules endothéliales se fait par un mécanisme qui requiert l'expression de ICAM-1, dépendante du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Rahman, et al, 1999). Ce dernier est activé en réponse à une cascade qui fait intervenir la protéine kinase C- $\delta$  (PKC- $\delta$ ) qui assure la phosphorylation des éléments de la voie de p38 mitogen-



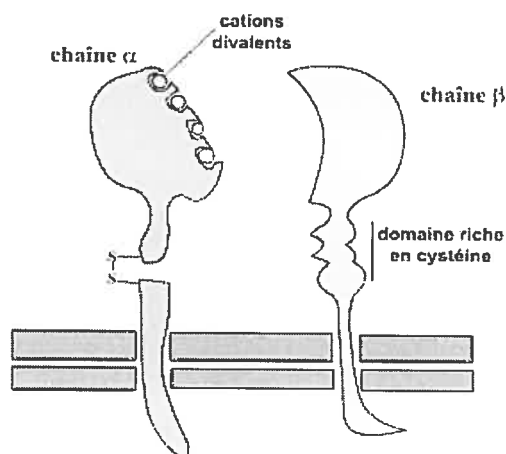
activated protein (MAP) kinase. La transcription du gène ICAM1 se fait par un double mécanisme. Une première voie requiert l'activation de la kinase IKK $\beta$  (Mercurio et al, 1997, Zandi et al, 1997) qui assure la phosphorylation de I $\kappa$ B (inhibiteur de NF- $\kappa$ B). Cette phosphorylation de I $\kappa$ B au niveau des ses sérine (Ser32 et Ser36) (Traenckner et al, 1995) conduit à son ubiquitination suivie par une dégradation par le proteasome. Le NF- $\kappa$ B est transféré alors dans le noyau où il pourra se lier au promoteur d'ICAM-1. Une deuxième voie de signalisation durant laquelle le potentiel de transactivation de NF- $\kappa$ B est directement stimulé par sa phosphorylation directe (Anrather et al, 1999, Bird et al, 1997, Madrid et al, 2000, Vanden et al, 1998) par la voie de p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase (Figure 24).



**Figure 24 :** La figure illustre les événements de signalisation qui régulent l'induction du facteur de transcription NF-κB et l'activation de la transcription de ICAM-1 dans les cellules endothéliales sous l'effet de la thrombine. Cette dernière active la voie de PKC-δ qui assure l'activation de IKKβ et p38 MAP kinase. L'activation de IKKβ contribue à l'induction de la transcription du gène ICAM-1 par liaison de NF-κB au promoteur de ICAM-1 et dégradation de IκBα. L'activation de p38 MAP kinase contribue à la transcription de ICAM-1, possiblement par augmentation du potentiel de transactivation de NF-κB p65 lié par phosphorylation. Alternativement, la p38 MAP kinase peut contribuer à l'interaction de NF-κB avec la machinerie basale de transcription à travers la phosphorylation de TBP (TATA binding protein) (Rahman et al, 2001).

### C-1-3 Les intégrines :

Les intégrines sont des complexes protéiques transmembranaires, caractérisées par une structure hétéro-dimérique qui comporte deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$ . Actuellement, 15 chaînes  $\alpha$  et 8 chaînes  $\beta$  qui peuvent se combiner en 24 hétérodimères différents ont été décrites (Figure 25).



**Figure 25 :** La structure des intégrines. Ce sont des hétérodimères composées de deux chaînes différentes  $\alpha$  et  $\beta$  qui sont des protéines avec des domaines transmembranaires, dont la portion extracellulaire contient la région de liaison au ligand. La chaîne  $\alpha$  contient des acides aminés ayant des liaisons divalentes avec le calcium; la chaîne  $\beta$  contient des ponts disulfides modelant la molécule. La portion intracellulaire est assez courte, celle de la chaîne  $\beta$  est reliée aux protéines du cytosquelette (notamment l'actine). (Modifié de [http://www.smbh.univ.paris13.fr/smbh/pedago/resour\\_bilogie/charnaux/modules\\_bio\\_cel/adh\\_cell\\_famil.ht](http://www.smbh.univ.paris13.fr/smbh/pedago/resour_bilogie/charnaux/modules_bio_cel/adh_cell_famil.ht)).

Par leur domaine intracytoplasmique, les intégrines sont associées aux microfilaments d'actine du cytosquelette et par leurs segments extracellulaires, elles sont impliquées dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Tamkun et al, 1986). Les intégrines jouent aussi un rôle majeur dans l'interaction leucocyte-endothélium en ayant comme partenaire les molécules de la superfamille des immunoglobulines.

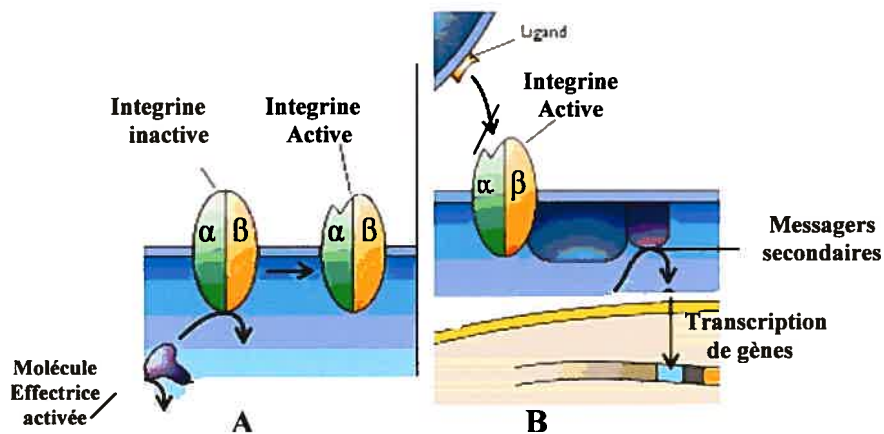
L'expression des intégrines varie d'un type cellulaire à un autre, alors que certaines intégrines sont limitées ou spécifiques à un type cellulaire donné.

#### a- Les intégrines $\alpha v$ et les intégrines $\beta 5$ :

Très peu d'études ont été faites sur l'implication des intégrines endothéliales et leur participation dans l'interaction leucocyte-endothélium. Par contre, ce sont surtout les intégrines leucocytaires ( $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) qui sont connus pour leurs rôles dans la migration transendothéliale. Pourtant, les cellules vasculaires expriment différents types d'intégrines :  $\alpha 1\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , et  $\alpha \beta 4$  (Albelda et al, 1989; Cheng et Kramer, 1989; Cheresh, 1987; Klein et al, 1993; Massia et Hubbell, 1992). Ces hétérodimères  $\alpha$  et  $\beta$  avec des molécules d'adhésion comme les cadhérines et le PECAM-1, jouent un rôle important dans la maintenance de l'intégrité de la couche endothéliale et sa liaison à la matrice extracellulaire (Lampugnani et al, 1991; Tang et al, 1993). L'expression des intégrines  $\alpha v$  et  $\beta 5$  du côté endothélial a été confinée auparavant surtout au côté basal de la cellule où ils interagissent avec la matrice extracellulaire et stabilisent l'assise endothéliale. L'étude du protéome de la membrane plasmique endothéliales pulmonaire, récemment effectuée dans notre laboratoire, a révélé l'existence de ces intégrines à la surface lumineuse (front apical) de la cellule endothéliale alvéolaire. Les mêmes données

ont été rapportées par Kyathanahall et al, (2004). La présence des intégrines  $\alpha v$  et  $\beta 5$  au front sanguin de la cellule endothéliale suggère que ces intégrines endothéliales pourraient jouer un rôle jusqu'à présent ignoré, dans l'interaction leucocyte-endothélium. D'où notre intérêt d'inclure ces intégrines dans l'étude présentée plus loin. Quantitativement,  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  sont les formes majeures des intégrines dans la cellule endothéliale. L'intégrine  $\alpha v\beta 3$  est la plus étudiée, elle participe à l'adhésion de l'endothélium à sa membrane basale et peut avoir plusieurs ligands : la fibronectine, la vitronectine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène, l'ostéopontine et la thrombospondine (Cheng et al, 1991; Cheresh, 1993) et PECAM1. On décrit les intégrines  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha v\beta 5$  comme des facteurs angiogéniques importants. L'administration d'inhibiteurs de ces intégrines réduit la néo-vascularisation chez la souris. Une étude faite sur les cellules de la microvascularisation endothéliale pulmonaire suggère que l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  est très importante dans le maintien de l'intégrité endothéliale. Dans l'endothélium des microvaisseaux pulmonaires, l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  est localisée dans les bordures cellulaires (Tang et al, 1993). Son expression génique est stimulée par un métabolite issue de l'action enzymatique de la lipoxigénase sur l'acide arachidonique : 12-hydroxyoctadécaénoïque acide (12(S)-HETE). Cette stimulation s'effectue à travers la voie de la protéine kinase C (Dean et al, 1995). Les médiateurs qui régulent l'expression de cette intégrine du côté endothélial dans divers cas pathologiques et physiologiques sont : la cytokine TGF  $\beta$  (Ignatz et al, 1989), le TNF $\alpha$  (Defilippi et al, 1991), l'interleukine-1 (Lafrenie et al, 1992), les facteurs de stimulation de la différenciation hématopoïétique GM-CSF et M-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor et macrophage colony-stimulating factor ) (De Nichilo et Burns, 1993), la prostaglandine E2 (Milam et al, 1991), le facteur basique de croissance des fibroblastes bFGF (fibroblast

growth factor) (Klein et al, 1993), et les phospholipides (Conforti et al, 1990). Une des caractéristiques les plus intéressantes des intégrines est leur capacité de transmettre de l'information par des voies bi-directionnelles (inside-out et outside-in signaling) (Figure 26). Les intégrines peuvent être présentes à la surface des cellules dans un état « criptique » sans lier leurs ligands. Des processus intracellulaires, apparemment impliquant des petites protéines G (Katagiri et al, 2004, Giagulli et al, 2004) changent la conformation du domaine extracellulaire des intégrines et les rendent capable de reconnaître leurs ligands spécifiques (signalisation « inside-out »). En revanche, la formation des complexes intégrines – ligands est capable de déclencher des voies multiples de signalisations à l'intérieur de la cellule (signalisation « outside-in ») (Lindborn et al, 2002, Rossetti et al, 2002).



**Figure 26** : Signalisation "inside-out" et "outside-in" des intégrines. Le premier mécanisme de signalisation (inside-out) (A) est important dans le recrutement des leucocytes durant la réponse inflammatoire. Sous les conditions basales les intégrines sont en conformation inactive. Après activation suite à des signaux générés dans la cellule, il y a changement de conformation des heterodimeres d'intégrines. Ce changement leur donne une grande affinité envers leurs ligands. Le deuxième mécanisme de signalisation (outside-in) débute à la surface cellulaire par une liaison du ligand à l'intégrine conduisant à une signalisation biochimique dans la cellule. Des messagers secondaires classiques activés par le domaine cytoplasmique des intégrines incluant les protéines G et les tyrosines kinases régulent l'expression de certains gènes. (Etzioni, 2000).

**D- Description de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et de la migration transendothéliale (diapédèse) :**

Le processus d'extravasation des leucocytes circulants lors d'une réaction inflammatoire constitue un bon modèle d'adhérence fonctionnelle qui met en jeu les principales familles de molécules d'adhésion (Lawrence et Springer, 1991). La succession des événements au cours de ce processus peut se résumer ainsi (Figure 27).

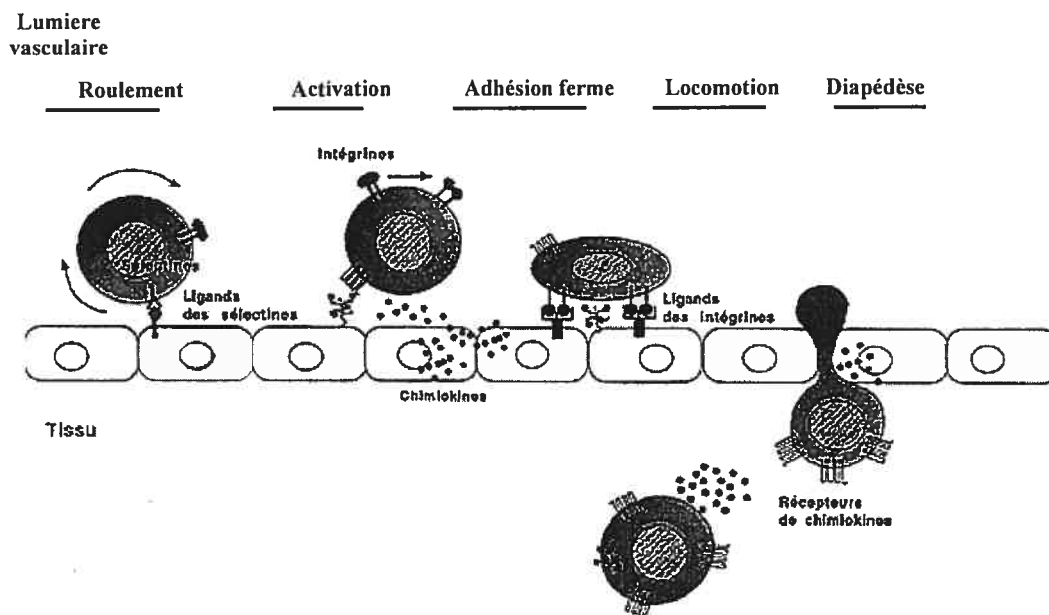
(a) Phase précoce et transitoire prise en charge par la famille des sélectines : P-sélectine et E-sélectine de côté endothélial, dont l'expression et/ou l'apparition à la surface sont induites suite à l'activation de l'endothélium par certaines cytokines. Elles se lient à leurs ligands (PSGL1 et ESL1 respectivement), présents à la surface des leucocytes et produisent un ralentissement des leucocytes dans la circulation. Ceux-ci vont s'accrocher à la surface endothéliale (le phénomène de marginalisation) et continuer à avancer à faible vitesse avec le courant sanguin en « roulant » le long de la paroi vasculaire. La L-sélectine leucocytaire participe également à cette étape de faible adhésion en se liant à ses contre-récepteurs – les sialomucines endothéliales. Au cours de cette étape des liaisons entre les molécules de sélectines et leurs ligands sont continuellement formées et rapidement dissociées. La durée de vie de ces liaisons est de l'ordre d'une seconde (Kaplanski et al, 1993). Cependant, ces interactions ne suffisent pas à arrêter les leucocytes (Lawrence et Springer, 1991) qui, jusqu'ici, ne sont pas activés.

(b) Phase tardive et durable caractérisée par l'activation des intégrines leucocytaires  $\beta_2$  (LFA-1 ou  $\alpha_L\beta_2$  ou CD11a/CD18) et MAC-1 ( $\alpha_M\beta_2$  ou CD11b/CD18) et  $\alpha_4\beta_1$ , (VLA4 ou CD49d-CD29) qui sont les ligands respectifs de ICAM1 et VCAM1 sur la cellule endothéliale, induits par des cytokines (l'interféron gamma, le facteur nécrosant des tumeurs  $\alpha$ (TNF  $\alpha$ ), et l'interleukine 1(IL1). Ces interactions permettent l'adhésion



ferme des leucocytes à l'endothélium. Les leucocytes migrent ainsi de façon spécifique au site de l'inflammation, car seuls les vaisseaux activés expriment les molécules responsables du ralentissement des leucocytes et leur adhésion ferme à l'endothélium - étape cruciale pour l'induction du processus de diapédèse.

(c) La traversée active des parois vasculaires par les leucocytes a surtout été étudiée pour les polymorphonucléaires mais intéresse aussi les lymphocytes et les monocytes circulants. Elle est favorisée par le ralentissement circulatoire, et l'afflux leucocytaire. Suite à l'adhésion plus forte entre les intégrines leucocytaires et les ICAM et VCAM endothéliales, les leucocytes migrent le long de la surface endothéliale jusqu'au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales où ils se feraient un chemin de passage vers le tissu. Cette étape, appelée « locomotion » est encore mal connue. Elle dépendrait de l'interaction entre les intégrines CD11a/CD18 et CD18/CD11b leucocytaires avec ICAM-1 et ICAM-2 endothéliales; le blocage de celles-ci par des anticorps, après l'étape d'adhésion, empêche la migration des leucocytes vers les jonctions inter-endothéliales. (Schenkel et al, 2004). Une fois à proximité des bordures cellulaires, les polymorphonucléaires émettent ensuite des pseudopodes, s'infiltrant entre les cellules endothéliales, puis traversent la membrane basale modifiée par dépolymérisation et digestion enzymatique (figure 27). Mais le phénomène de diapédèse reste très controversé quant au mécanisme et l'emplacement où elle s'effectue (à travers les jonctions entre deux cellules endothéliales ou à travers le corps même d'une seule cellule endothéliale).



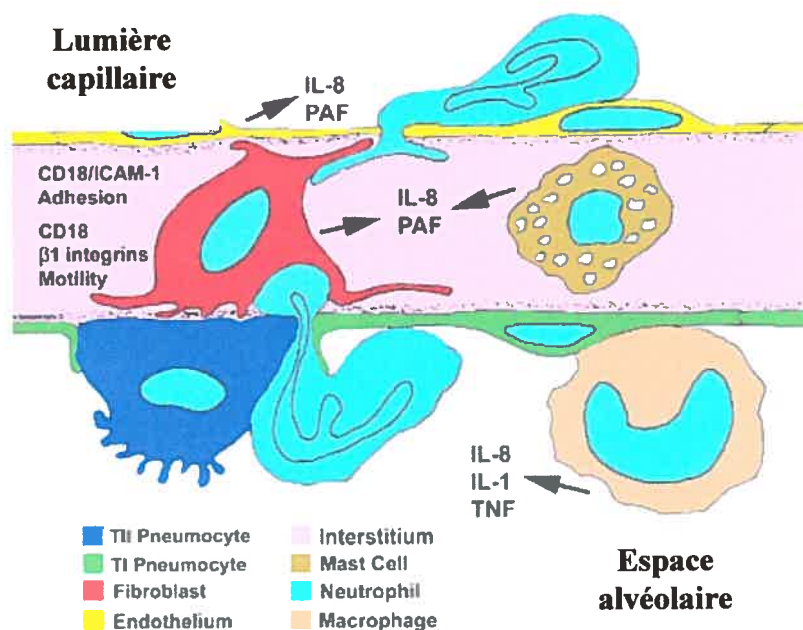
**Figure 27:** Cascade de la transmigration endothéliale des leucocytes. **Roulement** des leucocytes circulants sur l'endothélium activé via des interactions entre les sélectines et leurs ligands. Les chimiokines ou autres médiateurs pro inflammatoires sécrétés par différentes sources : les mastocytes, les macrophages, ou par l'endothélium lui-même permettent le revirement du roulement vers l'**adhésion ferme** suite à l'activation des intégrines. Une étape de locomotion permettra au leucocyte d'atteindre les jonctions cellulaires où se fait la dernière étape de la **diapédèse** des leucocytes à travers l'endothélium et l'entrée dans le tissu enflammé. <http://www.kb.u-psud.fr/kb/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours-immunologie/cours/cours9.htm>.

À titre d'exemple au niveau des alvéoles capillaires la migration des neutrophiles peut être para-cellulaire avec une préférence marquée pour la migration aux coins de convergence de trois cellules endothéliales (Figure 28) ou transcellulaire ou les deux en même temps. Sunil et al, (2001) ont examiné en temps réel la formation transitoire des ouvertures dans les jonctions inter-endothéliales, en observant la distribution de la VE cadhérine rendue visible par conjugaison avec une petite protéine ayant une fluorescence intrinsèque (green fluorescent protein ou GFP). Des pores de 4–6  $\mu\text{m}$  de taille se forment au moment du passage du leucocyte au travers de la jonction, et se ferment 5 min après la transmigration du leucocyte. Il faut mentionner pourtant que ces études ont été menées *in vitro*. L'attraction des leucocytes vers les jonctions inter-endothéliales et le mécanisme de la diapédèse proprement dite semble impliquer trois molécules situées en abondance dans la région jonctionnelle : le PECAM 1 (tel que discuté dans le paragraphe sur cette molécule), les molécules jonctionnelles d'adhésion (junctional adhesion molecules ou JAM) et le CD99.

- **JAM** ou « junctional adhesion molecules » appartient à une nouvelle famille d'immunoglobulines (Ig) qui comprend trois membres (JAM-1, JAM-2 et JAM-3). Ceux-ci sont des protéines transmembranaires qui s'engagent dans des liaisons homophiliques adhésives (Naik et al, 2001, Bazzoni et al, 2000, Kostrewa et al, 2001) et ont été prouvées de jouer un rôle important dans l'émigration des neutrophiles au niveau du poumon (Liu et al, 2001). JAM-1 est la molécule la plus étudiée de cette famille. Elle est exprimé au niveau des jonctions intercellulaires épithéliales et endothéliales ainsi qu'au niveau des neutrophiles, des monocytes, des lymphocytes et des érythrocytes) (Malergue et al, 1998, Ostermann et al, 2002). Elle colocalise avec les composants des jonctions serrées (Martin-Padura et al, 1998, Bazzoni et al, 2000).

La fonction présomptive du JAM-1 est de promouvoir par des interactions homophiliques entre JAM-1 des cellules endothéliales et celui des leucocytes. Pourtant, dans certaines inflammations, la diapédèse des neutrophiles peut être indépendante de JAM-1. En plus, il a été montré que JAM-1 peut avoir un ligand leucocytaire hétérophilique : l'intégrine  $\alpha L\beta_2$  (CD11a/CD18 ou LFA-1) (Ostermann et al, 2002). Curieusement, JAM-1 et PECAM-1 peuvent jouer un rôle répresseur dans la migration transendothéliale. Le traitement des cellules endothéliales en culture avec une combinaison de TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  montre une perte d'expression de ces molécules au niveau des bordures cellulaires (Romer et al, 1995), cette diminution est due à une internalisation et une diminution de la synthèse de cette protéine (Rival et al, 1996). Cette perte de JAM-1 et PECAM-1 peut mettre fin à la réponse inflammatoire en prévenant la migration des leucocytes. Hiser et al, (1975) ont observé que suite à la redistribution de JAM-1 et PECAM-1 loin des jonctions inter-endothéliales sous des conditions de débit sanguin réduit il y a une baisse considérable de la migration des neutrophiles dans le poumon .

- **CD99** est une protéine transmembranaire, O-glycosylée de 32-kDa, initialement identifiée sur les cellules hématopoïétiques et les leucocytes. Récemment elle a été également trouvée dans les régions jonctionnelles des cellules endothéliales (Schenkel et al, 2002) et définie comme une nouvelle molécule d'adhésion inter endothéliale. Cette localisation permet de croire que cette molécule pourrait fonctionner de la même manière que le JAM1 dans la diapédèse des leucocytes.



**Figure 28 :** Schéma illustrant le phénomène de diapédèse au niveau des alvéoles pulmonaires et les différents éléments qui y interviennent. L'IL-1 $\beta$ , le facteur onconécrosant (TNF)- $\alpha$  secrétés par les macrophages alvéolaires activent les cellules endothéliales et les fibroblastes interstitiels ainsi que les mastocytes pour produire les facteurs chimiotactiques de neutrophiles tel que l'interleukine (IL)-8) et le facteur activateur des plaquettes (PAF). Les neutrophiles traversent l'endothélium et sa membrane basale. Dès que les neutrophiles émergent dans l'espace interstitiel, ils y adhèrent et roulent à la surface des fibroblastes. L'adhésion des leucocytes et leur mobilité requiert l'intégrine  $\beta_2$  ou (CD18) et intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). Les fibroblastes dans l'espace interstitiel permettent de donner des informations directionnelles permettant de guider les neutrophiles vers les coins tricellulaires là où les marges des pneumocytes de type II et pneumocyte de type I convergent (Burns et al, 2003).

