

Université de Montréal

EXPRESSION DE LA E- ET DE LA P-SÉLECTINE DANS LES
DERMATITES INDUITES PAR LE TUMOR NECROSIS FACTOR-
ALPHA (TNF- α) CHEZ LE CHIEN

Par

CLAUDINE TREMBLAY

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences vétérinaires option pathologie

Février, 2001

©Claudine Tremblay, 2001



SF
607
W54
2001
N.006

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

EXPRESSION DE LA E- ET DE LA P-SÉLECTINE DANS LES
DERMATITES INDUITES PAR LE TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA
(TNF- α) CHEZ LE CHIEN

Présenté par

CLAUDINE TREMBLAY

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Anne Lanevschi, Présidente du jury

Monique Doré, directrice de recherche

Christiane Girard, membre du jury

Mémoire accepté le 28 AVR 2001

SOMMAIRE

Les molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales jouent un rôle important dans le recrutement de leucocytes lors de différents processus inflammatoires. Les sélectines vasculaires sont responsables de l'adhésion initiale des leucocytes à l'endothélium durant leur extravasation vers les tissus enflammés. Des études *in vitro* chez le chien ont démontré que l'expression des sélectines peut être induite par certaines cytokines comme le tumor necrosis factor- α (TNF- α) et l'interleukine-1 (IL-1). L'objectif de cette étude était de déterminer si les sélectines vasculaires sont induites par les cytokines *in vivo* dans un modèle d'inflammation cutanée chez le chien. Des biopsies de peau ont été prélevées chez neuf chiens à des intervalles de temps variés après une injection intradermique de TNF- α (10 ng/site) ou de solution tampon contenant 0.1% d'albumine sérique bovine (PBS/BSA). Les anticorps monoclonaux MD3 (anti-P-sélectine) et CL-37 (anti-E-sélectine) ont été utilisés pour effectuer des colorations immunohistochimiques. Chez tous les animaux, le TNF- α a induit une réaction inflammatoire qui était maximale à 12 heures, et diminuait progressivement à 24 et 48 heures. Les sections de peau des chiens contrôles ne démontraient aucune expression de E- ou de P-sélectine tandis que le TNF- α a induit l'expression de P- et de E-sélectine dans les vaisseaux du derme dont le niveau le plus élevé a été remarqué à 12 heures et à 3 heures respectivement ($P < 0.05$). Plusieurs agrégats de plaquettes reconnus par l'anticorps anti-P-sélectine ont été observés dans la lumière de vaisseaux sanguins et dans les tissus périvasculaires. Ces résultats démontrent que le TNF- α peut induire l'expression de la P- et de la E-sélectine *in vivo* dans la peau chez le chien et suggèrent que ces sélectines sont impliquées dans le recrutement des leucocytes lors de dermatite chez l'espèce canine.

TABLES DES MATIÈRES

	Page
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Tables des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	x
Revue de littérature	
1. Inflammation	1
1.1 Définition	1
2. Inflammation aiguë	2
2.1 Cytokines et chémokines	3
2.1.1 Cytokines	3
2.1.2 Chémokines	3
2.2 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	4
2.2.1 Généralités	4
2.2.2 Récepteurs cellulaires du TNF- α	5
2.2.3 Activation des gènes proinflammatoires par le TNF- α	6
2.3 Changements vasculaires	8
2.3.1 Vasodilatation	8
2.3.2 Augmentation de la perméabilité vasculaire	8
2.3.3 Margination des leucocytes	9
2.4 Recrutement des leucocytes	10
3. Molécules d'adhésion	11
3.1 Les trois familles de molécules d'adhésion	11
3.1.1 Les sélectines	11
3.1.2 Les intégrines	15

	Page
3.1.3 Les immunoglobulines	16
3.2 P-sélectine	16
3.2.1 Expression	16
3.2.2 Endocytose	18
3.2.3 Distribution	18
3.2.4 Rôle	19
3.3 E-sélectine	21
3.3.1 Expression	21
3.3.2 Régulation de l'expression	22
3.3.3 Rôle	22
3.4 Les ligands des sélectines	22
3.5 Plaquettes	24
3.5.1 Activation	24
3.5.2 Plaquettes et Rolling	24
4. Les molécules d'adhésion et la peau	25
4.1 Atopie et dermatites allergiques	26
4.2 Hypersensibilité retardée	27
4.3 Psoriasis	28
4.4 Dermatites canines	28
4.5 Modèles expérimentaux de dermatite aiguë	29
Article	31
Discussion	65
Conclusion	70
Références	72

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1: Caractéristiques des souris déficientes en sélectine.....	20

Liste des figures

	Page
<u>Revue de littérature</u>	
Figure 1: Séquence des événements histologiques d'un processus inflammatoire	2
Figure 2: Représentation schématique de la réponse intracellulaire au TNF- α par le TNFR-I et le TNFR-II	6
Figure 3: Diagramme schématique de l'activation du NF- κ B	7
Figure 4: Régulation du recrutement et du mouvement des leucocytes dans un tissu enflammé.....	10
Figure 5: Structure des sélectines	13
<u>Article</u>	
Figure 1: Skin; dog : control skin	57
Figure 2: Skin; dog : three hours after TNF- α intradermal injection	58
Figure 3: Skin; dog : six hours after TNF- α intradermal injection.....	59
Figure 4: Skin; dog : twelve hours after TNF- α intradermal injection.....	60
Figure 5: Skin; dog : control skin. Immunohistochemistry performed with anti-P-selectin antibody	61
Figure 6 Skin; dog: twelve hours after TNF- α intradermal injection. Immunohistochemistry performed with anti-P-selectin antibody	62

