

2m 11.3193.1

Université de Montréal

Mécanismes par lesquels le VEGF induit la translocation de la P-sélectine
et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales.

par

Simon Rollin

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître *es* Science (M. Sc.)

en pharmacologie

Juillet 2003

© Simon Rollin, 2003



W

4

U58

2004

v. 106

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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



Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Mécanismes par lesquels le VEGF induit la translocation de la P-sélectine
et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Rousseau, Ph.D.

Président-rapporteur

Martin G. Sirois, Ph.D.

Directeur de recherche

Jean-François Tanguay, M.D.

Membre du jury



RÉSUMÉ

Nous avons récemment démontré que les effets inflammatoires du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sont médiés via la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF) par les cellules endothéliales (CE). De plus, le VEGF-A₁₆₅ induit la translocation de la P-sélectine à la surface des CE favorisant ainsi le roulement et l'adhésion des neutrophiles sur les CE. Toutefois, nous ne savons pas si la translocation de la P-sélectine induite par le VEGF-A₁₆₅ est médiée par l'activation des récepteurs VEGFR-1 et/ou R-2, ainsi que le corécepteur NRP-1 et si le PAF synthétisé est impliqué dans ce processus.

Un traitement avec le VEGF-A₁₆₅ (agoniste de VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1), VEGF-A₁₂₁ (agoniste de VEGFR-1 et VEGFR-2), VEGF-B (agoniste VEGFR1 et NRP-1), le *placental growth factor* (PlGF-1) (agoniste de VEGFR-1) et les VEGF-C et -D (agonistes de VEGFR-2) (10^{-9} M) ont induit une translocation rapide de la P-sélectine de l'ordre de 270, 135, 72, 80, 77 et 70% respectivement. De plus, afin de déterminer le rôle du PAF synthétisé par les *human umbelical vein endothelial cells* (HUVEC), nous avons utilisé des antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF dans la translocation de la P-sélectine induite par le VEGF et observé une inhibition jusqu'à 88%. Ces résultats démontrent que la translocation de la P-sélectine induite par le VEGF-A₁₆₅ sur les HUVEC implique l'activation de VEGFR-1 et VEGFR-2, lequel est potentialisé par la NRP-1, en plus de nécessiter la synthèse du PAF.

Mots clés : VEGF, PAF, P-sélectine, HUVEC, inflammation

ABSTRACT

We previously reported that vascular endothelial growth factor (VEGF-A₁₆₅) inflammatory effect is mediated by acute platelet-activating factor (PAF) synthesis from endothelial cells (EC). In addition, like PAF, VEGF-A₁₆₅ promotes P-selectin translocation on EC surface favoring the rolling and adhesion of neutrophils to EC. However, it is unknown whether VEGF-A₁₆₅ is mediating P-selectin translocation through VEGF receptor-1 (VEGFR-1) and/or VEGF receptor-2 (VEGFR-2) activation, and if the coreceptor neuropilin-1 (NRP-1) potentiates VEGF-A₁₆₅ activity. In addition, we wanted to assess if the synthesis of PAF mediated by VEGF-A₁₆₅ contributes to P-selectin translocation.

Treatment of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with VEGF analogs including VEGF-A₁₆₅ (VEGFR-1, R-2 and NRP-1 ligand), VEGF-A₁₂₁ (VEGFR-1 and R-2 ligand), placental growth factor-1 (VEGFR-1 ligand), VEGF-B (VEGFR-1 and NRP-1 ligand), VEGF-C and -D (VEGFR-2 ligands) at 10⁻⁹ M induced a rapid P-selectin translocation by 270, 135, 80, 72, 77 and 70% respectively. In addition, as VEGF-A₁₆₅ induces PAF synthesis in HUVEC, which are bearing PAF receptors, HUVEC were pretreated with PAF receptor antagonists which inhibited up to 88% the translocation of P-selectin mediated VEGF-A₁₆₅. These data show that VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin translocation in HUVEC implies the activation of VEGFR-1 and VEGFR-2, which is potentiated by NRP-1, and requires PAF synthesis.

Key words: VEGF, PAF, P-selectin, HUVEC, inflammation

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ _____	III
ABSTRACT _____	IV
LISTE DES FIGURES/TABLEAUX _____	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS _____	IX
REMERCIEMENTS _____	X
1.0. INTRODUCTION _____	1
1.1. Généralités sur le concept d'angiogenèse _____	1
1.1.1. L'endothélium _____	1
1.1.2. L'angiogenèse _____	1
1.2. Le <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) _____	3
1.2.1. Découverte du VEGF _____	3
1.2.2. Récepteurs du VEGF _____	4
1.3. L'inflammation _____	10
1.3.1. La réaction inflammatoire _____	10
1.3.2. Les corps de Weibel-Palade _____	11
1.3.3. Inflammation et angiogenèse _____	13
1.3.4. Le PAF est un médiateur inflammatoire _____	14
1.3.5. Les récepteurs du PAF _____	15
1.4. Adhésion des cellules inflammatoires aux cellules endothéliales _____	16
1.4.1. La famille des sélectines _____	16
1.4.2. Étapes d'adhésion aux cellules endothéliales _____	20
1.5. Problématique et but de l'étude _____	26
1.6. Approches expérimentales _____	27

2.0. ARTICLE SCIENTIFIQUE	28
2.1. Abstract	30
2.2. Introduction	31
2.3. Methods	33
2.4. Results	38
2.5. Discussion	45
2.6. Acknowledgments	51
2.7. References	52
2.8. Legends	58
2.9. Figures	63
3.0. DISCUSSION	76
3.1. Rôle des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1 dans la translocation de la P-sélectine endothéliale.	77
3.2. La synthèse du PAF médiée par le VEGF-A ₁₆₅ est essentielle à la translocation de la P-sélectine.	79
3.3. L'adhésion des neutrophiles aux HUVEC est dépendante de la P-sélectine, ainsi que de la synthèse du PAF.	80
3.4. Représentation schématique des résultats présentés dans le présent ouvrage.	82
4.0. CONCLUSION	86
5.0. RÉFÉRENCES	87

LISTE DES FIGURES / TABLEAUX

- Figure 1: Représentation des analogues du VEGF ainsi que ses récepteurs.
- Figure 2: Schéma général de la cascade d'évènements menant à l'adhésion des cellules inflammatoires aux tissus inflammés.
- Figure 3: Représentation des interactions connues entre différentes molécules d'adhésion.
- Figure 4: Mécanismes de translocation de la P-sélectine induite par le VEGF.
- Tableau 1: Protéines incluses dans les corps de Weibel-Palade.
- Tableau 2: Molécules impliquées dans l'adhésion des leucocytes aux CE.

Article

- Figure 1: P-selectin and vWf colocalize in Weibel-Palade bodies (WPB) of endothelial cells (rod-shaped like) and cluster to cell membrane upon stimulation.
- Figure 2: VEGF analogs induce P-selectin cell-surface expression in HUVEC.
- Figure 3: Expression and regulation of VEGF receptors in HUVEC.
- Figure 4: Contribution of VEGF receptors on P-selectin translocation.
- Figure 5: Contribution of NRP-1 on P-selectin translocation in HUVEC
- Figure 6: PAF-receptor expression in HUVEC.
- Figure 7: PAF synthesis mediated by VEGF analogs in HUVEC.
- Figure 8: Role of PAF and its receptors on VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin translocation.
- Figure 9: Contribution of P-selectin on VEGF-A₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to HUVEC.
- Figure 10: Contribution of VEGF receptors on neutrophil adhesion to HUVEC.
- Figure 11: Contribution of NRP-1 on neutrophil adhesion to HUVEC.

Figure 12: Role of PAF and its receptors on VEGF-A₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to HUVEC.

Figure 13: Proposed mechanisms by which VEGF-A₁₆₅ and its analogs mediate P-selectin translocation and neutrophil adhesion to endothelial cells.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CD62P	<i>cluster of determination 62P (P-selectin)</i>
CE	cellule endothéliale
cWP	corps de Weibel-Palade
Lyso-PAF-AT	lyso-PAF acétyltransférase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
NRP-1	neuropiline-1
PAF	facteur d'activation plaquettaire
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
rPSGL-Ig	<i>recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 Ig</i>
sPLA ₂	phospholipase-A ₂ de type sécrétoire
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-1	VEGF récepteur 1
VEGFR-2	VEGF récepteur 2
vWf	von Willebrand <i>factor</i>

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Martin G. Sirois pour m'avoir donné la chance de découvrir le domaine de la recherche fondamentale, en me permettant de faire deux stages aux cours de mes études sous-graduées, ainsi qu'en me dirigeant dans mes travaux de maîtrise. Ses conseils, ses idées et son support financier m'ont permis d'apprendre et de progresser dans le domaine.

Je remercie le Département de pharmacologie et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier et la qualité des études offertes.

Je remercie du fond du cœur mes collègues de travail pour leur bonne humeur et leur soutien scientifique, Caroline Lemieux, Catherine Marchand, Stéphanie Lapointe, Judith Favier, Julie Lacombe, David Gélinas, Pascal Bernatchez, Alexandre Brkovic, Paul-Eduard Neagoe, Guillaume Voghel et Pedro Geraldès. Un merci spécial à Ricardo Maliba et François Tremblay pour leur humour «particulier».

J'adresse un merci spécial à Dominique Lauzier, Dominique Chevalier, Louis Villeneuve et Véronique Philibert pour leur soutien technique, mais principalement leur amitié.

Je remercie Dr Guy Rousseau, Dr Martin G. Sirois et Dr Jean-François Tanguay pour l'évaluation de mon mémoire de maîtrise.

Je remercie sincèrement mes parents pour leur amour et leurs directives de vie qui m'ont aidé à me rendre là où je suis. À Lydia pour sa patience indéfectible, ses conseils judicieux et son amour sans borne.

1.0. INTRODUCTION

1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE CONCEPT D'ANGIOGENÈSE

1.1.1. L'endothélium

C'est en 1865 que His baptisa la monocouche cellulaire tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins comme étant l'endothélium; faisant la différence entre le « vrai » et le « faux » épithélium. Les vaisseaux sanguins composent le réseau de distribution du sang pour toutes les parties du corps. Ces vaisseaux sont de tous calibres, allant d'environ 10 μm pour les capillaires à 2 cm pour l'aorte humaine. Après cette observation, la croyance était que cette monocouche de cellules ne servait que de barrière physique entre le sang et les tissus. Au cours du dernier siècle, des évidences grandissantes suggérèrent que cette simple monocouche joue en fait un rôle essentiel au niveau de l'homéostasie générale. L'endothélium fût souvent associé à l'accumulation et à la transmigration de leucocytes durant l'inflammation (1), ainsi qu'à la prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) médiales dans la lumière vasculaire aux endroits où l'endothélium était absent (2). De plus, Henscher démontra en 1922 que les cellules endothéliales (CE) étaient directement impliquées dans le développement de thromboses. Les rôles de l'endothélium commençaient alors à peine à être connus.

1.1.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. C'est un phénomène très complexe requérant une séquence

d'événements essentiels et devant intervenir à des moments précis. En 1939, Clark et Clark rapportèrent la séquence d'évènements qui constitue le processus angiogénique (3). En premier lieu, les CE de capillaires ou de veinules post-capillaires sont soumises à une intense activation en réponse à un stimulus angiogénique local. Par la suite, il se produit une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une dégradation protéolytique de la membrane basale des CE, permettant ainsi la migration des CE en direction du stimulus angiogénique. Les CE subissent alors un changement morphologique: elles s'allongent, s'alignent et bourgeonnent pour ensuite se diviser et se multiplier, permettant ainsi au tubule de croître et de former la structure tridimensionnelle du capillaire vers la source de stimulation (4). La dernière étape consiste en la maturation du vaisseau, celle-ci étant accomplie par la reconstruction de la membrane basale. Le développement vasculaire est un phénomène essentiel qui est retrouvé dans plusieurs situations. La guérison vasculaire en condition inflammatoire (5), en situation ischémique (6), lors du développement des organes durant l'embryogenèse (7) et pendant le cycle menstruel de la femme ne sont que quelques exemples des conditions physiologiques requérant le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Par contre, lorsque l'angiogenèse échappe au contrôle physiologique, elle peut participer au développement de nombreuses pathologies (tumeurs, métastases ; 8). Par exemple, Judah Folkman suggéra en 1971 qu'à partir d'un certain stade (1 mm^3), la masse tumorale devenue trop grande doit impérativement recruter des CE environnantes pour former son propre système de circulation, dans le but d'accroître le flot sanguin l'irriguant (8). Cette transition vers une phase angiogénique permet la prolifération de la masse tumorale ainsi que la migration de cellules tumorales dans la circulation systémique, menant à la formation de métastases.

1.2. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

1.2.1. Découverte du VEGF

Le VEGF fut d'abord considéré comme le facteur angiogénique X retrouvé dans les rétinopathies à caractère angiogénique (9). En 1948, Michaelson suggéra que, dans le développement de la rétinopathie pathologique, la rétine relâche dans le corps vitreux un facteur angiogénique encore inconnu capable d'induire une néovascularisation non seulement locale (rétine), mais également distale (iris). Des études récentes ont démontré que ce facteur X n'est nul autre que le VEGF et qu'en plus d'être retrouvé dans les rétinopathies prolifératives (10,11), il est également secrété par divers types cellulaires (11, 12).

Le VEGF fut initialement isolé dans un milieu de culture de cellules tumorales et comme un facteur agissant sur l'augmentation de la perméabilité vasculaire (13). Quelques années plus tard, le gène codant pour la protéine du VEGF humain fut identifié (14) et son analyse révéla qu'il est composé de 8 exons répartis sur une distance approximative de 14 Kb sur le chromosome 6p21.3 (11). Par épissage alternatif, le VEGF est produit sous 5 isoformes (206, 189, 165, 145 et 121 acides aminés), le VEGF₁₆₅ et le VEGF₁₂₁ sont les deux isoformes les plus abondants (15-17). Les protéines recombinantes des VEGF-A₁₆₅, 189 et 206 sont capables de lier fortement l'héparine grâce à leur « *heparin binding domain* » (18). Depuis, cinq différents gènes ont été identifiés comme étant apparentés au gène du VEGF-A: le « *placental growth factor* » (isoformes PlGF-1 et -2), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et l'homologue viral VEGF-E (19-21). Le VEGF-A₁₆₅ demeure à ce jour le membre de la famille du VEGF qui est le plus étudié.

Depuis sa découverte, plusieurs effets ont été associés au VEGF-A₁₆₅ sur les CE. Plusieurs groupes ont démontré qu'il est capable d'induire, dans les CE, une accumulation transitoire de calcium cytoplasmique (22), des changements morphologiques (23), la prolifération et la migration (24). Cette dernière propriété a fasciné les scientifiques s'intéressant au phénomène, puisque l'angiogenèse est un processus complexe impliquant la dégradation de la membrane basale vasculaire et de la matrice extracellulaire, ainsi que la migration et la prolifération des CE. Le VEGF-A₁₆₅ possède la capacité d'influencer chacune de ces étapes de façon directe ou indirecte, faisant de ce facteur de croissance une molécule de premier ordre lors de l'angiogenèse pathologique. Par ailleurs, la délétion d'un seul allèle du gène codant pour le VEGF-A est létal (jour 10,5 de gestation chez la souris) suite à des malformations dans le développement des vaisseaux sanguins, suggérant son étroite relation dans le développement embryonnaire des vaisseaux (26-27). Enfin, des études *in vivo* ont démontré que le VEGF-A₁₆₅ est également un facteur inflammatoire et angiogénique (24) et que ses activités ne sont pas exclusivement limitées aux CE, car il augmente la migration des monocytes (cellules inflammatoires) (25). Ces dernières données renforcent donc l'hypothèse voulant que le VEGF-A₁₆₅ soit capable de provoquer une réponse inflammatoire pouvant mener à l'angiogenèse.

1.2.2. Récepteurs du VEGF

Des études ont démontré que le VEGF-A₁₆₅ exerce ses multiples actions sur les CE via l'activation de récepteurs de type tyrosine kinase: le VEGFR-1, aussi nommé flt-1 (fms-like tyrosine kinase-1) (28) et le VEGFR-2, ou flk-1/KDR (fetal liver kinase) (29). Ces deux récepteurs sont constitués de 7 domaines de type immunoglobuline, d'une seule région transmembranaire et d'une extrémité intracellulaire à activité tyrosine kinase (30-

31). Le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont les deux sites principaux de liaison du VEGF-A₁₆₅, avec une constante d'affinité (Kd) de 10-20 pM (28) et 75-125 pM (29) respectivement. Notons également qu'il existe un autre récepteur de type tyrosine kinase associé à la famille des VEGFR; le VEGFR-3, mais ce dernier n'est pas présent dans les CE du lit vasculaire, il n'est retrouvé que dans l'endothélium lymphatique (32). Les isoformes VEGF-A₁₂₁ et VEGF-A₁₆₅ et les analogues PlGF-1, PlGF-2 et VEGF-B ont la capacité de lier la glycoprotéine de ~180 kDa qu'est le VEGFR-1 (Figure 1 ; 28). Il est intéressant de noter que la phosphorylation du VEGFR-1 est très difficile à détecter et qu'en plus, dans les CE, il n'y a pas d'activité proliférative, migratoire ou de changement du cytosquelette associés à ce récepteur (33-34). La question du rôle principal du VEGFR-1 a été clairement posée par une expérience d'inactivation génique ciblée où le domaine tyrosine kinase intracellulaire de ce récepteur a été supprimé tandis qu'était conservé le domaine extracellulaire de liaison du VEGF (35). Les vaisseaux de ces souris sont apparemment normaux et la perméabilité vasculaire est normale (35). Ces résultats suggèrent donc un rôle prédominant du domaine extracellulaire (et non du domaine tyrosine kinase) du VEGFR-1 qui pourrait agir comme leurre (*decoy receptor*), capturant le VEGF-A₁₆₅ et régulant ainsi la concentration du ligand disponible pouvant se lier au VEGFR-2 (33). Dans ce cas précis, la présence de PlGF-1, PlGF-2 ou de VEGF-B serviraient à déplacer le VEGF-A₁₆₅ vers le VEGFR-2, expliquant l'activité de potentialisation du PlGF-1 sur les activités biologiques du VEGF-A₁₆₅ à faibles concentrations (33).

Les isoformes VEGF-A₁₂₁ et VEGF-A₁₆₅ ainsi que les analogues VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E ont la capacité de lier la glycoprotéine de ~200-230 kDa qu'est le VEGFR-2 (Figure 1 ; 29). La phosphorylation de VEGFR-2 est plus puissante que celle de VEGFR-1

et mène à la prolifération, la migration et le changement de morphologie des CE (34-36), en plus d'entraîner une synthèse accrue du facteur d'activation plaquettaire (PAF) (37). De plus, de nombreux types de cellules n'exprimant pas ces récepteurs ont montré une forte réponse mitogénique et/ou chimiotactique au VEGF-A₁₆₅ lorsqu'elles furent transfectées avec un plasmide codant pour le VEGFR-2 (28, 34). En revanche une telle activité n'a pas été observée lorsque ces cellules furent transfectées avec le gène du VEGFR-1 (34).

En plus de ces récepteurs à activité tyrosine kinase, il a été démontré en 1998 que les actions médiées par le VEGF-A₁₆₅ sont potentialisées par sa capacité de se lier à la neuropiline-1 (NRP-1) (38). En effet, il a été démontré que la liaison du VEGF-A₁₆₅ à la NRP-1 était médiée par la région codée par l'exon 7 du gène du VEGF. Cet exon n'est pas transcrit lors de l'épissage menant à la synthèse du VEGF-A₁₂₁, ce qui explique l'incapacité de ce dernier à lier la NRP-1 (39). Par contre, les analogues PlGF-2, VEGF-B et VEGF-E ont cependant cette région codante (exon 7) dans leurs gènes, ce qui leur confèrent la capacité de se lier à la NRP-1.

La NRP-1 possède un site de liaison extracellulaire comprenant deux domaines '*complement-binding*' (CUB), deux domaines d'homologie du facteur de coagulation V/VIII, un domaine MAM (meprin, A5) notamment impliqué dans l'homo- et l'hétérodimérisation du récepteur (39), un domaine transmembranaire très court et une chaîne cytoplasmique d'environ 40 acides aminés. Ce site récepteuriel a d'abord été identifié comme un récepteur pour les séphorines, des molécules impliquées dans le développement et le guidage des axones lors du développement neuronal (40-42).

Nous avons démontré dans le laboratoire que la NRP-1 joue un rôle majeur sur les effets médiés par le VEGF-A₁₆₅. En effet, ce corécepteur potentialise les effets biologiques en augmentant significativement la migration des CE, leur prolifération ainsi que la synthèse de PAF lorsque ces dernières sont stimulées par le VEGF-A₁₆₅ (ligand pour le VEGFR-2 et NRP-1) (38). Notons que le VEGF-B et le PlGF-2 sont capables de lier le VEGFR-1 et la NRP-1, mais qu'il n'y a pas à ce jour d'effet biologique décrit démontrant que la NRP-1 puisse potentialiser les effets reliés à l'activation de VEGFR-1.

Des données des plus intéressantes viennent de l'inactivation génique des récepteurs du VEGF chez la souris, par recombinaison homologe. Ainsi, les souris VEGFR-2^{-/-} meurent à 7,5-8,5 jours de gestation dû au fait de l'absence de différenciation des angioblastes en CE (43). Suite à l'inactivation du VEGFR-1 chez les souris (VEGFR-1^{-/-}), le développement des CE est normal à partir des angioblastes, mais l'assemblage tridimensionnel des vaisseaux est manquant, ce qui provoque la mort pendant le développement (8,5 jours) (44). Enfin, lors de l'inactivation génique de la NRP-1 chez les souris (NRP-1^{-/-}) le développement est également compromis au point d'être létal au jour 12,5-13,5 de gestation (45). L'effet majeur est un retard important dans le développement des fibres nerveuses crâniennes et spinales exprimant la NRP-1, en plus d'un développement vasculaire enrayé. Ainsi, sans la NRP-1, les vaisseaux sanguins brachiaux se développent de façon inappropriée et le réseau vasculaire est désorganisé, ce qui est létal (45).

En conclusion, le facteur de croissance VEGF-A et ses récepteurs, agissent de façon essentielle dans le développement embryonnaire pour synchroniser et organiser l'architecture vasculaire. Ce fait est corroboré par la létalité d'une délétion génique de n'importe quel des récepteurs du VEGF-A. Le VEGF-A et ses récepteurs sont impliqués dans plusieurs processus biologiques tels que la prolifération cellulaire et la migration cellulaire, des processus essentiels lors du développement.

Figure 1 : Représentation des analogues du VEGF-A ainsi que ses récepteurs. Le VEGF-A₁₆₅ est capable de se lier à VEGFR-1, VEGFR-2 et à la NRP-1, mais se lie pas au VEGFR-3 de l'endothélium lymphatique. Le VEGF-A₁₂₁ se lie à VEGFR-1 et VEGFR-2 et non à la NRP-1. Les analogues PlGF-1 et PlGF-2 ont la capacité de se lier au VEGFR-1, mais seul le PlGF-2 peut lier la NRP-1. Le VEGF-B, peut se lier à VEGFR-1 ainsi qu'à NRP-1. Pour le VEGF-C et VEGF-D ils sont capables de se lier au VEGFR-2, mais sans se lier à la NRP-1. De plus, ces deux derniers sont les seuls analogues capable de se lier au VEGFR-3 situé sur l'endothélium lymphatique. En ce qui concerne le VEGF-E, il se lie au VEGFR-2 ainsi qu'à la NRP-1.

VEGF-A₁₆₅ VEGF-A₁₆₅ VEGF-A₁₆₅ VEGF-A₁₆₅

VEGF-A₁₂₁ VEGF-A₁₂₁

PlGF-1

PlGF-2

VEGF-B

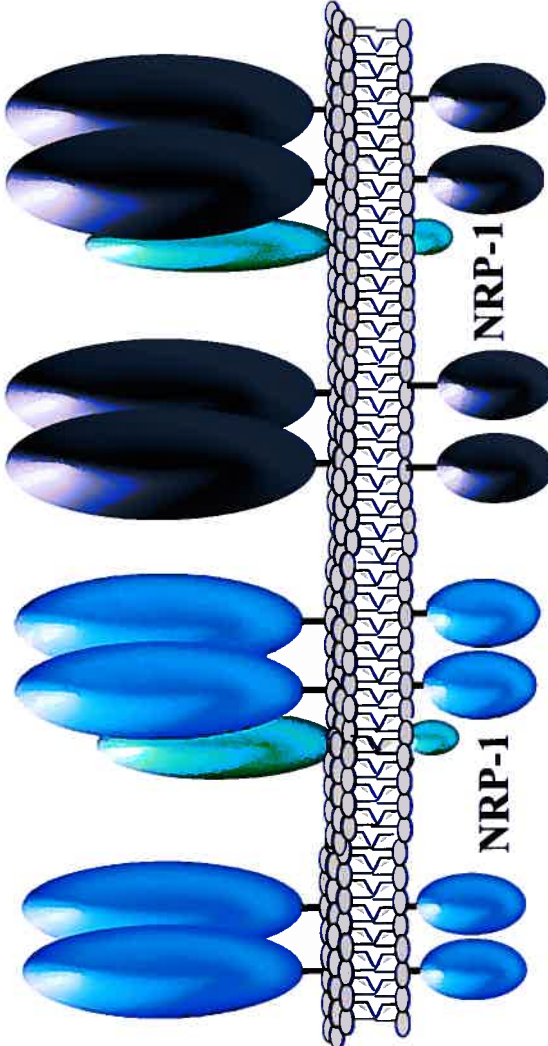
PlGF-2

VEGF-B

VEGF-C

VEGF-D

VEGF-E



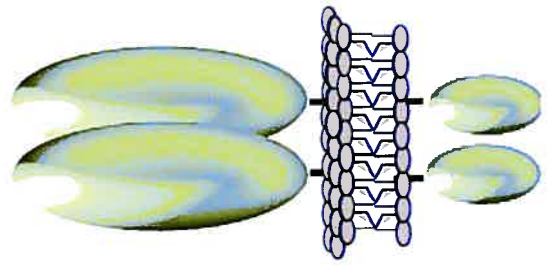
VEGFR-1

VEGFR-1

VEGFR-2

VEGFR-2

VEGF-C
VEGF-D



VEGFR-3

Endothélium Vasculaire

Endothélium Lymphatique

1.3. L'INFLAMMATION

1.3.1. La réaction inflammatoire

Chez l'homme, le système immunitaire sert de système de défense. Ce système sert à maintenir le corps de l'hôte fonctionnel, ainsi qu'à le défendre contre les intrusions extérieures. La première ligne de défense est le tégument (la peau), qui agit comme une barrière physique contre la pénétration d'agents pathogènes. Par contre, lorsqu'une brèche survient, une seconde ligne de défense entre en jeu; c'est l'inflammation. C'est dans l'antiquité que furent décrits les 4 signes cardinaux de l'inflammation: la rougeur, la chaleur, l'enflure et la douleur. Avec l'amélioration des techniques scientifiques il fut aisé de déterminer que la rougeur et la chaleur observées étaient dues à l'augmentation du flot sanguin dans les vaisseaux sanguins situés à proximité du site inflammé. Julius Cohnheim (1839-1884) nota que l'inflammation était associée à une altération locale de la microcirculation, en plus de voir une augmentation de l'adhérence/transmigration des cellules inflammatoires (monocytes, leucocytes) à travers la paroi vasculaire inflammée. L'enflure est subséquente à une augmentation de la perméabilité endothéliale qui cause l'exsudation de plasma et de protéines vasculaires au site inflammé. Quant à la douleur, elle survient suite à l'irritation des terminaisons nerveuses locales par les agents pro-inflammatoires relâchés par les cellules environnantes.