Chaque étape dans ce processus est un pré-requis pour la prochaine. Si les leucocytes ne roulent pas, suite à un événement quelconque (blocage des récepteurs par des antagonistes ou défaut de ligands), elles ne peuvent pas adhérer non plus à l'endothélium; et s'ils ne peuvent adhérer ils ne peuvent pas transmigrer.

## Matériels et méthodes

### Objectif :

Le choix des molécules d'adhésion citées dans le tableau (III) a été fait à partir de celles les plus pertinentes pour l'adhésion cellulaire en générale et la migration transendothéliale des leucocytes en particulier. La plupart de ces molécules ont été étudiées sous des conditions physiologiques ou pathologiques variées (inflammations et maladies). Mais le point reproché à ces études, c'est que les molécules sont traitées séparément dans des contextes différents : au niveau des lits vasculaires distincts, sous des conditions de stimulation et d'inflammation diverses. D'où notre intérêt d'étudier l'expression de ces molécules d'adhésion au niveau d'un même lit vasculaire (l'endothélium pulmonaire) et de voir l'altération de leur expression avec le diabète où très peu d'études ont été faites *in vivo*. Ainsi que l'évolution de cette altération suite au traitement à l'insuline.

Pour cela des membranes endothéliales (front luminal) pulmonaires ont été préparées afin de détecter l'expression des molécules d'adhésion à la surface membranaire. La même détection a été faite au niveau de l'homogénat total de poumon. En effet certaines molécules d'adhésion pourraient se trouver en réserve dans des organelles intracellulaires comme c'est le cas de la P-sélectine au niveau des corps de Weibel Palade. L'expression de ces molécules d'adhésion à la surface membranaire et au niveau de l'homogénat cellulaire donnerait une idée sur leur provenance (synthèse de *novo* ou simple translocation à partir des réserves au niveau du cytoplasme). La technique utilisée est celle de l'immunobuvardage suivit par une analyse densitométrique.

C'est la première fois à notre connaissance qu'un éventail aussi large de molécules qui interviennent dans la cascade de migration transendothéliale des leucocytes, incluant les trois familles des sélectines, des immunoglobulines et des intégrines a été étudié *in vivo*.

**Modèle animal :** Des rats males Sprague Dawley 125g, (Charles River Inc. St Laurent, Québec, Canada) ont été utilisés dans toutes les expériences. Ils ont été partagés en trois groupes : le premier groupe a été laissé comme contrôle, un deuxième groupe de rats ont été rendus diabétiques par une injection de streptozotocine (STZ) (70mg/kg poids corporel). Les animaux sont maintenus hyperglycémiques sans traitement à l'insuline pour 2 mois et demi. Ils ont été individuellement testés pour la glycémie 48 h après l'injection à la STZ et juste avant le sacrifice, utilisant le kit GlycoTest II (Roche Diagnostics; Laval, Québec, Canada). La glycosurie est surveillée de façon hebdomadaire durant 2 mois et demi, utilisant les bandelettes Uriscan (VWR-Canlab, Montréal, Québec, Canada). Un troisième groupe de rats diabétiques de deux mois et demi ont été traités à l'insuline par injection sous-cutanée d'une dose quotidienne de 5-15U/ml d'insuline (HUMULIN ultralente, Elli Lilly, Ont.), pendant trois semaines. La glycémie a été vérifiée pendant toute la durée du traitement pour ajuster la dose d'insuline injectée. Les animaux ont eu libres accès à la nourriture standard et à l'eau. Toutes les expériences ont été conduites avec l'approbation du Comité Institutionnel de Déontologie pour l'Expérimentation sur les Animaux.



## **1-Purification du front luminal de la membrane plasmique des cellules endothéliales pulmonaires :**

Les membranes plasmiques endothéliales (front sanguin ou pôle apical) ont été purifiées à la méthode de la silice cationique colloïdale (Chaney et Jacobson, 1983). Le principe de cette méthode repose sur la modification de la densité des membranes par l'attachement des billes de silice colloïdale -nano particules de 20 à 40nm- (Nalco1060, Nalco Chemical Co, Chicago, Il) chargées positivement à leur surface et l'acide polyacrylique (Jacobson et al, 1992). Les avantages de cette méthode :

- a)- Marquage sélectif du front luminal de la cellule endothéliale.
- b)- Facilité de rupture des cellules endothéliales (très minces, donc résistantes aux forces de cisaillement.
- c)- Séparation par simple centrifugation dans des milieux denses.
- d)- Sontrôle facile de la pureté par microscopie électronique : seulement les membranes marquées par la silice sont des membranes endothéliales.

Les poumons de rats ont été perfusés séquentiellement avec: le tampon phosphate salin (PBS) (phosphate buffered saline (10mM tampon phosphate, pH 7.4, 0.85% NaCl) pour débarrasser les vaisseaux du sang, le tampon MBS (MES buffered saline) (Sigma, Chemical, CO, St Louis, MO), la silice colloïdale 1% dans le MBS, lavage au MBS pour enlever la silice non attachée aux membranes. L'acide polyacrylique 1% est perfusé ensuite pour bloquer les charges excédantes de la silice, suivit par le tampon d'homogénéisation supplémenté avec l'inhibiteur de sérine protéase phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma, Chemical, Co, St Louis, MO). Le poumon récolté est homogénéisé dans un homogénéisateur Potter Eveljehm et filtré à travers un filtre

100µm Nytex. Après une centrifugation de 20 minutes à 300 g, dans une centrifugeuse Beckman TJ6 pour se débarrasser des éléments légers de l'homogénat, le culot obtenu est suspendu dans le tampon d'homogénéisation et centrifugé encore une fois. Le culot est suspendu une troisième fois dans le tampon d'homogénéisation avec ajout de 1mg DNase I et 1mg RNase A avec une incubation sur glace pendant 1 heure. On ajoute ensuite un volume égal d'une solution de Nycodenz 1.02 g/ml à l'homogénat. Une centrifugation à 20,000 rpm, rotor Sw60 Ti, 20 minutes est effectuée dans une ultracentrifugeuse Beckman à 4°C; cette étape est répétée une deuxième fois. Seulement les membranes endothéliales recouvertes de silice, beaucoup plus lourdes que les organites, les endo-membranes ainsi que les membranes provenant d'autres cellules qui n'ont pas été exposées à la silice sont récupérées dans le sédiment. Le culot final est suspendu dans le tampon d'homogénéisation; c'est la fraction membranaire appelée P2.

## **2-Contrôle par microscopie électronique de la pureté des membranes P2 :**

Les membranes P2 ont été fixées dans la glutaraldehyde 1.5% toute la nuit à 4°C. Une centrifugation a été effectuée à 30,000 rpm avec un rotor SW60 Ti, Bekman, 1h pour sédimenter les membranes. Le culot a été lavé dans le tampon phosphate avant de le post-fixer dans l'osmium 1% pour 1h à 4°C. Après un deuxième lavage au tampon phosphate, une série de déshydratation à l'éthanol a été effectuée. Les membranes déshydratées ont été enrobées dans l'Epon. Des sections minces (50 nm) orientées transversalement par rapport au sédiment, afin de contenir toute l'épaisseur de celui-ci, ont été colorées à l'uranyle acétate et au plomb avant de les examiner au microscope

électronique. Tout matériel qui ne se présente pas sous la forme de feuillet membranaire ou qui n'est pas associé avec les particules de silice est considéré comme contaminant.

### **3-Solubilisation des membranes P2 :**

Des membranes P2 issues des rats normaux, diabétiques non traités et diabétiques traités à l'insuline ont été solubilisées dans 1% SDS, soumises aux ultrasons, bouillies et centrifugées à 12,000 rpm dans une micro-centrifugeuse pour enlever les particules de silice. Le surnageant, contenant les protéines membranaires solubilisées, est récupéré.

Les protéines ont été mesurées par la méthode d'Amidoblack (Schaffer et Weismann, 1973). C'est une méthode conçue pour déterminer la quantité des protéines dans des solutions diluées en présence des solutés qui interfèrent avec d'autres essais colorimétriques. Les mesures ont été faites en quadruples pour assurer leur exactitude.

### **4-Séparation des protéines par électrophorèse et analyse par immunobuvardage :**

Les protéines (40 $\mu$ g) de la membrane plasmique endothéliale purifiée des animaux normaux, diabétiques, et diabétiques traités à l'insuline ont été solubilisées en tampon Laemmli et séparées par SDS-PAGE dans un système Mini-PROTEAN II (BioRad Laboratoires, USA).

Après leur séparation électrophorétique, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose avec le système Mini Trans-blot (BioRad Laboratories USA) dans un tampon Tris-glycine/méthanol (Towbin, 1979). Après le transfert, la

membrane a été bloquée pour 1h avec une solution de blocage pour western blot (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Une série d'anticorps (dilutions faites dans le tampon de blocage) dirigée contre diverses molécules d'adhésion endothéliales (tableau III) a été incubée avec la membrane pendant 24h à 4°C ou 2h à la température ambiante. Les membranes lavées au tampon Tris saline additionné de 0.1% Tween 20 (TBST) ont été incubées pour 1h à la température de la pièce avec les anticorps secondaires (anti-souris, anti-lapin ou anti-chèvre) marqués à la peroxydase (Sigma, Chemical Co, St Louis, MO) et le signal immunocytochimique a été mis en évidence par chemiluminescence (ECL) en utilisant un kit ECL selon les indications du manufacturier (Amersham).

#### **5-Quantification densitométrique :**

Les images ont été numérisées sur un scanner par transparence et enregistrées à une résolution de 150 pixels/inch. Une analyse densitométrique des bandes a été effectuée par un programme (Scion Image Meyer Instruments Inc, Houston TX.) d'analyse et de traitement d'images permettant de quantifier les résultats de l'immunobuvardage.

Antigène	Nature de l'anticorps	Dilution	Source
CD34	Souris monoclonal	1/80	Labratoire Dr Ghitescu
ICAM1	Chèvre Polyclonal	1/00	Santa Cruz biotechnology
VCAM1	Chèvre Polyclonal	1/100	Santa Cruz biotechnology
PECAM1	Souris monoclonal	1/100	Labratoire Dr Ghitescu
CEACAM1	Chèvre Polyclonal	1/200	Santa Cruz biotechnology
P-SÉLECTINE	Chèvre Polyclonal	1/50	Santa Cruz biotechnology
E-SÉLECTINE	Lapin Polyclonal	1/200	Santa Cruz biotechnology
INTÉGRINE $\alpha v$	Lapin Polyclonal	1/100	Chemicon
INTÉGRINE $\beta 5$	Lapin Polyclonal	1/100	Chemicon

**Tableau III** : Le tableau montre les différents anticorps primaires utilisés pour mettre en évidence les molécules d'adhésions étudiées (antigènes), les différentes dilutions effectuées pour chaque anticorps ainsi que leur provenance (source).

#### **6-Proportionnalité des résultats de l'analyse densitométrique des « western blots » avec la quantité de protéines mises sur gel SDS PAGE :**

La clé de l'approche expérimentale utilisée réside dans la proportionnalité entre l'intensité du signal immunochimique (immunobuvardage) et la quantité d'antigène respectif. Pour vérifier si notre méthode d'analyse répond à cette exigence, nous avons testé :

a)- la reproductibilité du signal d'immunobuvardage pour des échantillons contenant la même quantité d'antigène et

b)- si une relation linéaire existe entre la quantité d'antigène et l'intensité du signal ECL.

- Pour le premier point, 5 échantillons identiques de P2, chacun contenant 40 $\mu$ g de protéines ont été indépendamment préparés, chargés sur SDS-PAGE, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec l'anticorps anti-ICAM1. L'intensité du signal immunochimique s'avère constante pour tous les échantillons (Figure 29).

La deuxième question a été vérifiée et validée par une électrophorèse sur gel SDS-PAGE sur lequel 3 quantités décroissantes de protéines membranaires P2 (40  $\mu$ g, 20  $\mu$ g et 10  $\mu$ g) ont été mises. L'immunoblot a été effectué avec l'anticorps anti-CD34 qui est une des molécules d'adhésion étudiées. L'analyse densitométrique des signaux démontre qu'une relation linéaire existe entre la quantité de protéine et l'intensité du signal (Figure 30).

### **7-Validation de l'état diabétique des animaux :**

L'état diabétique des animaux en expérience (rats diabétiques ou diabétiques et traités à l'insuline) a été évalué par deux méthodes complémentaires :

(a) la glycémie, ayant une valeur moyenne de 5-6 mmoles/l chez les rats témoins monte à plus de 30 mmoles/l chez les animaux diabétiques et fluctue significativement chez ceux qui ont reçu de l'insuline.

(b) la détection immunochimique des produits précoces de glycation dans les membranes endothéliales. Ces produits sont le résultat de l'attachement covalent des

sucres réducteurs comme le glucose aux résidus lysine des protéines (réaction Maillard ou de glycation). Étant donné que la réaction est non enzymatique, la quantité de produits de glycation détectée dans un tissu quelconque dépend seulement du taux de sucre circulant et représente donc un excellent indice du niveau de la glycémie, intégré sur une période plus longue.

Des fractions de 20 µg de membranes endothéliales (P2) de poumon de 3 animaux normaux, 3 diabétiques et 3 autres rats diabétiques traités à l'insuline, ont été mises sur gel (SDS-PAGE) et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les produits de glycation (épitopes lysyl-glucose) ont été détectés par immunobuvardage en utilisant un anticorps polyclonal obtenu dans notre laboratoire et dirigé contre la glucitolysine (Figure 31).

#### **8-Étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion chez des rats normaux versus rats diabétiques :**

Les membranes P2 de poumons de 4 rats normaux versus 4 rats diabétiques non traités ont été préparées de la même manière (citée plus haut) avant de les mettre sur gel SDS-PAGE et de les transférer sur membrane de nitrocellulose en vue d'une étape d'immunobuvardage. Les résultats de ce dernier ont fait l'objet d'une analyse densitométrique pour quantifier les différences d'expression de chaque molécule d'adhésion étudiée entre les deux groupes de rats. Cette analyse a été répétée au moins 3 fois pour chaque molécule d'adhésion en utilisant des échantillons provenant de poumons de rats différents (12 échantillons de membranes P2 de poumons de rats normaux et 12 autres de rats diabétiques au total).

**9-Étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion chez des rats normaux versus rats diabétiques traités à l'insuline :**

Pour voir l'impact d'un traitement à l'insuline, contre l'hyperglycémie sur l'expression des molécules d'adhésion, une deuxième étude a été entamée. Cette étude suit le même protocole que celui antérieurement décrit sauf que la comparaison a été faite entre les membranes plasmiques de 4 rats normaux et 4 rats diabétiques traités à l'insuline pendant trois semaines.



## Résultats

La plupart des données dans la littérature sont concentrées sur les molécules d'adhésion solubles du fait de leur impact clinique et thérapeutique (marqueurs de plusieurs types d'inflammation et maladies). Peu d'études ont été consacrées aux molécules d'adhésion membranaires localisées à la surface des cellules endothéliales *in vivo*. Ces dernières suite à leur clivage deviennent une source importante pour les molécules d'adhésion solubles. Le but de notre étude était d'évaluer le taux d'expression des molécules d'adhésion à la surface apicale endothéliale, donc à l'endroit précis où ces molécules sont supposées remplir leur fonction de médiateurs entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire.

### A-Altération de l'expression des molécules d'adhésion au cours du diabète :

Les résultats obtenus de l'étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion chez des animaux normaux versus animaux diabétiques se divisent en deux groupes :

-Une partie des molécules d'adhésions diminuent leur expression lors du diabète en comparaison à l'état physiologique normal (Figure 32). Celles-ci sont :

a-Les sélectines et leurs ligands :

L'antigène **CD34**, un ligand de la L-sélectine leucocytaire diminue de 2 fois (Figure 32-B), alors que dans le cas de la **E-sélectine**, son expression ne montre pas de changement significatif (Figure 32-A).

#### b-La superfamille des immunoglobulines :

Le **PECAM 1** diminue de 2 fois et demie au cours du diabète (Figure 32-E). Pour le **CEA-CAM 1**, deux isoformes ont été identifiés au niveau de la membrane luminale endothéliale pulmonaire de rat : la première contient 4 domaines immunoglobulines au niveau du N-terminal de la molécule, c'est donc l'isoforme **CEA-CAM 1-4** qui correspond à une bande de 100-105 KDa. La deuxième contient seulement 2 domaines immunoglobulines **CEA-CAM 1-2** située à 55 KDa. C'est la première fois que cette dernière isoforme est identifiée chez le rat. Ces deux isoformes présentent une diminution très forte d'expression à la surface de la membrane endothéliale chez des rats diabétiques (Figure 32-C-D) (environ 6 fois pour le **CEA-CAM1-4** et 3 fois pour le **CEA-CAM1-2**).

#### c- Les intégrines :

La présence de l'intégrine  $\alpha v$  et l'intégrine  $\beta 5$  au front sanguin de la cellule endothéliale pulmonaire diminuent de 3 fois et 12 fois respectivement (Figure 32-F-G). Une autre partie des molécules d'adhésion (**ICAM1**, **VCAM1** et **P-sélectine**) présente au contraire, une augmentation considérable de leur expression au cours du diabète (Figure 33) :

L'expression de l' **ICAM1** et de **VCAM1** augmente de 5 et 3 fois et demi respectivement en comparaison à des contrôles (Figure 33-A-B), tandis que la quantité de **P-sélectine** double à la surface membranaire chez les animaux diabétiques (Figure 33-C).

L'évaluation comparative du niveau d'expression des mêmes molécules d'adhésion au niveau de l'homogénat entier de poumon produit un patron d'altération similaire à celui trouvé pour les membranes endothéliales purifiées (Figure 34). La

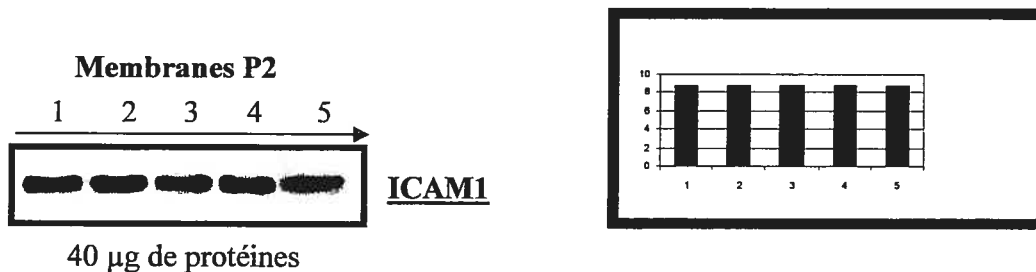
tendance générale d'augmentation (Figure 34-H-I-J) ou de diminution (Figure 34-A-B-C-D-E-F-G) de l'expression de chacune des molécules d'adhésion comprises dans les deux catégories décrites ci-haut se reproduit intégralement; les différences entre les résultats obtenus pour les membranes purifiées et l'homogénat total se situent seulement au niveau de la valeur exacte du rapport diabétique/normal.

### **B-L'effet du traitement à l'insuline sur l'expression des molécules**

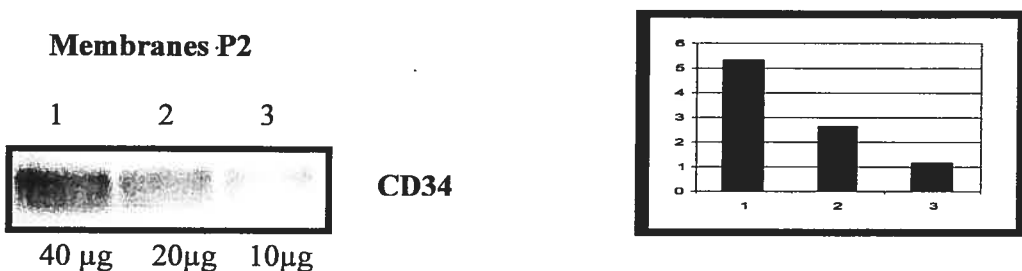
#### **endothéliales d'adhésion :**

L'étude comparative entre des rats normaux versus des rats diabétiques traités à l'insuline a été faite au niveau des membranes P2 uniquement. En effet les résultats issus la première étude comparative entre des homogénats (normaux versus diabétiques) suit le même patron que ceux issus des membranes P2 avec des variations dans le taux d'augmentation et de diminution de l'expression membranaire de chaque molécule d'adhésion. Ajouté à cela notre but dans ce projet qui est de voir l'expression à la surface membranaire de ces molécules et non l'expression totale au niveau de la cellule endothéliale. Après le traitement à l'insuline des rats diabétiques, toutes les molécules d'adhésion notent une augmentation significative en comparaison à des rats normaux (Figure 35) sauf pour l'isoforme CEA-CAM1-4 dont l'expression ne montre pas de changement significatif d'expression entre les rats contrôles et ceux traités à l'insuline après le diabète alors que l'expression de l'isoforme CEA-CAM1-2 augmente drastiquement (4fois) comparativement aux contrôles (Figure 35).

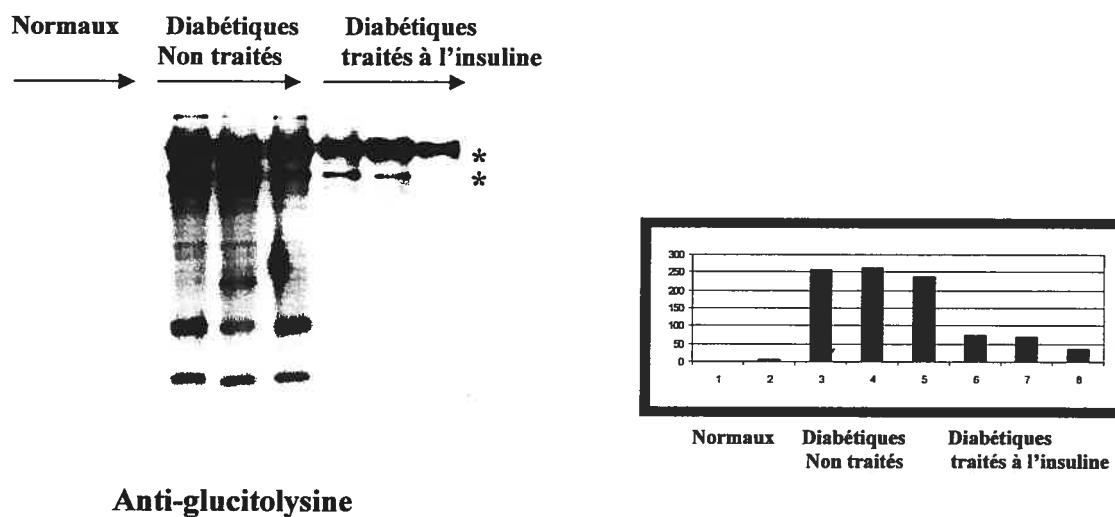
## VALIDATION DE LA METHODE D'IMMUNOBUVARDAGE QUANTITATIF



**Figure 29** : Contrôle de reproductibilité du signal d'immunobuvardage quantitatif. L'intensité de la réponse immunochimique évaluées par analyse densitométrique de chaque bande correspondante à l'antigène ICAM1 sont pratiquement égales pour tous les échantillons (5) contenant la même quantité de protéines (40 µg) de membrane plasmique endothéliale .