	Page
Figure 7: Leukocyte infiltration in TNF- α -induced dermatitis	63
Figure 8: E- and P-selectin expression in TNF- α -induced dermatitis	64

Liste des sigles et des abréviations

ADP: Adénosine diphosphate
ATF: Activating transcription factor
AINS: Anti-inflammatoire non-stéroïdien
AP-1: Activating protein-1
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: Acide ribonucléique messenger
CD: Classe de différenciation
DTH: Delayed type hypersensitivity
EGF: Epidermal growth factor
ESL-1: E-selectin ligand-1
ICAM: Intercellular adhesion molecule
INF- γ : Interféron-gamma
IL: Interleukine
LAD: Leukocyte adhesion deficiency
LFA: Leukocyte function antigen
LPS: Lipopolysaccharide
MadCAM: Mucosal addressin cell adhesion molecule
NF- κ B: Nuclear factor kappa B
NIK: NF- κ B inducing kinase
NO: Oxyde nitrique
PBS/BSA: Phosphate buffered saline/Bovine serum albumine
PCR: Polymerase chain reaction
PECAM: Platelet endothelial cell adhesion molecule
PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1
SCR: Short consensus repeat
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TNFR: Tumor necrosis factor receptor
VCAM: Vascular cell adhesion molecule
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VLA: Very late antigen

Remerciements

Cette étude a été subventionnée par le Fonds du Centenaire de l'Université de Montréal et le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada.

L'auteure remercie sa directrice de recherche, Dre Monique Doré, pour sa rigueur scientifique et son perfectionnisme; Dres Manon Paradis et Nadia Bergeron pour leur expertise dermatologique; M. et Mmes Jules Deslandes, Line Pépin, Jacinthe Cardin, Bibiane Pépin pour leur support technique; Mme Hélène Brodeur, Dres Ellen Pestilli, Julie Boisclair et Isabelle Lanthier ainsi que Drs Jean-René Galarneau, Luc Chouinard et Igor Mikaelian pour leur aide lors des manipulations; Dr. C. W. Smith pour nous avoir fourni l'anticorps CL-37 et M. Sébastien Julien pour sa compréhension et son support.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. INFLAMMATION

1.1 Définition

Tout au cours de leur vie, les mammifères sont soumis à différents stimuli exogènes ou endogènes qui induisent parfois des processus inflammatoires localisés ou généralisés. Fondamentalement, l'inflammation est nécessaire pour la protection contre les pathogènes exogènes ou endogènes. Elle a comme but ultime la destruction de l'agent causant le dommage cellulaire ou tissulaire. Suite à un stimulus¹, une cascade de réactions complexes se produisent dans les tissus. Ces réactions sont généralement orchestrées de façon rigoureuse par de nombreux médiateurs cellulaires ou plasmatiques. L'un des points tournants des processus inflammatoires se produit lorsque les vaisseaux sanguins réagissent en réponse au stimulus. Leur endothélium devient alors plus perméable et interagit avec les cellules sanguines provoquant l'accumulation de fluides et de leucocytes dans les tissus. L'infiltrat inflammatoire, l'œdème et les médiateurs de l'inflammation servent à détruire, à diluer et à localiser l'agent agresseur mais causent aussi des dommages aux tissus environnants¹. L'inflammation est intimement associée à la réparation tissulaire qui commence tôt dans le processus inflammatoire.

On sépare l'inflammation en processus aigu ou chronique. L'inflammation aiguë est de courte durée, soit de quelques heures jusqu'à quelques jours (environ deux jours). Elle est principalement caractérisée par une exsudation de fluides et de protéines plasmatiques (œdème) dans les tissus, par l'activation des plaquettes intravasculaires et par une émigration de leucocytes, majoritairement des neutrophiles^{1,114} (Figure 1). L'inflammation chronique quant à elle, est de plus longue durée et fait souvent suite à l'inflammation aiguë lorsque l'agent causal ne peut être éliminé. Elle se caractérise histologiquement par la présence de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages, par de la fibrose, de la néovascularisation et parfois par de la nécrose tissulaire^{1,114}.

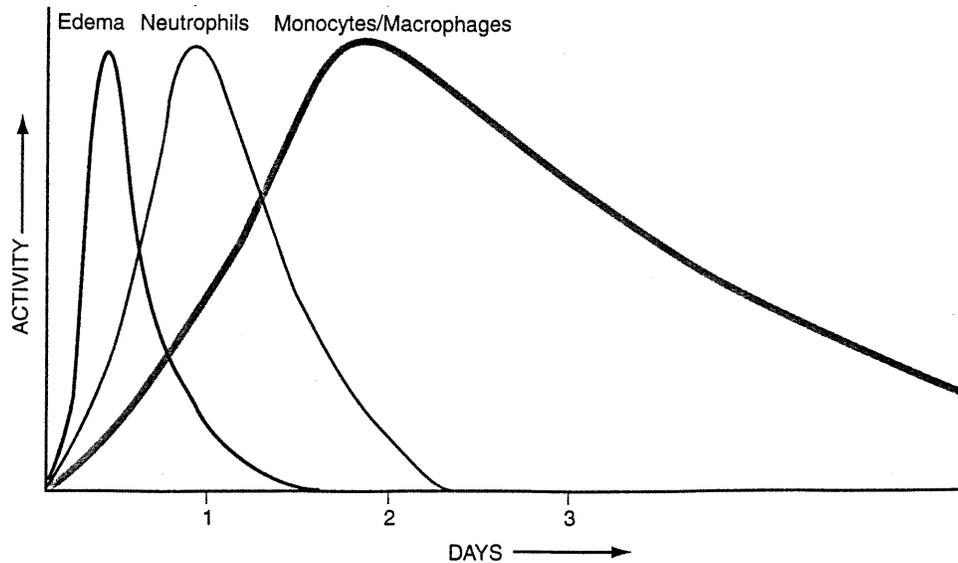


Figure 1 Séquence des événements histologiques lors d'un processus inflammatoire. L'œdème apparaît rapidement mais est un phénomène transitoire qui diminue considérablement, tôt dans la réaction inflammatoire. Les neutrophiles constituent la première ligne de défense lors d'une insulte. L'apparition des macrophages reflète le début de la chronicité d'un processus qui dure depuis quelques jours. Tiré de référence 1.