L'inflammation se divise en 2 phases: aiguë et chronique (45, 46). L'inflammation aiguë (premier stade de l'inflammation) est une réponse rapide, non spécifique et stéréotypée. Elle ne comporte pas de composante immunologique, et opère toujours de la même façon quelque soit l'agent causal. L'inflammation aiguë, ou hyperperméabilité

vasculaire, est une conséquence directe de l'effet des médiateurs inflammatoires sur la contraction des CE, donc de la formation de brèches intercellulaires (*gap junctions*), conduisant à l'extravasation des protéines plasmatiques. Ainsi, la zone affectée devient rouge, chaude et enflée; le sérum sanguin s'échappe des vaisseaux dilatés et distend les interstices tissulaires, constituant l'œdème.

L'inflammation chronique (deuxième stade de l'inflammation) est de longue durée et implique généralement une réponse immunitaire spécifique (45, 46). Ainsi, des lymphocytes s'ajoutent aux cellules inflammatoires déjà en place. De plus, le stimulus pro-inflammatoire active les CE qui, subséquemment, expriment à leur surface plusieurs types de molécules d'adhésion visant à faciliter le ralentissement et l'arrêt des cellules inflammatoires de la circulation au site inflammé. Les monocytes et leucocytes sont ensuite appelés à migrer vers l'interstitium en direction des molécules chimiotactiques pour y exercer plus de phagocytose et/ou d'actions protéasiques. Des réactions délétères peuvent donc endommager grandement les tissus environnants, en plus de causer une prolifération fibrovasculaire faisant partie du processus de réparation tissulaire qui est déjà activé.

1.3.2. Les corps de Weibel-Palade

En 1964, les docteurs Weibel et Palade ont identifié, à l'aide de la microscopie électronique, des organelles en forme de grains de riz « *rod-shaped like organelles* » d'environ 0,1 µm de largeur par 4 µm de longueur et situées dans le cytosol des CE (47). En reconnaissance de leurs travaux, la communauté scientifique a ainsi nommé ces organelles comme étant les corps de Weibel-Palade (cWP).

Ces cWP sont des organelles contenant plusieurs molécules impliquées dans divers phénomènes tels que l'hémostase (von Willebrand factor, vWf) et l'adhésion des cellules inflammatoires (CD-62P, CD63) (Tableau 1). Une sécrétion bien orchestrée de ces molécules par les CE est la meilleure façon de modifier rapidement et sélectivement le microenvironnement d'un lit vasculaire et donc de moduler l'interaction entre les processus de coagulation, de fibrinolyse et d'inflammation (48). Ainsi, suite à un stimulus approprié, il se produit une redistribution de ces organelles cytosoliques vers la membrane de façon à y fusionner, pour induire la relâche et/ou la translocation membranaire de différentes molécules qui entraîneront diverses activités biologiques. Par exemple, le facteur de von Willebrand est une molécule relâchée dans la circulation, essentielle à la cascade de la coagulation sanguine, car elle sert à lier le facteur VIII permettant ainsi l'activation du facteur X de la cascade de coagulation (49, 50). De son côté, la P-sélectine est une molécule transloquée à la surface de la membrane (51) et qui en liant son ligand « *P-selectin glycoprotein ligand* » (PSGL-1) sert à induire la cascade d'adhésion des cellules inflammatoires aux CE.

Au cours de l'inflammation, les CE sont soumises à plusieurs stimuli pro-inflammatoires et subissent plusieurs changements. Il se produit notamment une augmentation du niveau de calcium intracellulaire, une réorganisation du cytosquelette, ainsi qu'une redistribution des cWP vers la membrane plasmique. Les cWP contiennent des molécules pro-inflammatoires dont l'interleukine-8 (52) et sont donc des marqueurs importants de l'inflammation.

<u>Protéines</u>	<u>Actions</u>	<u>Références</u>
von Willebrand factor (vWf)	Hémostase	49, 50
P-sélectine (CD62P)	Adhésion des leucocytes	51, 53
LAMP (CD63)	Adhésion des leucocytes	54
Endothéline	Vasoconstriction	55
Interleukine-8	Réaction inflammatoire	52, 56
Tissu-plasminogen activator	fibrinolyse	57, 58

Tableau 1: Résumé des principales molécules retrouvées dans les corps de WP et qui seront secrétées ou transloquées lors d'un stimulus approprié. Adapté de: Histochem. Cell Biol., 2002; 117:113-122.

1.3.3. Inflammation et angiogenèse

Plusieurs évidences laissent supposer que l'inflammation précède et/ou accompagne presque automatiquement l'angiogenèse dans des conditions tant physiologiques que pathologiques (59). En effet, la vascularisation de la majorité, sinon la totalité des tumeurs, est caractérisée par une perméabilité vasculaire accrue avec la présence de cellules inflammatoires telles que les monocytes et neutrophiles (59). Bien que plusieurs autres facteurs de croissance, tels que le « *basic* ou *acidic fibroblast growth factor* » et l'« *epidermal growth factor* » (24, 60), soient capables d'induire la prolifération et/ou la migration des CE, le VEGF-A₁₆₅ est le seul facteur de croissance capable d'induire une forte augmentation de la perméabilité vasculaire. Par ailleurs, les études du Dr Sirois ont démontré que l'effet inflammatoire du VEGF-A₁₆₅ est médié par la synthèse du PAF au niveau des CE (37). Il a de plus été démontré que cette synthèse de PAF joue un rôle prépondérant dans l'angiogenèse induite par le VEGF-A₁₆₅, renforçant ainsi l'hypothèse de la relation entre l'inflammation et l'angiogenèse (62). Il est également intéressant de noter que le PAF en soi possède la capacité d'induire l'angiogenèse *in vivo* (63).

1.3.4. Le PAF est un médiateur inflammatoire

Le facteur d'activation plaquettaire (PAF, 1-O-alkyl-2-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) est une molécule lipidique créée à partir de lipides membranaires (64). De nos jours, le PAF est connu pour être un puissant inducteur de multiples phénomènes biologiques tels que l'agrégation plaquettaire (65, 66), l'hypotension (67), la bronchoconstriction (68) et principalement sa capacité à engendrer l'inflammation (65, 66). Cette dernière propriété est imputable à l'augmentation de la perméabilité vasculaire qu'induit le PAF. En effet, le PAF se lie aux CE et active des changements au niveau du cytosquelette. Les changements morphologiques des CE se traduisent par une contraction transitoire de ces dernières et, subséquemment, par la formation de brèches intercellulaires permettant ainsi aux protéines plasmatiques de traverser vers l'interstitium (66, 69, 70).

Deux mécanismes bien distincts ont été décrits pour la synthèse du PAF. Le premier est nommé « *de novo* », et répond aux besoins physiologiques de l'organisme. L'activité des enzymes qui le compose est principalement dictée par la disponibilité en substrat et permet une synthèse de PAF basale et constitutive (71). La deuxième voie est celle du remodelage et semble davantage influencée par différents stimuli pro-inflammatoires ou pro-allergiques. La synthèse débute soit par l'activation d'une phospholipase A₂ (PLA₂) ou d'une transacylase indépendante du Coenzyme A (CoA-IT) capable d'hydrolyser un phospholipide membranaire (généralement le 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) générant ainsi une molécule d'acide arachidonique et une molécule de lyso-PAF, le précurseur du PAF. Ce dernier est par la suite transformé en PAF par la lyso-PAF acétyltransférase (Lyso-PAF-AT) (72, 73). Des études récentes réalisées dans notre laboratoire ont permis de préciser le mécanisme de la

synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ par les CE. En effet, le VEGF-A₁₆₅, via sa liaison avec le VEGFR-2, induit la phosphorylation de la p38 MAPK et de la p42/44 MAPK. Ces deux dernières enzymes participent ensuite à l'activation de la voie de remodelage du PAF, voie qui est en partie gouvernée par l'induction de la sPLA₂ type V (37, 74, 75).

1.3.5. Les récepteurs du PAF

Le PAF est un puissant médiateur inflammatoire (65, 66) qui agit suite à l'activation de son récepteur spécifique. Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et couplé à une protéine de type G (RCPG; 76, 77). Ce RCPG est retrouvé sur plusieurs types cellulaires tels que: les leucocytes, les cellules musculaires lisses et les CE (77). De plus, selon le type cellulaire, ce RCPG peut activer de façon spécifique une sous-unité G_i, G_s ou G_q (78-80) de façon à réguler les mécanismes intracellulaires tels que: l'augmentation de l'influx de Ca⁺⁺, l'activation de la protéine kinase C ou de la PLA₂ (81-82).

Il est cependant intéressant de noter que suite aux études de liaisons du groupe du Dr Bazan (1990), trois sites d'affinités différents et spécifiques ont été identifiés dont un à la surface membranaire et deux intracellulaires (81). Ces résultats innovateurs ont également mené à la distinction des deux sous-types de récepteurs du PAF intracellulaires. Ainsi, il existe un sous-type de récepteur au niveau du cytosol et un autre à la surface du noyau (77). D'autres études ont également été conduites avec des antagonistes des deux sous-populations de récepteurs du PAF (intracellulaire et membranaire). Ainsi, le CV-3988 se révèle être un antagoniste des récepteurs du PAF ($IC_{50\text{membranaire}} = 254 \text{ nM}$, $IC_{50\text{intracellulaire}}$

= 1,57 nM; 83-84) et démontre la capacité d'inhiber de façon dose-dépendante l'agrégation plaquettaire induite par le PAF (85). De plus, les courbes de liaison ont démontré que le CV-3988 agit en antagoniste non-spécifique des récepteurs du PAF (83). Alors que le BN 52021 est un antagoniste qui montre une spécificité beaucoup plus grande pour les récepteurs membranaires que pour les récepteurs intracellulaires ($IC_{50\text{membranaire}} = 164 \text{ nM}$, $IC_{50\text{intracellulaire}} = 1,62 \mu\text{M}$; 84). Enfin, le LAU8080 (BN 50730) est un composé qui est spécifique aux récepteurs intracellulaires du PAF, sans toutefois démontrer de sélectivité pour l'un ou l'autre des deux sous-types de récepteur intracellulaire ($IC_{50\text{membranaire}} = IC_{50\text{intracellulaire}} = 590 \text{ pM}$; 83, 86).

1.4. ADHÉSION DES CELLULES INFLAMMATOIRES AUX CELLULES ENDOTHÉLIALES

1.4.1. La famille des sélectines

Dans la cascade d'adhésion, plusieurs classes de molécules sont impliquées; les molécules chimiotactiques (i.e. leucotriène B₄), les molécules qui activent les cellules inflammatoires (i.e. PAF) et d'autres qui induisent la transmigration des cellules inflammatoires du flot sanguin et leur maintien près du site inflammé, (i.e. molécules d'adhésion). Il existe trois groupes de molécules d'adhésion: les sélectines, les « *cell adhesion molecules* » (CAM, des protéines à domaines immunoglobulines) et les intégrines (Tableau 2). La famille des sélectines est intéressante et essentielle à l'initiation de la cascade d'adhésion et est composée de trois membres: la E-sélectine, la L-sélectine et la P-sélectine (Tableau 2). Ces trois membres possèdent une conformation quasi identique et comportent un domaine extracellulaire lectine localisé à l'extrémité aminoterminal NH₂,

SÉLECTINES	Nom	Autre(s) nom(s)	Localisation	Ligands
	P-Sélectine	CD62P, GMP-140, PADGEM	CE, Plaquettes	PSGL-1
	E-Sélectine	CD62E	CE	150kD glycoproteins, CD11/CD18, PSGL-1
	L-Sélectine	CD62L, LECAM-1, LAM-1	Leucocytes	GlyCAM, MadCAM, CD34, Sgp 200

Protéines à domaines Ig	ICAM-1	CD54a	CE, Monocytes	CD11a/CD18, CD11b/CD18
	ICAM-2	CD102	CE	CD11a/CD18
	VCAM	CD106	CE	CD49d/CD29
	PECAM-1	CD31	CE, Leucocytes, Plaquettes	PECAM-1
	MadCAM	---	CE	L-sélectine, CD49d/ β 7
	GlyCAM	---	CE	L-sélectine

INTÉGRINES	CD11a/CD18	LFA-1 ; $\alpha_L\beta_2$	Leucocytes	ICAM-1 ; ICAM-2
	CD11b/CD18	Mac-1 ; $\alpha_M\beta_2$	Granulocytes ; monocytes	ICAM-1 ; iC3b
	CD11c/CD18	p150, 95; $\alpha_X\beta_2$	Granulocytes ; Monocytes	iC3b
	CD11d/CD18	$\alpha_d\beta_2$	Macrophages	ICAM-1
	CD49d/CD29	VLA-4; $\alpha_4\beta_1$	Lymphocytes; Monocytes; Eosinophiles	VCAM-1
	CD49d/ β 7	$\alpha_4\beta_7$	Lymphocytes	VCAM-1, MadCAM-1

Tableau 2 : Molécules impliquées dans l'adhésion des leucocytes aux CE.

CAM = cell adhesion molecule; (E)LAM = (endothelial) leucocyte adhesion molecule; GMP = granule membrane protein; ICAM = intercellular CAM; LFA = lymphocyte function-associated antigen; MadCAM = mucosal addressin CAM; PADGEM = platelet activation-dependent granule external membrane protein; PECAM = platelet endothelial CAM; PSGL-1 = P-selectin glycoprotein ligand; VCAM = vascular endothelial CAM; VLA = very late antigen.

Modifié de: Am. J. Hypert., 2001; 14 :page 44S-54S

un domaine EGF (homologue à *epidermal growth factor*), et des domaines « *consensus repeats* » (CR; 6 pour la E-sélectine, 2 pour la L-sélectine et 9 pour la P-sélectine). Finalement, elles possèdent un domaine hydrophobe transmembranaire et se terminent par une courte queue cytoplasmique en carboxyterminale COOH (87).

La E-sélectine est exprimée à la surface des CE suite à l'induction de sa transcription par l'IL-1 β ou les lipopolysaccharides (LPS) (88, 89). Cette synthèse protéique *de novo* est maximale 3-4 heures après la stimulation (90). Pour interagir avec les neutrophiles, la E-sélectine des CE lie la « *E-selectin ligand-1* », ESL-1, (91) et la « *P-selectin glycoprotein ligand-1* », PSGL-1, (92, 93) pour engendrer ces effets d'adhésion.

Des études de microscopie intravitale ont démontré que la fonction de la E-sélectine dans le roulement des cellules inflammatoires est similaire à celle de la P-sélectine (94, 95). Du fait de cette redondance fonctionnelle, les souris n'exprimant pas la E-sélectine, ne présentent que peu de différence dans le roulement des cellules inflammatoires (95). En revanche, seule la E-sélectine participe à la transition du roulement vers l'adhésion ferme. Ainsi, les souris E-sélectine^{-/-} présentent une diminution de l'adhésion ferme des cellules inflammatoires suite à une stimulation par une molécule chimiotactique (96). De plus, ces souris montrent de graves problèmes inflammatoires menant à une mort prématurée (97).

Le second membre de la famille est la L-sélectine. Cette molécule est exprimée de façon constitutive à la surface des microvilli des cellules inflammatoires (98). Elle est impliquée dans les étapes de la capture et du roulement des cellules inflammatoires à la surface des CE. Des études ont démontré que suite à la capture de leucocytes, la L-sélectine est clivée près de la membrane et ce, entre 1 à 5 minutes après le stimulus tel

qu'avec le leucotriène B₄, l'IL-8 ou le « *tumor necrosis factor- α* » TNF- α (99-101). Il a été proposé que ce clivage survient de façon normale pour permettre à la cellule inflammatoire de rouler vers le site où elle doit transmigrier. En effet, Walcheck et coll. ont démontré que les neutrophiles roulaient beaucoup moins rapidement sur une surface couverte du ligand de la L-sélectine (102).

La L-sélectine peut lier quatre types de ligands; GlyCAM-1, CD-34, MadCAM-1 et Sgp-200. Le « *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1* » (GlyCAM-1) est en fait un complexe moléculaire qui requiert trois éléments structuraux pour lier la L-sélectine; l'acide sialique, un fucose et un sulfate (103). Le CD34, qui est exprimé à la surface des CE (104) doit être glycosylé pour lier correctement la L-sélectine (105). Le « *mucosal addressin cell adhesion molecule-1* » MadCAM-1 (106) nécessite une modification dans sa chaîne de sucre (*carbohydrate*) pour être compatible avec la L-sélectine (107). Enfin, le Sgp200 est une glycoprotéine sulfatée servant de ligand pour la L-sélectine (108). Il est très intéressant de noter que la L-sélectine, tout comme la P-sélectine, peut se lier au PSGL-1, démontrant un rôle commun quant à leur implication dans le processus d'adhésion (109-111).

Le dernier membre de la famille des sélectines est la P-sélectine. Elle est emmagasinée dans les corps de WP des CE et dans les granules- α des plaquettes. Suite à un stimulus tel que par l'histamine ou la thrombine ces vésicules vont rapidement (<5 min) fusionner avec la membrane plasmique, de façon à relâcher (facteur de von Willebrand) ou exposer (P-sélectine) leurs constituants à la lumière vasculaire (112, 113). L'expression de la P-sélectine est maximale après 10 minutes et est maintenue pendant environ 30-60

minutes. Elle est par la suite réinternalisée par endocytose ou clivée et relarguée dans la circulation (113-116). De plus, avec un stimulus tel que l'IL-4 ou l'oncostatine, la transcription et l'expression protéique de la P-sélectine se trouvent augmentées pendant environ 72 heures (117). Le PSGL-1 est le ligand principal de la P-sélectine et nécessite des modifications dans ses chaînes de sucre (*carbohydrate*). Ainsi, pour son activité de liaison avec la P-sélectine, un acide sialique et un fucose doivent être ajoutés, en plus de greffer des chaînes latérales à un noyau-2- β -1,6-*N*-acetyl-gluosaminyltransferase, générées par l'enzyme noyau-2 (*core-2 enzyme*) (118-121).

La P-sélectine est un marqueur de l'inflammation aiguë. Lors d'un stimulus inflammatoire tel que mentionné ci-dessus, elle est rapidement transloquée à la membrane pour induire l'adhésion des cellules inflammatoires au CE. Comme le VEGF-A₁₆₅ est un facteur de croissance capable d'induire une réponse inflammatoire, nous étions par conséquent intéressé à déterminer les mécanismes par lesquels le VEGF-A₁₆₅ induit la translocation de la P-sélectine.

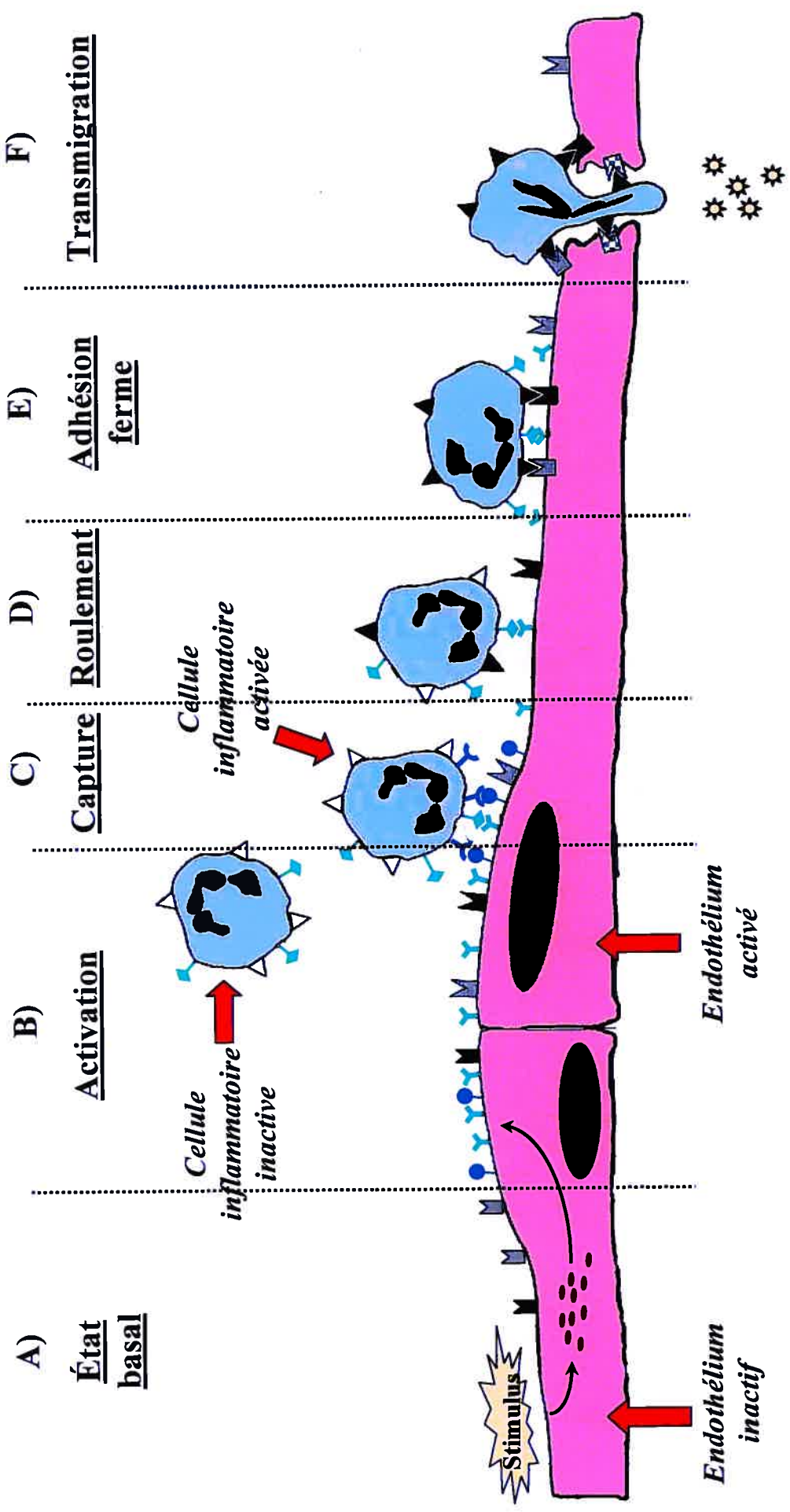
1.4.2. Étapes d'adhésion aux cellules endothéliales

Le processus inflammatoire est très complexe et comprend plusieurs étapes (pour revues; 87, 122). L'activation des CE à l'état basal par divers stimuli inflammatoires (Figure 2A) conduit à la translocation de la P-sélectine et à la synthèse du PAF (Figure 2B), favorisant l'adhésion des cellules inflammatoires aux CE. L'adhésion des cellules inflammatoires aux CE des vaisseaux sanguins comporte quatre étapes: la capture (*tethering*) et l'activation des cellules inflammatoires interagissant avec les CE (Figure 2C), le roulement à la surface des CE (Figure 2D), l'adhésion ferme aux CE (Figure 2E) et

finalement la transmigration entre les CE (Figure 2F). Avec l'amélioration constante des techniques d'investigation, la liste des molécules d'adhésion impliquées à chacune des étapes sus-mentionnées s'est agrandie et complexifiée, mais se résume à trois grandes familles: les sélectines, les CAM et les intégrines (Tableau 2).