**Figure 30** : Une relation linéaire existe entre la quantité d'antigène (40, 20 et 10µg de protéines de membrane endothéliale) et l'intensité du signal. Analyse par densitométrie de la bande correspondante à l'antigène CD34.

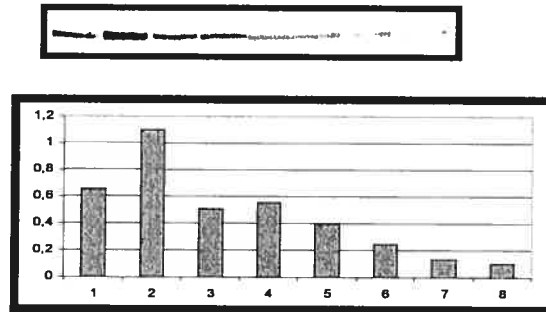


**Figure 31:** L'état diabétique révélé par une détection immuno-chimique des produits précoces de glycation dans les membranes endothéliales purifiées de trois animaux normaux, trois diabétiques et trois diabétiques traités à l'insuline, Notez l'absence de produits de glycation chez les animaux normaux par rapport à ceux diabétiques et la réduction significative de la glycation suite au traitement à l'insuline. Les deux astérisques\* correspondent à la laminine et le collagène de type VI.



E

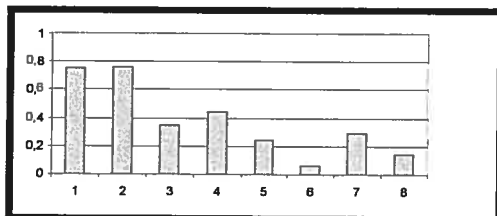
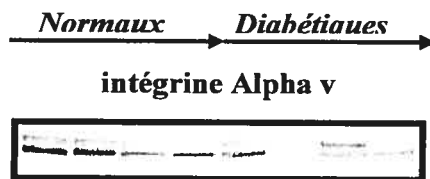
## PECAM1



PECAM1// D/ N=0.41

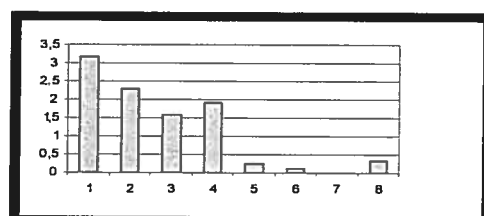
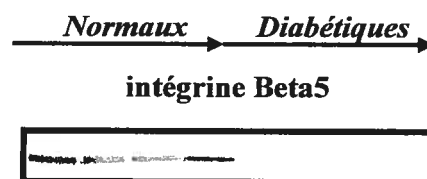
La famille des intégrines

F



Intégrine Alpha v// D/N=0.32

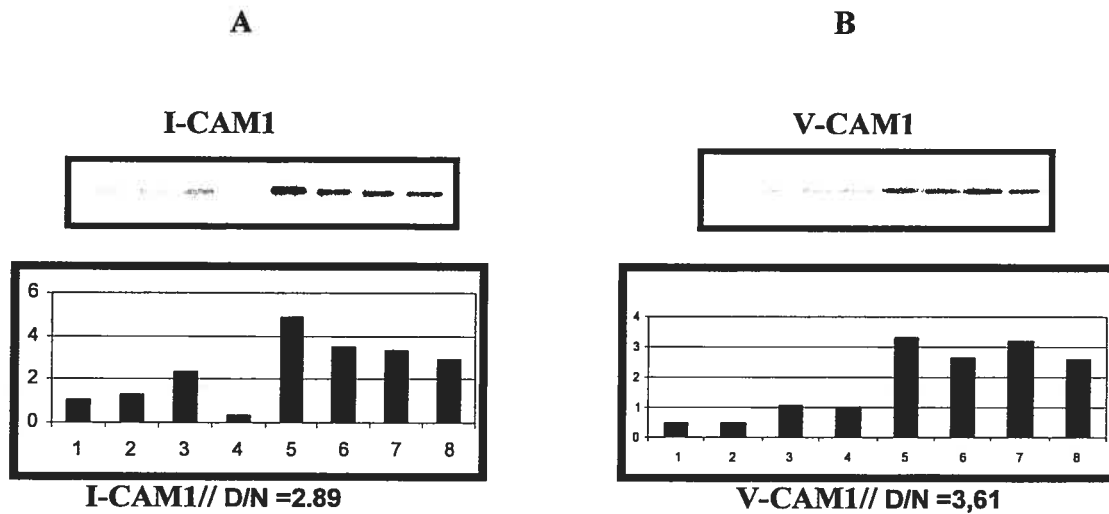
G



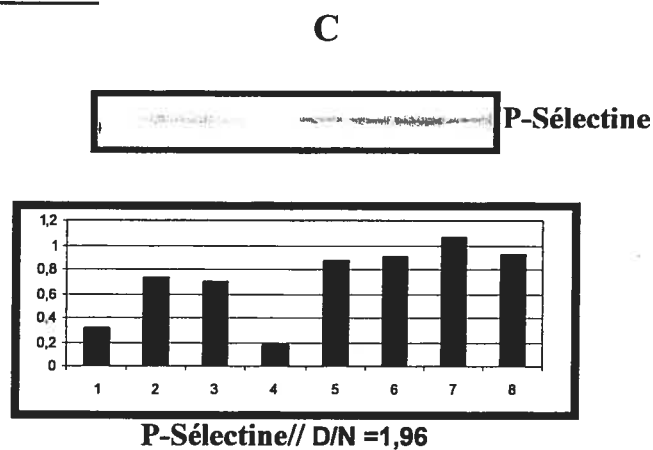
Intégrine Beta 5// D/N = 0.08

**Figure 32** : Molécules d'adhésion dont l'expression au niveau des membranes endothéliales pulmonaires (P2) diminue au cours du diabète. Immunobuvardage et analyse densitométrique du signal. D/N : rapport moyen entre l'intensité du signal mesuré dans les échantillons provenant des rats diabétiques (D) et des animaux normaux (N), respectivement.

### La superfamille des immunoglobulines



### Famille des Sélectines



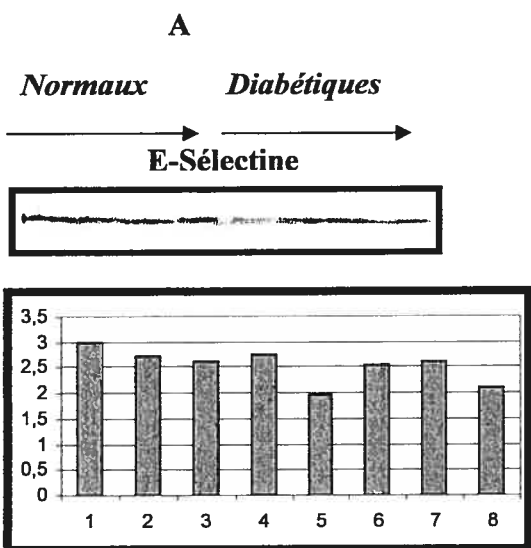
**Figure 33 :** Molécules d'adhésion dont l'expression au niveau des membranes endothéliales pulmonaires (P2) augmente au cours du diabète. Immunobuvardage et analyse densitométrique. D/N : rapport moyen entre l'intensité du signal mesuré dans les échantillons provenant des rats diabétiques (D) et des animaux normaux (N), respectivement.



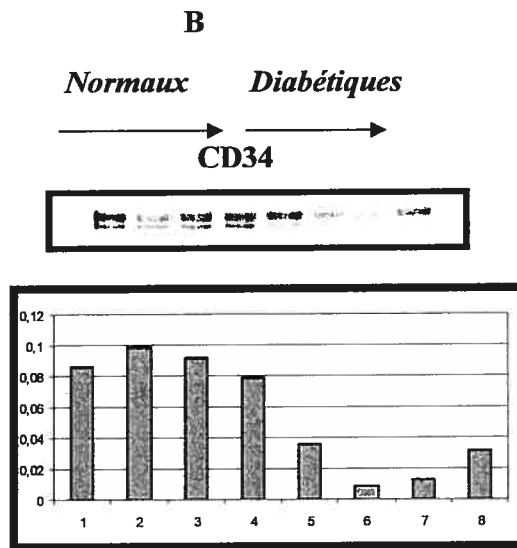
## NORMAUX /DIABÉTIQUES

### HOMOGENAT

#### Sélectines endothéliales et le ligand de la sélectine leucocytaire

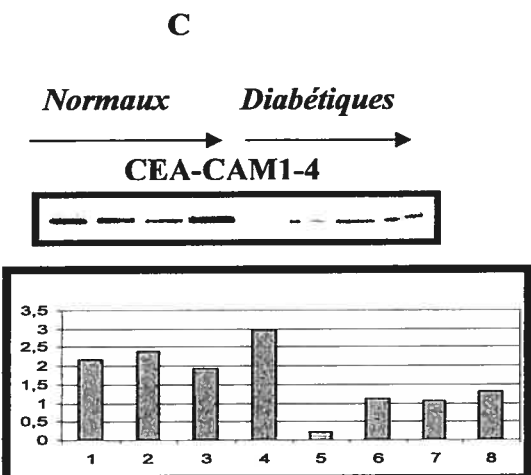


**E-Sélectine // D/N=0.95**

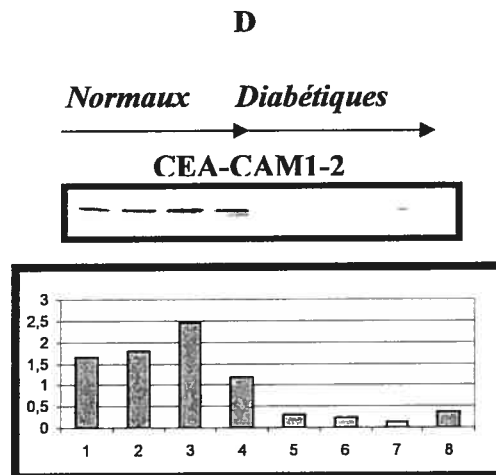


**CD34// D/ N=0.65**

#### La superfamille des immunoglobulines



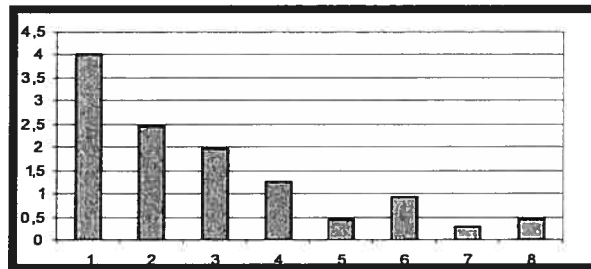
**Cea-cam1-4// D/N =0.38**



**Cea-cam1-2 D/N =0.07**

**E**

**PECAM1**

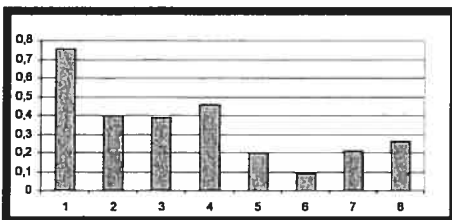


**Pecam// D/N=0.21**

**La famille des intégrines**

**F**

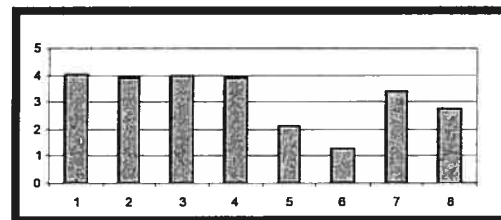
**intégrine Alpha v**



**Intégrine Alpha v// D/N=0.38**

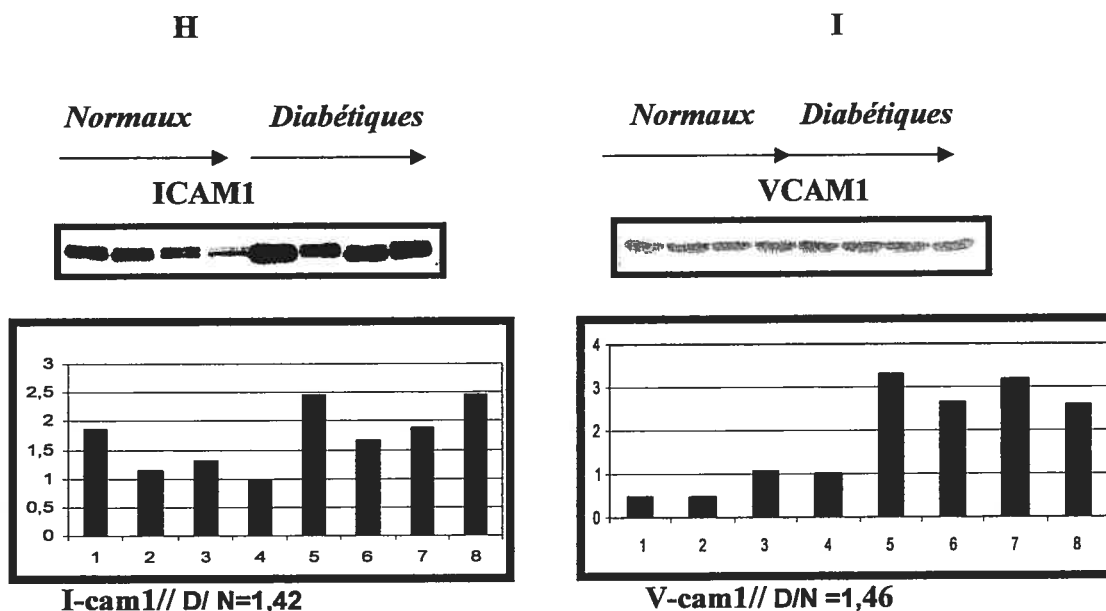
**G**

**intégrine Beta5**

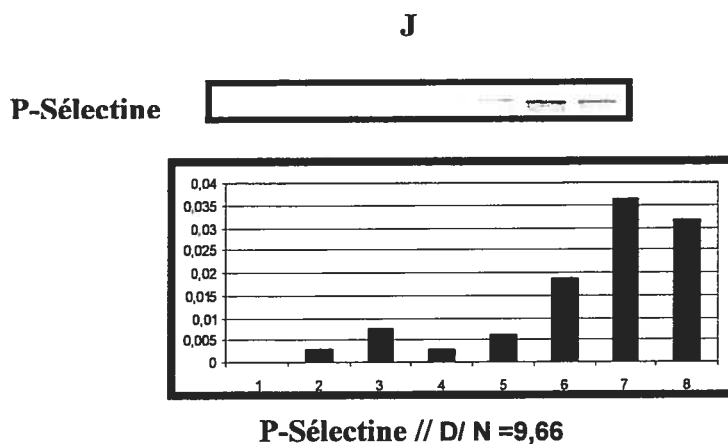


**Intégrine Beta5// D/N =0.85**

### La superfamille des immunoglobulines



### La famille des Sélectines

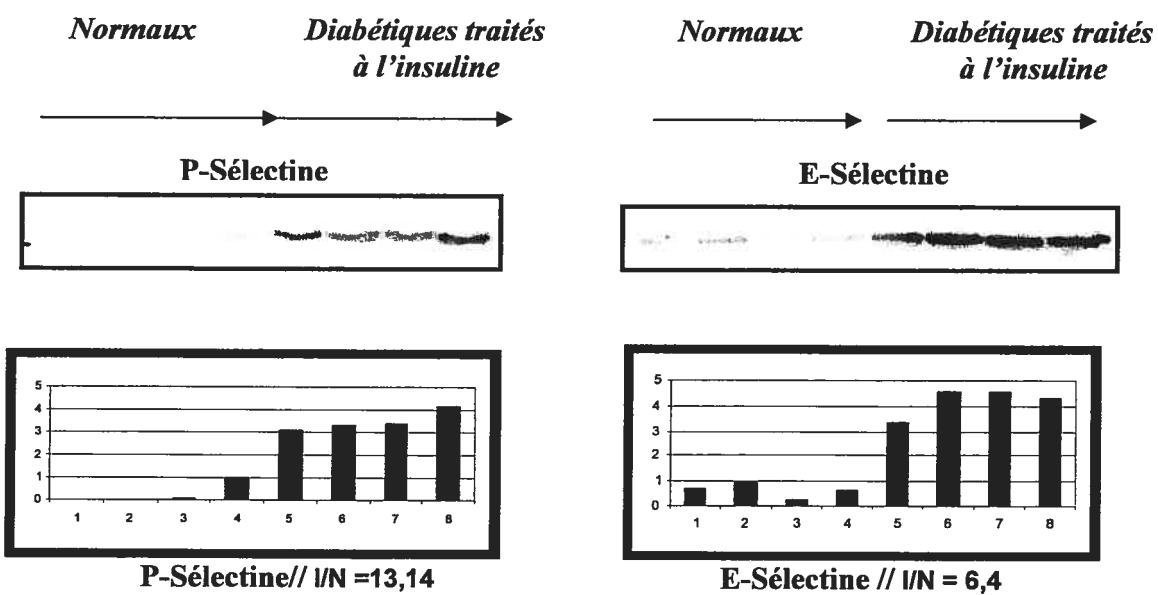


**Figure 34 :** Détection comparative, par immunobuvardage, du niveau d'expression des molécules d'adhésion dans l'homogénat total de poumon des rats normaux et diabétiques.

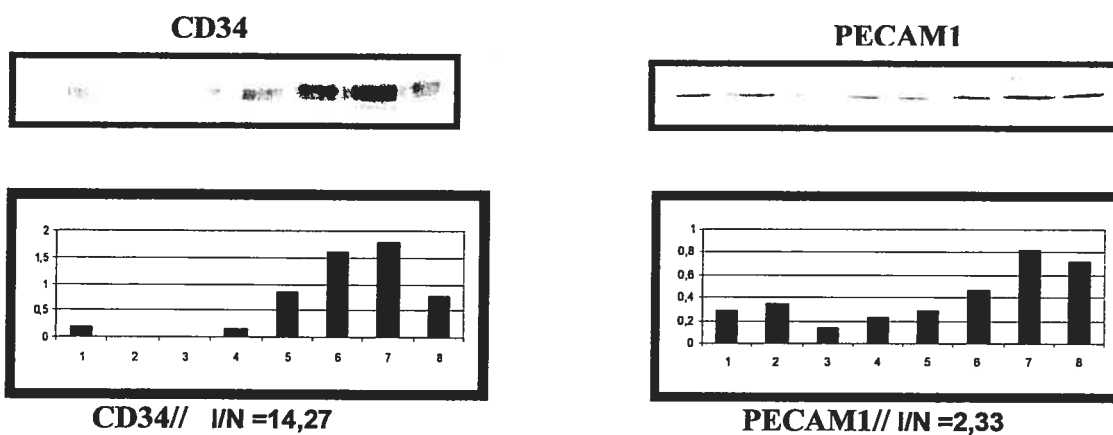
D/N : le rapport moyen entre l'intensité du signal mesurée par densitométrie dans les échantillons provenant des rats diabétiques (D) et normaux (N), respectivement.

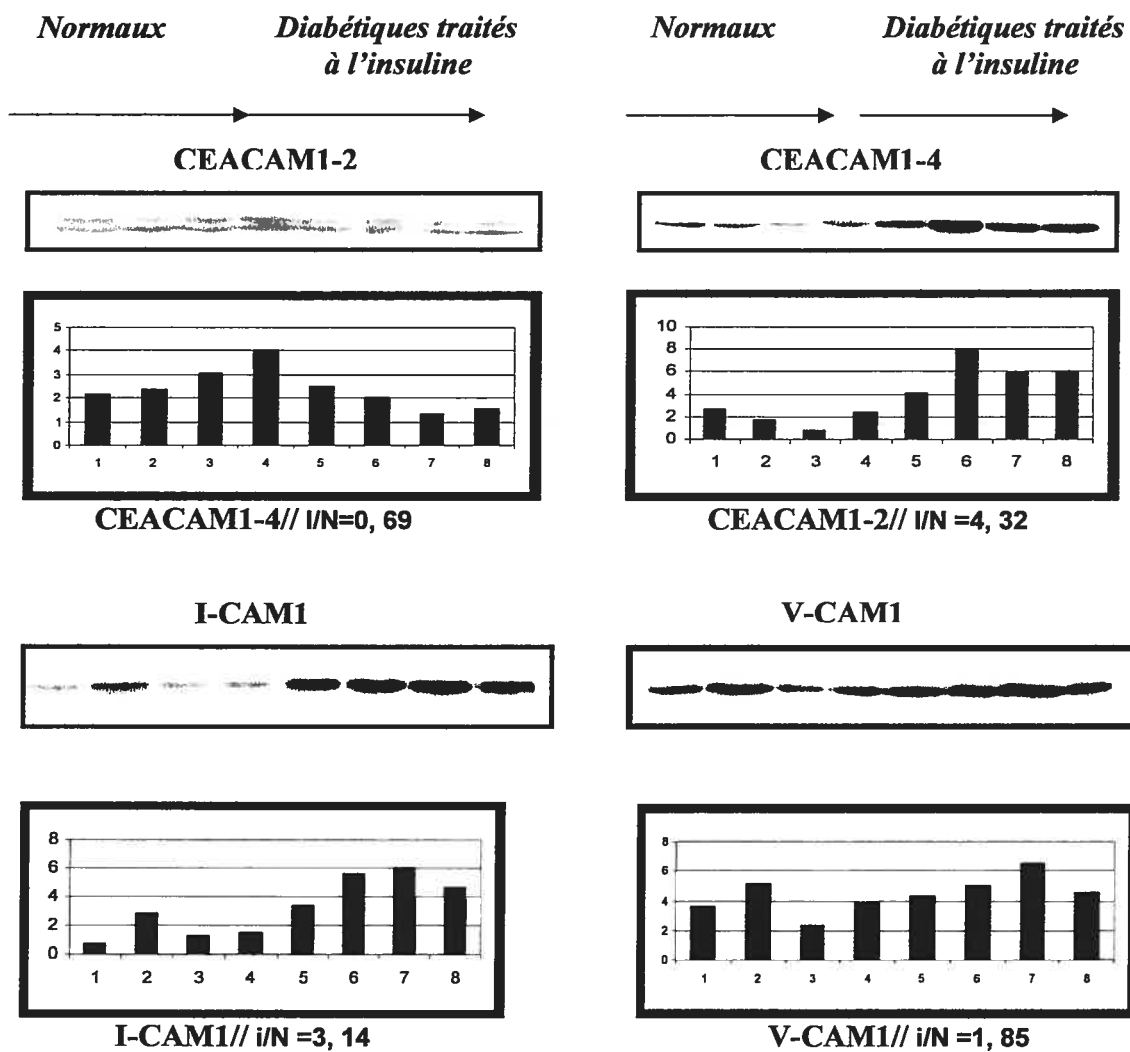
## NORMAUX /DIABÉTIQUES TRAITÉS À L'INSULINE

### A-la famille des Sélectines



### B-Superfamille des Immunoglobulines





**Figure 35:** Étude comparative de l'expression des molécules d'adhésion au niveau des membranes endothéliale P2 des rats normaux (N) versus des rats diabétiques traités à l'insuline(I).

## Discussion

Le recrutement des leucocytes de la circulation vers l'espace extravasculaire est une étape critique dans la réponse inflammatoire et la réparation des dommages causés à un tissu. Comme expliqué précédemment, la migration des leucocytes à travers la barrière endothéliale se fait selon un processus qui est loin d'être aléatoire, répondant à une cadence d'association et de dissociation des liaisons entre les différentes molécules des deux surfaces, leucocytaire et endothéliale. Ces molécules d'adhésion ont été considérées comme des marqueurs de l'activation endothéliale et du dommage causé dans la microvascularisation lors d'une inflammation (Boulbou et al, 2004).