Cette revue de littérature traitera plus particulièrement de l'inflammation aiguë, puisque les dermatites induites par le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) se traduisent par une réaction inflammatoire aiguë.

2. INFLAMMATION AIGUË

La réponse inflammatoire contre un agent pathogène survient rapidement et implique principalement deux constituants du système immunitaire retrouvés dans la circulation sanguine : les anticorps (défense spécifique) et les leucocytes (défense non-spécifique). Il n'est donc pas surprenant que les phénomènes vasculaires aient une importance capitale dans les inflammations aiguës^{1,14}. Ces changements vasculaires ainsi que la migration des leucocytes à un endroit spécifique sont influencés par plusieurs médiateurs comme les chémokines et les autres cytokines^{1,2}.

2.1 Cytokines et Chémokines

2.1.1 Cytokines

Les cytokines sont des protéines produites par plusieurs types de cellules. Les lymphocytes et les macrophages activés en synthétisent en grande quantité lors d'inflammation et en sont la source principale¹. Les cellules endothéliales et les cellules du tissu conjonctif sont également de bonnes sources de cytokines. Les cytokines peuvent être sous-classifiées en monokines (produites par les macrophages), lymphokines (produites par les lymphocytes), interleukines (produites par les cellules hématopoïétiques) et les chémokines (pouvoir chimiotactique). Lors d'une réaction inflammatoire, les cellules synthétisent une multitude de cytokines qui vont interagir avec plusieurs types de cellules environnantes. Cette synthèse est transitoire et rigoureusement régulée, sa durée dépendant principalement du stimulus. Les cytokines provoquent souvent des réactions en chaîne, une cytokine induisant la synthèse d'une autre cytokine par la même cellule ou par une cellule voisine et ainsi de suite. Les cytokines interagissent avec leur récepteur sur les cellules cibles. L'expression de ces récepteurs est régulée par différents signaux endogènes ou exogènes.

Les cytokines ayant un rôle dans l'activation des cellules inflammatoires incluent l'interféron-gamma (IFN- γ), le TNF- α , le TNF-bêta (β) et les interleukines 5, 10 et 12 (IL-5, IL-10 et IL-12)¹. Ces cytokines sont notamment impliquées dans l'activation des macrophages et des autres leucocytes lors d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire telle que dans les dermatites expérimentales de ce projet de recherche.

2.1.2 Chémokines

Le chimiotactisme peut se définir comme étant un mouvement des cellules en direction d'un stimulus chimique². Cette migration se fait selon le gradient chimique dans les tissus enflammés. Donc, les substances chimiotactiques

stimulent les cellules inflammatoires et dirigent leur mouvement vers le site inflammatoire. Des substances exogènes tout comme des substances endogènes possèdent un pouvoir d'attraction sur les leucocytes. Les constituants de la paroi bactérienne (lipopolysaccharide [LPS]) et certains autres produits bactériens représentent l'exemple le plus commun d'agents chimiotactiques exogènes¹.

Les stimuli chimiotactiques endogènes classiques incluent un dérivé du complément, le C5a, ainsi que certains dérivés de l'acide arachidonique comme la leukotriène B₄². Ces médiateurs formés au site de l'inflammation recrutent une variété de leucocytes de façon non-spécifique.

Durant la dernière décennie, plusieurs cytokines chimiotactiques (chémokines) ont été découvertes. Cette nouvelle classe importante de médiateurs inflammatoires attire généralement des sous-groupes spécifiques de leucocytes (eg. IL-8 pour les neutrophiles et éotaxine pour les éosinophiles)². Elles peuvent être produites par une variété de cellules mais les cellules inflammatoires mononucléaires représentent la source principale de ces médiateurs. Ces protéines ont un poids moléculaire de 8 à 10 kilodaltons et partagent des caractéristiques structurales communes³. Elles interagissent avec des récepteurs membranaires spécifiques pour une ou plusieurs chémokines. La majorité des récepteurs pour les chémokines sont exprimés par les leucocytes bien que d'autres cellules peuvent aussi en posséder en quantité moindre (eg. neurones, astrocytes, cellules microgliales, épithéliales ou endothéliales)⁴.

2.2 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

2.2.1 Généralités

A l'origine, le TNF- α a été décrit par Carswell et collaborateurs comme une substance induite par les endotoxines, dérivée des macrophages et qui cause de la nécrose hémorragique dans les tumeurs solides⁵. Cette protéine a subséquemment été clonée et on lui a attribué un large éventail d'activités. Au niveau cellulaire, le TNF- α est responsable de l'activation de plusieurs gènes

impliqués dans la réponse inflammatoire, la prolifération cellulaire, la réponse contre les agents viraux, l'inhibition de la croissance et la mort cellulaire⁶. Avec l'interleukine-1 (IL-1), il représente une des deux cytokines majeures de l'inflammation⁶. Leur sécrétion par les macrophages activés peut être stimulée par différentes substances dont les endotoxines, les complexes immuns, les toxines, les dommages chimiques ainsi que lors d'une variété de processus inflammatoires¹.