Figure 2 : Schéma général de la cascade d'évènements menant à l'adhésion des cellules inflammatoires aux tissus inflammés. L'endothélium à l'état basal n'exprime pas de façon constitutive la P-sélectine ou le PAF (A). Lors d'un stimulus activateur, les cWP fusionnent avec la membrane plasmique, causant la translocation de la P-sélectine à la surface de la CE. Le PAF est également synthétisé à partir des lipides membranaires et exprimé à la surface de la CE (B). Suite à l'activation de l'endothélium, le PSGL-1 exprimé de la cellule inflammatoire entre d'abord en contact avec la P-sélectine des CE, capturant ainsi la cellule inflammatoire en plus de l'activer (C). La seconde étape est le roulement à la surface des CE, ce qui active de façon plus marquée la cellule inflammatoire qui verra les VCAM et ICAM interagir avec les intégrines activées de la cellule inflammatoire (D). L'étape suivante est celle de l'adhésion ferme, où la cellule inflammatoire s'aplatie à la surface des CE et n'est plus entraînée par le flot sanguin (E). Finalement, des molécules chimiotactiques sous-endothéliales vont attirer la cellule inflammatoire vers la lame basale, et d'autres molécules impliquées dans l'adhésion vont causer la transmigration (F).

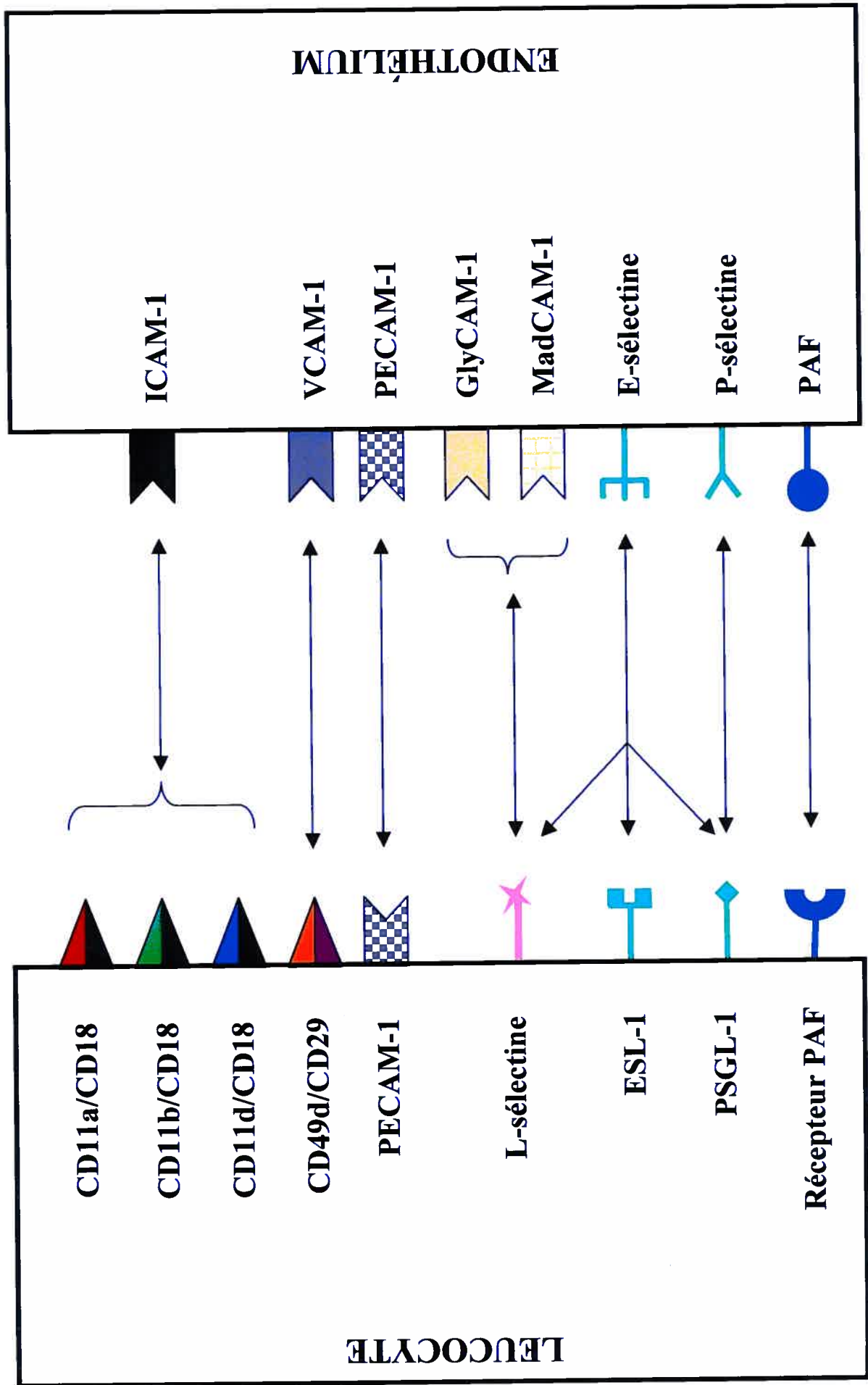
Figure 3 : Représentation des interactions ligands-récepteurs des différentes molécules d'adhésion. Représentation schématique des diverses molécules d'adhésion présentes à la surface de l'endothélium ainsi que sur une cellule inflammatoire (leucocyte), ainsi que leurs ligands ou récepteurs.



●	↔	↔	↔	⊞	⊞
●	↔	↔	↔	⊞	⊞
⊞	↔	↔	↔	⊞	⊞
⊞	↔	↔	↔	⊞	⊞
⊞	↔	↔	↔	⊞	⊞

● PAF ↔ Récepteur PAF ⊞ PECAM-1
 ⊞ P-sélectine ↔ PSGL-1 ⊞ Molécule chimiostatique
 ⊞ VCAM-1 ↔ Intégrine active ⊞ Intégrine inactive
 ⊞ ICAM-1 ↗ Corps de Weibel-Palade

Adapté de: Am. J. Hypert., 2001; 14: 44S-54S



La première étape de l'adhésion est celle de la capture. Elle correspond aux premières interactions moléculaires entre les CE des vaisseaux sanguins et les cellules inflammatoires. Cette étape est médiée par la famille des sélectines, plus précisément la P-sélectine. Cette molécule est rapidement transloquée à la surface de la membrane des CE de façon à être exposée à la lumière vasculaire. Ainsi, la P-sélectine sert de point d'ancrage pour son ligand, le PSGL-1 exprimé à la surface des cellules inflammatoires (87) médiant ainsi la capture de ces dernières. Notons également que la L-sélectine à la surface des cellules inflammatoires, agit également dans l'étape de la capture en liant notamment GlyCAM, ainsi que la P-sélectine elle-même (104). La capture conduit à l'activation des leucocytes. En diminuant leur vitesse, ce processus permet des interactions plus efficaces avec d'autres molécules activatrices, telles que les chimiokines (123) et le PAF (124), présentées à la surface des CE. En retour, ce contact activateur va entraîner la régulation à la hausse d'autres molécules d'adhésion, telles que les membres de la famille des intégrines.

La seconde étape est le roulement. Cette étape est caractérisée par un contact plus intime entre les cellules inflammatoires et les CE. Suite à la capture, il se produit une augmentation marquée du nombre de molécules d'adhésion à la surface des cellules inflammatoires. Il s'agit de membres de la famille des β intégrines, principalement $\alpha_L\beta_2$ (CD11a/CD18) et $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18) (125). Le rôle de ces intégrines est de ralentir davantage les cellules inflammatoires à la surface des CE, conduisant à leur arrêt complet près du site lésé/inflamé. Ce processus favorise l'interaction des molécules d'adhésion et active le processus suivant. Notons que la P-sélectine continue à jouer un rôle important à ce stade. En effet, chez des souris ayant subies une délétion des deux allèles du gène

codant pour la P-sélectine (P-sélectine^{-/-}) il y a une importante réduction du roulement des neutrophiles au niveau de l'endothélium (126).

La troisième étape de cette cascade est l'adhésion ferme. Cette étape est caractérisée principalement par l'arrêt complet des cellules inflammatoires au site où ils ont la possibilité de transmigrer vers l'espace sous-endothélial. À cette étape, la E-sélectine agit de façon non-négligeable. En effet, des souris ayant subi une délétion des deux allèles codant pour la E-sélectine (E-sélectine^{-/-}) montrent un nombre réduit d'adhésion ferme en réponse à des molécules chimiotactiques (96) ou à une stimulation par des cytokines (127). Les cellules inflammatoires sont principalement ancrées fermement aux CE par l'interaction de leurs intégrines (122). Ainsi, c'est principalement le CD18 (sous-unité β_2) des intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 qui s'active. En effet, des souris CD18^{-/-} présentent des défauts entre autre de recrutement des leucocytes dans le péritoine (128) et dans la peau (129). Le rôle de ces intégrines est de lier ICAM-1 présent à la surface des CE. ICAM-1 est régulée à la hausse par une synthèse protéique *de novo* qui est maximale entre 3-6 heures selon le stimulus inflammatoire (122). La présence de β_1 intégrine $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) à la surface de certaines cellules inflammatoires (macrophages, éosinophiles; 130) est de moindre importance par rapport aux β_2 intégrines, mais peut partiellement compenser le rôle des β_2 intégrines lorsque ces dernières sont manquantes (131, 132).

La dernière étape de cette cascade est celle de la transmigration. C'est la migration des cellules inflammatoires à travers la monocouche de CE. Le but de cette étape est de permettre aux cellules inflammatoires d'atteindre l'espace sous-endothélial de façon à rejoindre la source du signal chimiotactique qui est à l'origine de l'inflammation. La

famille des intégrines est très impliquée à ce niveau (CD11a/CD18 et $\alpha_4\beta_1$), ainsi que les ligands de la famille des CAM (PECAM-1 et ICAM-1), et en particulier PECAM-1. Ainsi, l'emploi d'un anticorps anti-PECAM réduit jusqu'à 90% la transmigration de monocytes et de neutrophiles à travers les CE (133, 134).

Ces étapes de l'adhésion peuvent donc évoluer vers deux possibilités: premièrement un processus de réparation normal qui mènera à une résolution et un retour à un tissu sain et fonctionnel. Inversement, ceci pourrait être la poursuite chronique d'un phénomène normal qui est devenu dégénératif et nuisible (arthrite rhumatoïde, inflammation chronique dans une plaque d'athérosclérose), qui est marqué par une affluence continue de cellules inflammatoires (46).

1.5. PROBLÉMATIQUE ET BUT DE L'ÉTUDE

Il est connu depuis longtemps que la P-sélectine est rapidement transloquée à la surface des CE suite à un stimulus approprié. Plus récemment il a été démontré que le VEGF et le PAF pouvaient induire une telle translocation. Par contre, il n'avait pas été démontré le rôle de chacun des récepteurs du VEGF dans la translocation de la P-sélectine ni s'il existait un lien direct entre cette translocation induite par le VEGF et la synthèse de PAF. Par conséquent, nous avons voulu investiguer le rôle des VEGFR-1, VEGFR-2 ainsi que le corécepteur NRP-1 dans la translocation de la P-sélectine à la surface des CE de veines de cordons ombilicaux humains (HUVEC). De plus, nous avons étudié la contribution respective des récepteurs intracellulaires et extracellulaires du PAF suite à une stimulation au VEGF- A_{165} sur le phénomène d'induction de la translocation de la P-sélectine. En seconde partie nous avons recherché, en condition statique, le rôle de la P-

sélectine et de son principal ligand (PSGL-1) dans l'adhésion de neutrophiles aux HUVEC stimulées par le VEGF-A₁₆₅. Enfin, nous avons étudié le rôle du PAF et de ses récepteurs dans l'adhésion des neutrophiles aux CE stimulées par le VEGF-A₁₆₅.

1.6. APPROCHES EXPÉRIMENTALES

Toutes les approches expérimentales utilisées dans ce mémoire se retrouvent de façon intégrale dans l'article qui suit.

2.0. ARTICLE

Re: Blood MS #2003-07-2272.R1

Title: VEGF-MEDIATED ENDOTHELIAL P-SELECTIN TRANSLOCATION: ROLE OF VEGF RECEPTORS AND ENDOGENOUS PAF SYNTHESIS

Dear Dr. Sirois:

Your revised manuscript has been successfully uploaded to Blood Manuscript Central. However, if you have not faxed your Author Statement, further review cannot begin. Please read below for more information.

If you have just submitted for early online posting on the journal's web site in First Edition (<http://www.bloodjournal.org/papbyrecent.shtml>), the instructions below do not apply to you, and you will be notified by journal staff individually about any future matters prior to posting. If you have submitted for review or revision, please continue to read below.

In order for your manuscript to re-enter into the review process, we must have the AUTHOR STATEMENT, signed by all coauthors. The form can be found for printing out at <http://www.bloodjournal.org/misc/authstatement.shtml>.

Please indicate your revised manuscript number, 2003-07-2272.R1, on the faxed form, and PLEASE INCLUDE THE ASSOCIATE EDITOR'S NAME.

Also, please go to <http://www.bloodjournal.org/misc/cts.shtml> to print out, fill out, and fax a COPYRIGHT TRANSFER FORM. Please fax it, along with the AUTHOR STATEMENT, to 202-776-0549.

You should refer to your revised manuscript ID number, 2003-07-2272.R1, and to your Associate Editor in all further correspondence with Blood's editorial office regarding this manuscript.

You can keep track of the progress of your revised manuscript by periodically logging into Blood Manuscript Central at <http://blood.manuscriptcentral.com>, where the status will be displayed in your Author Center.

Please let us know if you experience any problems with the system or if you have questions or concerns in general. We appreciate your continued interest in the Blood Journal.

Sincerely,

Editorial Office Staff
Blood, Journal of the American Society of Hematology
1900 M St. NW, Suite 200
Washington, DC 20036
202-776-0548 (tel.)
202-776-0549 (fax)
editorial@hematology.org (e-mail)

A) Déclaration des coauteurs d'un article



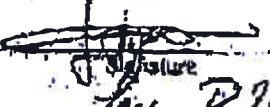
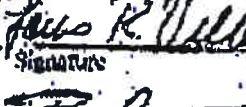
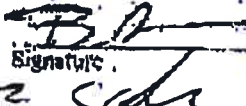
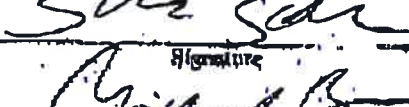
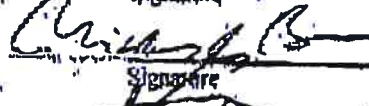
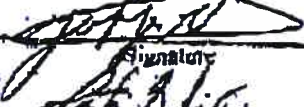

1 **Identification**
Simon Rollin
Département de pharmacologie, Faculté de médecine

2 **Description de l'article**
Titre: VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis

Liste des auteurs: Simon Rollin, Caroline Lemieux, Ricardo Maliba, Judith Fayier, Louis R. Villeneuve, Bruce G. Allen, Shay Baker, Nicolas G. Bazan, Yvonne Merhi, Martin G. Sirote.

Submission de la version corrigée à la revue: « Blood », Novembre 2003

3 **Déclaration de tous les coauteurs autres**
A titre de coauteur de l'article de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Simon Rollin inclue cet article dans son résumé de thèse qui a pour titre: Mécanismes par lesquels le VEGF induit la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales.

Caroline Lemieux Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Ricardo Maliba Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Judith Fayier Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Louis R. Villeneuve Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Bruce G. Allen Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Shay Baker Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Nicolas G. Bazan Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Yvonne Merhi Coauteur		le 11 décembre 03 Date
Martin G. Sirote Coauteur		le 11 décembre 03 Date

**VEGF-MEDIATED ENDOTHELIAL P-SELECTIN TRANSLOCATION:
ROLE OF VEGF RECEPTORS AND ENDOGENOUS PAF SYNTHESIS**

Simon Rollin^{1,2@}, Caroline Lemieux^{1,2@}, Ricardo Maliba^{1,2}, Judith Favier^{1,2}, Louis R. Villeneuve¹, Bruce G. Allen¹, Shay Soker³, Nicolas G. Bazan⁴, Yahye Merhi¹ and Martin G. Sirois^{1,2*}

¹Montreal Heart Institute, ²Department of Pharmacology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, ³Department of Urology, Children's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA, USA, and ⁴Neuroscience Center, LSU Health Sciences Center, New Orleans, LA, USA.

Running Title: VEGF-mediated P-selectin translocation

@S. Rollin and C. Lemieux contributed equally. Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and supported by grants from CIHR and Heart and Stroke Foundation of Québec.

Category: Hemostasis, Thrombosis and Vascular biology

Word count: Including title to discussion: 5 500; Abstract: 196

*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, PhD

Montreal Heart Institute

5000, Belanger Street

Montreal, QC, Canada, HIT 1C8

Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)

FAX: (514) 376-1355



ABSTRACT

We previously reported that vascular endothelial growth factor (VEGF-A₁₆₅) inflammatory effect is mediated by acute platelet-activating factor (PAF) synthesis from endothelial cells (EC). Like PAF, VEGF-A₁₆₅ promotes P-selectin translocation on EC surface. However, it is unknown whether VEGF-A₁₆₅ is mediating P-selectin translocation through VEGF receptor-1 (VEGFR-1) and/or VEGF receptor-2 (VEGFR-2) activation, and whether the coreceptor neuropilin-1 (NRP-1) potentiates VEGF-A₁₆₅ activity. In addition, we sought to determine whether the synthesis of PAF mediated by VEGF-A₁₆₅ contributes to P-selectin translocation. Treatment of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with VEGF analogs including VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, placental growth factor-1 (PlGF-1), VEGF-B, VEGF-C and -D (10^{-9} M) induced a rapid P-selectin translocation by 270, 135, 80, 72, 77 and 70% respectively. Pretreatment of HUVEC with a selective VEGFR-2 inhibitor (SU1498) inhibited the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, VEGF-C and -D, without affecting the effects mediated by PlGF and VEGF-B (VEGFR-1 analogs). Pretreatment with selective PAF-receptor antagonists inhibited up to 88% the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅. These data show that the activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 can lead to P-selectin translocation. However, maximal effect was mediated by VEGF-A₁₆₅ upon the activation of VEGFR-2/NRP-1 complex and requires PAF synthesis.

INTRODUCTION

Although vascular endothelial growth factor (VEGF) can induce as other growth factors the proliferation and migration of endothelial cells (EC), it is the only growth factor known so far able to promote protein extravasation (1-3). Furthermore, the vascular permeability increase mediated by VEGF seems to be linked to its angiogenic properties (1-4). The intensive research on VEGF led to the identification of five different VEGF isoforms of 206, 189, 165, 145 and 121 amino acids, which are now termed as VEGF-A_{206, 189, 165, 145 and 121}, and which are produced by alternative splicing of a single gene containing eight exons. The VEGF family also includes five different analogs: placental growth factor (PlGF-1 and -2), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and a viral homolog, VEGF-E. The actions of VEGF family members are mediated by the activation of selective tyrosine kinase receptors including VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR), which are expressed almost exclusively on EC, and VEGFR-3 (Flt-4), which is mainly limited to lymphatic endothelium. VEGF-A binds to VEGFR-1 and VEGFR-2; PlGF-1, PlGF-2 and VEGF-B bind to VEGFR-1; VEGF-C and D bind to VEGFR-2 and R-3; whereas VEGF-E interacts only with VEGFR-2 (5, 6; for reviews). Recent studies also reported that neuropilin-1 (NRP-1); a transmembrane receptor first described on axons in the developing nervous system (7), also acts as a coreceptor, complexing with VEGFR-1 and VEGFR-2 (8-10). NRP-1 enhances the binding of VEGF-A₁₆₅ to VEGFR-2 and potentiates various VEGF-A₁₆₅ biological activities (8). Such selectivity is attributable to the presence of VEGF-A exon 7 in VEGF-A₁₆₅, a domain that is lacking in VEGF-A₁₂₁, VEGF-C, VEGF-D and PlGF-1 (8, 11). On the other hand, although NRP-1 can interact with PlGF-2 and VEGF-B isoforms, which have a sequence homologous to the NRP-1 binding exon 7-encoded peptide of VEGF-A₁₆₅, NRP-1 does not potentiate their biological activities upon VEGFR-1 stimulation (9, 10).

Over the last years, we have shown in ECs that the inflammatory effect of VEGF-A₁₆₅ is mediated through the synthesis of a potent inflammatory mediator, namely platelet-activating factor (PAF) (12). We subsequently investigated the role played by VEGF-A receptors, and showed that VEGF-A₁₆₅ induces EC migration, proliferation and PAF synthesis through the activation of VEGFR-2, and that such effects can be potentiated by the expression of VEGFR-2 coreceptor neuropilin-1 (NRP-1) (13, 14), whereas the activation of VEGFR-1 in the presence or absence of NRP-1 had no or marginal contribution on these activities (13, 14).

The induction of acute endothelial PAF synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ might also play a pivotal role in the interaction between inflammatory cells and ECs (15-18). Indeed, VEGF-A₁₆₅, like other inflammatory mediators including histamine and thrombin, promotes the fusion of cytosolic Weibel-Palade bodies (WPB) with the plasma membrane, leading to the release of von Willebrand factor (vWf) and to a rapid and transient translocation of P-selectin to the endothelial apical surface (19-24). Once translocated, P-selectin recognizes its high affinity counter-receptor, P-selectin-glycoprotein-ligand-1 (PSGL-1) on neutrophils and promotes the rolling and transient adhesion of neutrophils onto EC (25, 26). In addition, newly formed endogenous PAF, which remains associated with the EC (27-29), may interact with its receptor expressed on neutrophils (30). This interaction up-regulates the function of the neutrophil CD11b/CD18 integrin complex, making it competent to bind to specific endothelial ligands such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (27). Together, these interactions might contribute to the firm adhesion of neutrophils onto EC, which is critical in the early/acute recruitment of leukocytes at injury and inflammatory sites, and contributing to the induction of pathological angiogenesis (15-18).

Other aspects should be taken into account regarding the potential contribution of newly synthesized PAF on VEGF-mediated P-selectin translocation and on the adhesion of neutrophils onto activated EC. Firstly, a treatment with exogenous PAF can induce the translocation of endothelial P-selectin (16); secondly, ECs express cell-membrane and intracellular PAF receptors (31-35); thirdly, since most, if not all, the PAF synthesized by the EC under VEGF-A₁₆₅ stimulation remains associated with ECs, either on the cell surface and/or within the cell (12), it is thus possible that PAF may serve as an autocrine and/or an intracellular messenger for the induction of endothelial P-selectin translocation upon VEGF-A₁₆₅ stimulation.

In the present study, by using VEGF analogs, selective inhibitors and antagonists, we assessed how VEGF-A₁₆₅ promotes P-selectin translocation, the contribution of its receptors, and whether this implies the contribution of endogenously synthesized PAF. Finally, we investigated the role of P-selectin and PAF on VEGF-A₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to ECs.

METHODS

Chemicals

Histamine was purchased from Sigma Co. (St-Louis, MO, USA), human recombinant VEGF₁₆₅ from Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA), human recombinant VEGF₁₂₁, VEGF-B, -C, -D and PlGF₁₅₂ (PlGF-1) from R & D Systems (Minneapolis, MN, USA). SU1498 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA), BN 52021 and CV-3988 from Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA), whereas LAU 8080 (formerly known as BN 50730) was synthesized and obtained from LSU Health Sciences Center (New Orleans, LA, USA). Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM); F-12 medium and Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) were obtained from Life Technologies (Burlington, ON, Canada).

Cell Culture

HUVEC were isolated from fresh umbilical cords and cultured as described previously (36). Briefly, HUVEC were seeded on gelatin-coated (0.25%) plates and cultured in DMEM/F-12 (3:2) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone Lab., Logan UT, USA), EGM-2 singlequote without VEGF (Clonetics, Walkersville, MD, USA) and 2% antibiotics (Penicillin and Streptomycin; Sigma). HUVEC were characterized by cobblestone appearance and used at passage 1 or 2.

Confocal Microscopy

Post-confluent HUVEC grown on glass coverslips were rinsed with DPBS (37°C), stimulated with histamine (10^{-4} M) or VEGF- A_{165} (10^{-9} M) for 7.5 min, and then fixed with 1% paraformaldehyde-DPBS solution. In another series of experiments, following paraformaldehyde fixation, HUVEC were permeabilized with DPBS-Triton X-100 (0.5%). Nonspecific binding of primary antibodies was prevented by preincubating fixed HUVEC with 10% serum from the species used to raise the secondary antibodies. Cells were incubated with rabbit polyclonal anti-human P-selectin antibodies (1:100 dilution), and/or with goat polyclonal anti-human von Willebrand factor (vWf) antibodies (1:200 dilution) (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA) for 90 min. Cells were rinsed with DPBS and incubated either with swine anti-rabbit tetramethylrhodamine isomer-R (TRITC)-conjugated IgG (1:100 dilution) and/or with donkey anti-goat fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated IgG (1:100 dilution) (DAKO Diagnostics, Mississauga, ON, Canada) for 60 min. The expression of PAF receptors (PAFR) in HUVEC was assessed by using the same procedure. Primary antibodies were goat polyclonal anti-human PAFR IgG (1:200 in 1% serum, Sigma). Glass coverslips were mounted using a 1,4-diazabicyclo-2-2-2-octane (DABCO)/glycerol (1:1) solution. HUVEC were observed on a Zeiss

Axiovert 100 M microscope adapted with an LSM 510 confocal system. Images were recorded with the LSM 510 software.