Notre étude démontre que tous ces marqueurs dits d'activation endothéliale sont exprimés par l'endothélium normal, non activé. Au cours du diabète, l'expression de ces molécules d'adhésion montre des variations significatives par rapport aux animaux sains. Ce changement n'est pas uniforme pour toutes les molécules des trois grandes familles de molécules d'adhésion étudiées. Deux types d'altérations sont notées : des molécules d'adhésion dont l'expression augmente avec la condition d'hyperglycémie (ICAM1, VCAM1 et P-sélectine) et d'autres qui diminuent (CD34, Pecam1, CEACAM1 et les intégrines  $\alpha_v$  et  $\beta_5$ ). Ceci expliquerait peut être l'intervention spatio-temporelle différente de ces molécules d'adhésion dans la cascade de transmigration endothéliale des leucocytes.

Ces résultats suggèrent qu'au cours de diabète un état pro-inflammatoire s'installe dans la microvascularisation pulmonaire, état caractérisé par un patron particulier d'expression de ces différentes molécules d'adhésion endothéliales. Ceci est en accord avec d'autres données de la littérature indiquant que l'inflammation prend des facettes

moléculaires et cellulaires spécifiques au tissu et au type d'inflammation (Muller et al, 2002). Ainsi, Nagel, et al, (1994) ont trouvé que les molécules d'adhésion ICAM1, VCAM1 et E-sélectine ne répondent pas de la même façon à différents types de stress et d'inflammation. Tandis que ICAM1 est augmenté à la surface des cellules HUVEC exposées à des forces de cisaillement (analogues à celle provoquées par le courant sanguin sur la paroi des artères). VCAM1 et E-sélectine ne présentent pas de changement quant à leur expression transcriptionnelle et protéique.

Également, Hughes et al, (2004) ont décrit un patron spécifique de changements de molécules d'adhésion dans la vascularisation rétinienne de patients diabétiques.

Ce changement dans l'expression des molécules d'adhésion suite à l'activation des cellules endothéliales au cours du diabète facilite et augmente l'adhérence des leucocytes à la surface endothéliale (Joussen et al, 2001, MacKinnon et al, 2004). Ceci est sous l'influence de plusieurs facteurs qui favorisent l'interaction cellulaire, endothélium-leucocyte et qui peuvent jouer un rôle important dans l'initiation et la propagation de l'athérosclérose et de l'inflammation vasculaire.

La présence de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium activé est la conséquence de deux processus complémentaires :

- (a) la synthèse *de novo* et
- (b) une redistribution de ces molécules entre la membrane plasmique et des compartiments intracellulaires (comme c'est le cas de la P-sélectine stockée dans les corps de Weibel-Palade).

Etant donné que le modèle diabétique étudié est celui d'une maladie chronique (2 mois et demi), la deuxième variante semble moins probable. L'intervention des mécanismes qui activent et modulent les facteurs de transcription responsables de la synthèse des

molécules d'intérêt pourrait expliquer de manière plus plausible les altérations de leur expression.

Plusieurs études ont lié le facteur de transcription NFκB à la transcription de plusieurs gènes de molécules d'adhésion. Au cours du diabète, plusieurs mécanismes métaboliques et éléments moléculaires sont mis en œuvre ayant comme conséquence une augmentation de l'expression et/ou l'activité de NFκB. Selon les théories en vogue ces mécanismes associés au diabète sont :

1. l'augmentation de la voie des polyols
2. la glycosylation nonenzymatique (glycation des protéines)
3. le stress oxydatifs des radicaux libres d'oxygène reconnus pour activer le NFκB
4. l'altération de la synthèse et sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les leucocytes, l'endothélium et diverses cellules des tissus
5. la diminution du facteur de croissance fibroblastique

Au cours du diabète expérimental, toutes les molécules d'adhésion étudiées ont subi des modifications quant à leur expression à la surface endothéliale en réponse aux altérations métaboliques qui accompagnent cette pathologie. En effet, en présence d'une hyperglycémie, le métabolisme du glucose est détourné vers la voie des polyols au lieu d'être oxydé dans la voie de la glycolyse. L'excès de glucose est réduit en sorbitol sous l'action de l'aldose réductase en présence de NADPH. L'accumulation du sorbitol s'accompagne d'une déplétion en myoinositol qui entrave le métabolisme des phosphoinositides, la production de diacylglycérol et d'inositol triphosphate. Ces deux derniers éléments régulent l'activité de la protéine kinase C (PKC) et leur déplétion induit un



défaut d'activation de cette kinase (Figure 36) et par conséquent, la phosphorylation des protéines par la PKC se trouve affectée.

#### **A-Superfamille des immunoglobulines :**

La sialomucine CD34 est l'une des protéines qui sont phosphorylées par la PKC au niveau des résidus sérine de son domaine cytoplasmique. Le recrutement de cette immunoglobuline à la surface cellulaire, se fait à partir du CD34 intracellulaire suite à son hyper-phosphorylation par cette kinase activée (Fackler et al, 1990). Ce processus est indépendant de la transcription ou la traduction de cet antigène (Fackler et al, 1992). Le rôle de CD34 comme molécule d'adhésion dans le cas d'inflammation n'est pas encore étudié. Nos résultats montrent qu'au cours du diabète expérimental le CD34 se trouve parmi les immunoglobulines dont l'expression à la surface membranaire endothéliale est diminuée (Figure 32-B). Ajouté à cela des résultats non publiés de notre laboratoire qui montrent que l'expression de la PKC chez des rats diabétiques diminue comparativement à l'état physiologique normale. Ce qui concorde avec les résultats de Kamiya et al, (2003) qui ont rapporté que l'hyperactivité de la voie des Polyols suite à une hyperglycémie induit une diminution de l'activité la protéine kinase C (PKC) spécialement la PKC $\alpha$  (Figure 36). Notons que la théorie de déplétion en myoinositol est en contradiction avec celle de l'hyperglycémie chronique qui augmenterait l'activité de la PKC liée à une augmentation de la synthèse de novo de DAG à partir de précurseurs dérivés de la glycolyse (Inoguchi et al, 1994).

Un deuxième facteur qui influence l'expression de cette immunoglobuline, sont les cytokines, des médiateurs très importants dans le cas d'inflammation et de maladie en général. Ils sont responsables des signaux requis dans l'induction des altérations

endothéliales avec des effets régulateurs variables sur l'expression des molécules d'adhésion. En effet une variété de cytokines et facteurs de croissance et d'autres produits est relâchée dans la circulation avec activation du système immunitaire suite à une inflammation. Daxecker et al, (2002) ont trouvé que l'expression de l'immunoglobuline CD34 est diminuée à la surface des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) exposées à la combinaison de cytokines  $TNF\alpha$ ,  $IFN\ \gamma$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL2$  et  $IL6$ . L'ajout de l'une des cytokines anti-inflammatoires,  $IL4$  ou  $IL10$  ne change pas la tendance vers la diminution de l'expression de CD34. Ce résultat a été confirmé par Raab et al, (2002) qui ont trouvé que l'ajout d'une autre cytokine à la combinaison  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  ou  $IFN\ \gamma$  module l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales d'une façon synergétique ou antagoniste. L'ajout de  $IL4$  aux trois cytokines ( $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$  ou  $IFN\ \gamma$ ) diminue l'expression des deux immunoglobulines : CD34 et PECAM1. Un autre groupe (Buján et al, 1999) a noté une désorganisation des cellules HUVEC en culture exposées à des cytokines inflammatoires telles que : l'interféron gamma ( $IFN\ \gamma$ ) et/ou l'interleukine10 ( $IL10$ ), et une disparition de PECAM1 des jonctions cellulaires ce qui implique une diminution de son expression totale à la surface cellulaire. Un taux élevé de ces cytokines est fortement associé au diabète (Sarvetnick et al, 1997), ce qui expliquerait la chute de l'expression de ces deux immunoglobulines (CD34 et PECAM1) au niveau de l'endothélium vasculaire des rats diabétiques (Figure 32-B-E). Cette atténuation de l'expression de PECAM-1 a été rapportée dans plusieurs autres types d'inflammation *in vitro*. Un des facteurs les plus déterminants aussi au cours du diabète, c'est la formation et l'accumulation des produits de glycation avancés (Feng et al, 2005, McCarty, 2005) (Figure 37). La glycosylation non enzymatique ou glycation des protéines (liaison

irréversible du glucose sur les groupements amine des protéines) est une des conséquences essentielles de l'hyperglycémie et ce processus se déroule selon trois étapes :

1-Formation d'une base de Schiff instable par combinaison de la fonction aldéhyde du glucose avec les résidus aminés de la protéine.

2- Réarrangement d'Amadori, des aldimines antérieurement préformées aboutissent aux produits de glycation dits précoces.

3- Accumulation lente et irréversible, par réarrangements, transferts d'hydrogène et formation d'intermédiaires très réactifs, de produits avancés de glycation ou produits de Maillard.

Ces produits de glycation avancés agissent à différents niveaux. D'abord en produisant des altérations dans la structure de la membrane basale par la perturbation de l'assemblage plurimoléculaire suite à la glycation des protéines de la matrice extracellulaire. Les produits de glycation avancés (AGE) par leur interaction avec leurs récepteurs (RAGE) à la surface endothéliale participent au développement du stress oxydatif et de l'état inflammatoire (Yoo et al, 2004). L'interaction AGE/RAGE est connu par l'induction d'une activation soutenue de NF- $\kappa$ B par l'augmentation du taux de synthèse de NF $\kappa$ B p65 (qui forme avec la sous unité p50 le complexe NF- $\kappa$ B). Ceci contribue à l'activation persistante de NF- $\kappa$ B observée durant l'hyperglycémie (Bierhaus et al, 2001). Il a été démontré que l'activation du NF- $\kappa$ B est requise pour la transcription de certains gènes incluant ICAM1 et VCAM1, P-sélectine et E-sélectine. Meng et Liu , (2003) ont exposé des cellules HUVEC à des produits de glycation

avancés (AGE) en combinaison à des cytokines proinflammatoires. Ils ont noté une chute significative de l'expression de PECAM-1 à la surface cellulaire. Les mêmes cellules traitées avec du glucose, mimant des conditions d'hyperglycémie, montrent aussi une atténuation de l'expression de PECAM1 (Baumgartner-Parzer et al, 1995). Cette chute de l'expression de la protéine PECAM-1 à la surface cellulaire, *in vitro* s'accompagne d'une diminution au niveau transcriptionnel (mRNA). Parallèlement aux études *in vitro*, une analyse immunohistochimique *in vivo* sur l'expression des molécules d'adhésion dans la vascularisation endothéliale du mésentère de rat révèle une importante augmentation de l'expression d'ICAM-1 mais pas celle du PECAM1 à la surface cellulaire suite à une augmentation de certains marqueurs de l'inflammation tels que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), et l'oxyde nitrique (NO) (Scalia et Lefer, 1998). En plus de CD34 et PECAM1, nous avons montré une diminution au cours du diabète expérimental de l'expression des deux isoformes (celles à deux et à quatre domaines immunoglobulines) d'une troisième immunoglobuline, CEACAM1 à la surface de la membrane endothéliale de poumon (Figure 32-C-D). Dans le cas d'une réponse inflammatoire suite à une infection bactérienne (exposition à des lipopolysaccharides), il y a une augmentation de l'expression de CEACAM1 suite à l'activation du facteur de transcription NFκB via les récepteurs Toll 4 (TLR4) couplé aux protéines Gi à la surface de la membrane, qui assure une série de phosphorylation au niveau de la voie de signalisation ERK (extracellular signal-regulated kinase). En revanche, il a été rapporté que l'expression de CEACAM1 est régulée par le facteur de croissance fibroblastique (FGF) qui augmente sélectivement son expression, or l'expression de FGF est atténuée chez les individus diabétiques dans plusieurs tissus différents (Hart et al, Nature, 2000). En plus du rôle de NF-kappaB dans l'expression de CEACAM1 (Muenzner et al, 2002),

le Sp2 est aussi un facteur de transcription qui se lie au promoteur de CEACAM1 *in vitro* et *in vivo*. Phan et al, (2004) ont rapporté que le Sp2 réprime la transcription du gène de CEACAM1 en recrutant l'histone deacetylase au promoteur de CEACAM1. L'expression de ce facteur de transcription (Sp2) est augmentée sous des conditions de stress oxydatif (Beck et al, 2001). Par conséquent la diminution de l'expression de CEACAM1 au niveau de l'endothélium pulmonaire au cours du diabète peut être attribuée à l'atténuation de l'expression de FGF au cours du diabète ainsi qu'à une augmentation de Sp1 (répresseur de la transcription du gène CEACAM1) sous l'action du stress oxydatif augmenté lors du diabète. Les deux immunoglobulines PECAM1 et CEACAM1 partagent une caractéristique commune qui peut être à l'origine de la diminution de leur expression à la surface cellulaire. Les deux molécules possèdent un même site de clivage dans leur domaine cytoplasmique qui est protégé par la liaison de la calmoduline contre l'action des enzymes protéolytiques. La liaison de la calmoduline aux protéines cibles dépend de son changement conformationnel suite à la liaison de  $Ca^{2+}$ . Au cours du diabète, une élévation prolongée du glucose résulte dans une glycation de la calmoduline (comme toute autre protéine). Cette dernière glyquée n'est plus capable de lier le  $Ca^{2+}$ , donc la calmoduline se trouve dans une conformation qui ne lui permet pas de se lier à ses protéines cibles comme le PECAM1 et le CEACAM1 (Kowluru et al, 1987). Wong et al, (2004) ont rapporté qu'une fois le site de clivage dans la partie juxtamembranaire cytoplasmique de PECAM1 est démasqué suite au relâchement de la Calmoduline. Le PECAM1 devient cible aux clivages protéolytiques par les protéases de surface (Wong et al, 2004). De la même manière que PECAM1, les deux isoformes de CEACAM1 (CEACAM1-4 et CEACAM1-2) lient la calmoduline au niveau de leur domaine cytoplasmique au niveau de la région proximale de la

membrane plasmique (Schumann et al, 2001, Fournes et al, 2001). Deux autres immunoglobulines étudiées l'ICAM-1 et le VCAM-1 (Figure 33-A-B) montrent un patron d'altération contraire aux premières molécules d'adhésions étudiées (CD34, PECAM1 et CEACAM1). Leurs taux augmentent de manière significative au cours du diabète. Sengoelge et al, (1998) ont rapporté qu'en présence des cytokines proinflammatoires et AGE qui diminuent l'expression de PECAM1, il y a augmentation significative de celle de ICAM-1 et VCAM-1. La même combinaison des cytokines (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  ou IFN  $\gamma$  et IL4) causant une diminution de l'expression de PECAM1 et CD34, augmente l'expression de VCAM1 et ICAM1 appartenant à la même superfamille de molécules (Raab et al, 2002). Les taux d'expression du mRNA et de la protéine ICAM-1 *In vitro* sont augmentées après incubation des cellules endothéliales avec des concentrations élevées de glucose (Kado, et al, 2001). Même résultat, a été retrouvé par VandenBerg , et al, (2004) qui ont montré, eux aussi, une augmentation de VCAM-1 et de l'ICAM-1 sous l'action de TNF-alpha à l'encontre de PECAM1. L'exposition des cellules endothéliales en culture aux concentrations élevées de glucose conduit à leur activation par l'augmentation de l'expression de VCAM-1 et ICAM-1. D'ailleurs dans le sérum de patients diabétiques, les molécules ICAM-1 et VCAM-1 solubles se trouvent à un taux élevé (Otsuki et al, 1997). Cette augmentation de l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 responsables de l'adhésion ferme des leucocyte à l'endothélium lors d'une inflammation vasculaire requiert l'activation de NF- $\kappa$ B. Une surexpression de ces molécules d'adhésion au niveau de la surface de l'endothélium activé est une caractéristique critique de l'inflammation vasculaire associée aux différentes autres maladies comme l'athérosclérose. Dans ce dernier cas, elle aide à l'accumulation des monocytes au niveau de l'intima aortique (Cybulsky et al, 2001).

L'augmentation de ICAM-1 et VCAM-1 se trouve également sous l'influence de la voie des polyols (Figure 36). En effet, Ramana et al, (2004) ont montré que l'inhibition de cette dernière (activé lors du diabète), par des inhibiteurs de l'aldose réductase (AR) prévient l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 au niveau des cellules de la veine ombilicale endothéliale humaine (HUVECs) et par conséquent une diminution de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. À part les cytokines et les produits de glycation avancés, le stress oxydatif intervient aussi dans la pathologie des complications vasculaires du diabète. L'hyperglycémie chronique est associée à un stress oxydatif créée par le déséquilibre entre les radicaux libres (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyl) et les antioxydants endogènes (formes réduites de la vitamine C, de la vitamine E et du glutathion réduit) capables de les bloquer (Bonfont-Rousselot et al, 2004). La voie des polyols inclue l'autoxydation du glucose et la sur-production des radicaux libres d'oxygène via NAD (P) H oxydase (Figure 38). Cette dernière contrôle l'expression de certaines molécules d'adhésions qui se trouvent être influencées par l'action du stress oxydatif. En plus de la voie des polyols, la NAD (P) H oxydase endothéliale constitue une importante source du stress oxydatif. Plusieurs interactions ligand-récepteur favorisent l'activation de cette enzyme (Figure 40). Parmi ceux-ci :

-L'interaction de l'angiotensine II (Ag II) avec son récepteur AT1 (angiotensin type1 receptor) (Kusaka et al, 2004) est potentiellement importante. Ceci du au fait qu'au cours du diabète, l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) augmente et par conséquent le taux de l'angiotensine II augmente (Erman et al, 1993, Candido et al, 2002).

- L'interaction des cytokines avec leurs récepteurs (Kojda et al, 1999).

-L'interaction des AGE avec leur récepteur RAGE (Wautier et al, 2001, Wautier et al, 2004).

La NAD (P) H oxydase est reconnue de produire le superoxyde dans les leucocytes pour la destruction de pathogènes (Deleo et al, 1996). Récemment cette enzyme a été impliquée dans la production des réactifs d'oxygène (ROS) dans les cellules endothéliales (Weber et al, 1994). À part d'être des agents antibactériens, les ROS sont des molécules de signalisation cellulaire. Ils médient l'induction de l'expression des gènes des molécules d'adhésion. L'exemple de l'expression de ICAM1 qui est influencée par les ROS générés par la NAD (P) H oxydase suite à une induction par le TNF $\alpha$  (Fan et al, 2002). Une relation entre la production du superoxyde via la NAD (P) H oxydase et l'expression des molécules d'adhésion par l'endothélium vasculaire de l'aorte des souris diabétiques a été établie, spécialement pour ICAM1 et VCAM1 (Yun et al, 2004). Un autre groupe a montré dans un autre model animal diabétique (le porc) (Zhang et al, 2003) que les ROS fonctionnent comme des messagers secondaires activant les gènes du facteur de transcription NF $\kappa$  B (Cominacini et al, 1997), certaines molécules d'adhésion (ICAM1, VCAM1 et E-sélectine) et certaines cytokines via le NF $\kappa$  B (Ghosh et al, 1998).

#### **B-Les sélectines et leurs ligands leucocytaires :**

L'expression des sélectines est aussi modulée par les cytokines. La synthèse de la E-sélectine est induite par le TNF $\alpha$ , l'IL1 $\beta$  et l'IL10 (Vora et al, 1996) et elle est réduite suite à l'exposition des cellules endothéliales à l'IFN $\gamma$  (Melrose et al, 1998).



L'exposition des cellules endothéliales à une seule cytokine *in vitro* (Melrose et al, 1998) n'est pas capable d'induire la synthèse de la P-sélectine mais l'association de TNF $\alpha$  avec n'importe quelle autre cytokine déclenche l'expression de cette molécule. Nos résultats concordent avec le patron d'expression décrit ci-haut et obtenu *in vitro* avec la combinaison de cytokines TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  ou IFN  $\gamma$  et IL 4. Ceci laisserait sous entendre que la même combinaison de cytokines agit en conditions d'hyperglycémie (Sarvetnick et al, 1997). *In vivo* les cytokines peuvent provenir de plusieurs cellules circulantes et aussi de la cellule endothéliale elle même durant une période de stimulation donnée. Le mécanisme par lequel des cytokines modulent l'effet d'autres cytokines n'est pas tout à fait clair. L'expression de la E-sélectine a été toujours limitée à l'endothélium activé (Muller et al, 2002). Or dans l'endothélium vasculaire de poumon de rat, nous avons trouvé qu'elle est exprimée à un niveau détectable par immunobuvardage même dans le cas de l'état physiologique normal en absence de toute stimulation. À l'encontre de la P-sélectine qui rejoint la surface cellulaire suite à une translocation rapide à partir des réserves intracellulaires, l'expression de la E-sélectine à la surface de la cellule endothéliale requiert une induction au niveau transcriptionnel suite à l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B et sa liaison au promoteur du gène de la E-sélectine (Ghersa et al, 1992). Une fois la protéine E-sélectine synthétisée, elle agit comme inhibiteur de sa propre expression (Figure 38), ce qui peut expliquer l'aspect biphasique de l'expression de la E-sélectine rencontré au cours de l'activation de type aigue des cellules endothéliales. Un tel exemple est celui observé dans l'inflammation *in vivo* de la vascularisation pulmonaire suite à la déposition des complexes immunes (Mulligan et al, 1993, Ward PA et al, 2003). Celui-ci commence

par une augmentation jusqu'à l'atteinte d'un maximum, pour revenir au niveau basal et ensuite diminuer à de niveaux plus bas encore.

Nos résultats montrent que, contrairement aux autres molécules d'adhésion, l'expression de la E-sélectine ne change pas significativement à deux mois et demie du diabète, son taux d'expression comparativement aux contrôles est presque inchangé (légère diminution) (Figure 32-A).

La deuxième sélectine endothéliale étudiée, la P-sélectine, montre en générale une augmentation marquée à la surface de l'endothélium vasculaire dans la plupart des tissus durant le développement d'une inflammation chronique ou aigue, ce qui démontre son importance dans le recrutement des leucocytes au niveau de l'endothélium (Wagner, 1995). Nous avons démontré aussi que le taux d'expression de la P-sélectine augmente avec le diabète *in vivo* dans les capillaires pulmonaires des rats diabétiques comparativement à des rats contrôles (Figure 33-C). Une réponse endothéliale similaire, entraînant une surexpression de la P-sélectine a été détecté dans d'autres modèles d'inflammation, celle associée à un choc hémorragique (Xu et al, 2004) ou à l'infusion pulmonaire à l'endotoxine (Kiefmann et al, 2004). L'administration de TNF $\alpha$  ou les lipopolysaccharide (LPS) augmentent aussi l'expression du gène de la P-sélectine au niveau des cellules endothéliales chez les rats et les souris mais pas chez l'humain. Contrairement aux autres molécules d'adhésion l'augmentation de l'expression de la P-sélectine requiert en plus du facteur de transcription NF $\kappa$ B, deux autres éléments ATF/CRE qui sont présents chez les rats et souris mais pas au niveau du gène de la P-sélectine humaine. Ceci explique en partie pourquoi la stimulation de la transcription de la P-sélectine par TNF- $\alpha$  ou LPS est dépendante et spécifique pour chaque espèce (Lijun et al, 1998). Un autre médiateur très important dans l'expression de la P-sélectine, est la

thrombine. Cette dernière par sa liaison au PARS (protéinase activator receptor) induit une réponse bimodale de la P-sélectine avec une première étape d'activation en quelques minutes et une deuxième après 4 à 6 heures. Cette dernière requiert une synthèse protéique alors que la première reflète la simple translocation des réserves intra cytoplasmiques à la surface cellulaire (décharge du contenu des WPB) (Hattori et al, 1989).