L'endothélium vasculaire est la cible principale des actions proinflammatoires du TNF- α et de l'IL-1^{1,7}. Dans les cellules endothéliales, plusieurs changements sont induits par ces cytokines, la plupart étant régulés par la transcription des gènes. L'ensemble de ces modifications de l'endothélium est appelé l'"activation endothéliale"⁸. Plus particulièrement, le TNF- α et l'IL-1 induisent la synthèse de molécules d'adhésion et de médiateurs chimiques (incluant d'autres cytokines, des chémokines, des facteurs de croissance, des eicosanoïdes et de l'oxyde nitrique [NO]), la production d'enzymes associées au remodelage de la matrice extracellulaire et l'augmentation de la thrombogénicité de l'endothélium^{1,9}. Le TNF- α est aussi responsable de l'agrégation et de l'amorçage ("priming") des neutrophiles¹.

2.2.2 Récepteurs cellulaires du TNF- α

Deux types de récepteurs membranaires (TNFR-I et TNFR-II) sont responsables de la majorité des réponses cellulaires médiées par le TNF- α ⁷. L'expression de ces deux récepteurs sur les cellules est omniprésente. Ils font partie de la superfamille des récepteurs TNF (TNF receptor superfamily) qui inclut également le récepteur lymphotoxin- α , le Fas (CD95) et le CD40¹⁰. La plupart des réponses inflammatoires induites par le TNF- α semblent médiées par le TNFR-I. En effet, les animaux déficients en TNFR-I ne démontrent pas de réaction inflammatoire suite à une stimulation par le TNF- α tandis que les animaux déficients en TNFR-II démontrent une réponse inflammatoire, bien qu'elle soit légèrement diminuée¹¹. Plusieurs évidences suggèrent que le signal par le TNFR-II pourrait être additif au signal du TNFR-I⁷. Cependant, le rôle exact du TNFR-II

dans plusieurs types cellulaires, incluant les cellules endothéliales, demeure encore incertain.

2.2.3 Activation des gènes proinflammatoires par le TNF- α

Les deux principaux facteurs de transcription activés par le TNF- α sont le facteur nucléaire kappa B (nuclear factor κ B; NF- κ B) et la protéine activatrice 1 (activating protein 1; AP-1)⁷.

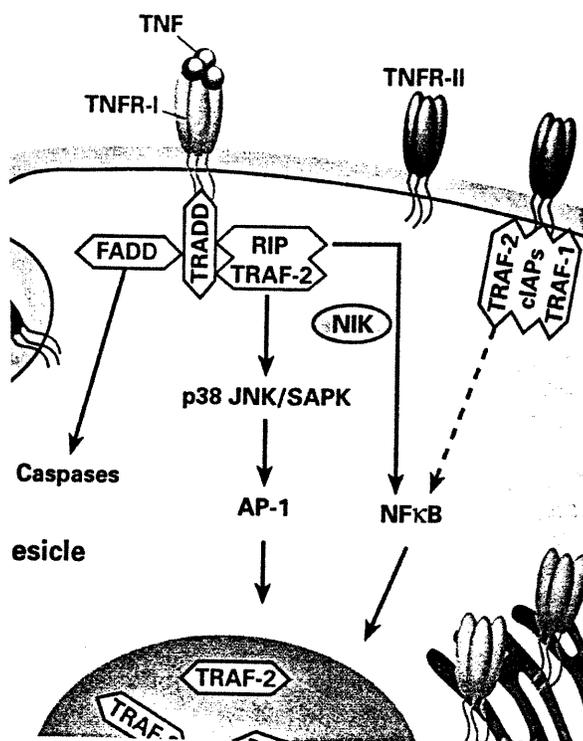


Figure 2 Représentation schématique de la réponse intracellulaire suite à l'activation du TNFR-I et du TNFR-II par le TNF α . (Modification de la figure 1, référence 7)

Dans une cellule non-activée, le NF- κ B réside dans le cytoplasme sous forme d'un complexe avec son inhibiteur, le I κ B (Figure 2)¹². Après une stimulation par le TNF- α , le I κ B est phosphorylé par le complexe kinase I κ B (NF- κ B inducing kinase; NIK). Cette réaction inactive le I κ B et libère le NF- κ B de son complexe. Une fois libre dans le cytoplasme, le NF- κ B migre dans le noyau

où il se lie au site κB des régions promotrices (promoter region) des gènes de protéines inflammatoires¹³ (Figure 3). Parmi celles-ci, on retrouve un grand nombre de cytokines, des enzymes et des molécules d'adhésion dont ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine¹² et P-sélectine (il existe cependant une variation selon les espèces pour cette dernière molécule d'adhésion).