Cell-Surface ELISA

Flat-bottom 96-well plates were coated with 0.25% gelatin; HUVEC (20 000 cells/well) were seeded and grown up to 3 days post-confluence. HUVEC were rinsed with DPBS (37°C), pretreated with a DPBS-CaCl₂ (1 mM) solution with or without selective antagonists or inhibitors 15 min prior to stimulation with VEGF analogs, PAF or histamine. Reactions were stopped by removing stimulation medium and adding 1% paraformaldehyde for 20 min. Following a rinse with DPBS, cells were incubated with blocking solution (5% BSA in DPBS) for 15 min. Rabbit polyclonal anti-human P-selectin antibodies (1:100 dilution) were added for 90 min and then rinsed with DPBS. Binding was assessed by secondary detection with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5 000 dilution) for 45 min. The plates were read at 450 nm by an automatic plate reader. Nonspecific binding was assessed by substituting primary antibodies with normal rabbit serum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Western blot analyses of VEGF receptors

Confluent HUVEC (100-mm tissue-culture plate) were rinsed with fresh HBSS-HEPES (10 mM; pH 7.4) and stimulated either with DPBS, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, VEGF-C or VEGF-D. In a series of experiments, HUVEC were pretreated for 15 min with VEGFR-2 inhibitor (SU1498) or PAFR antagonists prior to stimulation. Stimulation medium was removed, lysates prepared, immunoprecipitations performed on 1 mg of total proteins, and western blot analyses performed as previously described (13, 14). Primary antibodies used were rabbit anti-human VEGFR-1, rabbit anti-mouse VEGFR-2, rabbit anti-human VEGFR-3 or goat anti-human NRP-1 IgG

polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Then, the membranes used for VEGFR-1, VEGFR-2 or VEGFR-3 protein expression were also used to detect their phosphorylation, (but not for NRP-1 phosphorylation, as we previously described that VEGF-A₁₆₅ and its analogs do not mediate NRP-1 phosphorylation) (14). Antibodies detecting VEGFR-1, VEGFR-2 or VEGFR-3 protein expression were removed by treating the membranes with Re-Blot Plus Strong stripping solution (Chemicon International, Temecula, CA, USA) for 20 min, followed by a brief rinse with 0.1% TTBS. To detect the receptor tyrosine phosphorylation, the same detection procedure was followed, except that the primary antiserum was a mouse anti-phosphotyrosine clone 4G10 (1:4 000 dilution; Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY, USA). Kaleidoscope molecular weights (Bio-Rad) were used as standard for SDS-PAGE immunoblotting experiments.

Neutrophil purification

Venous blood was obtained from healthy donors, free from medication for at least 10 days before the experiments as described previously (36). This procedure yielded a neutrophil population that is 95% pure, as determined by a Coulter counter and Wright-Giemsa staining, and over 95% viable when assessed by trypan blue exclusion assay.

Neutrophil Adhesion Assay

HUVEC were seeded and cultured (40 000 cells/well; 24-well plates) as described for cell surface ELISA experiments. To evaluate the contribution of PAF and/or P-selectin to the adhesion of neutrophils to endothelial cells, HUVEC were rinsed with DPBS (37°C), and pretreated with a DPBS-CaCl₂ (1 mM) solution alone or containing PAFR antagonists, which bind selectively to intracellular PAFR [LAU8080; 10⁻¹⁰-10⁻⁷ M], extracellular PAFR [BN 52021;

10^{-8} - 10^{-5} M] or to intra- and extracellular PAFR [CV-3988; 10^{-8} - 10^{-5} M]), or a P-selectin antagonist, recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand Ig molecule; (rPSGL-Ig; 1 ng-50 μ g/ml; kindly provided by Dr. A. Kumar, Genetics Institute, Andover, MA, USA) for 15 min at 37°C. Neutrophils (1×10^5 in 500 μ l of DPBS with 1 mM CaCl_2) were added to each well and HUVEC were stimulated with PAF (10^{-9} M) or VEGF analogs (10^{-9} M) for 7.5 min. The wells were rinsed rapidly with DPBS, to remove non-adherent neutrophils, and fixed with a 1% paraformaldehyde / 1% glutaraldehyde-DPBS solution. Neutrophil adhesion to HUVEC was assessed with a color video digital camera adapted to a binocular microscope. For each well, three fields of view (FOV) were randomly selected and the neutrophils in each FOV were counted as number of adhered neutrophils/ mm^2 and expressed as neutrophil adhesion (%).

Preparation of GST-VEGF-A₁₆₅ exon 7 fusion protein

To assess the potential contribution of NRP-1 in potentiating the effects of VEGF-A₁₆₅ over VEGF-A₁₂₁ on P-selectin translocation and neutrophil adhesion to HUVEC, we produced a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein encoding exon 7 of human VEGF-A₁₆₅ (GST-Ex7). This sequence is not present in VEGF-A₁₂₁ and is responsible for the binding of VEGF-A₁₆₅ to NRP-1 (8). The sequence encoding for exon 7 of human VEGF-A₁₆₅ was cloned into the vector pGEX-2TK (Amersham Biosciences). *Escherichia coli* (DH5 α) were transformed with pGEX-2TK or p2TK-exon 7 vectors to produce GST and GST-Exon 7 proteins. The recombinant proteins were purified from bacterial lysates using glutathione and heparin affinity chromatographies, as described previously (37).

Measurement of PAF synthesis

PAF production by HUVEC was measured by incorporation of ^3H -acetate into lyso-PAF. Briefly, HUVEC were cultured to confluence in 6-well plates as detailed above, and stimulated with VEGF analogs (10^{-9} M) for 7.5 min. Reactions were stopped and synthesized ^3H -PAF was extracted, purified by HPLC, and quantified by β -counting (38).

Statistical analysis

Data are mean \pm s.e. mean. Statistical comparisons were made by analysis of variance, followed by a Bonferroni's *t*-test for multiple comparison. Data were considered significantly different if values of $p < 0.05$ were observed.

RESULTS

Localization of P-selectin and von Willebrand factor in HUVEC

The subcellular localization of P-selectin and von Willebrand factor was assessed by dual labeling, using selective antibodies against P-selectin and/or vWf, in conjunction with confocal microscopy. In control (DPBS)-treated HUVEC, we observed a homogenous cytosolic distribution of P-selectin and vWf (Fig. 1A-C). Treatment with VEGF- A_{165} (10^{-9} M) for 7.5 min induced a clustering of Weibel-Palade bodies (WPB) along the cytoplasmic membrane (Fig. 1D-F). As positive control, HUVEC were treated with histamine (10^{-4} M) for 7.5 min, which promoted a clustering pattern of WPB similar to that observed in VEGF- A_{165} -treated cells (Fig. 1G-I) (19, 24). When, purified, non-specific rabbit and goat IgG were used as negative control primary antibodies, staining was not detected (data not shown).

Effect of VEGF analogs and corresponding receptors on P-selectin translocation

The effect of VEGF analogs plus the contribution of their receptors and the coreceptor NRP-1 on P-selectin translocation in HUVEC was assessed by cell surface ELISA. In a first series of experiments, HUVEC were treated with VEGF-A₁₆₅, time- (0-15 min; 10⁻⁹ M) and dose-dependently (10⁻¹² to 10⁻⁸ M; 7.5 min). VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M), which interacts with VEGFR-1, VEGFR-2 and NRP-1, increased basal P-selectin translocation up to 270% within 7.5 min (Fig. 2A and B). Treatment with VEGF-A₁₂₁ (10⁻⁹ M), which interacts with VEGFR-1 and VEGFR-2, but not with NRP-1, increased P-selectin translocation by 135% (Fig. 2C). Treatment with PlGF-1 (VEGFR-1 ligand) or VEGF-B (VEGFR-1 and NRP-1 ligand) increased P-selectin translocation by 79 and 72% respectively, with maximal effect at 10⁻⁹ M (Fig. 2D and E). Treatment with VEGF-C and VEGF-D (VEGFR-2 and VEGFR-3 analogs) increased P-selectin translocation by 77 and 69% respectively, at 10⁻⁹ M (Fig. 2F and G). To assess if the activation of VEGF receptors by various analogs can be additive on P-selectin translocation, we performed assays with combinations of VEGF analogs; the combination of PlGF-1 (10⁻⁹ M) with VEGF-C or VEGF-D (10⁻⁹ M) increased P-selectin translocation by 130 and 94%, whereas the combination of VEGF-B (10⁻⁹ M) with VEGF-C or VEGF-D (10⁻⁹ M) increased it by 99 and 70% respectively (Fig. 2H).

Activation and regulation of VEGF receptors

As VEGF analogs induced P-selectin translocation, Western blot analyses was employed to both confirm the expression of VEGF receptors and NRP-1 in HUVEC, and assess the capacity of VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M; 7.5 min) to promote VEGFR-1/-2 phosphorylation, and VEGF-C and VEGF-D to mediate VEGFR-2/-3 phosphorylation. In addition, using a selective VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 5 x 10⁻⁶ M, [IC₅₀ = 700 nM]); (39), we determined whether the translocation

of P-selectin induced by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ implies the activation of VEGFR-1 and/or VEGFR-2, and if VEGFR-3 contributes to VEGF-C and VEGF-D effect. VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 and NRP-1 were detected by immunoblotting and their expression remained the same at least up to passage 2 (Fig. 3A-G; upper bands). Western blot analysis revealed phosphorylation of VEGFR-1 and VEGFR-2 mediated by VEGF-A₁₆₅ (Fig. 3A and B; lower bands), and the phosphorylation of VEGFR-2 and VEGFR-3 by VEGF-C and VEGF-D (Fig. 3C and D; lower bands). Pretreatment with SU1498 abrogated the phosphorylation of VEGFR-2 mediated by VEGF-A₁₆₅, VEGF-C or VEGF-D (Fig. 3B and C; lower bands) without affecting the phosphorylation of VEGFR-1 and VEGFR-3 (Fig. 3A and D; lower bands).

In addition, as we used selective intra-, extra- and both intra- and extracellular PAF-receptor antagonists (LAU8080, 100 nM [IC₅₀ = 590 pM]; BN 52021, 10 μM [IC₅₀ = 164 nM]; and CV-3988, 10 μM [IC₅₀ = 254 nM]) (31-33) to address the contribution of PAF and its receptors on VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin translocation and neutrophil adhesion to HUVEC, we performed a western blot analysis to assess if a pretreatment with these antagonists would interfere with the activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 mediated by VEGF-A₁₆₅. Pretreatment with these PAFR antagonists did not affect the capacity of VEGF-A₁₆₅ to mediating the phosphorylation of VEGFR-1 and VEGFR-2 (Fig. 3E and F; lower bands). For each receptor subtype, in negative control experiment, in which primary antibodies were omitted, we could not detect positive bands (data not shown).

P-selectin translocation mediated by VEGF analogs: Role of VEGFR-1, VEGFR-2 and NRP-1

To assess if VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ are mediating P-selectin translocation through VEGFR-1 and/or VEGFR-2 activation, we pretreated the HUVEC with the VEGFR-2-selective inhibitor, SU1498. Blockade of VEGFR-2 activation reduced by 91 and 85% the translocation of P-

selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ (10⁻⁹ M) (Fig. 4). SU1498 was also efficient at preventing the effect of VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ at lower concentrations (10⁻¹¹ and 10⁻¹⁰ M) (data not shown). The blockade of VEGFR-2 activation with SU1498 reduced also by 80 and 56% the translocation of P-selectin mediated by VEGF-C and VEGF-D (10⁻⁹ M). Finally, the blockade of VEGFR-2 stimulation with SU1498 did not affect P-selectin translocation mediated by PlGF-1 and VEGF-B (10⁻⁹ M) (Fig. 4).

As VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ mediated P-selectin translocation through VEGFR-2 activation, and VEGF-A₁₆₅ was more potent than VEGF-A₁₂₁, this lead us to suggest that NRP-1 might potentiate the effect of VEGF-A₁₆₅. To address this, we pretreated the HUVEC with a GST fusion protein encoding the exon 7 of human VEGF-A₁₆₅ (GST-Ex7) to block the interaction of VEGF-A₁₆₅ with NRP-1. Pretreatment of HUVEC with GST-Exon7 (10⁻¹⁰ to 10⁻⁷ M) 15 min prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) reduced P-selectin translocation to the level induced by VEGF-A₁₂₁ (Fig. 5). To insure that such reduction was not due to the GST protein itself, HUVEC were pretreated with GST (up to 10⁻⁷ M), which did not reduce of P-selectin translocation mediated by VEGF-A₁₆₅. Pretreatment of HUVEC either with GST-Exon7 or GST (up to 10⁻⁷ M) did not reduce the ability of VEGF-A₁₂₁ to induce P-selectin translocation (Fig. 5). Treatment of HUVEC with GST-Exon7 or GST (up to 10⁻⁷ M) alone did not affect the basal level of P-selectin translocation (data not shown).

Contribution of PAF to VEGF-A₁₆₅-induced P-selectin translocation

We have previously shown that VEGF-A₁₆₅ induces PAF synthesis (12). Furthermore, exposure of ECs to PAF promotes P-selectin translocation (36). To determine whether PAF and its cell membrane and intracellular receptors contribute to VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin

translocation, we first confirmed that HUVEC expressed cell membrane and intracellular PAF receptors (Fig. 6). We then, we assessed the capacity of VEGF analogs to mediate PAF synthesis. Treatment of HUVEC with VEGF analogs capable at activating VEGFR-2 (VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, VEGF-C and VEGF-D; 10⁻⁹ M for 7.5 min) increased by 75 to 95% the synthesis of PAF. VEGFR-1 analogs (PlGF-1 or VEGF-B) had no effect on PAF synthesis (Fig. 7).

We then examined if newly synthesized PAF, and its receptors, were involved in the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅. Pretreatment with selective intra-, extra- and both intra- and extracellular PAF-receptor antagonists (LAU8080, up to 100 nM [IC₅₀ = 590 pM]; BN 52021, up to 10 μM [IC₅₀ = 164 nM]; and CV-3988, up to 10 μM [IC₅₀ = 254 nM]) (31-33) reduced dose-dependently the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ up to 39, 65 and 88% respectively (Fig. 8A). Pretreatment with highest concentrations of PAF antagonists prior to a stimulation with PAF (10⁻⁹ M) reduced PAF-induced P-selectin translocation by 88-95% (Fig. 8B). PAF antagonists alone had no effect on the basal P-selectin translocation (data not shown).

Contribution of P-selectin translocation to neutrophil adhesion to HUVEC

As VEGF analogs induced P-selectin translocation, which might contribute to promoting neutrophil adhesion to endothelial cells, we wanted to define its contribution to the adhesion of neutrophils to HUVEC. Treatment with VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) for 7.5 min, which promoted maximal P-selectin translocation (Fig. 2), increased the adhesion of neutrophils to HUVEC by 318% (Fig. 9). In the same series of experiments, HUVEC were pretreated with recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand Ig molecule (rPSGL-Ig; 10 ng - 10 μg/ml) (37) for 15 min prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅. rPSGL-Ig produced a concentration-dependent inhibition

of VEGF-A₁₆₅-induced neutrophil adhesion, with a complete inhibition at 1 µg/ml (Fig. 9). Normal mouse IgG did not affect VEGF-A₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to HUVEC (Fig. 9).

Effect of VEGF analogs and corresponding receptors on neutrophil adhesion to HUVEC

Treatment with VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, PlGF-1, VEGF-B, -C and -D (10^{-9} M, 7.5 min) increased the adhesion of neutrophils to HUVEC by 415, 230, 176, 192, 272 and 242% respectively (Fig. 10). To assess if the effects mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ were mediated by the activation of VEGFR1 and/or VEGFR-2, and if the effects of VEGF-C and -D were mediated by the activation of VEGFR-2 and/or VEGFR-3, HUVEC were pretreated with the selective VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 5×10^{-6} M) 15 min prior to stimulation with VEGF analogs. Inhibition of VEGFR-2 activation reduced by 83 and 100% the adhesion of neutrophils to HUVEC mediated by VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, and by 81 and 77% the effect of VEGF-C, and VEGF-D. However, such pretreatment did not alter the capacity of PlGF-1 and VEGF-B (VEGFR-1 agonists) to induce neutrophil adhesion to HUVEC (Fig. 10).

VEGF-A₁₆₅ was more potent than VEGF-A₁₂₁ at mediating the adhesion of neutrophil to HUVEC, despite that both ligands acted through VEGFR-2 activation. This difference may be attributable to the capacity of VEGF-A₁₆₅, but not over VEGF-A₁₂₁, to bind to NRP-1 as observed for the induction of P-selectin translocation (Fig. 5). Pretreatment of HUVEC with GST-Exon7 (10^{-10} to 10^{-7} M) 15 min prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) reduced the neutrophil adhesion to the level mediated by VEGF-A₁₂₁. Such pretreatment did not reduce the capacity of VEGF-A₁₂₁ capacity to mediate neutrophil adhesion (Fig. 11). Pretreatment of HUVEC with GST (10^{-7} M) had no effect on neutrophil adhesion (Fig. 11). GST-Exon7 or GST (10^{-7} M) alone had no effect on the basal level of neutrophil adhesion (data not shown).

Contribution of PAF to VEGF-A₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to HUVEC

As the activation of VEGFR-2 with selective VEGF analogs lead to PAF synthesis and the blockade of intra- and/or extracellular PAF receptors reduced VEGF-A₁₆₅ mediated P-selectin translocation, we assessed how PAFR antagonists would affect the adhesion of neutrophils to HUVEC. Pretreatment with the intracellular PAFR antagonist, LAU8080 (up to 100 nM), reduced VEGF-A₁₆₅-mediated adhesion of neutrophils to HUVEC by 94%, whereas a pretreatment with the extracellular PAFR antagonist, BN 52021 (up to 10 μM), or with the intra- and extracellular PAFR antagonist, CV-3988 (up to 1 μM), completely prevented the adhesion of neutrophils to HUVEC (Fig. 12A).

When HUVEC were pretreated with the highest effective concentrations of PAF antagonists prior to a stimulation with PAF (10^{-9} M), the adhesion of neutrophils to HUVEC was reduced by 81 to 96% (Fig. 12B). Treatment of HUVEC with PAF antagonists alone had no effect on basal neutrophil adhesion to HUVEC (data not shown).

DISCUSSION

In the current study, by using VEGF analogs, we showed that VEGFR-1 and VEGFR-2 activation induced a rapid and transient translocation of endothelial P-selectin. In addition, we observed that VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁, which can both bind to VEGFR-1 and VEGFR-2, mediated P-selectin translocation mainly through VEGFR-2 activation and that the binding of VEGF-A₁₆₅ to NRP-1 potentiated its effect as compared to VEGF-A₁₂₁. Finally, by pretreating the HUVEC with selective PAF-receptor antagonists and rPSGL-Ig molecules, we were able to demonstrate that endogenous PAF synthesis is essential for VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin translocation, which in turn is essential for the adhesion of neutrophils onto activated HUVEC.

VEGF receptors involvement in P-selectin translocation

Firstly, we observed the expression of VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 and NRP-1 in HUVEC, which is in agreement with previous reports (14, 39). Treatment with VEGF-C and VEGF-D which can activate VEGFR-2 and VEGFR-3 in HUVEC, elicited about 30% of the maximal effect obtained with VEGF-A₁₆₅ on P-selectin translocation (Fig. 2). Pretreatment with SU1498 prior to a stimulation with VEGF-C or VEGF-D abrogated the phosphorylation of VEGFR-2 and P-selectin translocation up to 80% without affecting the phosphorylation of VEGFR-3 (Figs. 3 and 4). As VEGF-C and -D bind to VEGFR-2, without interacting with NRP-1 (40), we can therefore state that VEGFR-2 stimulation *per se* is sufficient to promote, in part, P-selectin translocation. Treatment of HUVEC with VEGFR-1 agonists; PlGF-1 and VEGF-B increased P-selectin translocation by about 30% as compared to VEGF-A₁₆₅, suggesting that VEGFR-1 stimulation promote in part, P-selectin translocation. Treatment with VEGF-A₁₂₁, which binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 but not to NRP-1 increased P-selectin translocation by 135%, which represents 50% of the effect mediated by VEGF-A₁₆₅, suggesting that the binding capacity of

VEGF-A₁₆₅ to NRP-1 potentiates the translocation of endothelial P-selectin. This hypothesis is supported by our data in which we observed that a pretreatment of HUVEC with a GST-VEGF-A₁₆₅ exon 7 fusion protein (GST-Ex7) which prevents the binding of VEGF-A₁₆₅ to NRP-1 (37), reduced the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ to the level mediated by VEGF-A₁₂₁. In addition, pretreatment of HUVEC with SU1498 prior to stimulation with VEGF-A₁₂₁ and VEGF-A₁₆₅ abrogated the activation of VEGFR-2 and almost completely the translocation of P-selectin without affecting the activation of VEGFR-1. Therefore, our data demonstrate that the activation of VEGFR-2 is favored over VEGFR-1 by VEGF-A isoforms, and that the presence of NRP-1 doubles the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ as compared to VEGF-A₁₂₁.

Despite the fact that VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ can both activate VEGFR-1 and VEGFR-2, they seem to mediate P-selectin translocation only through VEGFR-2 activation. This is in agreement with previous reports suggesting that VEGFR-1 might act as a decoy receptor for VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁, and that their effects are mediated by VEGFR-2 activation and potentiated by NRP-1 (for VEGF-A₁₆₅) (8, 13, 14, 41). Another possibility is that VEGF-A isoforms activate VEGFR-1 differently as compared to other VEGFR-1 analogs (9, 41-43). This hypothesis is in agreement with our results, as the activation of VEGFR-1 with VEGF-B or PlGF-1 increased P-selectin translocation, by about 30% as compared to VEGF-A₁₆₅ maximal effect. Furthermore, Auterio and colleagues showed recently that VEGF-A₁₆₅ induced a strong phosphorylation of VEGFR-1 tyrosine (Tyr) residues Tyr1213 and to a lesser extent Tyr1242 and Tyr1333, whereas PlGF induced the phosphorylation of Tyr1309 but not Tyr1213 (44). Such variations in the activation of VEGFR-1 by various analogs might explain different biological activities mediated by VEGF-A and its analogs.

Contribution of endogenous PAF synthesis on P-selectin translocation

Stimulation of ECs with VEGF-A₁₆₅ or other inflammatory mediators lead to a rapid and transient PAF synthesis, which remains associated to ECs, with 20% or less being exposed on the cell surface, whereas the major portion resides inside the cells (12-14, 27-29). By using selective PAF-receptor (PAFR) antagonists, it has been shown that endogenous PAF can act as a second messenger to promote a rapid and transient synthesis of prostacyclin (PGI₂), and as a transcriptional factor of c-fos and c-jun (31-33, 45). Consequently, endogenous synthesized PAF might contribute at regulating the translocation of P-selectin upon the activation of its cell membrane and/or its intracellular receptors.

By confocal microscopy, we confirmed that HUVEC express cell membrane and cytosolic PAF receptors, which is in agreement with previous reports (29, 34, 35). Stimulation of HUVEC with VEGF analogs capable at activating VEGFR-2 doubled the basal level of PAF synthesis, whereas the activation of VEGFR-1 either with PlGF-1 or VEGF-B had no such effect. Pretreatment with selective intra-, extra-, and both intra- and extracellular PAF-receptor antagonists (LAU8080, BN 52021, and CV-3988) prior to a stimulation with VEGF-A₁₆₅ reduced P-selectin translocation by 39, 65 and 88%, respectively (Figs. 6-8). Together, our data demonstrate that VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin translocation is mediated by VEGFR-2 activation, PAF-dependent, and that PAF promotes P-selectin translocation through the activation of its cell membrane and intracellular receptors. Interestingly, although VEGFR-1 has been considered in numerous studies as a binding site and/or a decoy receptor, our data show that the activation of VEGFR-1 by PlGF-1 and VEGF-B can lead to a partial translocation of P-selectin, and independently from PAF synthesis.

VEGF-mediated neutrophil adhesion to HUVEC is P-selectin-dependent

Previous reports have shown the potential contribution of endothelial P-selectin and PAF to mediate neutrophil adhesion to EC activated by numerous inflammatory mediators (24-30). If it is established that P-selectin plays a pivotal role in this regard, it is less clear whether PAF is essential. In some reports, it was suggested that PAF might act in concert with P-selectin whereas in others, it has been shown that the blockade of P-selectin was sufficient to prevent neutrophil adhesion onto EC (46-49). Such discrepancies might be explained by the fact that the use of PAF-receptor antagonists prevented the adhesion of neutrophils onto EC; however, in numerous studies, the authors did not take into account that newly synthesized PAF, as shown in our study, directs the translocation of P-selectin. Consequently, it is possible that the contribution of PAF is essential for the induction of P-selectin but not *per se* for the adhesion of neutrophils onto activated EC.

In our study, we showed that a treatment of HUVEC with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M), a concentration that induces within minutes maximal P-selectin translocation, and PAF synthesis, increased by over 300% the adhesion of neutrophils onto HUVEC. Then, by pretreating the HUVEC with a P-selectin antagonist (rPSGL-Ig), we observed a complete inhibition of neutrophil adhesion onto HUVEC mediated by VEGF-A₁₆₅ (Fig. 9). These data demonstrate that P-selectin is essential for neutrophil adhesion to activated EC, and that the interaction between endothelial PAF and its receptors expressed on neutrophils is not sufficient by itself to support the adhesion of neutrophils to EC. When we pretreated the HUVEC with selective PAFR antagonists, we observed that the blockade of intracellular PAFR with LAU8080, which does not interfere with PAFR expressed on cell membranes (32), prevented the translocation of P-selectin by 39%, which was sufficient to reduce the adhesion of neutrophils onto HUVEC by 94%. These data

illustrate that the blockade of P-selectin expression by about 40% is sufficient to prevent almost completely the adhesion of neutrophils to activated ECs, despite the fact that *de novo* synthesized PAF could interact with its cell-membrane receptors on HUVEC and neutrophils. These data strengthen the hypothesis that P-selectin itself is sufficient to promote neutrophil adhesion onto activated EC, and that endothelial PAF has no, or a marginal role *per se* on the adhesion of neutrophils.

Finally, as defined for P-selectin translocation, we observed that the blockade of VEGFR-2 activation with SU1498 abrogated the adhesion of neutrophils mediated by VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, VEGF-C and VEGF-D by 77 to 100%, without altering the adhesion of neutrophils mediated by VEGFR-1 analogs; PlGF-1 and VEGF-B. In addition, by pretreating the HUVEC with GST-Ex7, we observed that NRP-1 contributes at potentiating the adhesion of neutrophils to HUVEC mediated by VEGF-A₁₆₅ as compared to VEGF-A₁₂₁.