### **C-Les intégrines :**

Dans la littérature très peu d'études sont consacrées à l'expression des intégrines endothéliales au cours de l'inflammation. C'est surtout les intégrines leucocytaires  $\beta 1$  et  $\beta 2$  qui ont été étudiées du fait de leur rôle très important dans la migration des leucocytes via leur interaction avec les immunoglobulines endothéliales VCAM1 et ICAM1. Pourtant nos résultats montrent qu'en état normal, l'endothélium pulmonaire exprime à la surface apicale des sous unités alpha v et beta 5 des intégrines. Ceux-ci confirment les trouvailles de Conforti et al, (1992) dans le même tissu.

Si ces molécules arrivent au front luminal grâce aux imperfections d'un système de trafic de protéines ciblées au pôle basal de la cellule endothélial, où elles possèdent un rôle physiologique réel à l'interface endothélium-sang, cette question reste pour le moment ouverte. Nous avons trouvés qu'au cours du diabète expérimental, l'expression de ces deux sous unités d'intégrines à la surface luminale endothéliale pulmonaire diminue (Figure 32-F-G).

Il a été récemment rapporté que l'expression des deux sous unités alpha v et bêta 3 dans l'homogénat total de poumon diminue suite à une infection bactérienne du poumon de rat par *Escheriscia.coli* (Kayathanahalli et al, 2004).

Le rôle des sous unités d'intégrines endothéliales alpha v, bêta 3 et bêta 5 a été extensivement étudié dans l'angiogenèse, la migration cellulaire, et la signalisation cellulaire. Un nombre de facteurs modulant leur expression a été rapporté, incluant le facteur de croissance transformant  $\beta$  (transforming growth factor beta ou TGF  $\beta$ ) (Scaffidi et al, 2004), le facteur de croissance vasculaire endothéliale (vascular endothelial growth factor ou VEGF) et le facteur de croissance fibroblastiques (fibroblast growth factor ou FGF) (Sepp et al, 1994). Ces cytokines dites angiogéniques augmentent l'expression des sous unités alpha v et bêta 3 (Basson et al, 1992). Nous avançons l'hypothèse que la chute de l'expression de alpha v (Figure 32-F) soit la conséquence de l'atténuation de l'expression du FGF au cours du diabète (Ward et al, Nature, 2000).

#### **D-L'effet du traitement à l'insuline sur l'expression des molécules d'adhésion**

##### **chez les rats diabétiques :**

Nos résultats montrent une augmentation de toutes les molécules d'adhésion à la surface luminale de l'endothélium pulmonaire (sauf pour l'isoforme de CEACAM1-4 qui diminue) après le traitement des rats diabétiques à l'insuline.

L'insuline représente l'agent thérapeutique majeur utilisé pour contrecarrer les effets du diabète. La question si le l'insuline pourrait retourner au normal l'activation endothéliale chronique antérieurement décrite et caractérisée par une surexpression de l'ICAM-1, VCAM-1 et de la P-sélectine nous a paru évidente. Dans notre modèle de traitement (trois semaines) des rats diabétiques, l'effet de l'insuline sur la glycation nonenzymatique des protéines endothéliales a été notable. A l'exception de deux bandes à haut poids moléculaire tout le reste du spectre de protéines glyquées de la membrane

endothéliale revient au normal en conséquence de la normalisation de la glycémie. Les seules deux bandes toujours positives aux anticorps anti glucyctollysine (Figure 31, astérisques) ont été identifiées par spectrométrie de masse en étant la laminine et collagène type VI. Ceux-ci sont des protéines de matrice cellulaire dont la longue durée de vie prévient leur remplacement par des protéines non-glyquées nouvellement synthétisées.

De manière surprenante, nos résultats ont montré que le traitement à l'insuline ne réduit pas la surexpression de l'ICAM1, VCAM1 et de la P-sélectine. Par contre, nous avons enregistré une augmentation de toutes les molécules d'adhésion localisées à la surface de l'endothélium pulmonaire, sauf l'isoforme CEA-CAM1-4 qui diminue).

Un sondage de la littérature place nos résultats au centre de données conflictuelles. Certains travaux ont montré que l'insuline réduit l'état inflammatoire associé au diabète. En effet, l'insuline exerce un effet anti-inflammatoire au niveau cellulaire et moléculaire *in vitro* et *in vivo* (Aljada et al, 2000, Dandona et al, 2001). À faible dose d'insuline il y a réduction dans la génération des ROS par les cellules mononucléaires. Il a été noté aussi une suppression de l'expression de la NAD (P) H oxydase et la liaison du NF- $\kappa$ B intranucléaire alors qu'il y a augmentation de l'expression de I $\kappa$ B et suppression de certains marqueurs de l'inflammation comme la protéine chimiotactique des monocytes (monocyte chemotactic protein-1 ou MCP-1), l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) (Dandona et al, 2001, Aljada et al, 2002). Ces marqueurs de l'inflammation contribuent à une interruption de la traduction du signal généré par l'insuline, ce qui prévient son effet anti-inflammatoire (Dandona et al, 2004) (Figure 40). De l'autre côté, une série d'articles suggèrent le contraire. Il a été rapporté (Okouchi et al, 2004) que la migration transendothéliale des leucocytes à

travers des cellules HUVEC en culture est augmentée suite à l'administration de l'insuline. Ceci est associée à une augmentation de PECAM1 et ICAM1 via l'activation de la voie des protéines kinases activées par des agents mitogènes (mitogen activated protein kinase ou MAP kinase) (Okouchi et al, 2002a, 2002b). Pour ajouter à la confusion, une étude récente ciblée sur des patients avec rétinopathie diabétique recevant un traitement à l'insuline, a montré l'absence de toute corrélation entre l'insuline et le taux de molécules d'adhésion mesurées dans la circulation.

Il faut noter que cette diversité de résultats contradictoires dérivent de modèles complètement différents : patients vs animaux avec diabète induit expérimental, études *in vitro* vs *in vivo*.

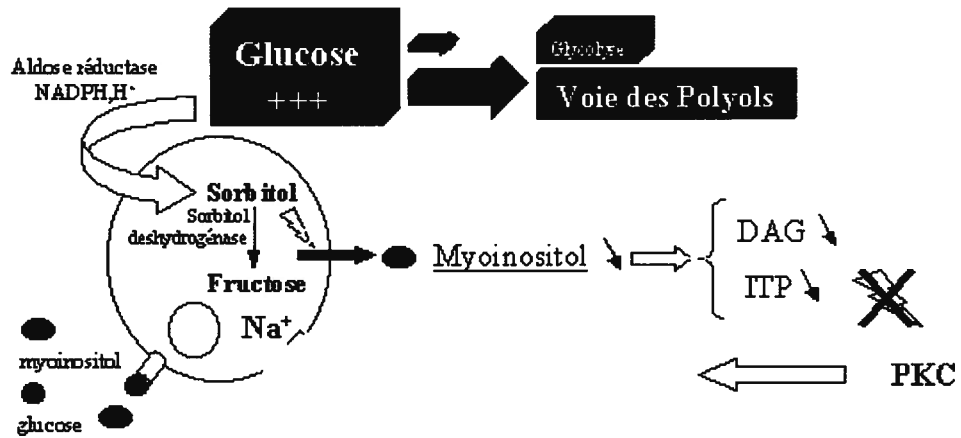


Figure 36 : La voie des Polyols.

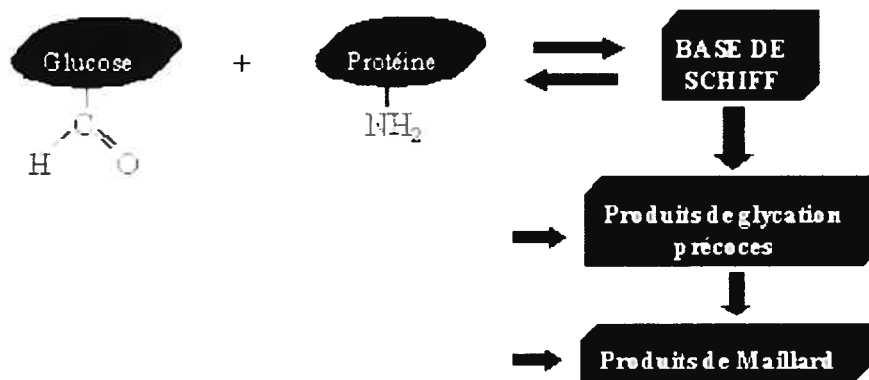
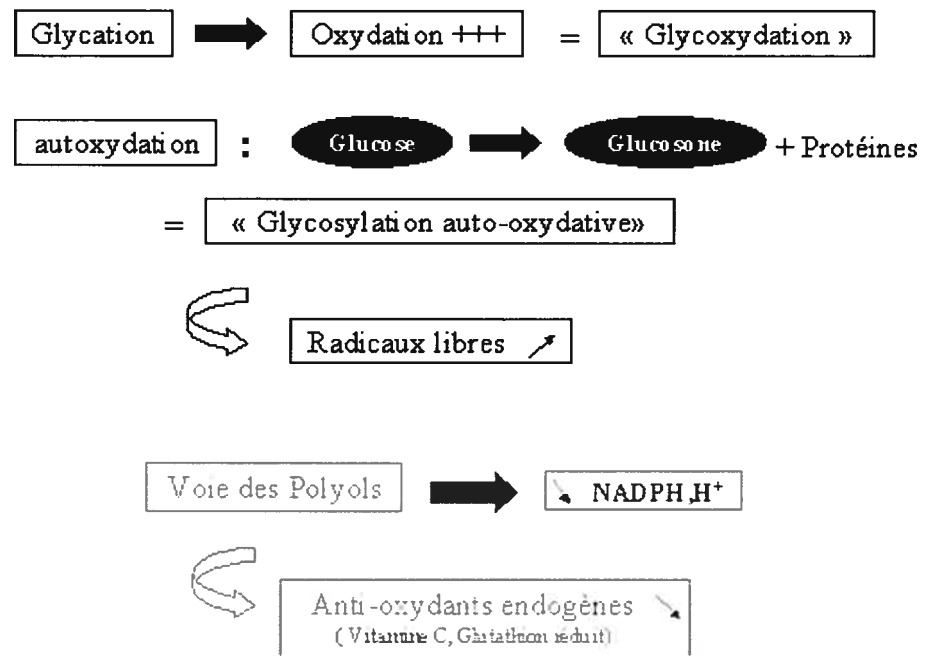


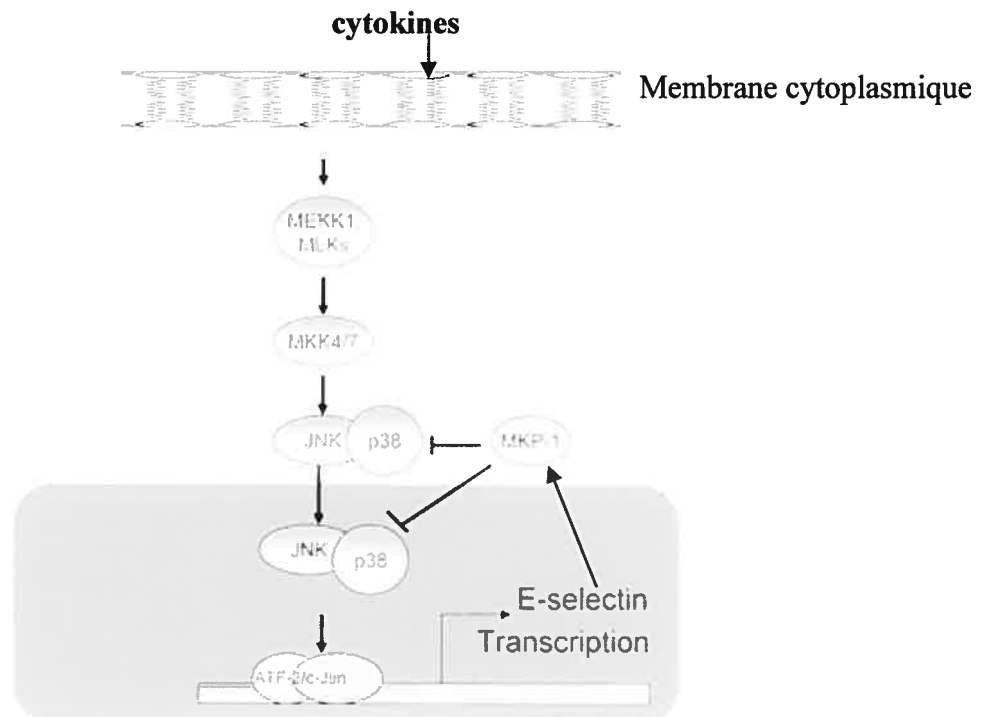
Figure 37 : Glycation des protéines.



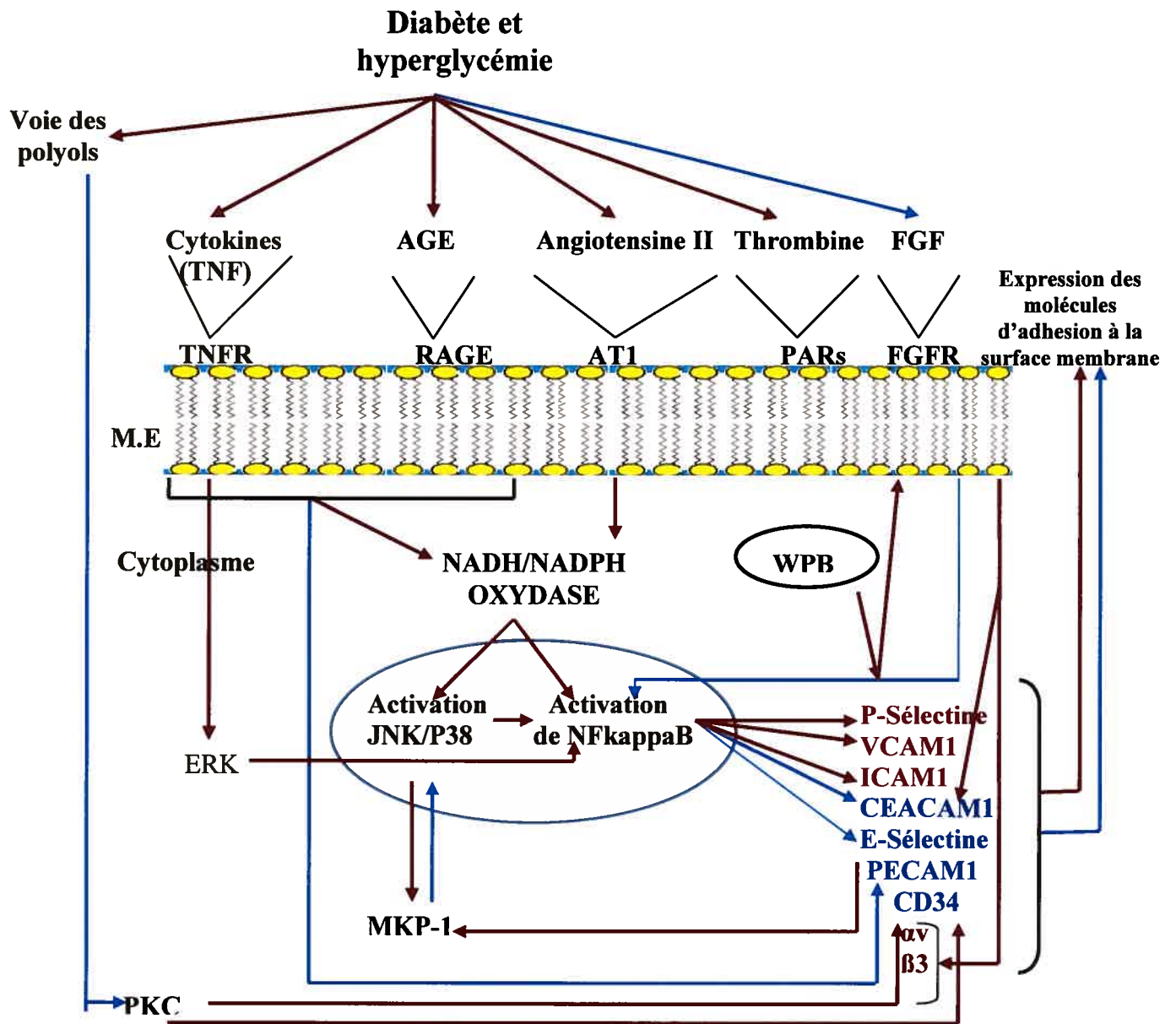
**Figure 38 : Stress oxydatif.**

Synthèse du 14ème Congrès de l'IDF, Washington DC, Juin 1991 <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/alfediam/Complications/microangiopathie-2.html>





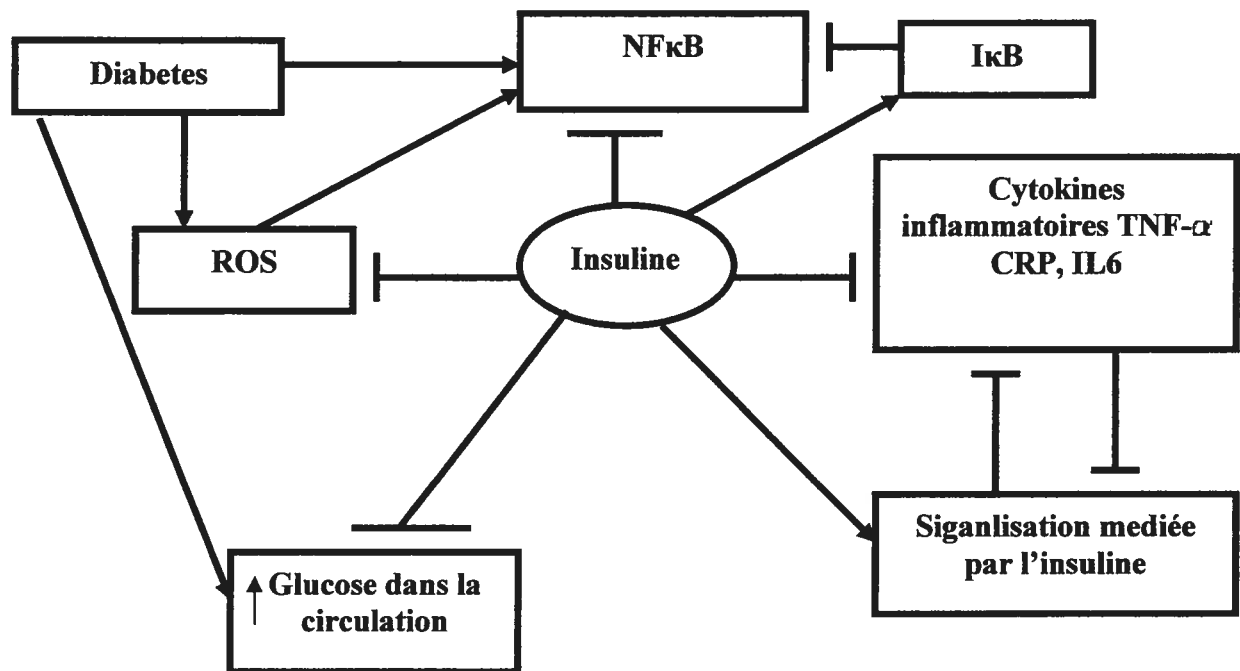
**Figure 39 :** Régulation de l'expression E-Sélectine. Dans les cellules endothéliales, la stimulation par les cytokines résulte en une activation transitoire de la voie de JNK/p38 kinases à travers une cascade de signalisation au cours de laquelle la MAPK kinase kinase1 (MEKK1) phosphoryle et active la MAPK kinase 4–7, qui phosphorylera à son tour la JNK et p38 MAPKs. JNK et p38 kinases phosphorylent les deux facteurs de transcription c-Jun et ATF-2, augmentant ainsi leurs propriétés de transactivation. JNK et p38 sont constitutivement présents dans le noyau et leur état de phosphorylation est régulé par la phosphatase MKP-1. Cette dernière qui est activée suite à l'accumulation de la transcription des mRNA de la E-Selectine. Figure modifiée de Raj Wadgaonkar et al, (2004).



**Figure 40:** Régulation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales lors du diabète. Les différents éléments caractérisant cette pathologie complexe et qui sont impliqués dans l'activation de différentes voies (polyol, PKC, JNK/P38K, ERK).

Régulation négative (inhibition)

Régulation positive (activation)



**Figure 41 :** Au cours du diabète il y a induction des réactifs d'oxygène (ROS), activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, changement proinflammatoires (facteur nécrosant des tumeurs TNF- $\alpha$ , l'interleukine 6 et la protéine C-réactive et augmentation du taux du glucose dans la circulation). L'insuline permet d'inverser tous ces paramètres. Les cytokines pro-inflammatoires inhibent à leur tour la signalisation médiée par l'insuline. (Paresh Dandona et al, 2004).

## Conclusion

En conclusion notre étude a démontré que toutes les molécules d'adhésions étudiées sont exprimées d'une façon constitutive à la surface endothéliale du poumon de rat. Le diabète expérimental cause une altération considérable quant à l'expression de ces molécules d'adhésions avec une diminution de l'expression des deux immunoglobulines PECAM1, CEACAM1 qui sont localisées abondamment sur les bordures cellulaires et qui semblent jouer un rôle dans la diapédèse. Cette dernière serait ralentie au cours du diabète et favoriserait l'accumulation des leucocytes sur l'endothélium vasculaire et par la suite l'athérosclérose qui est l'une des résultats des complications vasculaires avancées chez les patients diabétiques. Les intégrines endothéliales ( $\alpha v$  et  $\beta 5$ ) ainsi que le CD34 qui pour la première fois sont étudiés au cours du diabète montrent eux aussi une chute d'expression à la surface endothéliale luminale mais leurs rôles dans l'interaction leucocytes-endothélium restent à être déterminés. En parallèle une augmentation sélective de la P-sélectine qui intervient dans la première phase d'attraction des leucocytes et l'initiation de leur roulement à la surface endothéliale a été notée. Les immunoglobulines (ICAM1 et VCAM1) intervenant dans la phase suivante de l'adhésion ferme se trouvent elles aussi augmentées dans les conditions de diabète assurant ainsi l'adhésion des leucocytes à la surface endothéliale via leurs interactions avec les intégrines leucocytaires. Ceci est en parfait accord avec l'augmentation de l'agrégation des leucocytes caractéristique de la dysfonction endothéliale en condition d'hyperglycémie. Zhang et al, (2004) ont observé que l'activité de la myéloperoxydase (MPO) (enzyme caractéristique des leucocytes) dans la vascularisation des rats diabétiques est élevée et qu'il existe une corrélation linéaire entre l'activité de MPO et la dysfonction endothéliale des animaux diabétiques.