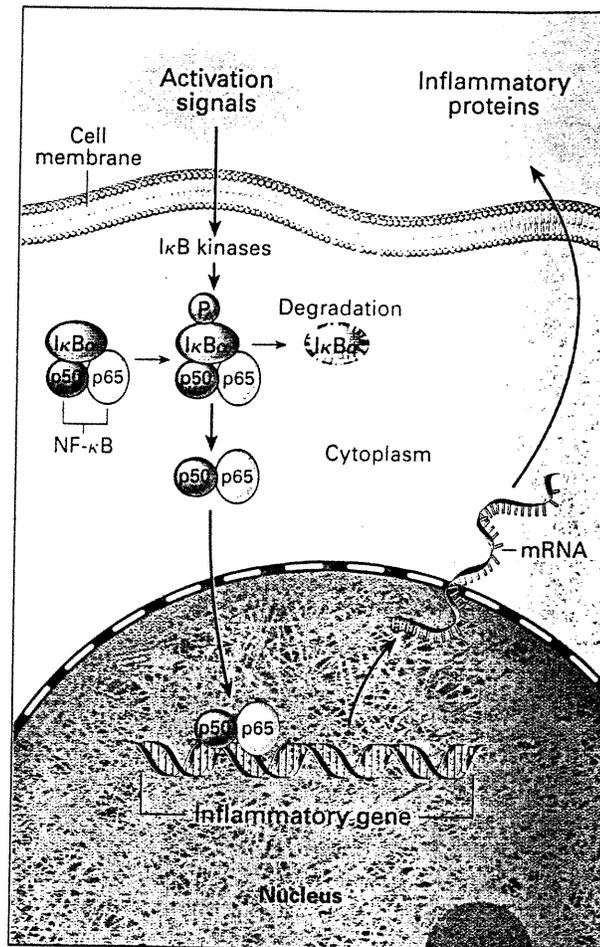


Figure 3 Diagramme schématique de l'activation du NF- κ B.

Le NF κ B (p50-p65) est séquestré dans le cytoplasme sous forme de complexe avec le I κ B. Une fois libéré de son emprise, il migre dans le noyau pour amorcer la transcription de gènes codant pour des protéines inflammatoires. Tiré de référence 12.

L'AP-1 fait partie d'une famille d'activateurs transcriptionnels et est normalement formée d'un homo- ou d'un hétérodimère de Jun, Fos et de membres de la famille de l'activateur de facteur de transcription (activating transcription factor; ATF)¹⁴. Dans les cellules endothéliales par exemple, le TNF- α induit un

complexe c-Jun/ATF-2, responsable de l'induction de la synthèse de E-sélectine¹⁵. L'activation de l'AP-1 par le TNFR est régulée par la voie de signalisation ("signaling pathway") du "mitogen activated protein kinase" (MAPK) ou par d'autres chemins (eg. p38 kinase, JNF/SAPK pathway)⁷.

2.3 Changements vasculaires

2.3.1 Vasodilatation

Lors d'une agression, la réponse vasculaire initiale consiste en une vasoconstriction transitoire des artéioles d'une durée de quelques secondes. Cette réaction qui n'est pas constante pourrait être induite par certains médiateurs dont l'endothéline, une substance produite par les cellules endothéliales¹¹⁵. Par la suite, on observe une vasodilatation qui implique tout d'abord les artéioles et qui résulte en l'ouverture de nouveaux lits capillaires dans les régions avoisinantes. Il survient alors une augmentation du flot vasculaire, ce qui produit de la rougeur et de la chaleur localisées au site inflammatoire. La chaleur et la rougeur sont, avec la tuméfaction et la douleur, les quatre signes cardinaux de l'inflammation^{1,114}. La durée de la vasodilatation dépend de la virulence et de la persistance du stimulus. Éventuellement, cette vasodilatation provoque un ralentissement plus ou moins marqué de la circulation sanguine.

2.3.2 Augmentation de la perméabilité vasculaire

Le passage de fluides riches en protéines (exsudat) à travers la paroi vasculaire et son accumulation dans les tissus représente l'une des caractéristiques majeures de l'inflammation aiguë. Cette accumulation protéique dans les tissus crée une pression osmotique importante qui entraîne une augmentation accrue des fluides extravasculaires, que l'on appelle l'œdème. Dans un tissu sain, l'échange de fluides entre les compartiments intra- et extravasculaires dépend de l'intégrité de l'endothélium. Lors d'une inflammation, plusieurs mécanismes permettent le

passage de fluides dans les tissus. 1) La **contraction des cellules endothéliales**¹⁵ est médiée par des substances vasoactives (eg. histamine, sérotonine) et elle se produit seulement dans les veinules. Elle survient rapidement après l'insulte et dure de 15 à 30 minutes. 2) Une **réorganisation du cytosquelette**¹⁶ des cellules endothéliales peut être induite par certaines cytokines dont l'IL-1, le TNF- α et l'interféron- γ . Les cellules se séparent les unes des autres permettant ainsi le passage de fluides dans les tissus. Elle implique principalement les veinules et, à un degré moindre, les capillaires. 3) **L'augmentation de la transcytose**¹⁷ à travers le cytoplasme endothélial par l'entremise d'organelles vésiculovacuolaires se produit exclusivement dans les veinules. Certains facteurs comme le vascular endothelial growth factor (VEGF) sont en cause. 4) Finalement, un **dommage direct**¹⁸ (brûlure, bactérie lytique) ou un **dommage causé par les leucocytes**¹⁷ (radicaux libres, enzymes protéolytiques) peuvent également mener à l'exsudation de fluides dans les tissus.

2.3.3 Margination des leucocytes

Suite à la perte de fluides dans les vaisseaux sanguins de petit calibre, on observe une augmentation de la concentration de cellules sanguines (érythrocytes et leucocytes) par rapport au fluide dans la lumière vasculaire. Cette stagnation se caractérise par une augmentation de la viscosité du sang reflétée histologiquement par l'accumulation d'érythrocytes dans des vaisseaux sanguins distendus. Au fur et à mesure que cette stase s'installe, on observe un mouvement des leucocytes du centre du flot sanguin vers la périphérie des vaisseaux, un processus appelé margination des leucocytes¹⁹. L'interaction de l'endothélium avec les leucocytes, maintenant ralentis, est accentuée. Les leucocytes commencent alors leur migration vers le tissu qui débute par un roulement le long de l'endothélium, le "rolling", suivi d'une adhésion ferme et d'une transmigration entre les cellules endothéliales. Ce processus sera décrit en détail ultérieurement.