In conclusion, stimulation of VEGF receptors leads to endothelial P-selectin translocation. The major pathway is mediated by the activation of the VEGFR-2/NRP-1 complex by VEGF-A₁₆₅, and which implies endogenous PAF synthesis. Furthermore, we showed that PAF exercises an autocrine and an intracrine activity on P-selectin translocation. Interestingly, stimulation of VEGFR-1 either by PlGF-1 or VEGF-B leads to a lesser extent, and independently from PAF synthesis, to the translocation of P-selectin. Finally, the translocation of P-selectin onto activated EC is sufficient to support the adhesion of neutrophils, whereas PAF is essential for P-selectin translocation but not for the adhesion of neutrophils on activated HUVEC (Fig. 13). Since VEGF-mediated angiogenic properties appear to be linked to vascular permeability

increase, the regulation of PAF synthesis and/or P-selectin translocation mediated by VEGF might contribute at preventing the development of diseases implying pathological angiogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Danielle Libersan for her technical assistance.

REFERENCES

1. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
2. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, *et al.* Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1989;84:1470-1478.
3. Favard C, Moukadiri H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol. Cell*. 1991;73:1-6.
4. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 1995;146:1029-1039.
5. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp. Cell Res.* 1999;253:117-130.
6. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol.* 2001; 280:C1358-C1366.
7. Fujisawa H, Takagi S, Hirata T. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev. Neurosci.* 1995;17:343-349.
8. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998; 92:735-745.
9. Migdal M, Huppertz B, Tessler S, *et al.* Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J. Biol. Chem.* 1998;35:22272-22278.

10. Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, *et al.* Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* 1999;30:21217-21222.
11. Neufeld G, Cohen T, Gitay-Goren H, *et al.* Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variant, *Cancer Metastasis. Rev.*, 1996;15:153-158.
12. Sirois MG, Edelman ER. Vascular endothelial growth factor effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am. J. Physiol.* 1997;272:H2746-H2756.
13. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis is Flk-1 dependent. *J. Biol. Chem.* 1999;274: 31047-31054.
14. Bernatchez PN, Soker S, Rollin S, Sirois MG. Relative effect of VEGF and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: role of neuropilin-1. *J. Cell. Biochem.* 2002;85:629-639.
15. Lorant DE, Tophan MK, Whatley RE, *et al.* Inflammatory roles of P-selectin. *J. Clin. Invest.* 1993;92:559-570.
16. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2000;80:1669-1699.
17. Michiels C, Arnould T, Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000;1497:1-10.
18. Hattori R, Hamilton KK, Fugates RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von willebrand factor is accompanied by a rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.* 1989;264:7768-7771.

19. Sugama Y, Tiruppathi C, Janakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, Malik AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intracellular adhesion molecule-1: A mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J. Cell Biol.* 1992;119:935-944.
20. Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca⁺⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 1991;138:213-221.
21. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998;274:L678-L684.
22. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet α granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* 1989;84:92-99.
23. Bonafanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 1989;73:1109-1112.
24. Moore KL, Stults NL, Diaz S, *et al.* Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Cell Biol.* 1992;118:445-456.
25. Sako D, Chang X-J, Barone KM, *et al.* Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993;75:1179-1186.
26. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: A juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J. Cell Biology.* 1991;115:223-234.
27. Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA. The role of platelet-activating factor in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 1990;64:99-103.
28. Bussolino F, Camussi G. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur. J. Biochem.* 1995;229:327-337.

29. Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: A novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J. Cell Biol.* 1990;110:529-540.
30. Silvestro L, Ruikun C, Sommer F, *et al.* Platelet activating factor-induced endothelial cells expression of adhesion molecules and modulation of surface glycocalyx, evaluated by electron spectroscopy chemical analysis. *Semin. Thromb. Haemost.* 1994;20:214-222.
31. Marcheselli VL, Rossowska MJ, Domingo MT, Braquet P, Bazan NG. Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 1990;265: 9140-9145.
32. Marcheselli VL, Bazan NG. Platelet-activating factor is a messenger in the electroconvulsive shock-induced transcriptional activation of c-fos and zif-268 in hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 1994;37:54-61.
33. Bazan NG, Squinto SP, Braquet P, Panetta T, Marcheselli VL. Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: Intracellular PAF-binding sites and activation of a Fos/Jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids.* 1991;26:1236-1242.
34. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 1995;108:2369-2379.
35. Marrache AM, Gobeil F Jr, Bernier SG, *et al.* Nuclear localization of functional receptors for platelet activating factor. *J. Immunol.* 2002;169:6474-6481.
36. Théorêt J-F, Bienvenu J-G, Kumar A, Merhi Y. P-selectin antagonism with recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;298:658-664.
37. Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler IJ, Charnahelli H, Klagsbrun M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide

- corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF₁₆₅. *J. Biol. Chem.* 1997;272:31582-31588.
38. Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, Sirois MG. VEGF activation of endothelial cell PAF synthesis mediated by secretory phospholipase A₂. *Br. J. Pharmacol.* 2001;134:197-205.
39. Marchio S, Primo L, Pagano M, *et al.* Vascular endothelial growth factor-C stimulates the migration and proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 1999 ;274:27617-27622.
40. Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2002;515:81-90.
41. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Internat. J. Biochem. Cell Biol.* 2001;33:409-420.
42. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor (PlGF), which is related to vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cell Growth Differ.* 1996;7:213-221.
43. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, *et al.* Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic. *Lab. Invest.* 1997;76:517-531.
44. Autiero M, Waltenberger J, Communi D. *et al.* Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 2003;9:936-943.
45. Stewart AG, Dubbin PN, Harris T, Dusting GJ. Evidence for an intracellular action of platelet-activating factor in bovine cultured aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 1989;96:503-505.
46. Watanabe M, Yagi M, Omata M, *et al.* Stimulation of neutrophil adherence to vascular endothelial cells by histamine and thrombin and its inhibition by PAF antagonists and dexamethasone. *Br. J. Pharmacol.* 1991;102:239-245.

47. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, *et al.* Platelet-activating factor (PAF): Signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996;416:297-304.
48. Okayama N, Ichikawa H, Coe L, Itoh M, Alexander JS. Exogenous nitric oxide enhances hydrogen peroxide-mediated neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1998;274:L820-L826.
49. Burns AR, Bowden RA, Abe Y, *et al.* P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 1999;65:299-306.

LEGENDS

Figure 1. P-selectin and vWf colocalize in Weibel-Palade bodies (WPB) of endothelial cells (rod-shaped like) and cluster to cell membrane upon stimulation. HUVEC were stimulated with solution buffer (DPBS), histamine, or VEGF-A₁₆₅ for 7.5 min. By confocal microscopy, we detected the expression of P-selectin (A, D, G; TRITC staining), vWf (B, E, H; FITC staining) and their colocalization in WPB (C, F, I) by superimposing computerized pictures of the TRITC-labeled-P-selectin and FITC-labeled-vWf pictures, which results in the yellow color of WPB. In DPBS-treated cells, WPB were distributed homogeneously into the cells (A-C), in VEGF-A₁₆₅ (D-F) and histamine (G-I) treated cells, WPB clustered along the cell membrane (arrows).

Figure 2. VEGF analogs induce P-selectin cell-surface expression in HUVEC. P-selectin translocation on HUVEC was quantified by cell-surface ELISA. DPBS was used as negative control, and the basal translocation of P-selectin mediated by DPBS was set to 1. The translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) as a function of the time (0-15 min) (A) and at various concentrations (10⁻¹² to 10⁻⁸ M) in cells treated for 7.5 min (B) was measured. Translocation of P-selectin mediated by VEGF analogs was assessed at various concentrations (10⁻¹² to 10⁻⁸ M) in cells treated for 7.5 min (C-G). The combination of VEGFR-1 and VEGFR-2 agonists at 10⁻⁹ M (7.5 min) on P-selectin translocation was assessed (H). In each experiment, a group of cells was treated with normal rabbit IgG to evaluate the non-specific binding, which was subtracted from the values obtained upon stimulation with agonists. Data are means ± SEM of at least 12 experiments, *** p ≤ 0.001 as compared to DPBS.

Figure 3. Expression and regulation of VEGF receptors in HUVEC. HUVEC were treated either with DPBS or VEGF analogs (10⁻⁹ M) for 7.5 min. In some experiments, HUVEC were

pretreated for 15 min either with VEGFR-2 inhibitor or PAFR antagonists prior to stimulation with VEGF analogs. Total proteins were isolated and immunoprecipitations (IP) were performed either against VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 or NRP-1. Western blot (WB) analyses were performed with anti-VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 or NRP-1 antibodies (upper bands). Then, the membranes were treated with Re-Blot Plus Strong stripping solution and the detection of VEGFR-1, VEGFR-2 or VEGFR-3 phosphorylation (lower bands) was performed with anti-phosphotyrosine antibodies.

Figure 4. Contribution of VEGF receptors on P-selectin translocation. HUVEC were pretreated (+) or not (-) with a selective VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 5×10^{-6} M), 15 min prior to stimulation with VEGF analogs (10^{-9} M) for 7.5 min. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, * $p \leq 0.05$ and *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS, †† $p \leq 0.01$ and ††† $p \leq 0.001$ as compared to corresponding VEGF analogs untreated with SU1498.

Figure 5. Contribution of NRP-1 on P-selectin translocation in HUVEC. HUVEC were pretreated either with a GST fusion protein encoding the exon 7 of human VEGF-A₁₆₅ (GST-Ex7) or a GST protein 15 min prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁ for 7.5 min. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS, ††† $p \leq 0.001$ compared to VEGF-A₁₆₅.

Figure 6. PAF-receptor expression in HUVEC. HUVEC were fixed by DPBS-paraformaldehyde (1%) solution, and permeabilized with DPBS-Triton X-100 (0.5%) solution (A), and some counterparts were not permeabilized (B) (630X magnification). By confocal microscopy, we revealed the localization of FITC-labeled PAF receptors (green staining) in

HUVEC. Magnification of inserts (C and D) are provided for a better visualization of PAF receptors (2X zoom magnification of images A and B). Purified, non-specific goat IgG were used as negative control primary antibodies (E and F).

Figure 7. PAF synthesis mediated by VEGF analogs in HUVEC. HUVEC were stimulated with DPBS or VEGF analogs (10^{-9} M) for 7.5 min. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, * $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.01$ as compared to DPBS.

Figure 8. Role of PAF and its receptors on VEGFA₁₆₅-mediated P-selectin translocation. HUVEC were pretreated with selective PAF receptor antagonists 15 min prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) (A) or PAF (10^{-9} M) (B) for 7.5 min. Pretreatment with an intracellular (LAU8080), an extracellular (BN 52021) and a non-specific PAF-receptor antagonist (CV-3988) reduced significantly the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ and PAF. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, * $p \leq 0.05$ and *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS, ††† $p \leq 0.001$ compared to VEGF-A₁₆₅ (A) or PAF (B).

Figure 9. Contribution of P-selectin on VEGF-A₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to HUVEC. Neutrophils (1×10^5) were added to confluent HUVEC (24-well plates) and stimulated either with DPBS or VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) for 7.5 min. The wells were rinsed rapidly with DPBS to remove non-adherent neutrophils, and fixed with a 1% paraformaldehyde / 1% glutaraldehyde-DPBS solution. Pretreatment with rPSGL-Ig molecules reduced dose-dependently the adhesion of neutrophils to HUVEC mediated by VEGF-A₁₆₅. Data are means \pm

SEM of at least 12 experiments, *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS and †† $p \leq 0.01$, ††† $p \leq 0.001$ as compared to VEGF 10^{-9} M.

Figure 10. Contribution of VEGF receptors on neutrophil adhesion to HUVEC. HUVEC were pretreated (+) or not (-) with SU1498 (5×10^{-6} M), 15 min prior to the addition of neutrophils (1×10^5) and to the stimulation of HUVEC with VEGF analogs (10^{-9} M) for 7.5 min. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS, ††† $p \leq 0.001$ as compared to corresponding VEGF analogs untreated with SU1498.

Figure 11. Contribution of NRP-1 on neutrophil adhesion to HUVEC. HUVEC were pretreated either with a GST-Ex7 or a GST protein 15 min prior to the addition of neutrophils (1×10^5) and to the stimulation of HUVEC with VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁ for 7.5 min. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS. † $p \leq 0.05$ and ††† $p \leq 0.001$ compared to VEGF-A₁₆₅.

Figure 12. Role of PAF and its receptors on VEGFA₁₆₅-mediated neutrophil adhesion to HUVEC. HUVEC were pretreated with selective PAF receptor antagonists 15 min prior to the addition of neutrophils (1×10^5) and to the stimulation of HUVEC with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) (A) or PAF (10^{-9} M) (B) for 7.5 min. Pretreatment with an intracellular (LAU8080), an extracellular (BN 52021) and a non-specific PAF-receptor antagonist (CV-3988) reduced significantly the translocation of P-selectin mediated by VEGF-A₁₆₅ and PAF. Data are means \pm SEM of at least 6 experiments, *** $p \leq 0.001$ as compared to DPBS, ††† $p \leq 0.001$ compared to VEGF-A₁₆₅ (A) or PAF (B).

Figure 13. Proposed mechanisms by which VEGF-A₁₆₅ and its analogs mediate P-selectin translocation and neutrophil adhesion to endothelial cells. Activation of VEGFR-2/NRP-1 complex by VEGF-A₁₆₅ mediates *de novo* PAF synthesis which leads to P-selectin translocation (major pathway). Stimulation of VEGFR-1 either by PlGF-1 or VEGF-B induces to a lesser extent (and PAF-independently) the translocation of P-selectin (minor pathway). Translocation of P-selectin onto activated ECs is sufficient *per se* to support the adhesion of neutrophils, whereas synthesized PAF contributes indirectly to the adhesion of neutrophils by inducing the translocation of P-selectin on activated endothelial cells.

Figure 1

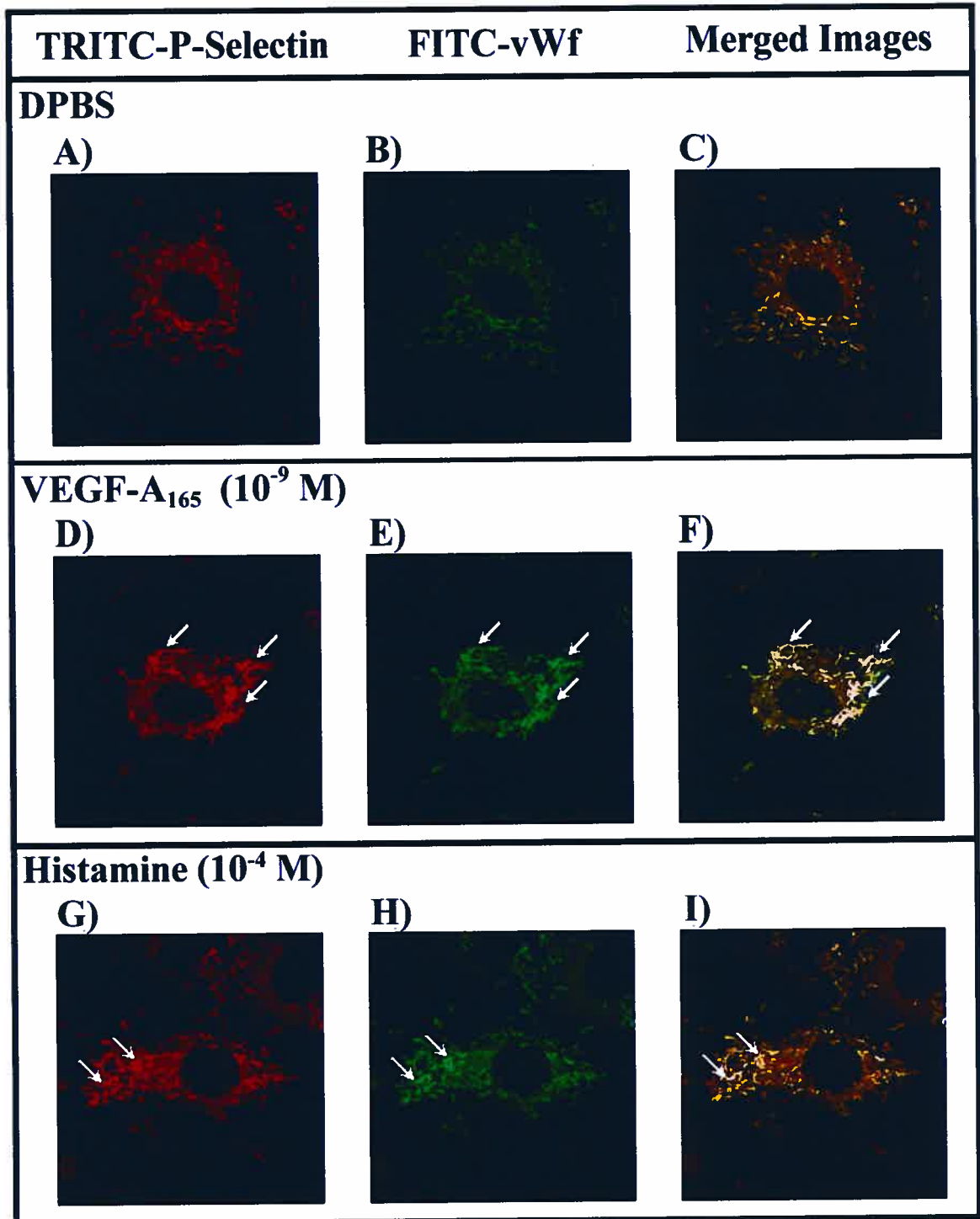


Figure 2

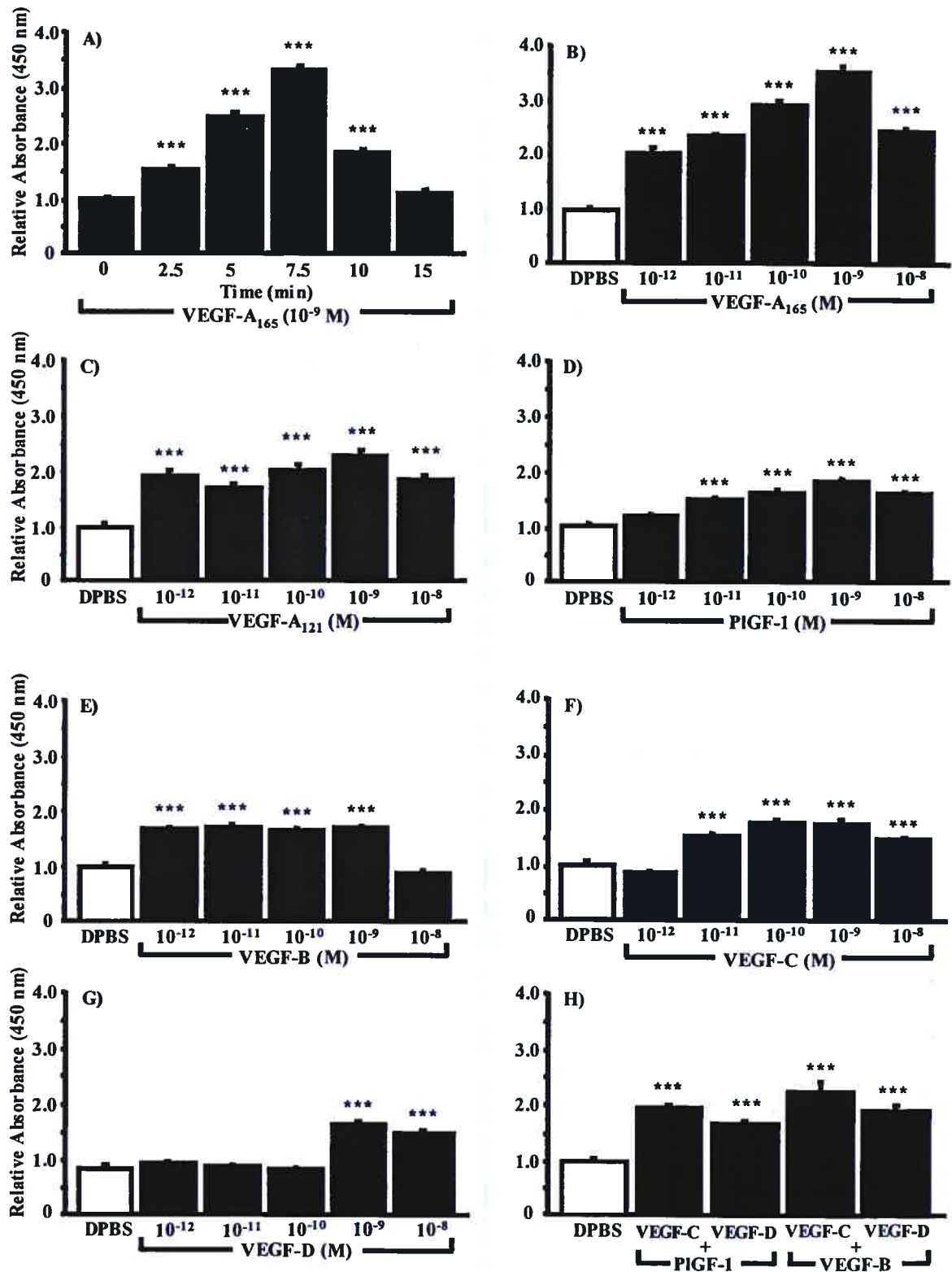


Figure 3

A) IP: @VEGFR-1 220 kDa				B) IP: @VEGFR-2 190 kDa			
WB: @VEGFR-1				WB: @VEGFR-2			
WB: @pVEGFR-1				WB: @pVEGFR-2			
DPBS	+	-	-		+	-	-
VEGF-A ₁₆₅	-	+	+		-	+	+
SU1498	-	-	+		-	-	+

C) IP: @VEGFR-2 190 kDa					D) IP: @VEGFR-3 150 kDa					
WB: @VEGFR-2					WB: @VEGFR-3					
WB: @pVEGFR-2					WB: @pVEGFR-3					
DPBS	+	-	-	-		+	-	-	-	
VEGF-C	-	+	+	-		-	+	+	-	
VEGF-D	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
SU1498	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+

E) IP: @VEGFR-1 220 kDa					F) IP: @VEGFR-2 190 kDa				
WB: @VEGFR-1					WB: @VEGFR-2				
WB: @pVEGFR-1					WB: @pVEGFR-2				
DPBS	+	-	-	-		+	-	-	-
VEGF-A ₁₆₅	-	+	+	+		-	+	+	+
LAU8080	-	-	+	-		-	-	+	-
BN 5201	-	-	-	+		-	-	-	+
CV-3988	-	-	-	-		-	-	-	+