Zanardo et al, (2003) ont rapporté qu'au cours du diabète expérimental de type1, l'interaction endothélium-leucocytes est déficiente, en conséquence d'une augmentation de la liaison des leucocytes à la vascularisation diabétique suite à l'altération de l'expression des molécules d'adhésion. Cette altération est le résultat de plusieurs facteurs à la fois qui augmentent dans les conditions d'hyperglycémie qui sont interdépendants et en même temps très liées entre eux. Ces facteurs (les produits de glycation avancée, les cytokines pro inflammatoires, les des cystéines protéinases tel que la thrombine et le stress oxydatif) agissent en concertation sur l'expression des molécules d'adhésion dans le cas du diabète. Le traitement aux antioxydants a démontré des effets bénéfiques sur les complications observées dans cette pathologie. Aussi chez les rats diabétiques l'inhibition de la voie de polyol (inhibition de l'aldose réductase) est effective dans la restauration de la réduction de la capacité migratoire des leucocytes au cours du diabète (Cruz et al, 2003).

Ce patron d'expression inverse des molécules d'adhésion à la surface luminale des cellules endothéliales au cours du diabète, *in vivo*, suggère que les molécules d'adhésion qui diminuent joue un rôle modulateur sur les fonctions d'adhésion au niveau de l'endothélium vasculaire de poumon.

**RÉFÉRENCES**

**Agarwal R, Siva S, Dunn S. R, Sharma K** (2002) Add-on angiotensin II receptor blockade lowers urinary transforming growth factor-beta levels. *Am. J. Kidney. Dis.* 39: 486-492.

**Albelda S. M, Daise M, Levine E. M, Buck C. A** (1989) Identification and characterization of cell-substrate adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 83: 1990-2002.

**Aljada A, Saadeh R, Assian E, Ghanim H, Dandona P** (2000) Insulin inhibits the expression of intercellular adhesion molecule-1 by human aortic endothelial cells through stimulation of nitric oxide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85: 2572–2575.

**Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P.** (2002) Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 1419–1422.

**Allen I. V, McQuaid S, McMahon J, Crangle K, McConnell R** (1996) The expression of the endothelial cell antigen CD34 in demyelinating disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 22: 101-7.

**Afar D. E. H, Stanners C. P, Bell J.C** (1992) Tyrosine phosphorylation of biliary glycoprotein, a cell adhesion molecule related to carcinoembryonic antigen. *Biochim. Biophys. Acta.* 1134: 46–52.

**Anrather J. V, Csizmadia M, Soares P, Winkler H** (1999) Regulation of NF- $\kappa$ B RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21(ras) and protein kinase C $\zeta$  in primary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274:13594-13603.

**Alon R, Feizi T, Yuen C. T, Fuhlbrigge R. C, Springer T. A** (1995). Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J. Immunol.* 154: 5356-66.

**Astiz M, DeGent G, Lin R** (1995) Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med.* 23: 265-71.

**Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Wong C, Du Pasquier L, 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.

**Baldwin H. S, Shen H. M, Yan H. C, DeLisser H. M, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum N. E, Newman P. J, Albelda S. M** (1994) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development.* 120: 2539-53.

**Barrande C, Traore Y, Szekeres G, Hirn J** (1993) Isolation and characterization of two new monoclonal antibodies against the CD34 molecule. *Hybridoma*. 12: 203-13.

**Bartfeld N. S, Pasquale E. B, Geltosky J. E, Languino L. R** (1993) The  $\alpha v \beta 3$  integrin associates with a 190-kDa protein that is phosphorylated on tyrosine in response to platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 268: 17270-17276.

**Basson C. T, Kocher O, Basson M. D, Asis A, Madri J. A** (1992) Differential modulation of vascular cell integrin and extracellular matrix expression in vitro by TGF-beta 1 correlates with reciprocal effects on cell migration. *J Cell Physiol.* 153: 118-28.

**Bates R. C, Buret A, van Helden D. F, Horton M. A, Burns G. F** (1994) Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J. Cell Biol.* 125: 403-415.

**Baum O, Troll S, Hixson D. C** (1996) The long and the short isoform of cell-CAM 105 show variant-specific modifications in adult rat organs. *Biochem Biophys Res Commun.* 227(3):775-81.

**Baumgartner-Parzer S. M, Wagner L, Pettermann M, Gessl A, Waldhausl W** (1995) Modulation by high glucose of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. *Diabetologia.* 38: 1367-70.



**Bazzoni G, Martinez-Estrada O. M, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E** (2000) Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J. Biol. Chem.* 275: 20520-20526.

**Bazzoni G, Martinez-Estrada O.M, Mueller F, Nelboeck P, Schmid G, Bartfai T, Dejana E, Brockhaus M.**(2000) Homophilic interaction of junctional adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 275: 30970-30976.

**Beauchemin N, Kunath T, Robitaille J, Chow B, Turbide C, Daniels E, Veillette A.** (1997) Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells. *Oncogene.* 14: 783–790.

**Beauchemin N, Draber P, Dveksler G, Gold P, Gray-Owen S, Grunert F, Hammarstrom S, Holmes K. V, Karlsson A, Kuroki M, Lin S. H, Lucka L, Najjar S. M, Neumaier M, Obrink B, Shively J. E, Skubitz K. M, Stanners C. P, Thomas P, Thompson J. A, Virji M, von Kleist S, Wagener C, Watt S, Zimmermann W** (1999). Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell. Res.* 252: 243-249.

**Beck G. R. Jr, Zerler B, Moran E** (2001) Gene array analysis of osteoblast differentiation. *Cell. Growth. Differ.* 12: 61-83.

**Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners C. P** (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell*. 57: 327–334.

**Bevilacqua M. P, Stengelin S, Gimbrone M. A. Jr, Seed B** (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 243:1160-5.

**Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert P. M, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt A. M, Stern D. M, Haring H. U, Schleicher E, Nawroth P. P** (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*. 50: 2792-2808.

**Bird T. A, Schooley K, Dower S. K, Hagen H, Virca G. D** (1997) Activation of nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B by interleukin-1 is accompanied by casein kinase II-mediated phosphorylation of the p65 subunit. *J. Biol. Chem*. 272: 32606-32612.

**Bonnefont-Rousselot D** (2004) The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treat. Endocrinol*. 3: 41-52.

**Boulbou M. S, Koukoulis G. N, Petinaki E. A, Germenis A, Gourgoulisanis** (2004) Soluble adhesion molecules are not involved in the development of retinopathy in type 2 diabetic patients. *Acta. Diabetol*. 41: 118-22.

**Boulton I. C, Gray-Owen S. D** (2002) Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol.* 3: 229-36.

**Brenner B. E, Gulbins K, Schlottmann U, Koppenhoefer G. L, Bruehl R. E, Springer T. A, Bainton D. F** (1996) Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 44: 835.

**Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, Koppenhoefer U, Busch GL, Walzog B, Steinhausen M, Coggeshall KM, Linderkamp O, Lang F.** (1996) L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 15376-15381.

**Brenner B, Weinmann S, Grassme H, Lang F, Linderkamp O, Gulbins E** (1997) L-selectin activates JNK via src-like tyrosine kinases and the small G-protein Rac. *Immunology.* 92: 214-9.

**Brooks P, Clark R. A. F, Cheresh D. A** (1994) Requirement of vascular integrin  $\alpha v \beta 3$  for angiogenesis. *Science.* 264: 569-571.

**Brummer J, Neumaier M, Gopfert C, Wagener** (1995) Association of pp60c-src with biliary glycoprotein (CD66a), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family downregulated in colorectal carcinomas. *Oncogene.* 11: 1649-55.

**Buchanan M. R, Bertomeu M. C, Haas T. A, Orr F. W, Eltringham-Smith L** (1993) Localization of 13-HODE and the vitronectin receptor in human endothelial cells and endothelial cell/platelet interactions in vitro. *Blood*. 81: 3303-3312.

**Bujan J, Gimeno M. J, Prieto A, Pascual G, Bellon J. M, Alvarez-Mon M** (1999) Modulation of PECAM-1 (CD31) expression in human endothelial cells: effect of IFN $\gamma$  and IL-10. *J. Vasc. Res.* 36: 106-13.

**Buckley C. D, Doyonnas R, Newton J. P, Blystone S. D, Brown E. J, Watt S. M, Simmons D. L** (1996) Identification of alpha v beta 3 as a heterotypic ligand for CD31/PECAM-1. *J. Cell. Sci.* 109: 437-45.

**Bullard D. C, Kunkel E. J, Kubo H, Hicks M. J, Lorenzo I, Doyle N. A, Doerschuk C. M, Ley K, Beaudet A. L** (1996) Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med.* 183: 2329-36.

**Burns A. R, Smith C. W, Walker D. C** (2003) Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol. Rev.* 83: 309-36.

**Bushdid P. B, Brantley D. M, Yull G. L, Blaeuer L. H, Hoffman L, Niswander L. D, Kerr F. E** (1998) Inhibition of NF- $\kappa$ B activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis. *Nature*. 392:615-8.

**Busch B, Walzog M, Steinhausen K. M, Coggeshall O, Brenner B, Beekhuizen H, Furth R. V** (1994) Growth characteristics of cultured human macrovascular venous and arterial and microvascular endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 31: 230–239.

**Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone M. A. Jr, Cremona O, Marchisio P. C, Dejana E** (1992) Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. *Blood.* 80: 437-46.

**Candido R, Jandeleit-Dahm K. A, Cao Z, Nesteroff S. P, Burns W. C, Twigg S. M, Dilley R. J, Cooper M. E, Allen T. J** (2002) Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 106: 246-53.

**Carden D. F, Moak Xiao C, Willis B. H, Robinson-Jackson S, Alexander S** (1998) Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am. J. Physiol.* 275: 385-92.

**Carman C. V, Springer T. A** (2003) Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 547-556

**Carrithers M, Tandon S, Canosa S, Michaud M, Graesser D, Madri J. A** (2005) Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice. *Am J Pathol.* 166: 185-96.

**Cominacini L, Garbin U, Fratta Pasini A, Paulon T, Davoli A, Campagnola M, Marchi E, Pastorino A. M, Gaviraghi G, Lo Cascio V (1997)** Lacidipine inhibits the activation of the transcription factor NF-kappaB and the expression of adhesion molecules induced by pro-oxidant signals on endothelial cells. *J. Hypertens.* 15: 1633-40.

**Cornejo C. J, Winn R. K, Harlan J. M (1997)** Anti-adhesion therapy *Adv. Pharmacol.* 39: 99-142.

**Coutelier J. P, Godfraind C, Dveksler G. S, Wysocka M, Cardellichio C. B, Noel H, Holmes K. V (1994)** B lymphocyte and macrophage expression of carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules that serve as receptors for the murine coronavirus. *Eur. J. Immunol.* 24: 1383-90.

**Chad E, Green David. N, Pearson, Raymond, Camphausen T, Donald E, Staunton Scott, Simon I (2004)** Shear-Dependent Capping of L-Selectin and P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 by E-Selectin Signals Activation of High-Avidity  $\beta_2$ -Integrin. *The Journal of Immunology.* 172: 7780-7790.

**Chan B. M, Wong J. G, Rao A, Hemler M. E (1991)** T cell receptordependent, antigen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. *J. Immunol.* 147: 398-404.

**Chang S. Y, Chen Y. Q, Fitzgerald L. A, Honn K. V** (1991) Analysis of integrin mRNA in human and rodent tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 108-113.

**Cheng Y. F, Kramer R. H** (1989) Human microvascular endothelial cells express integrin-related complexes that mediate adhesion to the extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 139: 275-286.

**Cheng Y. F, Clyman R. I, Enenstein J, Waleh N, Pytela R, Kramer R. H** (1991) The integrin complex  $\alpha v \beta 3$  participates in the adhesion of microvascular endothelial cells to fibronectin. *Exp. Cell. Res.* 194: 69-77.

**Cheresh D. A** (1987) Human endothelial cells synthesize and express an arggly-aspartic acid directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 84: 6471-6475.

**Chi-Rosso G, Lobb R** (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell.* 59: 1203-11.

**Christofidou-Solomidou M, Nakada M. T, Williams J, Muller W. A, DeLisser H. M** (1997) Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J. Immunol.* 158: 4872-4878.

**Chua C. C, Diglio C. A, Siu B. B, Chua B. H** (1994) Angiotensin II induces TGF-beta 1 production in rat heart endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1223: 141–147.

**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, Stern D. M** (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 91: 3527-3561.

**Collett C, Munro J. M** (1999) Selective induction of endothelial L-selectin ligand in human lung inflammation. *Histochem. J.* 31: 213-9.

**Conforti G, Zanetti A, Pasquali-Ronchetti I, Quaglino D. Jr, Neyroz P, Marchisio P. C, Dejana E** (1990) Modulation of vitronectin receptor binding by membrane lipid composition. *J. Biol. Chem.* 265: 4011-4019.

**Crockett Torabi E, Sulenbarger B, Smith C. W, Fantone J. C** (1995) Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J. Immunol.* 154: 2291-2302.

**Crovello C. S, Furie B. C, Furie B** (1993) Rapid phosphorylation and selective dephosphorylation of P-selectin accompanies platelet activation. *J. Biol. Chem.* 268: 14590-14593.



**Crovello C. S, Furie B. C, Furie B** (1995) Histidine phosphorylation of P-selectin upon stimulation of human platelets: a novel pathway for activation-dependent signal transduction. *Cell*. 82: 279-286.

**Cruz J. W, Soto-Suazo M. W, Hohman T. C, Akamine E. H, Zorn T. T, Fortes Z. B** (2003) Minalrestat and leukocyte migration in diabetes mellitus. *Diabetes. Metab Res. Rev.*19: 223-31.

**Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A** (2001) Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol. Rev.* 55 : 135-59.

**Cybulsky M. I, Fries J. W. U, Williams A. J, Sultan P, Davis V. M, Gimbrone M. A. Jr, Collins T** (1991) Alternative splicing of human VCAM-1 in activated vascular endothelium. *American Journal of Pathology*. 138: 815-820.

**Cybulsky M. I, Fries J. W, Williams A. J, Sultan P, Eddy R, Byers M, Shows T, Gimbrone M. A. Jr, Collins T** (1991) Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc. Natl. Acad Sci.* 88: 7859-63.

**Cybulsky M. I** (2001) A major rôle for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107:1255-62.

**Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S** (2001) Insulin inhibits intranuclear nuclear factor  $\kappa$ B and stimulates I $\kappa$ B in

mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 3257–3265.

**Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A (2004)** Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes *Trends in Immunology.* 1: 4-7.

**Da Silva-Azevedo L, Reutter W (1991)** The long isoform of the cell adhesion molecule C-CAM binds to actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256: 404-408.

**Daxecker H, Raab M, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller M. M (2002)** Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation. *Clin. Chim. Acta.* 325: 171-5.

**Dean G, Tang 1, Clement A, Diglio2 R. B, Kenneth V. H (1995)** Transcriptional activation of endothelial cell integrin  $\alpha_v$  by protein kinase C activator 12(S)-HETE. *Journal of Cell Science.* 108: 2629-2644.

**Defilippi P, Truffa G, Stefanuto G, Altruda F, Silengo L, Tarone G (1991)** Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interferon  $\beta$  modulate the expression of vitronectin receptor (integrin  $\beta_3$ ) in human endothelial cells. *J. Biol.Chem.* 266: 7638-7645.

**De Fougerolles A. R, Stacker S. A, Schwarting R, Springer T. A (1991)** Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* 174: 253-267.

**DeLeo F. R, Quinn M. T** (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol.* 60: 677-91.

**Delia D, Lampugnani M. G, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti M. A, Greaves M. F** (1993) CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood.* 81: 1001-8.

**DeMello D. E, Reid L. M** (2000) Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatr. Dev. Pathol.* 3: 439-449.

**DeMello D. E, Sawyer D, Galvin N, Reid L. M** (1997) Early fetal development of lung vasculature. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 16: 568-581.

**De Nichilo M. O, Burns G. F** (1993) Granulocyte-macrophage and (1989) Enhanced tumor cell adhesion to the subendothelial matrix resulting from 12(S)-HETE-induced endothelial cell retraction. *FASEB. J.* 3: 2285- 2293.

**Dietrich J. B** (2002) The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood–brain barrier. *J. Neuroimmunol.* 128: 58–68.

**Donda A, Mori L, Shamshiev A, Carena I, Mottet C, Heim M. H, Beglinger C, Grunert F, Rochlitz C, Terracciano L, Jantscheff P, De Libero G** (2000) Locally inducible CD66a (CEACAM1) as an amplifier of the human intestinal T cell response. *Eur. J. Immunol.* 30: 2593-603.

**Dong Z. M, Chapman S. M, Brown A. A, Frenette P. S, Hynes R. O, Wagner D. D** (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 102: 145-52.

**Dougherty G. J, Murdoch S, Hogg N** (1988) The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *European Journal Of Immunology.* 1: 35-39 .

**Dustin M. L, Bivona T. G, Philips M. R** (2004) Membranes as messengers in T cell adhesion signalling. *Nat. Immunol.* 5: 363-372 .

**Dveksler G. S, Pensiero M. N, Cardellichio C. B, Williams R. K, Jiang G. S, Holmes K. V, Dwir O, Kansas G. S, Alon R** (2001) Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J. Cell. Biol.* 155: 145–156.

**Dwir O, Kansas G. S, Alon R** (2001) Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. *J. Cell. Biol.* 155:145–156.

**Elstad M. R, Pine L. A, Cowley F. S, MCever R. P, mcintyre T. M , Prescott S. M, Zimmerman G. A** (1995) P-selectin regulates platelet-activating factor synthesis and phagocytosis by monocytes. *J. Immunol.* 155: 2109-2122.

**Edidin M** (1997) Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 528-32.

**Edidin M** (2001) Membrane cholesterol, protein phosphorylation, and lipid rafts. *Sci STKE.* 67: PE1.

**Edlund M, Gaardsvoll H, Bock E, Obrink B** (1993) Different isoforms and stock-specific variants of the cell adhesion molecule C-CAM (cell-CAM 105) in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 213: 1109-16.

**Edlund M, Blikstad I, Öbrink B** (1996) Calmodulin binds to specific sequences in the cytoplasmic domain of C-CAM and down-regulates C-CAM self-association. *J. Biol. Chem.* 271: 1393-1399.

**Ergun S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurmbach J. H, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C** (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1): a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Mol. Cell.* 5: 311-20.

**Erman A, van Dyk D. J, Chen-Gal B, Giler I. D, Rosenfeld J. B, Boner G** (1993) Angiotensin converting enzyme activity in the serum, lung and kidney of diabetic rats. *Eur. J. Clin. Invest.* 23: 615-20.

**Etzioni A, Doerschuk C. M, Harlan J. M** (1999) Of Man and Mouse: Leukocyte and Endothelial Adhesion Molecule Deficiencies. *Blood.* 94: 3281-3288.

**Etzioni A, Doerschuk C. M, Harlan J. M.** (2000) Similarities and dissimilarities between humans and mice looking at adhesion molecules defects. *Adv. Exp. Med. Biol.* 479: 147-61.

**Etzioni A** (2000) Integrins: the molecular glue of life. *Hosp. Pract.* 35: 102-8.

**Fackler M. J, Civin C. I, Sutherland D. R, Baker M. A, May W. S** (1990) Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen on hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 265: 11056-61.

**Fackler M. J, Civin C. I, May W. S** (1992) Up-regulation of surface CD34 is associated with protein kinase C-mediated hyperphosphorylation of CD34. *J. Biol. Chem.* 267: 17540-6.

**Fackler M. J, Krause D. S, Smith O. M, Civin C. I, May W. S** (1995) Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood.* 85: 3040.

**Fan J, Frey R. S, Rahman A, Malik A. B** (2002) Role of neutrophil NADPH oxidase in the mechanism of tumor necrosis factor-alpha -induced NF-kappa B activation and intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277: 3404-11.

**Fawcett J, Holness C. L. L, Needham L. A, Turley H, Gatter K. C, Mason D. Y Simmons D. L** (1992) Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature*. 360: 481-484.

**Feng L, Matsumoto C, Schwartz A, Schmidt A. M, Stern D. M, Pile-Spellman J** (2005) Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care*. 28: 379-84.

**Fehse B, Richters A, Putimtseva-Scharf K, Klump H, Li Z, Ostertag W, Zander A. R, Baum C** (2000) CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol. Ther.* 1: 448-56.

**Fina L, Molgaard H. V, Robertson D, Bradley N. J, Monaghan P, Delia D, Sutherland D. R, Baker M. A, Greaves M. F** (1990) Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 75: 2417-26.

**Fournes B, Sadekova S, Turbide C, Letourneau S, Beauchemin N** (2001) The CEACAM1-L Ser503 residue is crucial for inhibition of colon cancer cell tumorigenicity. *Oncogene*. 20: 219-30.

**Garlanda C, Dejana E** (1997) Heterogeneity of endothelial cells: Specific markers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1193–1202.

**Gerritsen M. E** (1992) Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2701-2711.

- Ghersa P, Hooft van Huijsdijnen R, Whelan J, DeLamarter J. F** (1992) Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J. Biol. Chem.* 267: 19226-32.
- Ghitescu L, Jacobson B. S, Crine P** (1999) A novel, 85 kDa endothelial antigen differentiates plasma membrane macrodomains in lung alveolar capillaries. *Endothelium.* 6: 241-50.
- Ghosh S, May M. J, Kopp E. B** (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-60.
- Giagulli C, Scarpini E, Ottoboni L, Narumiya S, Butcher E. C, Constantin G, Laudanna C** (2004) RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity.* 20: 5-35.
- Gilbert R, Cox A, Wu L, Allen T. J, Hulthen U. L, Jerums G, Cooper M. E** (1998) Expression of transforming growth factor-beta1 and type IV collagen in the renal tubulointerstitium in experimental diabetes: effects of ACE inhibition. *Diabetes* 47: 414-422.
- Goldberger A, Middleton K. A, Newman P. J** (1994) Changes in expression of the cell adhesion molecule PECAM-1 (CD31) during differentiation of human leukemic cell lines. *Tissue Antigens.* 44: 285-93.
- Goldberg H. A, Warner K. J** (1997) The staining of acidic proteins on polyacrylamide gels: enhanced sensitivity and stability of "Stains-all" staining in combination with silver nitrate. *Anal. Biochem.* 251: 227-33.



**Gonzalez M. A, Selwyn A. P** (2003) Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am. J. Med.* 115: 99S-106S.

**Gratzinger D, Canosa S, Engelhardt B, Madri J. A.** (2003) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial migration through its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 243-9.

**Gratzinger D, Barreuther M, Madri J. A** (2003) Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 modulates endothelial cell motility through the small G-protein Rho. *FASEB. J.* 17: 1458-69.

**Greaves M. F, Brown J, Molgaard H. V, Spurr N. K, Robertson D, Delia D, Sutherland D. R.** (1992) Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia.* 1: 31-6.

**Green S. A, Setiadi H, McEver R. P, Kelly R. B** (1994) The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J. Cell Biol.* 124: 435-448.

**Greicius G, Severinson E, Beauchemin N, Obrink B, Singer B. B** (2003) CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J. Leukoc. Biol.* 74: 126-34.

- Gulbins E, Busch G. L, Koppenhoefer U, Lang F, Linderkamp O** (1997) L-selectin regulates actin polymerisation via activation of the small G-protein Rac2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 802-807.
- Gumbiner B. M** (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84: 345-57.
- Gumkowski F, Kaminska G, Kaminski M, Morrissey L. W, Auerbach R** (1987) Heterogeneity of mouse vascular endothelium. *Blood Vessels.* 24: 11–23.
- Hagmann W** (1994) 12-Lipoxygenases and 12(S)-HETE: Role in cancer metastasis. *Cancer. Metast. Rev.* 13: 365-396.
- Hammarström** (1994) Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region. *Genomics.* 23: 659–668.
- Hafezi-Moghadam A, Thomas K. L, Prorock A. J, Huo Y, Ley K** (2001) L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment. *J. Exp. Med.* 193: 863–872.
- Harris E. S, McIntyre T. M, Prescott S. M, Zimmerman G. A** (2000) The leukocyte integrins *J. Biol. Chem.* 275: 23409-23412.
- Hart Alan. W, Baeza N, Apelqvist Å, Edlund H** (2000) Attenuation of FGF signalling in mouse  $\beta$ -cells leads to diabetes. *Nature.* 408: 864 – 868.