2.4 Recrutement des leucocytes

Le schéma suivant (Figure 4) résume bien la séquence d'événements qui mènent à l'accumulation de leucocytes dans les tissus lors d'une inflammation.

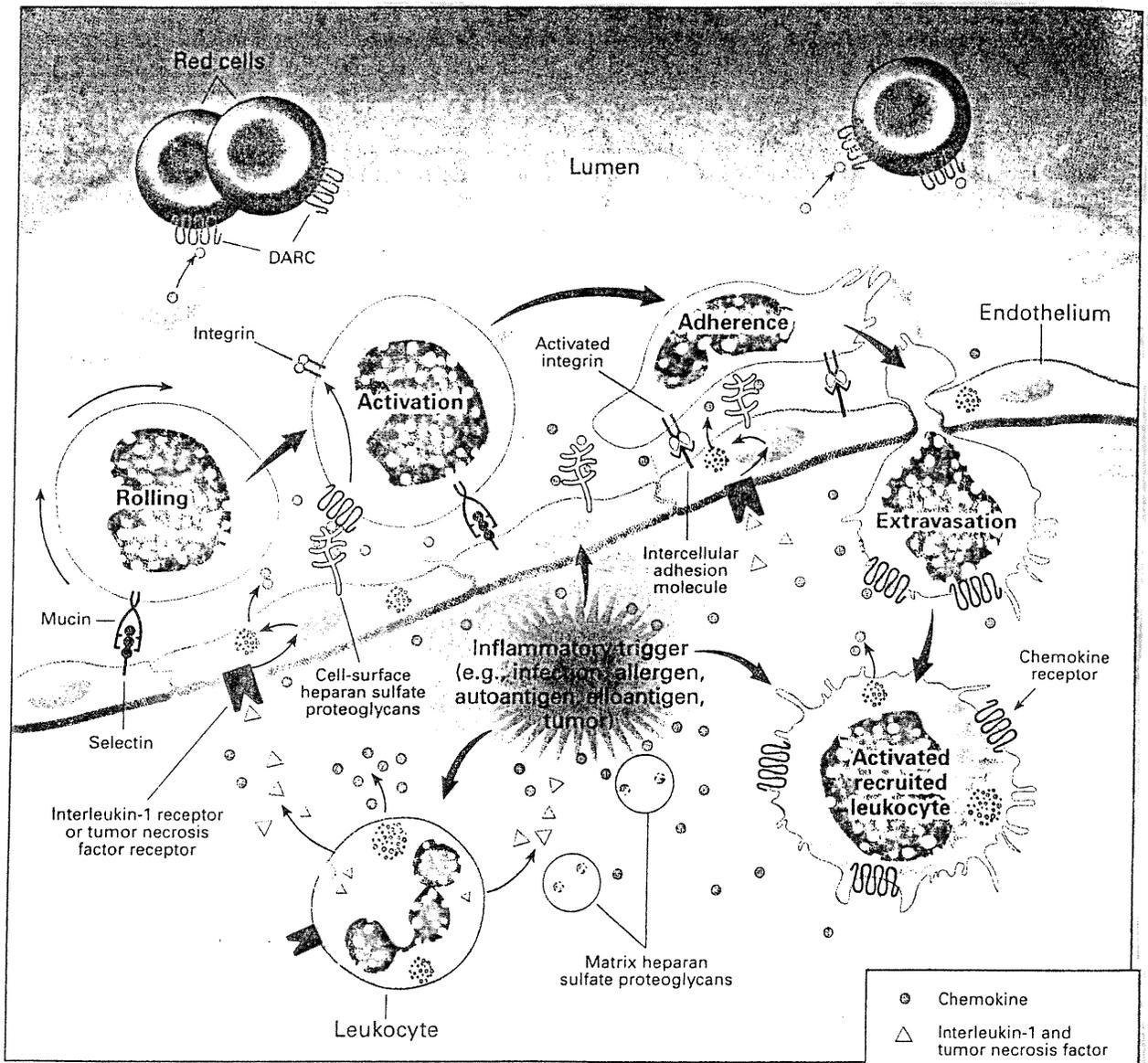


Figure 4 Régulation du recrutement et du mouvement des leucocytes dans un tissu enflammé. Tiré de référence 4

Le recrutement leucocytaire est initié lorsque l'agent causal (infectieux, allergène, autoantigénique ou autres) est introduit dans le tissu. L'inflammation s'amorce par la production locale de cytokines (TNF- α , IL-1) qui activent les cellules endothéliales. A la surface de ces dernières, on observe l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion qui est minimale ou nulle normalement. Le "rolling", l'adhésion ferme des leucocytes sur l'endothélium et la transmigration vers les tissus sont médiés par les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines, respectivement. Ensuite, les leucocytes migrent dans le tissu sous l'influence des chémokines. Une fois rendus à l'endroit où la concentration chimiotactique est optimale, les récepteurs à chémokines des leucocytes sont inactivés permettant ainsi l'arrêt des cellules inflammatoires à un site spécifique. Une réaction d'amplification survient lorsque les leucocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes synthétisent une quantité additionnelle importante de cytokines. Ces dernières activent un plus grand nombre de cellules endothéliales, augmentent l'avidité des intégrines leucocytaires pour leur ligand, augmentent le gradient chimiotactique et activent les cellules inflammatoires à produire des radicaux libres et des enzymes protéolytiques afin d'éliminer l'agresseur.

3. MOLÉCULES D'ADHÉSION

3.1 Les trois familles de molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire lors de réactions inflammatoires appartiennent à trois familles : les sélectines, les intégrines et la superfamille des immunoglobulines²⁰.