G) IP: @NRP-1 140 kDa			
WB: @NRP-1			
DPBS	+	-	-
VEGF-A ₁₆₅	-	+	+
SU1498	-	-	+

Figure 4

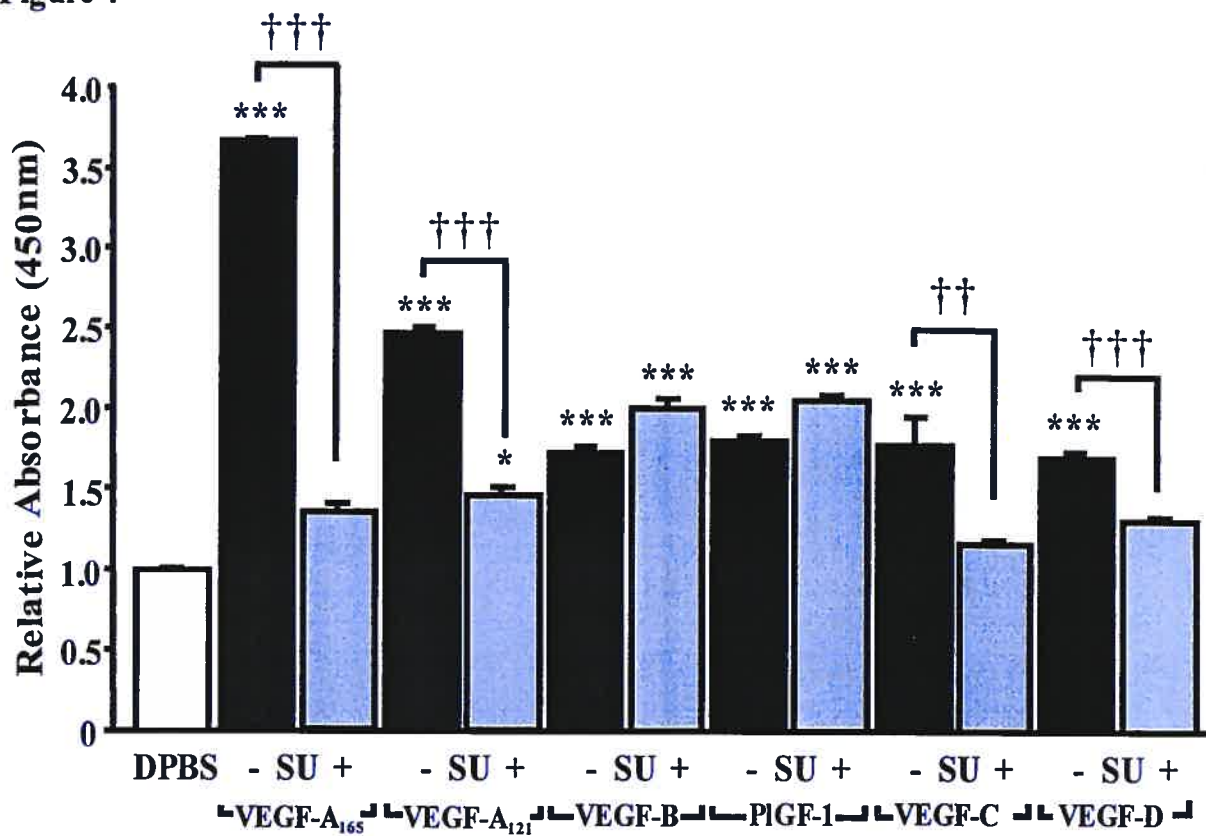


Figure 5

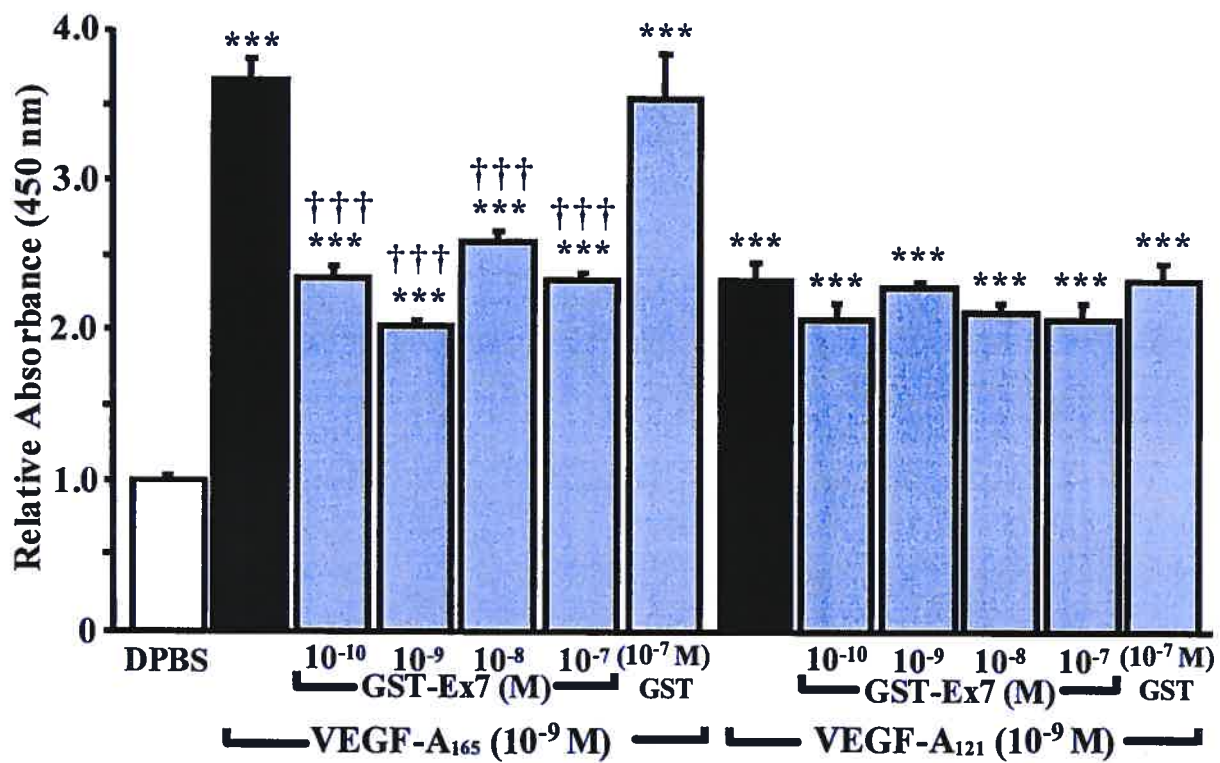


Figure 6

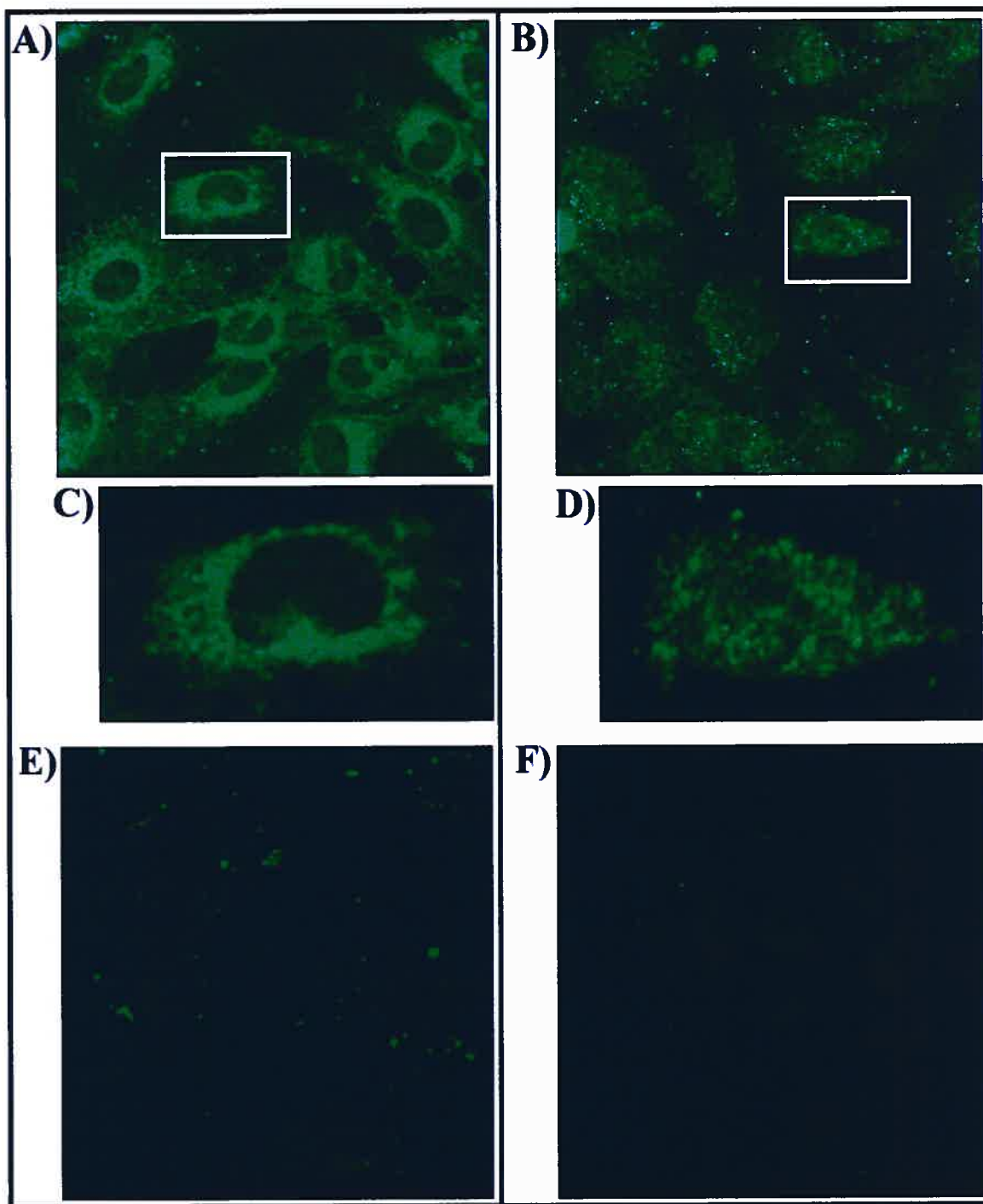


Figure 7

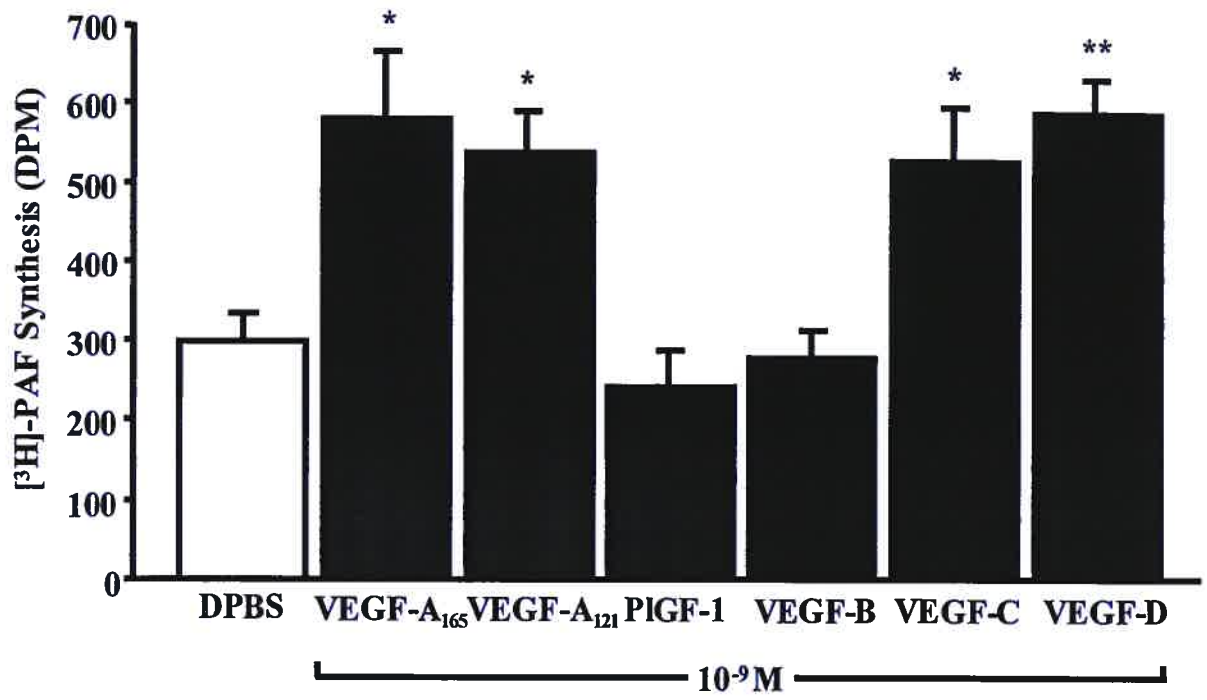


Figure 8

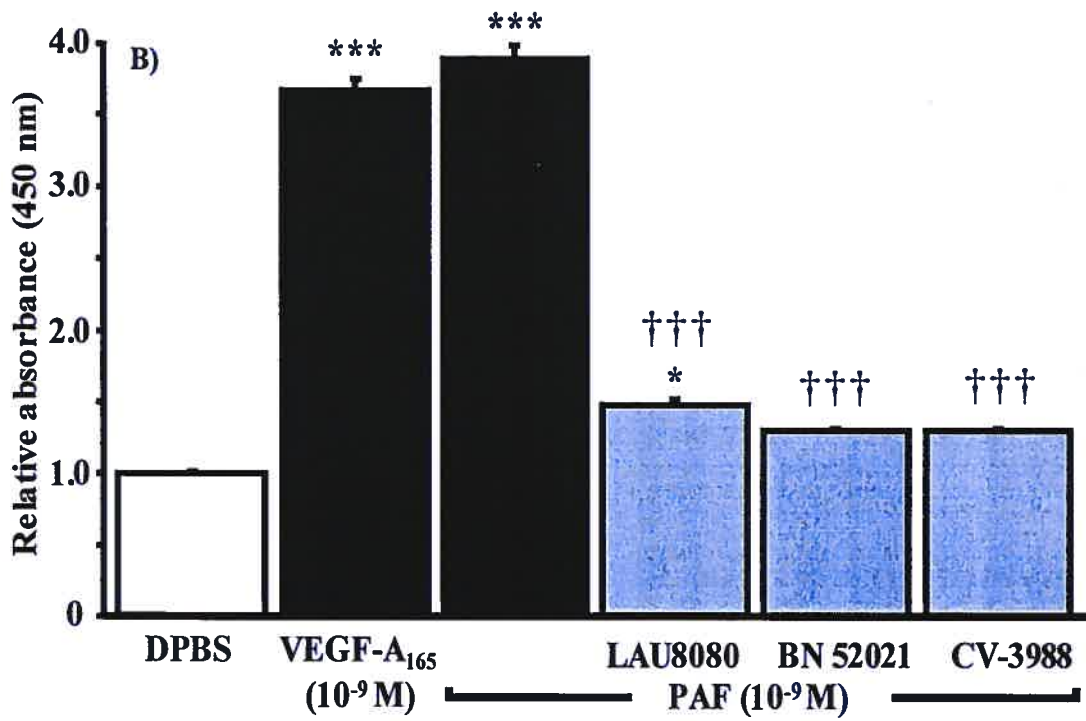
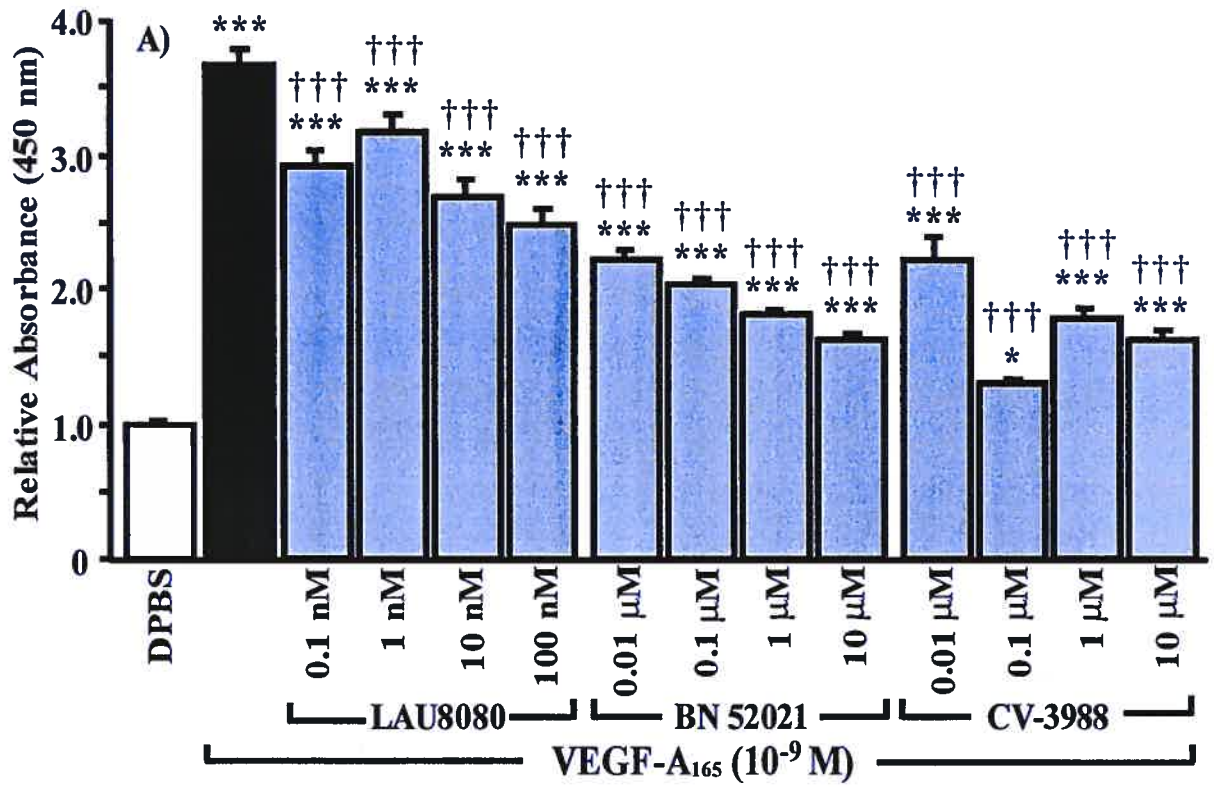