- Hayflick J. S, Kilgannon P, Gallatin W. M** (1998) The intercellular adhesion molecule (ICAM) family of proteins. New members and novel functions. *Immunol. Res.* 17: 313-27.
- Hattori R, Hamilton K. K, Fugate R. D, McEver R. P, Sims P. J** (1989) Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140 *J Biol Chem.* 264: 7768-71.
- Hattori R, Hamilton K. K, McEver R. P, Sims P. J** (1989) Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* May. 264: 9053-60.
- Heiska L, Kantor C, Parr T, Critchley D. R, Vilja P, Gahmberg C. G, Carpen O** (1996) Binding of the cytoplasmic domain of intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) to  $\alpha$ -actinin. *J. Biol. Chem.* 271: 26214–26219.
- Heiska L, Alfthan K, Gronholm M, Vilja P, Vaheri A, Carpen O** (1998), Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and-2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 21893–21900.
- Helander T. S, Carpen O, Turunen O, Kovanen P. E, Vaheri A, Timonen T** (1996) ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature.* 382: 265–268.

**Hickey M. J, Kanwar S, McCafferty D. M, Granger D. N, Eppihimer M. J, Kubes P** (1999) Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J. Immunol.* 162: 1137-43.

**Hill D. J, Virji M** (2003) A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA. *Mol. Microbiol.* 48: 117-29.

**Hiraoka N, Petryniak B, Nakayama J, Tsuboi S, Suzuki M, Yeh J. C, Izawa D, Tanaka T, Hiser W, Penman R. W, Reeves J. T** (1975) Preservation of hypoxic pulmonary pressor response in canine pneumococcal pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 112: 817-822.

**Hiser W, Penman R. W, Reeves J. T** (1975) Preservation of hypoxic pulmonary pressor response in canine pneumococcal pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 112: 817-22.

**Hong-Geller E, Cerione R. A** (2000) Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells. *J. Cell. Biol.* 148: 481-494.

**Hopkins A. M, Baird A. W, Nusrat A** (2004) ICAM-1: targeted docking for exogenous as well as endogenous ligands *Advanced Drug Delivery Reviews* 56 : 763-778.

**Honn K. V** (1993) Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential role in mediating tumor cell adhesion to endothelium. *J. Biol. Chem.* 268: 22883-22894.

**Honn K. V, Tang D. G, Gao X, Butovich I. A, Liu B, Timar J, Hsueh W. A, Law R. E** (1999) Insulin signaling in the arterial wall. *Am. J. Cardiol.* 84: 21J-24J.

**Hubbard A. K, Rothlein R** (2000) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Radic. Biol. Med.* 28: 1379-1386.

**Hughes J. M, Brink A, Witmer A. N, Hanraads-de Riemer M, Klaassen I, Schlingemann R. O** (2004) Vascular leucocyte adhesion molecules unaltered in the human retina in diabetes. *Br. J. Ophthalmol.* 88: 566-72.

**Humphries M. J, McEwan P. A, Barton S. J, Buckley P. A, Bella J, Paul Mould A** (2003) Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem. Sci.* 28: 313-320 .

**Hunter I, Lindh M, obrink B** (1994) Differential regulation of C-CAM isoforms in epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 107: 1205-16.

**Hunter I, Sawa H, Edlund M, Öbrink B** (1996) Evidence for regulated dimerization of cell-cell adhesion molecule (C-CAM) in epithelial cells. *Biochem. J.* 320: 847-853.

**Hynes R. O** (1992) Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 11-25.

**Ilan N, Madri J. A** (1999) New paradigms of signaling in the vasculature: ephrins and metalloproteases. *Curr Opin Biotechnol* 10: 536-540.

**Ilan N, Cheung L, Pinter E, Madri J. A** (2000) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 275: 21435-43.

**Ilan N, Cheung L, Miller S, Mohsenin A, Tucker A, Madri J. A** (2001) Pecam-1 is a modulator of stat family member phosphorylation and localization: lessons from a transgenic mouse. *Dev Biol.* 232: 219-32.

**Ilan N, Madri JA.** (2003) PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 15: 515-24.

**Imhof B. A, Aurrand-Lions M** (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes *Nat. Rev. Immunol.* 4: 432-444.

**Ignotz R. A, Heino J, Massague J** (1989) Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- $\beta$ . Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. *J. Biol. Chem.* 264: 389-392.

**Inoguchi T, Xia P, Kunisaki M, Higashi S, Feener E. P, King G. L.** (1994) Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am. J. Physiol.* 267: E369-79.

**Israël-Assayag E, Cormier Y** (2002) Adaptation to organic dust exposure: a potential role of l-selectin shedding? *Eur. Respir. J.* 19: 833-837.

**Janet T, Labourdette G, Sensenbrenner M, Pettmann B** (1992) Mitogenic growth factors regulate differentially early gene mRNA expression: a study on two clones of 3T3 fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 198:305-14.

**Jaye M, Schlessinger J, Dionne C. A** (1992) Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1135:185.

**Joussen A. M, Murata T, Tsujikawa A** (2001) Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am. J. Pathol.* 158: 147-52.

**Jutila M. A, Kurk S, Jackiw L, Knibbs R. N, Stoolman L. M** (2002) L-selectin serves as an E-selectin ligand on cultured human T lymphoblasts *J. Immunol.* 169: 1768-73.

**Jung U, Norman K. E, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet A. L, Ley K (1998)** Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J. Clin. Invest.* 102: 1526-33.

**Kado S, Wakatsuki T, Yamamoto M, Nagata N (2001)** Expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by high glucose concentrations in human aortic endothelial cells. *Life Sci.* 68: 727-37.

**Kamiya H, Nakamura J, Hamada Y, Nakashima E, Naruse K, Kato K, Yasuda Y, Hotta N (2003)** Polyol pathway and protein kinase C activity of rat Schwannoma cells. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 19: 131-9.

**Kaiserlian D, Rigal D, Abello J, Revillard J. P (1991)** Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur. J. Immunol.* 21: 2415–2421.

**Kammerer R, Hahn S, Singer B. B, Luo J. S, von Kleist S (1998)** Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 28: 3664-74.

**Kammerer R, Stober D, Singer B. B, Obrink B, Reimann J (2001)** Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 on murine dendritic cells is a potent regulator of T cell stimulation. *J. Immunol.* 166: 6537-44.



**Kanegae Y, Tavares A. T, Belmonte J. C, Verma I. M** (1998) Role of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors during the outgrowth of the vertebrate limb. *Nature*. 392: 611-4.

**Kansas G. S, Ley K, Munro J. M, Tedder T. F** (1993) Regulation of leukocyte rolling and adhesion to high endothelial venules through the cytoplasmic domain of L-selectin. *J. Exp. Med.* 177: 833-838.

**Kaplanski G, Farnarier C, Benoliel A. M, FOA C, Kaplanski S, Bongrand P.** (1994) A novel role for E- and P- selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *J. Cell Sci.* 107: 2449-2457.

**Katagiri K, Shimonaka M, Kinashi T** (2004) Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C- $\gamma$ 1. *J. Biol. Chem.* 279: 11875-81.

**Kelly C. P, O'Keane J. C, Orellana J, Schroy P. C, Yang S, LaMont J. T, Brady H. R** (1992) Human colon cancer cells express ICAM-1 in vivo and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion in vitro. *Am. J. Physiol.* 263: G864-G870.

**Kenji M** (2003) Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-ethylmaleimide-Sensitive Factor. *Cell.* 115: 139-150.

**Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S, Dorger M, Wesierska-Gadek J, Goetz A. E** (2004) Platelet-endothelial cell interaction in pulmonary micro-circulation: the role of PARS. *Thromb. Haemost.* 91: 761-70.

**Kilshaw P. J** (1999) *Mol. Pathol.* 52: 203-207.

**Kirshner J, Schumann D, Shively J. E** (2003) CEACAM1, a cell-cell adhesion molecule, directly associates with annexin II in a three-dimensional model of mammary morphogenesis. *J Biol Chem.* 278: 50338-45.

**Klein S, Giancotti F. G, Presta M, Albelda S. M, Buck C. A, Rifkin D. B** (1993) Basic fibroblast growth factor modulates integrin expression in microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 4: 973-982.

**Kojda G, Harrison D** (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43: 562-71.

**Kouhara H, Hadari Y. R, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J** (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell.* 89: 693-702.

**Kostrewa D, Brockhaus M, D'arcy A, Dale G. E, Nelboeck P, Schmid G, Mueller F, Bazzoni G, Dejana E, Bartfai T, Winkler F. K, and Hennig M** (2001) X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO. J.* 20: 4391-4398.

**Kowluru A, Kowluru R, Bitensky M. W, Corwin E, Solomon S. S, Johnson J. D** (1987) Suggested mechanism for the selective excretion of glycosylated albumin. *J. Exp. Med.* 166: 1259-1279.

- Krauter J, Hartl M, Hambach L, Kohlenberg A, Gunsilius E, Ganser A, Heil G** (2001) Receptor-mediated endocytosis of CD34 on hematopoietic cells after stimulation with the monoclonal antibody anti-HPCA-1. *J. Hematother. Stem. Cell Res.* 10: 863-71.
- Krause D. S, Ito T, Fackler M. J, Smith O. M, Collector M. I, Sharkis S. J, May W. S** (1994) Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood.* 84: 691-701.
- Kubes P, Kerfoot S. M** (2001) Leukocyte Recruitment in the Microcirculation: the Rolling Paradigm Revisited. *News. Physiol. Sci.* 16: 76-80.
- Kumar S, West D. C, Ager A** (1987) Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation.* 36: 57-70.
- Kunkel E. J, Ley K** (1996) Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ. Res.* 79: 1196-204.
- Kunkel E. J, Jung U, Bullard D. C, Norman K. E, Wolitzky B. A, Vestweber D, Beaudet A. L, Ley K** (1996) Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J Exp. Med.* 183: 57-65.
- Kunath T, Ordonez-Garcia C, Turbide C, Beauchemin N** (1995) Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene.* 11: 2375-82.

**Kusaka I, Kusaka G, Zhou C, Ishikawa M, Nanda A, Granger D. N, Zhang J. H, Tang J.** (2004) Role of AT1 receptors and NAD(P)H oxidase in diabetes-aggravated ischemic brain injury. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 286: 2442-51.

**Kusumi A, Koyama-Honda I, Suzuki** (2004) Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic.* 5:213-30.

**Kyathanahall S, Janardhan. G. D, Appleyard B. S** (2004) Expression of integrins subunits  $\alpha$  and  $\beta$  3 in acute lung inflammation. *Histochem. Cell. Biol.* 121 :383-390.

**Laemmli U. K** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

**Lamaze C, Chuang T. H, Terlecky L. J, Bokoch G. M, Schmid S. L.** (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature.* 382:177–179.

**Lafrenie R. M, Podor T. J, Buchanan M. R, Orr F. W** (1992) Upregulated biosynthesis and expression of endothelial cell vitronectin receptor enhances cancer cell adhesion. *Cancer Res.* 52: 2202-2208.

**Lanza F, Healy L, Sutherland D. R** (2001) Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 15: 1-13.

**Lampugnani M. G, Resnati M, Dejana E, Marchisio P. C** (1991) The role of integrins in the maintenance of endothelial cell monolayer integrity. *J. Cell. Biol.* 112: 479-490.

**Laudanna C, Constantin G, Baron P, Scarpini E, Scarlato G, Cabrini G, Dechecchi C, Rossi F, Cassatella M. A, 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 signalling-molecule. *J. Biol. Chem.* 269: 4021-6.

**Lawrence M. B, Springer T. A** (1991) **Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins.** *Cell.* 65: 859-873.

**Lawrence M. B, Springer T. A** (1993) Neutrophils roll on E-selectin. *J. Immunol.* 151: 6338-46.

**Leavesley D. I, Schwartz M. A, Rosenfeld, M, Cheresh D. A** (1993) Integrins  $\beta 1$  and  $\beta 3$ -mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J. Cell Biol.* 121: 163-170.

**Leeb T, Muller M** (2004) Comparative human-mouse-rat sequence analysis of the ICAM gene cluster on HSA 19p13.2 and a 185-kb porcine region from SSC 2q. *Gene.* 343: 239-44.

**Lefebvre T, Caillet-Boudin M. L, Buee L, Delacourte A, Michalski J. C** (2003) O-GlcNAc glycosylation and neurological disorders. *Adv. Exp. Med. Biol.* 535: 189-202.

**Lenter M, Levinovitz A, Isenmann S, Vestweber D** (1994) Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J. Cell. Biol.* 125: 471-81.

**Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D** (1993) Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J. Cell. Biol.* 121: 449-59.

**Ley K** (1996) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* 32: 733-42.

**Ley K, Allietta M, Bullard D. C, Morgan S** (1998) Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ. Res.* 83: 287-9.

**Liao F, Ali J, Greene T, Muller W. A** (1997) Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *Exp. Med.* 185: 1349-57.

**Lijun Xia, Pan Junliang, Yao Longbiao, McEver Rodger. P** (1998) A Proteasome Inhibitor, an Antioxidant, or a Salicylate, but not a Glucocorticoid, Blocks Constitutive and Cytokine-Inducible Expression of P-Selectin in Human Endothelial Cells. *Blood.* 91: 1625-1632.

**Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos J. C** (1995) Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur. J. Immuno.* 125: 1508-16.

**Lin G, Finger E, Gutierrez-Ramos J. C** (1995) Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur. J. Immunol.* 25: 1508-16.

**Lindbom L, Werr J** (2002) Integrin-dependent neutrophil migration in extravascular tissue. *Semin. Immunol.* 14: 115-121.

**Lindemann S, Tolley N. D, Dixon D. A, McIntyre T. M, Prescott S. M, Zimmerman G. A, Weyrich A. S.** (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol.* 154: 485-90.

**Lindmark E, Wallentin L, Siegbahn A** (2001) Blood Cell Activation, Coagulation, and Inflammation in Men and Women with Coronary Artery Disease. *Thromb. Res.* 103: 249-259.

**Liu B, Timar J, Howlett J, Diglio C. A, Honn K. V** (1991) Lipoxygenase metabolites of arachidonic and linoleic acids modulate the adhesion of tumor cells to endothelium via regulation of protein kinase C. *Cell. Regul.* 2: 1045-1055.

**Liu L, Moesner P, Kovach N. L, Bailey R, Hamilton A. D, Sebti S. M, Harlan, J. M** (1999) Integrin-dependent leukocyte adhesion involves geranylgeranylated protein(s) *J. Biol. Chem.* 274: 33334-33340.

**Liu Y, Nusrat A, Schnell F. J, Reaves T, A, Walsh S, Pochet M, Parkos C. A** (2000) Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell. Sci.* 113: 2363-2374.

**Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff B. D, Cybulsky M. I** (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ. Res.* 85: 199-207.

**Lorant D. E, Patel K. D, McIntyre T. M, McEver R. P, Prescott S. M, Zimmerman G. A** (1991) Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biol.* 115: 223-224.

**Lorant D. E, McEver R. P, McIntyre T. M, Moore K. L, Prescott S. M, Zimmerman G. A** (1995) Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surfaces. *J. Clin. Invest.* 96: 171-82.

**Luscinskas F. W, Lawler J** (1994) Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB. J.* 8: 929-938.



**MacKinnon J. R, Knott R. M, Forrester J. V** (2004) Altered L-selectin expression in lymphocytes and increased adhesion to endothelium in patients with diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 88: 1137-41.

**Madri J. A, Williams S. K** (1983) Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J. Cell. Biol.* 97: 153-165.

**Madrid L. V, Wang C. Y, Guttridge D. C, Schottelius A. J. G, Baldwin A. S, Mayo M. W** (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- $\kappa$ B. *Mol. Cell. Biol.* 20:1626-1638.

**Malergue F, Galland F, Martin F, Mansuelle P, Aurrand-Lions M, Naquet P** (1998) A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol. Immunol* 35: 1111-1119.

**Mamdouh Z, Chen X, Pierini L. M, Maxfield F. R, Muller W. A** (2003) Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature.* 421: 748-53.

**Markel G, Wolf D, Hanna J, Gazit R, Goldman-Wohl D, Lavy Y, Yagel S, Mandelboim O** (2002) Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *Clin. Invest.* 110: 943-53.

**Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E** (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin

superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell. Biol.* 142: 117-127.

**Massia S. P, Hubbell J. A** (1992) Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of IIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1. *J. Biol. Chem.* 267: 14019-14026.

**Matsudaira P** (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262:10035-10038.

**McEver R. P** (1991) Selectins: Novel receptors that mediate leukocyte adhesion during inflammation. *Thromb. Hemostas.* 65: 223-228.

**McCarty MF** (2005) The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics - though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. *Med. Hypotheses.* 64: 394-8.

**McEver R.P** (1997) Regulation of expression of E-selectin and P-selectin. *The Selectins: Initiators of Leukocyte Endothelial Adhesion.* D. Vestweber, editor. Harwood Academic Publishers. Amsterdam. 31-47.

**McEver R.P** (2001) Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb. Haemost.* 86: 746-756.

**McEver R.P.** (2002) Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:581-586.

**McGinn S, Poronnik P, King M, Gallery E. D, Pollock C. A** (2003): High glucose and endothelial cell growth: novel effects independent of autocrine TGF- $\beta$ 1 and hyperosmolarity. *Am. J. Physiol.* 284: C1374–C1386.

**McCuaig K, Turbide C, Beauchemin N.** (1992) mmCGM1a: a mouse carcinoembryonic antigen gene family member, generated by alternative splicing, functions as an adhesion molecule. *Cell. Growth. Differ.* 3: 165-74.

**McIntyre S. M, Prescott, Zimmerman G. A** (1993). Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* 92: 559-570.

**McPherson P. S, Kay B. K, Hussain N. K** (2001) Signaling on the endocytic pathway. *Traffic.* 2: 375–384.

**Medhora M. M, Teitelbaum S, Chappel J, Alvarez J, Mimura H, Ross F, Hruska K** (1993) 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> up-regulates expression of the osteoclast integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* 268: 1456-1461.

**Melrose J, Tsurushita N, Liu G, Berg E. L** (1998) IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J. Immunol.* 161: 2457-64.

**Meng D, Liu N** (2003) Expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells by exposure to advanced glycosylation end products and inflammatory mediators. *Chin. Med. J.* 116: 1336-40.

**Mercurio F, Zu H, Murray B. W, Shevchenko A, Bennett B. L, Li J. W, Young D. B, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997)** IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I $\kappa$ B kinase essential for NF- $\kappa$ B activation. *Science*. 278: 860-865.

**Milam S. B, Magnuson V. L, Steffensen B, Chen D. L, Klebe R. J (1991)** IL-1 $\beta$  and prostaglandins regulate integrin mRNA expression. *J. Cell. Physiol*. 149: 173-183.

**Miyasaka M, Lowe J. B, Fukuda M (1999)** A novel, high endothelial venule-specific sulfotransferase expresses 6-sulfo sialyl Lewis(x), an L-selectin ligand displayed by CD34. *Immunity*. 11: 79-89.

**Moore K. L, Eaton S. F, Lyons D. E, Lichenstein H. S, Cummings R. D, McEver R. P (1994)** The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, *O*-linked poly-*N*-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem*. 269: 23318-27.

**Muenzner P, Billker O, Meyer T. F, Naumann M (2002)** Nuclear factor-kappa B directs carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 receptor expression in *Neisseria gonorrhoeae*-infected epithelial cells. *J. Biol. Chem*. 277: 7438-46.

**Muller W. A, Ratti C. M, McDonnell S. L, Cohn Z. A (1989)** A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J. Exp. Med*. 170: 399-414.

**Muller A. M, Hermanns M. I, Cronen C, Kirkpatrick C. J** (2002) Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol.* 73: 171-80.

**Murphy H. S, Bakopoulos N, Dame M. K, Varani J, Ward P. A** (1998) Heterogeneity of vascular endothelial cells: differences in susceptibility to neutrophil-mediated injury. *Microvasc. Res.* 56: 203-11.

**Muenzner P, Billker O, Meyer T. F, Naumann M** (2002) Nuclear Factor- $\kappa$ B Directs Carcinoembryonic Antigen-related Cellular Adhesion Molecule 1 Receptor Expression in *Neisseria gonorrhoeae*-infected Epithelial Cells. *Biol. Chem.* 277: 7438-46.

**Mulligan M. S, Jones M. L, Vaporciyan A. A, Howard M. C, Ward P. A.** (1993) Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. *J. Immunol.* 151: 5666-74.

**Murciano J. C, Harshaw D. W, Ghitescu L, Danilov S. M, Muzykantov V. R** (2001) Vascular immunotargeting to endothelial surface in a specific macrodomain in alveolar capillaries. *Am. J. Respir. Crit Care. Med.* 164:1295-302.

**Musso T, Deaglio S, Franco L, Calosso L, Badolato R, Garbarino G, Dianzani U, Malavasi F.** (2001) CD38 expression and functional activities are up-regulated by

IFN-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. *J. Leukoc. Biol.* 69: 605-12.

**Nagel T, Resnick N, Atkinson W. J, Dewey C. F. Jr, Gimbrone M. A Jr (1994)**  
Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 94: 885-91.

**Naik U. P, Naik M. U, Eckfeld K, Martin-Deleon P, Spychala J, (2001)**  
Characterization and chromosomal localization of JAM-1, a platelet receptor for a stimulatory monoclonal antibody. *J. Cell. Sci.* 114: 539-547.

**Nakamura Y, Komano H, Nakauchi H (1993)** Two alternative forms of cDNA encoding CD34. *Exp. Hematol.* 21: 236-42.

**Neish A. S, Read M. A, Thanos D, Pine R, Maniatis T, Collins T (1995)**  
Endothelial Interferon Regulatory Factor 1 Cooperates with NF-kB as a Transcriptional Activator of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 molecular and cellular biology. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2558-69.

**Net Das Evcimen, Serpil Nebioglu (1996)** Calmodulin glycation in diabetic rat lenses. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1287-1293.

**Newman P. J, Newman D. K** (2003) Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 953-64.

**Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, Gahmberg C. G** (1991) The expression of human intercellular adhesion molecule-2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur. J. Immunol.* 21: 2629-32.

**Obrink B** (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 616-26 .

**Ocklind C, Obrink B** (1982) Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identification of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process. *J. Biol. Chem.* 257: 6788-95.

**Odin A. P** (1997) Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat. Res.* 386: 39-67.

**Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H** (1989) Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: Homophilic and heterophilic adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 39-45.

**Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki M, Arakawa F, Matsuoka Y, Kosaki G, Nakazato H** (1991) A specific heterotypic cell adhesion activity between members of

carcinoembryonic antigen family, W272 and NCA, is mediated by N-domains. *J. Biol. Chem.* 266: 7995–8001.

**Okouchi M(a), Okayama N, Shimizu M, Omi H, Fukutomi T, Itoh M (2002)** High insulin exacerbates neutrophil-endothelial cell adhesion through increasing endothelial surface expression of intercellular adhesion molecule-1 via activation of protein kinase C and mitogen activated protein kinase. *Diabetologia.* 45: 556-9.