3.1.1 Les sélectines

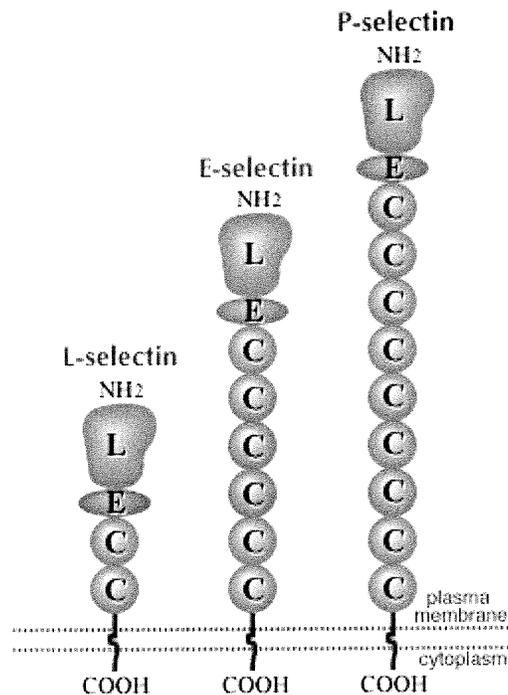
La famille des sélectines comporte trois membres : la P-sélectine, la E-sélectine et la L-sélectine. Ces trois membres partagent une structure moléculaire

relativement similaire (Figure 5) mais ils sont exprimés à la surface de cellules différentes et leur fonction et leur mode d'activation varient légèrement. La P-sélectine est préformée et emmagasinée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules alpha des plaquettes²¹. Elle est rapidement exprimée à leur surface lors d'une activation de ces cellules. La synthèse de nouvelle P-sélectine est aussi possible lors de certains processus inflammatoires qui durent plus de quelques heures^{22,23}. La E-sélectine est synthétisée et exprimée à la surface des cellules endothéliales lorsqu'elles sont activées par les médiateurs inflammatoires tandis que la L-sélectine est présente sur un grand nombre de leucocytes, notamment les lymphocytes²².

Les sélectines sont responsables de la toute première étape du recrutement des leucocytes soit le roulement des cellules inflammatoires sur l'endothélium ("rolling"). Cette étape a pour effet de ralentir le mouvement des leucocytes, de permettre un meilleur contact avec les cellules endothéliales et de favoriser les interactions entre les intégrines des leucocytes et les immunoglobulines des cellules endothéliales. L'affinité des sélectines pour leur ligand ne doit pas nécessairement être élevée²³. Pour supporter le "rolling" des leucocytes, les sélectines forment une liaison rapide, démontrant un taux de dissociation constant et élevé et une force extensible de ces liens²³. La vitesse du "rolling" diffère selon les sélectines²⁴. La L-sélectine produit une rotation plus rapide que la E-sélectine, la P-sélectine étant intermédiaire²⁴.

La répartition des sélectines et de leur ligand à la surface cellulaire influence leur fonction. La présence des récepteurs adhésifs sur les microvillosités des cellules (leucocytes) faciliterait l'établissement des premiers contacts entre les molécules d'adhésion et leur ligand dans des conditions de flux sanguin physiologique²⁵. Les récepteurs sur les microvillosités seraient essentiels à la liaison initiale dans le "rolling" mais n'influenceraient pas le mouvement de roulement. Les microvillosités sont le site de localisation des molécules d'adhésion responsables du "rolling". En effet, le ligand de la P-sélectine, le P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), la L-sélectine et certaines autres protéines ont été démontrés à la surface des microvillosités⁶⁶.

Figure 5 : Structure des sélectines



L : domaine lectine, E : domaine epidermal growth factor-like, C : Short consensus repeat

Tiré de <http://www.glycoform.gr.jp/science/word/lectin/LEAOSE.html>

La portion extracellulaire des sélectines est composée d'un domaine lectine de type C situé à l'extrémité amino-terminale de la molécule, d'un domaine "epidermal growth factor (EGF)-like" et d'un nombre variable d'éléments répétitifs, les "short consensus repeat" (SCR). Les trois sélectines sont ancrées dans la membrane par une région transmembranaire qui est suivie d'un court domaine cytoplasmique formant l'extrémité carboxy-terminale^{22,23,26}. Chaque domaine contribue au bon fonctionnement de la molécule et doit être correctement positionné pour être effectif²².

Le domaine lectine est le site de liaison des sélectines avec leur ligand. Plusieurs évidences démontrent bien le rôle adhésif du domaine lectine des sélectines. Par exemple, l'adhésion des sélectines peut être inhibée par des carbohydrates simples ou complexes ayant subis une sialylation, une fucosylation

ou les deux²⁷. Ceux-ci, reconnus pour leur capacité de liaison avec les structures de type lectine, occupent le site de liaison de la molécule (le domaine lectine) et le rendent inaccessible au ligand. L'adhésion peut aussi être empêchée par des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre certains épitopes du domaine lectine²⁸ ainsi que par l'EGTA²⁹, une substance qui cause la chélation du calcium. L'inhibition de l'adhésion des Sélectines peut aussi s'effectuer par un traitement avec la neuraminidase²⁹ qui coupe les acides sialiques présents dans les chaînes d'oligosaccharides du domaine lectine.