Figure 9

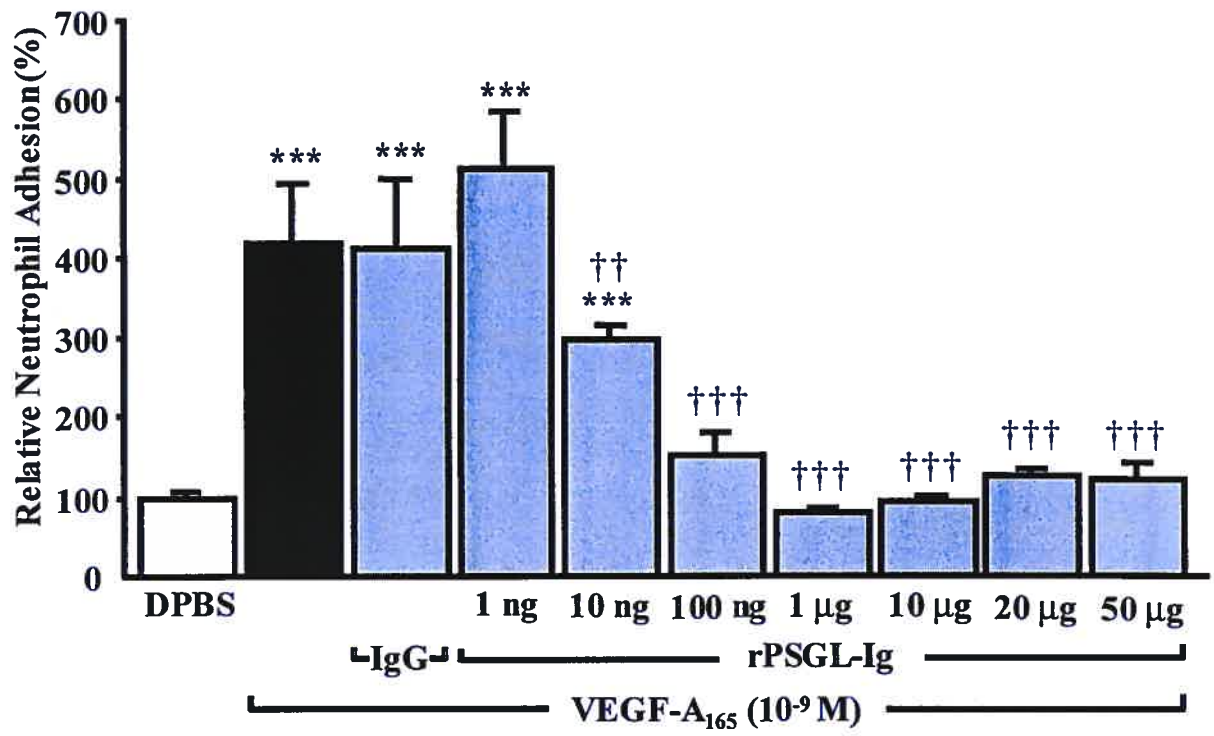


Figure 10

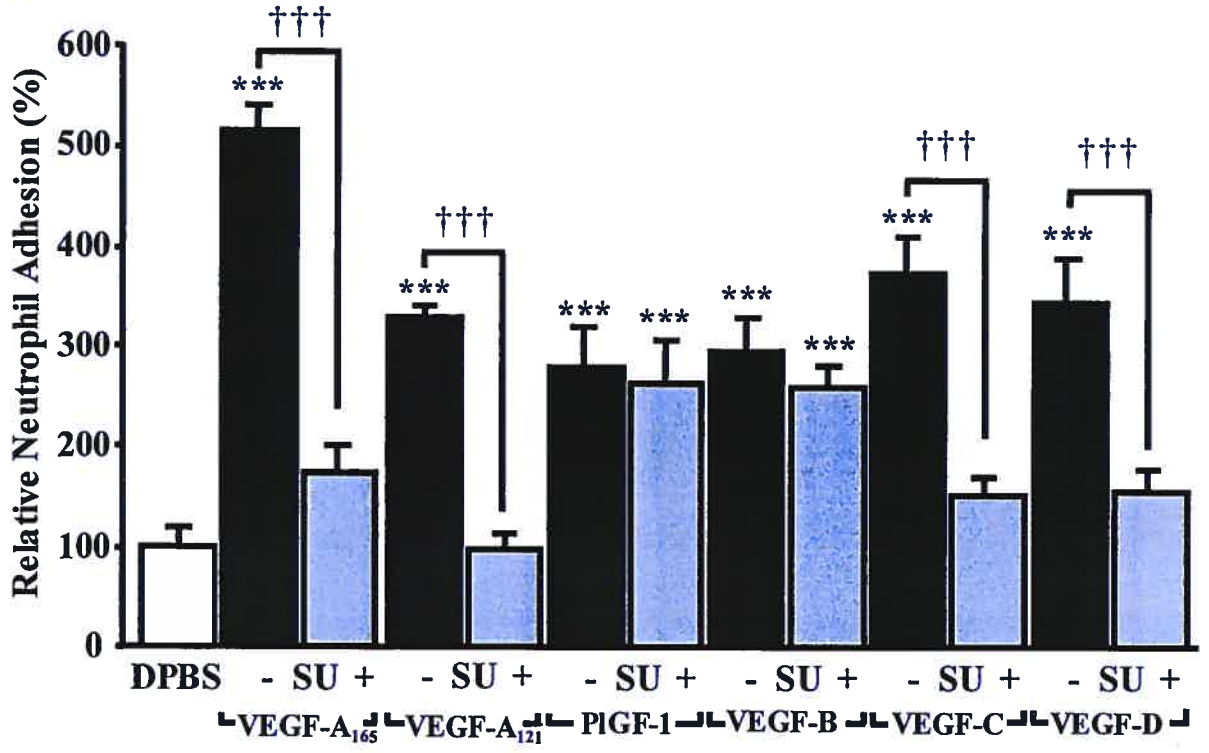


Figure 11

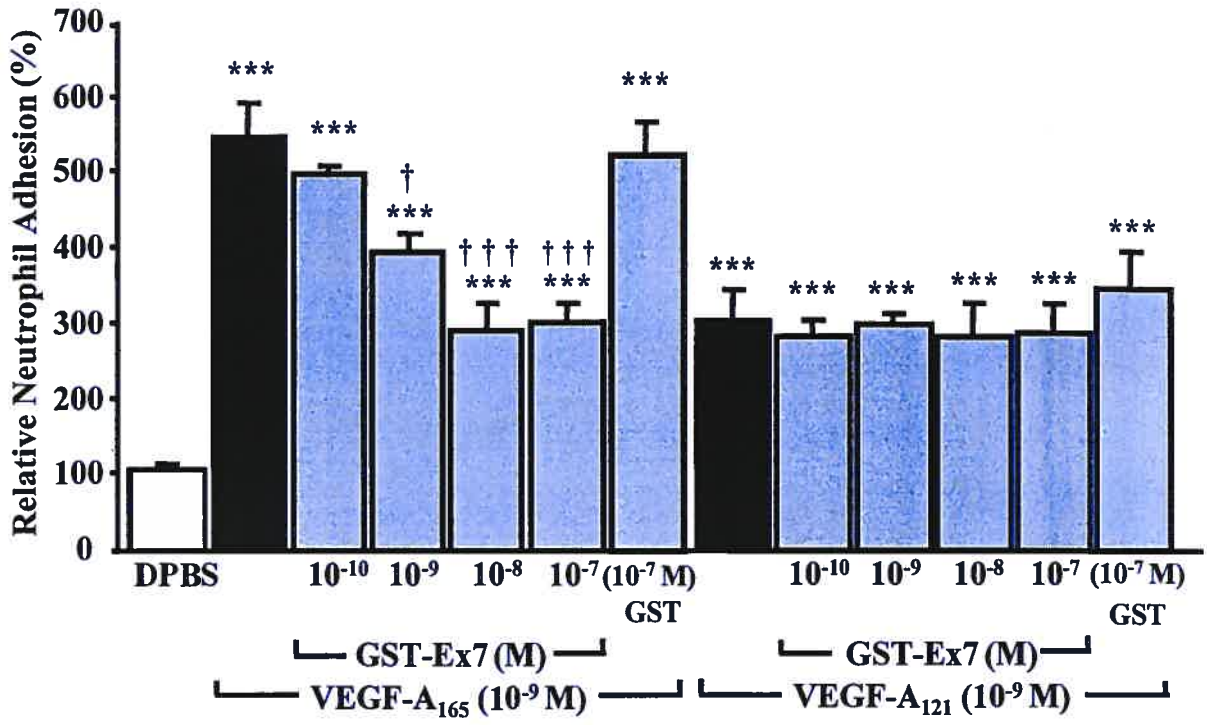


Figure 12

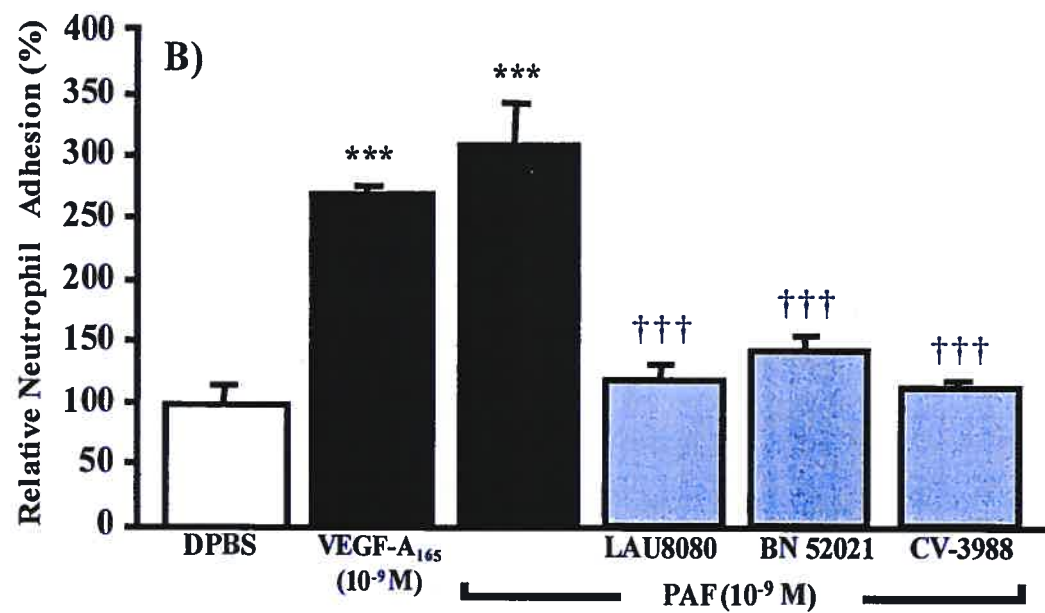
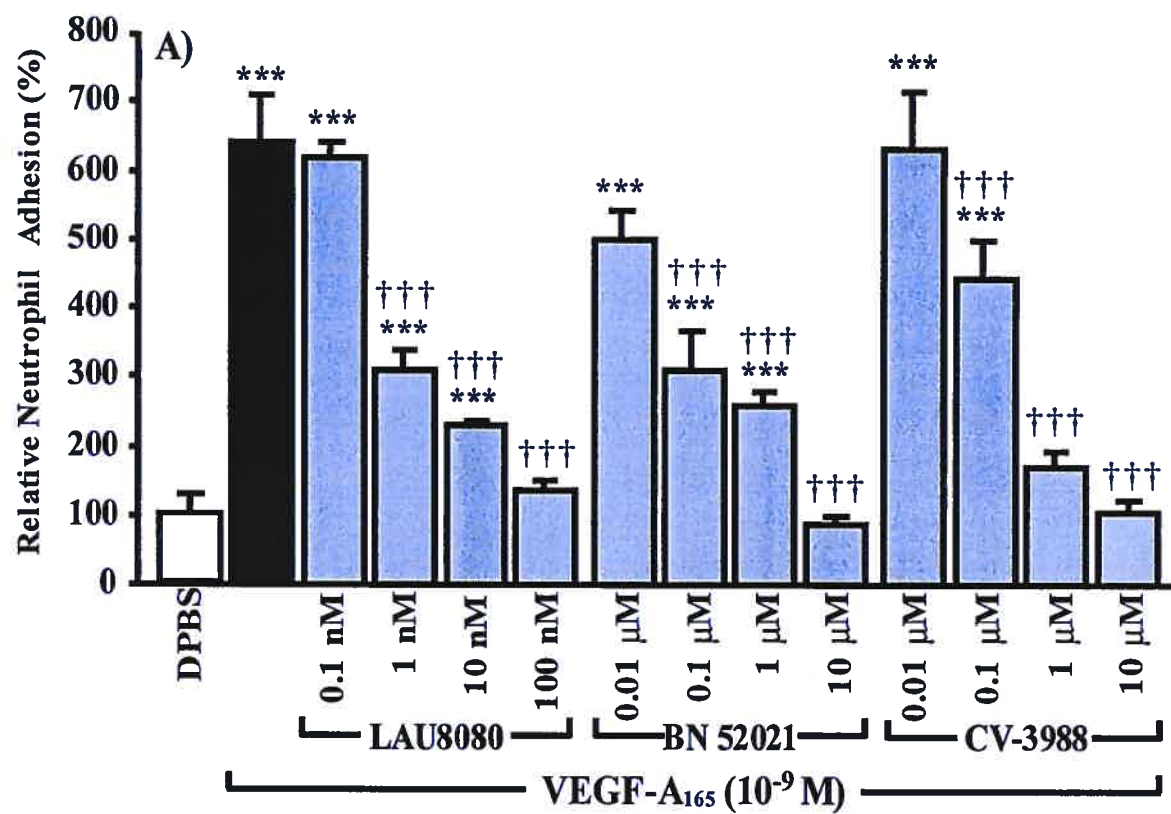
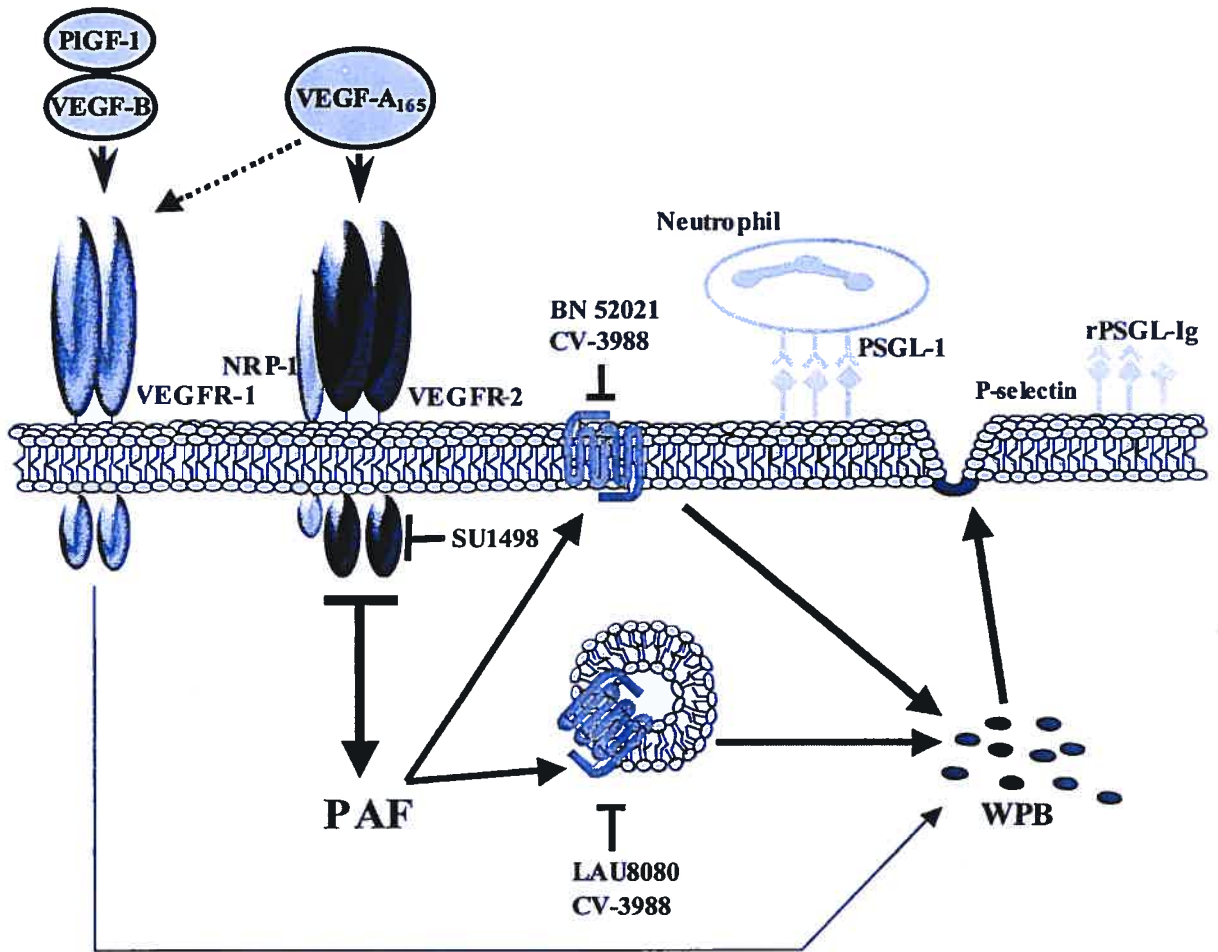


Figure 13



3.0. DISCUSSION

Des études antérieures ont démontré que le VEGF-A₁₆₅ augmente la perméabilité vasculaire, via la synthèse du PAF par les CE (135), et que cet effet est principalement dû à l'activation de VEGFR-2 et potentialisé par le corécepteur NRP-1 (135, 42). Toutefois, les mécanismes par lesquels le VEGF-A₁₆₅ induit la translocation de la P-sélectine endothéliale, ainsi que sa contribution à l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium activé, étaient inconnus. Au cours de la présente étude, nous avons donc démontré que le VEGF-A₁₂₁ ainsi que le VEGF-A₁₆₅ et ses analogues provoquent un autre phénomène inflammatoire: la translocation de la P-sélectine. De plus, nous avons démontré que ces facteurs de croissance provoquent la translocation de la P-sélectine à la surface des CE et que ce phénomène est dose-dépendant, rapide et transitoire. Les isoformes VEGF-A₁₂₁ et VEGF-A₁₆₅ se lient à VEGFR-1 et VEGFR-2, mais contrairement au VEGF-A₁₆₅, le VEGF-A₁₂₁ ne lie pas la NRP-1 (136). Cette différence de liaison nous a permis de déterminer le rôle spécifique de potentialisation du corécepteur NRP-1 sur la translocation de la P-sélectine induite par le VEGF-A₁₆₅, par rapport au VEGF-A₁₂₁. De surcroît, grâce à l'emploi du rPSGL-Ig et d'antagonistes spécifiques des récepteurs du PAF, nous avons déterminé que la translocation de la P-sélectine requiert de façon prédominante la synthèse *de novo* de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ et que la P-sélectine est essentielle à l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE activées. La translocation de la P-sélectine constitue donc une étape importante de l'inflammation puisqu'elle est essentielle à l'adhésion des cellules inflammatoires (polymorphonucléaires, monocytes) à l'endothélium lésé (pour revue; 87). Puisque divers groupes suggèrent que la réponse inflammatoire est l'étape initiale de l'angiogenèse chronique et pathologique (4), nous suggérons donc dans le présent ouvrage que le VEGF-A₁₆₅ joue également un rôle crucial dans l'inflammation

aiguë puisqu'en plus d'induire la synthèse de PAF qui contribue à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le VEGF-A₁₆₅ induit la translocation de la P-sélectine.

3.1. Rôle des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1 dans la translocation de la P-sélectine endothéliale.

La P-sélectine contenue dans les cWP est transloquée à la surface de la membrane cytoplasmique suite à un stimulus approprié (53). Des études antérieures ont démontré que le VEGF-A₁₆₅ possède la capacité d'induire la translocation de la P-sélectine ainsi que la relâche du vWf (137, 138), mais sans démontrer le rôle précis des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1. Ainsi, nous avons utilisé des analogues spécifiques du VEGF-A₁₆₅ ainsi qu'un inhibiteur spécifique du VEGFR-2 de façon à évaluer le rôle précis de chacun des récepteurs du VEGF-A₁₆₅ sur la translocation de la P-sélectine.

Afin d'évaluer précisément le rôle des récepteurs du VEGF, nous avons utilisé des analogues du VEGF-A₁₆₅. Nous avons observé qu'un traitement avec le VEGF-C ou le VEGF-D, des analogues de VEGFR-2 qui ne se lient pas à la NRP-1 (139), induit une translocation de la P-sélectine, mais cet effet ne représente que 30% de celui induit par le VEGF-A₁₆₅, ce qui nous permet de suggérer que l'activation de VEGFR-2 en soi est suffisante pour induire une translocation de la P-sélectine, bien que réduite par rapport au VEGF-A₁₆₅. De façon similaire, un traitement avec le VEGF-B ou le PlGF-1, des analogues de VEGFR-1, induit une translocation équivalente de la P-sélectine. Ces deux derniers agonistes causent une translocation équipotente qui ne représente que 30% de l'effet du VEGF-A₁₆₅. De façon intéressante, le VEGF-B, qui a la capacité de lier la NRP-1, n'entraîne pas plus de translocation de P-sélectine que le PlGF-1, qui ne peut lier la

NRP-1. Ces données nous permettent donc de suggérer que l'activation de VEGFR-1 en soi est suffisante pour induire en partie la translocation de la P-sélectine et que la NRP-1 ne potentialise pas cet effet médié par l'activation de VEGFR-1. L'isoforme VEGF-A₁₂₁ peut se lier et activer VEGFR-1 et VEGFR-2, mais ne peut se lier à la NRP-1. Le VEGF-A₁₂₁ induit une augmentation de la translocation de la P-sélectine de 135%, ce qui représente 50% de l'effet du VEGF-A₁₆₅, suggérant ainsi que la NRP-1 potentialise les effets du VEGF-A₁₆₅ sur la translocation de la P-sélectine. Cette hypothèse est également supportée par nos résultats démontrant que les combinaisons d'analogues de VEGFR-1 et VEGFR-2 ont induit tout au plus une augmentation de 130% de la translocation de la P-sélectine, ce qui représente environ 50% de l'effet obtenu avec le VEGF-A₁₆₅. Enfin, comme le VEGF-A₁₂₁ et VEGF-A₁₆₅ se lient au VEGFR-1 et au VEGFR-2 (135), nous voulions déterminer si leurs effets étaient médiés par le VEGFR-1 et/ou le VEGFR-2. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique (SU1498) de l'activité tyrosine kinase du VEGFR-2. Le prétraitement des CE avec le SU1498 permet d'inhiber l'activité de VEGFR-2, ce qui diminue presque totalement la translocation de la P-sélectine induite par VEGF-A₁₂₁ ou VEGF-A₁₆₅.

Ces données sont intéressantes à plusieurs niveaux. Tout d'abord, elles démontrent que l'activation de VEGFR-1 par le VEGF-B ou le PlGF-1 induit une translocation significative de la P-sélectine alors que la majorité des études antérieures, incluant les nôtres, ont démontré que l'activation de VEGFR-1 n'entraînait que peu ou pas d'effets biologiques (prolifération, migration ou synthèse de PAF par les CE) (135). Ensuite, le VEGF-A₁₆₅ et le VEGF-A₁₂₁, qui peuvent lier et activer VEGFR-1 et VEGFR-2, induisent de façon presque exclusive la translocation de la P-sélectine via l'activation de VEGFR-2. Enfin, nous avons été en mesure de démontrer que la NRP-1, qui peut former un complexe

avec VEGFR-1 et VEGFR-2, potentialise uniquement les effets du VEGF-A₁₆₅ lorsque ce dernier se lie à VEGFR-2. Ces observations sont similaires à d'autres études ayant suggérées que le VEGFR-1 agit comme leurre (*decoy receptor*) pour le VEGF-A₁₂₁ ou VEGF-A₁₆₅, régulant ainsi la concentration de ces ligands qui activeront VEGFR-2 (38, 42, 135, 140). Une autre possibilité est que les isoformes du VEGF-A peuvent activer le VEGFR-1 de façon différente par rapport aux autres agonistes du VEGFR-1 (PlGF et VEGF-B) (140-142). Auterio et coll. ont démontré que le VEGF-A₁₆₅ induit une phosphorylation des résidus tyrosine (Tyr) 1213, Tyr 1242 et Tyr 1333, alors que le PlGF induit une phosphorylation de Tyr 1309, mais pas de Tyr 1213 de VEGFR-1 (143). Les observations au sujet de ces variations de sites d'activation de VEGFR-1 pourraient être suffisantes pour expliquer les différences observées dans les activités induites par le VEGF-A et ses analogues.

3.2. La synthèse du PAF médiée par le VEGF-A₁₆₅ est essentielle à la translocation de la P-sélectine.

Des études antérieures ont démontré que le VEGF-A₁₆₅ produit ses effets inflammatoires via la synthèse du PAF et suite à l'activation du VEGFR-2 (61, 135). De plus, il a été démontré que le PAF exogène, tout comme l'histamine et la thrombine, est capable d'induire la translocation de la P-sélectine (51, 137, 138, 141, 144, 145). Par contre, ces études n'ont pas établi si la synthèse du PAF par les CE est essentielle à la translocation de la P-sélectine. De même, les différents modes d'actions du PAF endogène (autocrine, via l'activation de ses récepteurs membranaires des CE et/ou intracrine en activant les récepteurs du PAF cytosoliques et/ou nucléaires (83, 84, 146, 147, 148)) n'ont pas été étudiés.

A l'aide d'antagonistes spécifiques pour les récepteurs du PAF intracellulaires et extracellulaires, nous avons été capable de démontrer que la translocation de la P-sélectine induite par le VEGF-A₁₆₅ est dépendante de la synthèse du PAF et que ce dernier a un effet autocrine et intracrine sur la translocation de la P-sélectine. Dans notre étude, un prétraitement avec des antagonistes sélectifs pour les récepteurs du PAF intracellulaires (LAU8080), extracellulaires (BN 52021) et à la fois intra- et extracellulaires (CV-3988) a réduit de 39%, 65% et 88%, respectivement, la translocation de la P-sélectine. Dans une étude précédente, nous avons démontré que la synthèse de PAF était dépendante de l'activation de VEGFR-2 et que cet effet est potentialisé par le complexe VEGFR-2/NRP-1 (42, 135). Conséquemment, l'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1 par le VEGF-A₁₆₅ induit une synthèse de PAF qui active tous ses récepteurs extracellulaires et intracellulaires pour ainsi induire la translocation de P-sélectine à la surface cytoplasmique des CE.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la stimulation de CE avec le VEGF-B ou le PlGF-1 entraîne une translocation moindre, mais significative, de la P-sélectine lorsque comparé au VEGF-A₁₆₅ et que cet effet du VEGF-B et PlGF-1 est PAF-indépendant puisque l'activation de VEGFR-1 par le VEGF-A₁₆₅ et ses analogues n'induit pas la synthèse de PAF (135).

3.3. L'adhésion des neutrophiles aux HUVEC est dépendante de la P-sélectine, ainsi que de la synthèse du PAF.

Le processus inflammatoire est un phénomène aigu qui, dans certains cas, devient chronique (arthrite, athérosclérose, etc.; 46). Les cellules inflammatoires adhèrent au site inflammé lorsque certaines molécules sont impliquées et recrutées à la surface des CE

lésées. La P-sélectine est une molécule d'adhésion de la famille des sélectines qui se lie à son ligand PSGL-1 à la surface des cellules inflammatoires (principalement les leucocytes). Cette interaction entraîne un ralentissement de la vitesse des cellules inflammatoires, ce qui permet à des molécules activatrices (dont le PAF; pour revue 87), d'activer leurs récepteurs à la surface des cellules inflammatoires. Ces molécules activatrices ont pour effet d'augmenter l'expression membranaire d'autres molécules d'adhésion (β -intégrines; pour revue 87), ces dernières contribuant à l'immobilisation complète des cellules inflammatoires au site inflammé.

Nos travaux ont permis de démontrer le rôle de la P-sélectine dans le processus d'adhésion des neutrophiles aux CE. L'adhésion des neutrophiles en condition statique à des CE non-stimulées est minime (~ 50 neutrophiles adhérents / mm^2). Toutefois, un traitement avec le VEGF-A₁₆₅ permet d'augmenter de 318% l'adhésion des neutrophiles aux HUVEC. Ainsi, de façon à déterminer le rôle de la P-sélectine sur l'adhésion des neutrophiles aux HUVEC, nous avons prétraitées celles-ci avec le rPSGL-Ig pour ensuite les stimuler avec le VEGF-A₁₆₅. Le rPSGL-Ig est une molécule qui se lie à la P-sélectine endothéliale empêchant l'interaction avec la PSGL-1 des neutrophiles. Des doses croissantes de rPSGL-Ig ont permis de réduire de façon dose-dépendante l'adhésion des neutrophiles aux HUVEC stimulées avec le VEGF-A₁₆₅ et ce, jusqu'aux valeurs basales. Ces résultats démontrent bien le rôle primordial que joue la P-sélectine dans l'induction de l'adhésion des cellules inflammatoires aux CE.

Nous avons démontré que le PAF est essentiel dans l'induction de la translocation de la P-sélectine à la surface membranaire des CE suite à une stimulation par le VEGF-

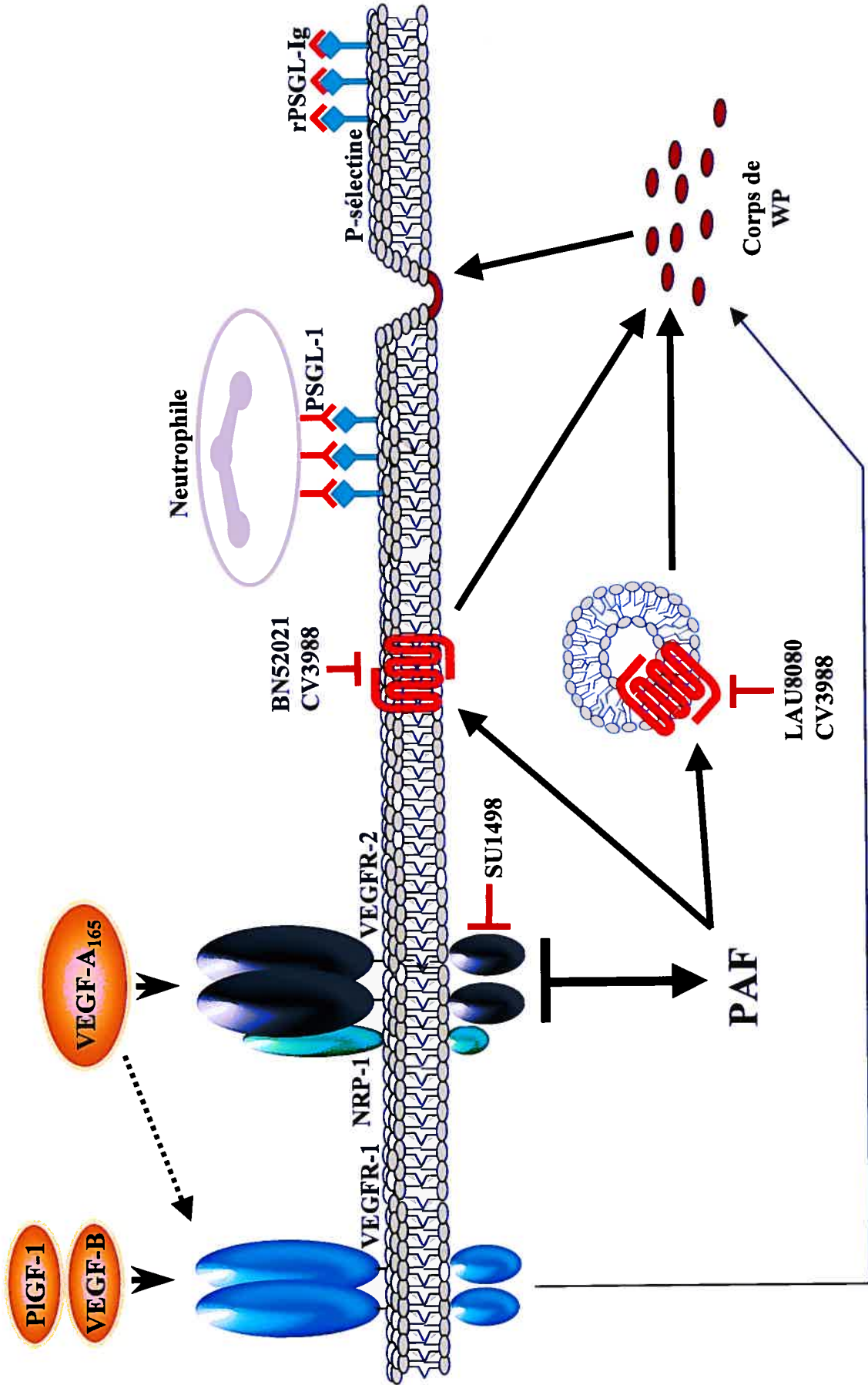
A₁₆₅. Nous avons donc voulu déterminer le rôle du PAF et de ses récepteurs dans l'adhésion des neutrophiles aux HUVEC stimulées avec le VEGF-A₁₆₅. Ainsi, l'antagonisme des récepteurs intracellulaires, des récepteurs membranaires ou de tous les récepteurs du PAF inhibe l'adhésion des neutrophiles aux HUVEC stimulées. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que leur analyse démontre un point essentiel: l'interaction entre le PAF et ses récepteurs membranaires n'est pas impliquée dans le processus direct d'adhésion des neutrophiles avec les CE. En effet, l'emploi du LAU8080 permet d'antagoniser les récepteurs intracellulaires, ce qui n'affecte en rien les récepteurs du PAF présents à la membrane plasmique (148), ces derniers restant disponibles pour interagir avec les neutrophiles. Ainsi, l'inhibition des récepteurs intracellulaires du PAF réduit de 39% la translocation de la P-sélectine, toutefois, cette inhibition partielle est suffisante pour bloquer l'adhésion des neutrophiles aux CE activées. Ces données démontrent bien le fait que la diminution de l'expression de la P-sélectine d'environ 40% est suffisante pour prévenir la quasi-totalité de l'adhésion des neutrophiles aux CE, et ce malgré le fait que le PAF synthétisé *de novo* peut se lier à son récepteur à la surface des neutrophiles. Finalement, ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle la P-sélectine est suffisante pour induire l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE activées et que le PAF n'a peu ou pas d'effet en soi lors de cette adhésion. En fait, le PAF est essentiel dans la translocation de la P-sélectine, qui elle, est essentielle à l'adhésion des neutrophiles aux CE activées.

3.4. Représentation schématique des résultats présentés dans le présent ouvrage.

La Figure 4 schématise les résultats obtenus et présentés dans le présent document. Ainsi, le VEGF-A₁₆₅ a la capacité de lier tous ses récepteurs, mais ses effets biologiques

sont essentiellement induits suite à sa liaison au VEGFR-2 et potentialisé par la NRP-1. La liaison ligand-récepteur mène ensuite à une synthèse de PAF *de novo* qui, à son tour, agit de façon intracrine et autocrine et lie ses récepteurs tant intracellulaires qu'à la surface membranaire. La liaison du PAF à ses récepteurs engendre une réaction qui mène les cWP à fusionner avec la membrane plasmique. L'exocytose des molécules contenues dans les cWP permet d'exposer les molécules d'adhésion P-sélectine du côté luminal des CE. Cette P-sélectine peut se lier à la PSGL-1 à la surface des neutrophiles et ainsi induire l'adhésion des neutrophiles aux CE activées. Il est très intéressant de noter que l'activation du VEGFR-1 par des analogues du VEGF-A permet d'induire une translocation de la P-sélectine, de façon moindre que le VEGF-A₁₆₅, et que cette induction est PAF-indépendante.