**Okouchi M(b), Okayama N, Imai S, Omi H, Shimizu M, Fukutomi T, Itoh M. (2002)** High insulin enhances neutrophil transendothelial migration through increasing surface expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 via activation of mitogen activated protein kinase. *Diabetologia.* 45: 1449-56.

**Okouchi M, Okayama N, Omi H, Imaeda K, Fukutomi T, Nakamura A, Itoh M (2004)** The antidiabetic agent, gliclazide, reduces high insulin-enhanced neutrophil transendothelial migration through direct effects on the endothelium. *Diabetes. Metab Res. Rev.* 20: 232-8.

**Olsen S, Teglund D, Nelson L, Gordon A, Copeland A, Georgescu A, Carrano S, Onrust S, V Hartl P. M, Rosen S. D, Hanahan D (1996)** Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97: 54-64.



**Onrust S. V, Hartl P. M, Rosen S. D, Hanahan D** (1996) Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97: 54-64.

**Ostermann G, Weber K. S, Zerneck A, Schroder A, Weber C** (2002) Jam-1 is a ligand of the beta2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nature Immunology* 3: 151-158.

**Otsuki M, Hashimoto K, Morimoto Y, Kishimoto T, Kasayama S** (1997) Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients. *Diabetes.* 46: 2096-101.

**Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R** (1992) Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141: 673-683.

**Patel K. D, Moore K. L, Nollert M. U, McEver R. P** (1995) Neutrophils use both shared and distinct mechanisms to adhere to selectins under static and flow conditions. *J. Clin. Invest.* 96: 1887-96.

**Perrotti D, Bellon T, Trotta R, Martinez R, Calabretta B. A** (1996) Cell proliferation-dependent multiprotein complex NC-3A positively regulates the CD34 promoter via a TCATTT-containing element. *Blood.* 88: 3336-48.

**Poke T, Newman W, Raghunathan G, Gopal I. T. V** (1991) Structural and functional studies of full-length vascular celladhesion molecule-I: internal duplication and homology to sev-eral adhesion proteins. *DNA. Cell. Biol.* 10: 349-57.

**Poy M. N, Yang Y, Rezaei K, Fernstrom M. A, Lee A. D, Kido Y, Erickson S. K, Najjar S. M** (2002) CEACAM1 regulates insulin clearance in liver. *Nat. Genet.* 30: 270-6.

**Phan D, Cheng C. J, Galfione M, Vakar-Lopez F, Tunstead J, Thompson N. E, Burgess R. R, Najjar S. M, Yu-Lee L. Y, Lin S. H** (2004) Identification of Sp2 as a transcriptional repressor of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in tumorigenesis. *Cancer Res.* 64: 3072-8.

**Prall F, Prall F, Nollau P, Neumaier M, Haubeck H. D, Drzeniek Z, Helmchen U, Loning T, Wagener C** (1996) CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues. *Histochem Cytochem.* 44: 35-41.

**Raab M, Daxecker H, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller M. M** (2002) Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin. Chim. Acta.* 321: 11-6.

**Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J** (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 18 :307-16.

**Rahman A, Anwar K. N, True A. L, Malik A. B** (1999) Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF- $\kappa$ B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion. *J. Immunol.* 162: 5466-5476.

**Rahman A, Khandaker N. Anwar, S. U, Ning Xu, Ye D. R, Leonidas C. P, Asrar B. M** (2001) Protein Kinase C- $\delta$  Regulates Thrombin-Induced ICAM-1 Gene Expression in Endothelial Cells via Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Cellular Biology.* 21: 5554-5565.

**Ramachandran V, Yago T, Epperson T. K, Kobzdej M. M. A, Nollert M. U, Cummings R. D, Zhu C, McEver R. P** (2001) Dimerization of a selectin and its ligand stabilizes cell rolling and enhances tether strength in shear flow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 10166–10171.

**Ramana K. V, Bhatnagar A, Srivastava S. K** (2004) Inhibition of aldose reductase attenuates TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *FASEB. J.* 18 : 1209-18.

**Rijcken E, Krieglstein C. F, Anthoni C, Laukoetter M. G, Mennigen R, Spiegel H. U, Senninger N, Bennett C. F, Schuermann G** (2002) ICAM-1 and VCAM-1 antisense oligonucleotides attenuate in vivo leucocyte adherence and inflammation in rat inflammatory bowel disease. *Gut.* 51: 529–535.

**Rival Y, Del Ma Rabiet M, Dejana E, Duperray A** (1996) Inhibition of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 synthesis and leukocyte transmigration in

endothelial cells by the combined action of TNF-alpha and IFN-gamma. *J. Immunol* 157: 1233-1241.

**Romer L. H, McLean N. V, Yan H. C, Daise M, Sun J, and Delisser H. M** (1995) IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J. Immunol.* 154: 6582-6592.

**Rossetti G, Collinge M, Bender J. R, Molteni R, Pardi R** (2002) Integrin-dependent regulation of gene expression in leukocytes. *Immunol. Rev.* 186: 189-207.

**Russell F. D, Skepper J. N, Davenport A. P** (1998) Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31: 424-430.

**Rupnick M. A, Cary A, Williams S. K, Williams S. K** (1988) Phenotypic diversity in cultured cerebral microvascular endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 435-44.

**Sadatomo T** (2003) Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 in Neutrophil Emigration during Acute Bacterial Pneumonia in Mice and Rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 167: 164-170.

**Sarvetnick N** (1997) IFN- $\gamma$ , IGIF, and IDDM. *Clin. Invest.* 99: 371-372.

**Satterthwaite A. B, Burn T. C, Le Beau M. M, Tenen D. G** (1992) Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. *Genomics*. 12:788-94.

**Sawa H, Kamada K, Sato H, Sendo S, Kondo A, Saito I, Edlund M, Obrink B** (1994) C-CAM expression in the developing rat central nervous system. *Brain. Res Dev. Brain. Res.*78: 35-43.

**Sawa H, Ukita H, Fukuda M, Kamada H, Saito I, Obrink B** (1997) Spatiotemporal expression of C-CAM in the rat placenta. *J Histochem Cytochem*. 45: 1021-34.

**Scaffidi A. K, Petrovic N, Moodley Y. P, Fogel-Petrovic M, Kroeger K. M, Seeber R. M, Eidne K. A, Thompson P. J, Knight D. A** (2004) alpha(v)beta(3) Integrin interacts with the transforming growth factor beta (TGFbeta) type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGFbeta1 in living human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 279: 37726-33.

**Scalia R, Lefer AM** (1998) *In vivo* regulation of PECAM-1 activity during acute endothelial dysfunction in the rat mesenteric microvasculature. *Journal of Leukocyte Biology*. 64: 163-169.

**Schaffer W, Weismann C** (1973) A rapid sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Annal.Biochem*. 56: 502-514.

**Scher M. G, Resneck W. G, Bloch R. J** (1989) Stabilization of immobilized lectin columns by crosslinking with glutaraldehyde. *Anal. Biochem*. 177:168-71.

**Schenkel A. R, Mamdouh Z, Chen X, Liebman R. M, Muller W. A** (2002) CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol.* 3: 143-150.

**Schenkel A. R, Mamdouh Z, Muller W. A** (2004) Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature Immunology.* 5: 393-400.

**Schmidtke D. W, Diamond S. L** (2000) Direct observation of membrane tethers formed during neutrophil attachment to platelets or P-selectin under physiological flow. *J. Cell. Biol.* 149: 719-30.

**Schnitzer J. E, McIntosh D. P, Dvorak A. M, Liu J, Oh P.** (1995) Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science.* 269:1435-9.

**Schumann D, Chen C. J, Kaplan B, Shively J. E** (2001) Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 directly associates with cytoskeleton. proteins actin and tropomyosin. *J. Biol. Chem.* 276: 47421-33.

**Schwartz M. A, Ingber D. E, Lawrence M, Springer T. A, Lechene C** (1991) Multiple integrins share the ability to induce elevations of intracellular pH. *Exp. Cell Res.* 195: 533-535.

**Schwartz M. A, Brown E. J, Fazeli B** (1993) A 50-kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 268: 19931-19934.

**Seftor R. E. B, Seftor E. A, Gehlsen K. R, Stetler-Stevenson W. G, Brown P. D, Ruoslahti E, Hendrix M. J. C** (1992) Role of  $\alpha v \beta 3$  integrin in human melanoma cell invasion. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 1557-1561.

**Sengoelge G, Fodinger M, Skoupy S, Ferrara I, Zangerle C, Rogy M, Horl WH, Sunder-Plassmann G, Menzel J** (1998) Endothelial cell adhesion molecule and PMNL response to inflammatory stimuli and AGE-modified fibronectin. *Kidney Int.* 54: 1637-51.

**Sepp N. T, Li L. J, Lee K. H, Brown E. J, Caughman S. W, Lawley T. J, Swerlick R. A.** (1994) Basic fibroblast growth factor increases expression of the  $\alpha v \beta 3$  integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 103: 295-9.

**Setiadi H, Disdier M, Green S. A, Canfield W. M, McEver R. P** (1995) Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J. Biol. Chem.* 270: 26818-26826.

**Setiadi H, Sedgewick G, Erlandsen S. L, McEver R. P** (1998) Interactions of the cytoplasmic domain of P-selectin with clathrin-coated pits enhance leukocyte adhesion under flow. *J. Cell. Biol.* 142: 859-871.

**Setiadi H, McEver R. P** (2003) Signal-dependent distribution of cell surface P-selectin in clathrin-coated pits affects leukocyte rolling under flow. *J. Cell. Biol.* 163: 1385-95.

**Silverman JS, Tamsen A.** (1998) CD34 and factor XIIIa-positive microvascular dendritic cells and the family of fibrohistiocytic mesenchymal tumors. *Am. J. Dermatopathol.* 20:533-6.

**Simons K, Vaz W. L** (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 269-95.

**Shi E, Kan M, Xu J, Wang F, Hou J, McKeehan W. L** (1993) Control of fibroblast growth factor receptor kinase signal transduction by heterodimerization of combinatorial splice variants. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3907-18.

**Simmons D, Makgoba M.W, Seed B** (1988) ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature.* 331: 624–627.

**Simmons D. L** (1995) The role of ICAM expression in immunity and disease *Cancer Surv.* 24: 141-55.

**Sligh J. E, Ballantyne C. M, Rich S. S, Hawkins H. K, Smith C.W, Bradley A, Beudet A. L** (1993) Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule1 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8529–8533.



**Smith J. W, Piotrowicz R. S, Mathis D** (1994) A mechanism for divalent cation regulation of  $\beta$ 3-integrins. *J. Biol. Chem.* 269: 960-967.

**Snapp K.R, Heitzig C.E, Kansas G.S** (2002) Attachment of the PSGL-1 cytoplasmic domain to the actin cytoskeleton is essential for leukocyte rolling on P-selectin. *Blood.* 99: 4494–4502.

**Somersalo K, Carpen O, Saksela E, Gahmberg C. G, Nortamo P, Timonen** (1995) T Activation of natural killer cell migration by leukocyte integrin-binding peptide from intracellular adhesion molecule-2 (ICAM-2). *Biol Chem.* 270: 8629-36.

**Springer T. A** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 346: 425–434.

**Springer T. A** (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1: 301–314.

**Stan R. V, Roberts W. G, Predescu D, Ihida K, Saucan L, Ghitescu L, Palade G. E** (1997) Immunolocalization and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Mol Biol Cell.* 8:595-605.

**Stanners C. P** (1998) *Cell Adhesion and Communication Mediated by the CEA Family.* Harwood Press. Amsterdam. 1–302.

**Staunton D. E, Dustin M. L, Springer T. A** (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature.* 339: 61-64.

**Steehmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, Borges E, Lenter M, Kocher H. P, Kleuser B, Vestweber D** (1995) The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*. 373: 615-20.

**Subramaniam M, Koedam J. A, Wagner D. D** (1993) Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell*. 4: 791–801.

**Suda J, Sudo T, Ito M, Ohno N, Yamaguchi Y, Suda T** (1992) Two types of murine CD34 mRNA generated by alternative splicing. *Blood*. 79: 2288-95.

**Sundberg U, Beauchemin N, Obrink B** (2004) The cytoplasmic domain of CEACAM1-L controls its lateral localization and the organization of desmosomes in polarized epithelial cells. *Cell. Sci*. 117: 1091-104.

**Sunil K. S, Bamba P. S, Perkins B. N, Luscinskas F. W** (2001) *in vivo* Real-Time Imaging of Vascular Endothelial-Cadherin during Leukocyte Transmigration Across Endothelium. *The Journal of Immunology*. 167: 2323-2330.

**Sutherland D. R, Marsh J. C, Davidson J, Baker M. A, Keating A, Mellors A** (1992) Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by *Pasteurella haemolytica* glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells. *Exp. Hematol*. 20: 590-9.

**Suzuki S, Argraves W. S, Arai H, Languino L. R, Pierschbacher M.D, Ruoslahti E (1987)** Amino acid sequence of the vitronectin receptor subunit and comparative expression of adhesion receptor mRNAs. *J. Biol. Chem.* 262: 14080-14085.

**Tadokoro S, Shattil S. J, Eto K, Tai V, Liddington R. C, de Pereda J. M, Ginsberg M. H, Calderwood D. A (2003)** Talin binding to integrin  $\beta$  tails: a final common step in integrin activation. *Science.* 302: 103-106.

**Tamkun J. W, DeSimone D. W, Fonda D, Patel R. S, Buck C, Horwitz A. F, Hynes R. O (1986)** Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell.* 46: 271-282.

**Tan Y, Low K. G, Boccia C, Grossman J, Comb M. J (1994).** Fibroblast growth factor and cyclic AMP (cAMP) synergistically activate gene expression at a cAMP response element. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7546-56.

**Tanaka T, Nakamura N, Kitagawa Y, Shigeta H, Hasegawa G, Obayashi H, Miyasaka M, Nakao H, Makino S, Kondo M (2000)** Prediction of diabetes in Biobreeding/Aburahi rats by the measurement of soluble L-selectin. *Autoimmunity.* 32: 101-7.

**Tang D. G, Grossi I. M, Diglio C. A, Honn K. V (1993)** 12(S)-HETE promotes tumor cell adhesion by increasing surface expression of  $\alpha v \beta 3$  integrins on endothelial cells. *Int. J. Cancer* 54: 102-111.

**Tang D. G, Chen Y. Q, Diglio C. A, Honn K. V** (1993) Protein kinase C-dependent effects of 12(S)-HETE on endothelial cell vitronectin and fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* 121: 689-704.

**Tang D. G, Diglio, C. A Honn K. V** (1994) Activation of microvascular endothelium by 12(S)-HETE leads to enhanced tumor cell adhesion via upregulation of surface expression of  $\alpha v\beta 3$  integrin: A posttranscriptional, PKC- and cytoskeleton-dependent process. *Cancer Res.* 54: 1119-1129.

**Tang D. G, Chen Y, Newman P. J, Shi L, Gao X, Diglio C. A, Shimaoka M, Springer T. A** (2003) Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 703-716.

**Timar J, Bazaz R, Kimler V, Haddard M, Tang D. G, Robertson D, Taylor J. D, Honn K. V** (1995) Immunomorphological characterization and effects of 12(S)-HETE on a dynamic intracellular pool of the IIb  $\beta$  3 integrin in melanoma cells. *J. Cell. Sci.* 108: 2175-2186.

**Thompson J. A, Grunert F, Zimmermann W** (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J. Clin. Lab. Anal.* 5: 344-66.

**Thompson R. D, Wakelin M. W, Larbi K. Y, Dewar A, Asimakopoulos G, Horton M. A, Nakada M. T, Nourshargh S** (2000) Divergent effects of platelet-

endothelial cell adhesion molecule-1 and beta 3 integrin blockade on leukocyte transmigration in vivo. *J. Immunol.* 165: 426-34.

**Thompson R. D, Noble K. E, Larbi K. Y, Dewar A, Duncan G. S, Mak T. W, Nourshargh S** (2001) Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *Blood* 97: 1854-1860.

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 4350-4.

**Traenckner E. B. M, Pahl H. L, Henkel T, Schmidt K. N, Wilk S, Baeuerle P. A** (1995). Phosphorylation of human  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  on serines 32 and 36 controls  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  proteolysis and NF- $\kappa\text{B}$  activation in response to diverse stimuli. *EMBO. J.* 14: 2876-2883.

**Ukropec J. A, Hollinger M. K, Salva S. M, Woolkalis M. J** (2000) SHP2 Association with VE-Cadherin Complexes in Human Endothelial Cells Is Regulated by Thrombin. *J. Biol. Chem.* 275: 5983-59860.

**Vanden Berghe W, Plaisance S, Boone E, De Bosscher K, Schmitz M. L, Fiers W, Haegeman G** (1998) p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-

activated protein kinase pathways are required for NF- $\kappa$ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* 273: 3285-3290.

**VandenBerg E, Reid M. D, Edwards J. D, Davis H. W.** (2004) The role of the cytoskeleton in cellular adhesion molecule expression in tumor necrosis factor-stimulated endothelial cells. *J. Cell. Biochem.*91: 926-37.

**Vallet B, Wiel E** (2001) Endothelial cell dysfunction and coagulation. *Crit. Care Med.* 29: S36-S41.

**Vaporciyan A. A, DeLisser H. M, Yan H. C, Mendiguren I. I, Thom S. R, Jones M. L, Ward P. A, Albelda S. M** (1993) Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment *in vivo*. *Science.* 262: 1580-1582.

**Vazeux R, Hoffman P. A, Tomita J. K, Dickinson E. S, Jasman R. L, St. John T, Gallatin W. M**(1992) Cloning and characterization of a new intercellular adhesion molecule ICAM-R. *Nature.* 360: 485-488.

**Virji M, Evans D, Griffith J, Hill D, Serino L, Hadfield A, Watt S. M.** (2000). Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*. *Mol. Microbiol.* 36: 784-95.

**Von Asmuth E. J. U, Smeets E. F, Ginsel L. A, Onderwater J. J. M, Leeuwenberg J. F. M, Buurman W.A** (1992). Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Immunol.* 22: 2519-2526.

**Vora M, Romero L. I, Karasek M. A** (1996) Interleukin-10 induces E-selectin on small and large blood vessel endothelial cells. *J. Exp. Med.* 184: 821-9.

**Wadgaonkar R, Pierce J. W, Somnay K, Damico R. L, Crow M. T, Collins T, Garcia J. G** (2004) Regulation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase pathways in endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 31: 423-31.

**Wagner D. D** (1993) The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb. Haemost.* 70:105-110.

**Wagner D. D** (1995) P-selectin chases a butterfly. *J Clin Invest.* 95: 1955-6.

**Ward P. A, Mulligan M. S, Vaporciyan A. A** (1993) Endothelial and leukocytic adhesion molecules in the pathogenesis of acute pulmonary injury. *Thromb. Haemost.* 70: 155-7.

**Ward P. A** (2003) Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. *Eur. Respir. J. Suppl.* 44: 22s-23s.

**Wautier J. L, Wautier M. P** (2001) Blood cells and vascular cell interactions in diabetes. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 25: 49-53.

**Wautier M. P, Chappey O, Corda S, Stern D. M, Schmidt A. M, Wautier J. L** (2001) Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: E685-94.

**Wautier J. L, Schmidt A. M** (2004) Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ. Res.* 95: 233-8.

**Weiping L, Earley K, Tantingco V, Hixson D. C, Liang C. T, Lin S. H** (1998) Association of an 80 kDa protein with C-CAM1 cytoplasmic domain correlates with C-CAM1-mediated growth inhibition. *Nature Publishing Group.* 16: 1141-1147.

**Wencel-Drake J. D, Plow E. F, Kunicki T. J, Keller D. M, Ginsberg M. H** (1986) Localization of internal pool of membraneglycoproteins involved in platelet adhesion responses. *Am. J. Pathol.* 124: 324-334.

**Wong M. X, Harbour S, Wee N, Janet L, Lau L. M, Andrews R. K, Denise E** (2004) Jackson Proteolytic cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is regulated by a calmodulin-binding motif *FEBS letters* 568: 70-78.

**Woo C. H, Lim J. H, Kim J. H** (2005) VCAM-1 upregulation via PKCdelta-p38 kinase-linked cascade mediates the TNF-alpha-induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288: L307-16.

**Williams L. A, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons D. L** (1999) Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM) *Mol. Immunol.* 36: 1175-1188.



**Wojciak-Stothard B, Williams L, Ridley A. J** (1999) Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J. Cell. Biol.* 145: 1293–1307.

**Wong M. X, Harbour S. N, Wee J. L, Lau L. M, Andrews R, K, Jackson D. E** (2004) Proteolytic cleavage of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) is regulated by a calmodulin-binding motif. *FEBS. Lett.* 568: 70-8.

**Woolkalis M. J, DeMelfi T. M, Blanchard N, Hoxie J. A, Brass L. F** (1995) Regulation of Thrombin Receptors on Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 270: 9868-9875.

**Wright S. D, Meyer B. C** (1986) Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 136: 1759-1764.

**Xiong J. P, Stehle T, Goodman S. L, Arnaout M. A** (2003) New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood.* 102: 1155-1159.

**Xi X. P, Graf K, Goetze S, Hsueh W. A, Law R. E** (1997) Inhibition of MAP kinase blocks insulin-mediated DNA synthesis and transcriptional activation of c-fos by Elk-1 in vascular smooth muscle cells. *FEBS. Lett.* 417: 283–286.

**Xu D. Z, Lu Q, Adams C. A, Issekutz A. C, Deitch E. A** (2004) Trauma-hemorrhagic shock-induced up-regulation of endothelial cell adhesion molecules is blunted by mesenteric lymph duct ligation. *Crit. Care. Med.* 32: 760-5.

**Yago T. A, Leppänen H, Qiu W. D, Marcus M. U, Nollert C, Zhu R. D, McEver R. P** (2002) Distinct molecular and cellular contributions to stabilizing selectin-mediated rolling under flow. *J. Cell. Biol.* 158: 787-799.

**Yonemura S, Hirao, M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S** (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* 140: 885-895.

**Yoo C. W, Song C. Y, Kim B. C, Hong H. K, Lee H. S** (2004) Glycated albumin induces superoxide generation in mesangial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 14: 361-8.

**Yoshida M, Westlin W. F, Wang N, Ingber D. E, Rosenzweig A, Resnick N Gimbrone M. A** (1996) Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J. Cell. Biol.* 133: 445-455.

**Yun M. R, Kim J. J, Im D. S, Yang S. D, Kim C. D** (2004) Involvement of NAD(P)H oxidase in the enhanced expression of cell adhesion molecules in the aorta of diabetic mice. *Life. Sci.* 75: 2463-72.

**Zanardo R. C, Cruz J. W, Martinez L. L, de Oliveira M. A, Fortes Z. B** (2003) Probucol restores the defective leukocyte-endothelial interaction in experimental diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 478: 211-9.

**Zandi E, Rothwarf D. M, Delhase M, Hayakawa M, Karin M** (1997) The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell.* 91: 243-252.

**Zhang C, Yang J, Jennings L. K** (2004) Leukocyte-derived myeloperoxidase amplifies high-glucose--induced endothelial dysfunction through interaction with high-glucose--stimulated, vascular non--leukocyte-derived reactive oxygen species. *Diabetes.* 53: 2950-9.

**Zhou H, Fuks A, Alcaraz G, Bolling T. J, Stanners C. P** (1993) Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J.Cell Biol.* 122: 951-960.

**Zollner O, Lenter M. C, Blanks J. E, Borges E, Steegmaier M, Zerwes H. G, Vestweber D** (1997) L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J. Cell. Biol.* 136: 707-716.