Figure 4 : Mécanisme proposé de translocation de la P-sélectine induite par le VEGF-A₁₆₅. Le VEGF-A₁₆₅ induit la synthèse du PAF suite à sa liaison à VEGFR-2/NRP-1. Le PAF lie ses récepteurs tant intracellulaires que membranaires. La liaison du PAF à ses récepteurs engendre l'exocytose des cWP et la relâche des molécules contenues dans les cWP, ce qui permet d'exposer à la lumière vasculaire les molécules d'adhésion P-sélectine. Cette P-sélectine permet ultimement de lier la PSGL-1 à la surface des neutrophiles, ce qui cause leur adhésion aux CE activées. Il est très intéressant de noter que l'activation du VEGFR-1 permet d'induire la translocation de la P-sélectine et que cette translocation est indépendante de la synthèse du PAF.



4.0. CONCLUSION

Ce manuscrit démontre que la stimulation des récepteurs du VEGF mène à la translocation de la P-sélectine endothéliale. La voie principale est médiée suite à l'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1 par le VEGF-A₁₆₅, et est un phénomène nécessitant la synthèse endogène de PAF. De surcroît, nous avons démontré que le PAF exerce ses effets de façon intracrine et autocrine sur la translocation de la P-sélectine. Le PAF est requis pour induire cette translocation, mais qu'il n'est pas impliqué *per se* dans l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE activées (Figure 4). Par ailleurs, la stimulation de VEGFR-1 par le PlGF-1 ou le VEGF-B mène de façon moindre et PAF-indépendante à la translocation de la P-sélectine. Nos travaux démontrent que le VEGF-A₁₆₅ se lie et active le complexe VEGFR-2/NRP-1, ce qui cause la synthèse de PAF endogène. Ce PAF se lie à ses propres récepteurs, membranaires et intracellulaires, ce qui cause la translocation de la P-sélectine. Enfin, cette P-sélectine est essentielle pour l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales.

En conclusion, la composante inflammatoire du VEGF est précisée en partie avec ces nouvelles données sur l'induction de la P-sélectine. Un meilleur contrôle de la P-sélectine dans ces situations pourrait aider à moduler l'adhésion des neutrophiles dans des phénomènes inflammatoires physiologiques et/ou pathologiques. De plus, il serait intéressant de compléter ces études *in vitro* par des études *in vivo* sur les effets qu'exercent le VEGF-A₁₆₅ sur l'induction de la P-sélectine.

5.0. RÉFÉRENCES

- 1- Lucher, T.F., VanHoutte, P.M. The endothelium modulator of cardiovascular function, CRC press, New York, 1990; 228.
- 2- Warrer, J.B. The endothelium: an introduction to current research. Wiley-Liss, New York, 1990; 317.
- 3- Hertig, A.T. Contrib. Embryol. 1935; 25: 37
- 4- Pepper, M.S. Manipulating Angiogenesis. Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol., 1995; 17: 605-619.
- 5- Sandison, J.C. Healing. Anat. Res. 1932; 54: 105.
- 6- Brown, G.C., Magargal, L.E., Federman, J.L. Ischemia and neovascularization. Trans. Ophthalmol. Soc. 1980; 100: 377-380.
- 7- Folkman, J. Clinical applications of research Angiogenesis. N. Engl. J. Med. 1995; 333: 1757-1763.
- 8- Folkman, J. Tumor Angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med., 1971; 285: 1182-1186.
- 9- Michaelson, I.C. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorder. Trans. Ophthalmol. Soc. 1988; 68: 137-180.
- 10- Adamis, A.P., Mille, J.W., Bernal, M-T., D'Amico D., Folkman, J., Yeo, T-K., Yeo, K.T. Increased vascular endothelial growth factor in vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. Am. J. Ophthalmol., 1994; 118: 445-450.
- 11- Vicenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., Persico, G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. Circulation, 1996; 93: 1493-1495.

- 12- Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H., Riseau, W., Ulrich, A. Glioblastoma growth is inhibited in vivo by negative dominant of Flk-1 mutant. *Nature*, 1994; 367: 576-579.
- 13- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, 1983, 219: 983-985.
- 14- Tisher, E., Mitchell, R., Hartmann, T., Silva, M., Gospodarawicz, D., Fiddes, J., Abraham J. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.*, 1991; 266: 11947-11954.
- 15- Leung, D.W., Cachanes, G., Kuang, W-J., Goedde, D.V., Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, 1989; 246: 1306-1309.
- 16- Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., Connolly, D.T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to platelet-derived growth factor, *Science*, 1989; 246: 1309-1312.
- 17- Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachanes, G., Li, B., Leung, D.W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of mRNA, *Mol. Endocrinol.*, 1991; 51: 1806-1814.
- 18- Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodavsky, I., Neufeld, G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules, *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 6093-6098.
- 19- Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., Stackner, S.A. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the

- tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (flt4), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 543-548.
- 20- Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., Persico, M.G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular endothelial growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991; 88: 9267-9271.
- 21- Ferrara, N., Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr. Rev.*, 1997; 18: 4-25.
- 22- Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992; 189: 824-831.
- 23- Ferrara, N., Henzel, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 161: 851-858.
- 24- Connolly, D.T., Heuvelam, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., Feder, J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelium cell growth and angiogenesis, *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 1470-1478.
- 25- Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familetti, P.C., Pan, Y-C., Olander, J.V., Connolly, D.T., Stern, D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration, *J. Exp. Med.*, 1990; 172: 1535-1545.
- 26- Ferrara, N., Carver-Morre, K., Chen, H, Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature*, 1996; 380: 439-442.

- 27- Carmeliet, P, Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gerntsensstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature*, 1996; 380: 435-439.
- 28- Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., Shibuya, M. A unique signal transduction pathway for the Flt tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor, *Oncogene*, 1995; 10: 135-147.
- 29- Plate, K.H., Breier, G., Weich, H., Mennel, H.D., Riseau, W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms, *Int. J. Cancer*, 1994; 59: 520-529.
- 30- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., Sato, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine-kinase gene (flt) closely related to the fms family, *Oncogene*, 1990; 5: 519-524.
- 31- Matthews, W., Jordan, C.T., Gavin, M., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lemischka, I.R. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88: 9026-9030.
- 32- Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., Allitalo, K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development, *Development*, 1996, 122; 3829-3837.
- 33- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., Ferrara, N. Placental growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo,

- and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR, *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 25646-25654.
- 34- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptor for vascular endothelial growth factor, *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 26988-26995.
- 35- Hiratsuka S, O Minowa, J Kuno, Noda, T., Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 9349-54.
- 36- Quinn, T.P., Peters, K.G., de Vries, C., Ferrara, N. and Williams, L.T. Fetal liver kinase-1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 7533-7537.
- 37- Sirois, M.G., Edelman E.R. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor, *Am. J. Physiol.*, 1997; 272: H2746-H2756.
- 38- Bernatchez, P.N., Rollin, S., Soker, S., Sirois, M.G. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J. Cell. Biochem.*, 2002; 85: 629-639.
- 39- Soker, S., Seiji, T., Hua Quan, M., Neufeld, G., Klagsbrun, M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, *Cell*, 1998; 92: 735-745.
- 40- Renzi, M.J., Feiner, L., Koppel, A.M., Raper, J.A. A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1, *J. Neurosci.*, 1995; 19: 7870-7880.

- 41- Takagi, S., Hirata, T. Agata, K. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors, *Neuron*, 1991; 7: 295-307.
- 42- Fujisawa, H., Takagi, S., Hirata, T. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers, *Dev. Neurosc.* 1995; 17: 343-349.
- 43- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature*, 1995; 376: 62-66.
- 44- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium, *Nature*, 1995; 376: 66-70.
- 45- Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanade, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, J.-I., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitsukawa., Fujisawa, H., Klagsburn, M.M., Hori, M., Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002; 99: 3657-3662.
- 46- Giraudet, P. *La réaction inflammatoire: physiopathologie, exploration clinique*, Vigot, Paris 260, 1984.
- 47- Weibel, E.R., Palade, G.E. New cytoplasmic components in arterial endothelia, *J. Cell Biol.*, 1964; 23: 101-112.
- 48- Datta, Y.H., Ewenstein, B.M. Regulated secretion in endothelial cells: biology and clinical implications, *Thromb. Haemost.*, 2001; 86: 1148-1155.

- 49- Wagner, D.D, Olmsted, J.B., Marder, V.J. Immunolocalization of von Willebrand factor protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, *J. Cell Biol.*, 1982; 95: 355-360.
- 50- Ewenstein, B.M., Warhol, M.J., Handin, R.I., Pober, J.S. Composition of the von Willebrand factor storage organelle (Weibel-Palade bodies) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells, *J. Cell Biol.*, 1987; 104: 2177-2187.
- 51- McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L., Bainton, D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies, *J. Clin. Invest.*, 1989; 84: 92-99.
- 52- Utgaard, J.O., Jahnsen, F.L., Bakka, A., Brandtzaeg, P., Haraldsen, G. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells, *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 1751-1756.
- 53- Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., Sims, P.J. 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.*, 1989; 264: 7768-7771.
- 54- Vischer, U.M., Wagner, D.D. CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, *Blood*, 1993; 82: 1184-1191.
- 55- Russell, F.D., Skepper, J.N., Davenport, A.P. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1998; 31: 424-430.
- 56- Wolff, B., Burns, A.R., Middleton, J., Rot, A. Endothelial cell 'memory' of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies, *J. Exp. Med.*, 1998; 188: 1757-1762.

- 57- Rosenoblet, C., Vischer, U.M., Gerard, R.D., Irminger, J.C., Halban, P.A., Kruithof, E.K. Storage of tissue-type plasminogen activator in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, *Artheroscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999; 19: 1796-1803.
- 58- Datta, Y.H., Youssoufian, H., Marks, P.W., Ewenstein, B.M. Targeting of a heterologous protein to a regulated secretion pathway in cultured endothelial cells, *Blood*, 1999; 94: 2696-2703.
- 59- Jackson, J.R., Seed, M.P. Kircher, C.H. Willoughby, D.A., Winkler, J.D. The codependence of Angiogenesis and chronic inflammation, *FASEB J.*, 1997; 11: 457-465.
- 60- Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A., Amento, E.P. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells, *J. Cell. Physiol.*, 1992; 153: 557-562.
- 61- Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Del Sorbo, L., Boccellino, M., Emanelli, G., Camussi, G. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model, *Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2000; 20: 80-88.
- 62- Andrade, S.P., Vieira, L.B., Bakhle, Y.S., Piper, P.J. Effects of platelet-activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse, *Int. J. Exp. Pathol.*, 1992; 73: 503-513.
- 63- Henson, P.M. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence or absence of complement, *J. Immunol.*, 1970; 104: 924-934.
- 64- Jakeman, L.B., Winer, J., Bennet, G.L., Altar, C.A., Ferrara, N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues, *J. Clin. Invest.*, 1992; 89: 244-253.

- 65- Handley, D.A., Arbeeny, C.M., Lee, M.L., van Valen, R.G., Saunders, R.N. Effect of platelet-activating factor on endothelial permeability to macromolecules, *Immunopharmacology*, 1984; 8: 137-144.
- 66- Wykle, R.L., Malone, B., Snyder, F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet aggregating lipid, *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 10256-10260.
- 67- Barnes, P.J., Chung, K.F., Page, C.P. Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988; 81: 919-934.
- 68- Morley, J., Page, C.P. and Paul, W. Inflammatory actions of PAF acether in guinea pig skin, *Br. J. Pharmacol.*, 1984; 80: 503-509.
- 69- Montrucchio, G., Alloatti, G., Camussi, G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.*, 2000; 80: 1669-1699.
- 70- Snyder, F. Platelet-activating factor and related lipids, Plenum Press, New York, 471, 1987.
- 71- Lee, T.-C., Leniham, D.J., Malone, B., Roddy, L., Wasserman, S.I. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils, *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 5526-5530.
- 72- Albert, D.H., Snyder, F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore activation, *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 97-102
- 73- Bernatchez, P.N., Winstead, M.V., Dennis, E.A., Sirois, M.G. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br. J. Pharmacol.*, 2001 ; 134: 197-205.

- 74- Bernatchez, P.N., Allen, B.G., G elinas, D.S., Guillemette, G., Sirois, M.G. Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways, *Br. J. Pharmacol.*, 2001; 134: 1253-1262.
- 75- Shukla, S.D., platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanisms, *FASEB J.*, 1992; 6: 2296-2301.
- 76- Marrache, A.M., Gobeil, F., Bernier, S., Stankova, J., Rola-Pleszczynski, M., Choufani, S., Bkaily, G., Bourdeau, A., Sirois, M.G., Vazquez-Tello, A., Fam, L., Joyal, J.-S., Filep, J.G., Varma, D.R., Ribeiro-da-Silva, A., Chemtob, S., Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor, *J. Immunol.*, 2002; 169: 6474-6481.
- 77- Agrawal, D.K., Ali, N., Numao, T. PAF receptors and G-proteins in human blood eosinophils and neutrophils, *J. Lipid Mediators*, 1992; 5: 101-104.
- 78- Lin, A.Y., Rui, Y.C. Platelet-activating factor induces calcium mobilization and phosphoinositide metabolism in cultured bovine cerebral microvascular endothelial cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1224: 323-328.
- 79- Shi, L.-C., Wang, H.-Y., Horwitz, J., Friedman, E. Guanine nucleotide regulatory proteins, Gq and Gi1/2, mediates platelet-activating factor-stimulated phosphoinositide metabolism in immortalized hippocampal cells, *J. Neurochem.*, 1996; 67: 1478-1484.
- 80- Bazan, H.E., Reddy, S.T., Woodland, J.M., Bazan, N.G. The accumulation of platelet activating factor in the injured cornea may be interrelated with the synthesis of lipoxygenase products, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 149: 915-920.
- 81- Bazan, H.E., Braquet, P., Reddy, S.T., Bazan, N.G. Inhibition of the alkali burn-induced lipoxygenation of arachidonic acid in the rabbit cornea in vivo by a platelet activating factor antagonist, *J. Ocul. Pharmacol.*, 1987; 3: 357-365.

- 82- Marcheselli, V.L., Rossowska, M.J., Domingo, M.-T., Braquet, P., Bazan, N.G. Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex, *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 9140-9145.
- 83- Bazan, N.G., Squinto, S.P., Braquet, P., Panetta, T., Marcheselli, V.L. Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a Fos/Jun/AP-1 transcriptional signaling system, *Lipids*, 1991; 26: 1236-1242.
- 84- Terashita, Z.-I., Tsushima, S., Yoshioka, Y., Nomura, H., Inada, Y., Nishikawa, K. CV-3988 - a specific antagonist of platelet activating factor (PAF), *Life Science*, 1983; 32: 1975-1982.
- 85- Marcheselli, V.L., Bazan, N.G. Platelet-activating factor is a messenger in the electroconvulsive shock-induced transcriptional activation of *c-fos* and *zif-268* in hippocampus, *J. Neuroscience Res.*, 1994; 37: 54-61
- 86- Vestweber, D., Blanks, J.E. Mechanisms that regulate the function of the Selectins and their ligands, *Physiol. Review*, 1999; 79: 181-213.
- 87- Bevilacqua, M.P., Poher, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., Gimbrone Jr., M.A. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 9238-9242.
- 88- Poher, J.S., Lapierre, L.A., Stolenpen, A.H., Brock, T.A., Springer, A.T., Fiers, W., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Gimbrone Jr., M.A. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin-1 species, *J. Immunol.* 1987; 138: 3319-3324.

- 89- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone Jr., M.A., Seed, B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins, *Science*, 1989; 243: 1160-1165.
- 90- Levinovitz, A., Mühlhoff, J., Isenmann, S., Vestweber, D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells, *J. Cell Biol.*, 1993; 121: 449-459.
- 91- Goetz, D.J., Greif, D.M., Ding, H., Camphausen, R.T., Howes, S., Comess, K.M., Snapp, K.R., Kansas, G.S., Luscinskas, F.W. Isolated P-selectin glycoprotein ligand-1 dynamic adhesion to P- and E-selectin, *J. Cell Biol.*, 1997; 137: 509-519.
- 92- Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Vestweber, D. Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells, *J. Cell Biol.*, 1994; 125: 471-481.
- 93- Hickey, M.J., Kanwar, S., McCafferty, D.M., Granger, D.N., Eppihimer, M.J., Kubes, P. Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen, *J. Immunol.*, 1999; 162: 1137-1143.
- 94- Kunkel, E.J., Ley, K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo, *Circ. Res.*, 1996; 79: 1196-1204.
- 95- Ley, K., Allietta, M., Bullard, D.C., Morgan, S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo, *Circ. Res.*, 1998; 83: 287-294.
- 96- Forlow, S.B., White, E.J., Barlow, S.C., Feldman, S.H., Lu, H., Bagby, G.J., Beaudet, A.L., Bullard, D.C., Ley, K. Severe inflammatory defect and reduced viability in CD18 and E-selectin double-mutant mice, *J. Clin. Invest.*, 2000; 106: 1457-1466.

- 97- Lewinshon, D.M., Bargatze, R.F., Butcher, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes, *J. Immunol.*, 1987; 138: 4313-4321.
- 98- Griffin, J.D., Spertini, O., Ernst, T.J., Belvin, M.P., Levine, H.B., Kanakura, Y., Tedder, T.F. GM-CSF and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursors, *J. Immunol.*, 1990; 145: 576-584.
- 99- Jutila, M.A., Rott, L., Berg, E.L., Butcher E.C. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1, *J. Immunol.* 1989; 143: 3318-3324.
- 100- Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., Butcher, E.C. Neutrophil MAC-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors, *Science*, 1989; 145: 1238-1241.
- 101- Walcheck, B., Khan, J., Fisher, J.M., Wang, B.B., Fisk, R.S., Payan, D.G., Feehan, C., Betageri, R., Darlak, K., Spatola, A.F., Kishimoto, T.K. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro, *Nature*; 1996; 380: 720-723.
- 102- Hemmerich, S., Rosen, S.D. 6'-sulfated sialyl Lewis x is a major capping group of GlyCAM-1, *Biochemistry*, 1994; 33: 4830-4835.
- 103- Baumhueter, S., Dybdal, N., Kyle, C., Lasky, L.A. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin, *Blood*, 1994; 84: 2554-2565.
- 104- Baumhueter, S., Singer, M.S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S.D., Lasky, L.A. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34, *Science*, 1993; 262: 436-438.

- 105- Shyjan, A.M., Bertagnolli, M., Kenney, C.J., Briskin, M.J. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) demonstrates structural and functional similarities to the alpha 4 beta 7-integrin binding domains of murine MadCAM-1, but extreme divergence of mucin-like sequence, *J. Immunol.*, 1996; 156: 2851-2857.
- 106- Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F., Butcher, E.C. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MadCAM-1, *Nature*, 1993; 366: 695-698.
- 107- Hemmerich, S., Butcher, E.C., Rosen, S.D. Sulfation-dependent recognition of high endothelial venules (HEV)-ligands by L-selectin and MECA 79, an adhesion-blocking monoclonal antibody, *J. Exp. Med.*, 1994; 180: 2219-2226.
- 108- Tracey, J.B., Rinder, H.M. Characterization of the P-selectin ligand on human hematopoietic progenitors, *Exp. Hematol.*, 1996; 24: 1494-1500.
- 109- Tu, L., Chen, A., Delahunty, M.D., Moore, K.L., Watson, S.R., McEver, R.P., Tedder, T.F. L-selectin binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes: interactions between the lectin, epidermal growth factor, and consensus repeat domains of the selectins determine ligand binding specificity, *J. Immunol.*, 1996; 157: 3995-4004.
- 110- Palecanda, A., Walcheck, B., Bishop, D.K., Jutila, M.A. Rapid activation-independent shedding of leukocyte L-selectin induced by cross-linking of the surface antigen, *Eur. J. Immunol.*, 1992; 22: 1279-1286.
- 111- Geng, J.-G., Bevilacqua, M.P., Moore, K.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Kim, J.M., Bliss, G.A., Zimmerman, G.A., McEver, R.P. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140, *Nature*, 1990; 343: 757-760.
- 112- Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., Sims, P.J. 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.*, 1989; 264: 7768-7771.
- 113- Michelson, A.D., Barnard, M.R., Hechman, H.B., MacGregor, H., Connolly, R.J., Loscalzo, J., Valeri, C.R. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996; 93: 11877-11882.
- 114- Berger, G., Hartwell, D.W., Wagner, D.D. P-selectin and platelet clearance, *Blood*, 1998; 92: 4446-4452.
- 115- Hartwell, D.W., Mayadas, T.N., Berger, G., Frenette, P.S., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and early inflammatory responses, *J. Cell Biol.*, 1998; 143: 1129-1141.
- 116- Yao, L., Pan, J., Setiadi, H., Patel, K.D. and McEver, R.P., Interleukin 4 and oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA protein in human endothelial cells, *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 81-92.
- 117- Kumar, R., Camphausen, R.T., Sullivan, F.X. and Cumming, D.A., Core2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase enzyme activity is critical for P-selectin glycoprotein ligand-1 binding to P-selectin, *Blood*, 1996: 3872-3879.
- 118- Li, F., Wilkins, P.P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R.D., McEver, R.P. Post-translational modifications of recombinant P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P- and E-selectin, *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 3255-3264.
- 119- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichensteinm H.S., Cummings, R.D., McEver, R.P. The P-selectin glycoprotein ligand-1 from human neutrophils displays sialyted, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine, *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 23318-23327.

- 120- Wilkins, P.P., McEver, R.P., Cummings, R.D. Structures of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells, *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 18732-18742.
- 121- Krieglstein, C.F., Granger, D.N. Adhesion molecules and their role in vascular disease, *Am. J. Hypert.*, 2001; 14: 44S-54S.
- 122- Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. Human chemokines: an update, *Annual Rev. Immunol.*, 1997; 15: 675-705.
- 123- Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions, *J. Clin. Invest.*, 1997; 98: 1699-1701.
- 124- Jung, U., Norman, K.E., Scharffetter-Kochanek, K., Beaudet, A.L., Ley, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo, *J. Clin. Invest.*, 1998;102: 1526-1533.
- 125- Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice, *Cell*, 1993; 74: 541-554.
- 126- Milstone, D.S., Fukumura, D., Padgett, R.C., O'Donnell, P.E., Davis, V.M., Benavidez, O.J., Monsky, W.L., Melder, R.J., Jain, R.K., Gimbrone, M.A. Jr. Mice lacking E-selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium, *Microcirculation*, 1998; 5: 153-171.
- 127- Walzog, B., Scharffetter-Kochanek, K., Gaetgens, P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice, *Am. J. Physiol.*, 1999; 276: G1125-1130.
- 128- Mizgerd, J.P., Kubo, H., Kutkoski, G.H., Bhagwan, S.D., Scharffetter-Kochanek, K., Beaudet, A.L., Doerschuk, C.M. Neutrophils emigration in the skin, lungs and

- peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice, *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1357-1364.
- 129- Hynes, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell*, 1992; 69: 11-25.
- 130- Berlin. C., Bargatze, R.F., Campbell, J.J., von Andrian, U.H., Szabo, M.C., Hasslen, S.R., Nelson, R.D., Berg, E.L., Erlandsen, S.L., Butcher, E.C. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow, *Cell*, 1995; 80: 413-422.
- 131- Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E., Springer, T.A. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell. Biol.* 1995; 128: 1243-1253.
- 132- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., Phillips, D.M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes, *J. Exp. Med.*, 1993; 178: 449-460.
- 133- Muller, W.A. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo, *J. Leukoc. Biol.*, 1995; 57: 523-528.
- 134- Bernatchez, P.N., Soker, S., Sirois, M.G. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 31047-31054.
- 135- Robinson, C.J., Stringer, S.E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, *J. Cell Science*, 2001; 114: 853-865.
- 136- Brock, T.A., Dvorak, H.F., Senger, D.R. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca⁺⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells, *Am. J. Pathol.*, 1991; 138: 213-221.

- 137- Hippenstiel, S., Krull, Ikemann, A., Risau, W., Clauss, M., Suttorp, N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells, *Am. J. Physiol.*, 1998; 274: L678-L-684.
- 138- Neufeld, G., Kessler, O., Herzog, Y. The interaction of neuropilin-1 and neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002; 515: 81-90.
- 139- Shibuya, M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1), *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 2001; 33: 409-420.
- 140- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M., Shibuya, M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor (PlGF), which is related to vascular endothelial growth factor (VEGF), *Cell Growth Differ.* 1996; 7: 213-221.
- 141- Ziche, M., Maglione, D., Ribatti, D., Morbidelli, L., Lago, C.T., Battisti, M., Paoletti, I., Barra, A., Tucci, M., Parise, G., Vincenti, V., Granger, H.J., Viglietto, G., Persico, M.G. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic, *Lab. Invest.* 1997; 76: 517-531.
- 142- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1, *Nat. Med.* 2003; (advance online publication): 1-8.
- 143- Sugama, Y., Tiruppathi, C., Janakidevi, K., Andersen, T.T., Fenton, J.W., Malik, A.B. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intracellular adhesion molecule-1: A mechanism for stabilizing neutrophil adhesion, *J. Cell Biol.* 1992; 119: 935-944.

- 144- Bonafanti, R., Furie, B.C., Furie, B., Wagner, D.D. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, *Blood*. 1989; 73: 1109-1112.
- 145- Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., McEver, R.P. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells, *J. Cell Biol.* 1992; 118: 445-456.
- 146- Bussolino, F., Camussi, G. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties, *Eur. J. Biochem.* 1995; 229: 327-337.
- 147- Marcheselli, V.L., Bazan, N.G. Platelet-activating factor is a messenger in the electroconvulsive shock-induced transcriptional activation of c-fos and zif-268 in hippocampus, *J. Neurosci. Res.* 1994; 37: 54-61.