Les domaines EGF et SCR sont aussi indirectement associés à l'adhésion des sélectines avec leur ligand^{22,23,26}. Par exemple, la suppression du domaine EGF abolit ou diminue considérablement l'action adhésive des sélectines²⁸. Cette suppression aurait un effet global sur la structure de la protéine en provoquant la disparition d'épitopes importants du domaine lectine. Donc, le domaine EGF fournirait une information structurale essentielle requise pour une conformation adéquate du domaine lectine afin qu'il soit reconnu par son ligand. L'interaction entre le domaine lectine et le domaine EGF sont responsables de la spécificité des sélectines pour certains ligands³⁰. Les domaines SCR quant à eux sont importants pour éloigner les portions lectine et EGF à une distance suffisante de la membrane cellulaire et ainsi permettre une interaction optimale du site de liaison avec les cellules cibles^{22,26}. Il a aussi été suggéré que les domaines SCR servent à oligomériser le récepteur pour augmenter l'avidité de l'interaction avec son ligand^{22,23}.

Le rôle exact de la région transmembranaire et du domaine cytoplasmique n'est pas complètement éclairci. Bien que le domaine cytoplasmique semble essentiel au bon fonctionnement de la L-sélectine, la suppression de ce dernier dans la P- et la E-sélectine ne semble pas affecter leur expression à la surface des cellules ni leur fonction adhésive dans certains essais *in vitro* avec des cultures cellulaires³¹. Cependant, l'interaction de la portion carboxy-terminale avec le cytosquelette pourrait être importante pour la signalisation intercellulaire ou pour une stabilisation mécanique immédiatement après l'adhésion du leucocyte à la E-sélectine³².

3.1.2 Les intégrines

Les intégrines, avec les immunoglobulines, sont responsables de l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales qui suit immédiatement la phase de "rolling". Cette adhésion provoque l'arrêt de la cellule inflammatoire sur l'endothélium et permet l'initiation du processus de transmigration vers les tissus. La plupart des intégrines impliquées dans le recrutement leucocytaire sont localisées sur les leucocytes²⁰. Normalement, ces dernières sont non-activées ou d'avidité faible pour leur ligand. Certaines cytokines (TNF- α) et chémokines (C5a et leukotriène B4) produites au site inflammatoire peuvent accroître l'expression des intégrines et leur avidité envers leur ligand^{1,4}. Récemment, il a été démontré que l'interaction de la E-sélectine avec son ligand induirait un signal intracellulaire qui pourrait aussi avoir un effet similaire³³. Cependant, les résultats de différentes études sont contradictoires quant à l'importance de ce dernier mécanisme d'activation³⁴.

En plus de leur rôle dans le recrutement des leucocytes lors d'inflammation, les intégrines sont aussi impliquées lors de la migration cellulaire dans l'embryogenèse, dans la réparation tissulaire et dans le comportement de certaines cellules tumorales²². Ce sont de grosses glycoprotéines membranaires constituées de deux sous-unités : une chaîne α et une chaîne β ²². Plusieurs combinaisons de ces sous-unités forment quelques 19 intégrines ou plus. Celles-ci sont sous-classifiées selon leur chaîne β en 7 sous-familles : $\beta 1$ à $\beta 7$ ³⁵. Seulement les sous-familles importantes lors d'inflammation seront décrites. Six $\beta 1$ intégrines ont été décrites dont seulement une est impliquée dans les interactions cellule-cellule; le VLA-4 (very late antigen-4). Celui-ci est exprimé sur les monocytes, les lymphocytes T et B, les basophiles et les éosinophiles mais pas sur les neutrophiles²². Il est le ligand pour le VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), un membre de la superfamille des Immunoglobulines³⁶.

Les trois membres de la sous-famille des $\beta 2$ intégrines sont aussi connus sous le nom de leucointégrines parce qu'ils sont exprimés seulement sur les

leucocytes. Ce sont le LFA-1 (leucocyte function antigen-1) ou CD11a/CD18, le Mac-1 ou CD11b/CD18 et le gp150,95 ou CD11c/CD18²². Ils sont exclusivement impliqués dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et leur ligand sont les ICAMs (intercellular adhesion molecules).

3.1.3 Les immunoglobulines

Les membres de la superfamille des immunoglobulines possèdent tous un ou plusieurs domaines immunoglobulines qui les caractérisent²². Ils se lient aux intégrines et sont également responsables de l'adhésion ferme qui précède l'extravasation des leucocytes dans les tissus. Cette famille comporte plusieurs membres dont LFA-2, LFA-3, ICAMs, VCAMs, PECAM-1 et MAdCAM-1²².

Les ICAMs (intercellular adhesion molecules) sont exprimées par une variété de cellules activées ou non. Par exemple, le ICAM-1 est exprimé par les cellules endothéliales ou les leucocytes lors d'une stimulation tandis que ICAM-2 est exprimé de manière constitutive par les cellules endothéliales²². Plusieurs cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 peuvent induire la synthèse et l'expression de ces molécules d'adhésion.

Le PECAM (platelet endothelial cell adhesion molecule) se retrouve en grande quantité sur la plupart des cellules endothéliales, surtout aux jonctions intercellulaires, ainsi que sur les plaquettes. On le retrouve aussi sur plupart des leucocytes mais en quantité moindre³⁷. Il est responsable de la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium.

3.2 P-sélectine

3.2.1 Expression

La P-sélectine est la seule sélectine retrouvée de façon constitutive dans les cellules endothéliales et dans les plaquettes. Lors d'une stimulation, il y a mobilisation et fusion de la membrane des vésicules sécrétoires où est localisée la

P-sélectine, avec la membrane plasmique. Ceci permet l'extériorisation de la molécule et la rend fonctionnelle. Les substances agonistes qui conduisent à l'expression de surface de la P-sélectine incluent l'histamine, la thrombine, les activateurs de la protéine kinase C, certains dérivés du complément, l'adénosine diphosphate (ADP) et les ionophores³⁸.

Cette expression survient très rapidement après le stimulus et devient maximale 5 à 10 minutes suivant la stimulation^{22,23}. L'expression de la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales est de loin la plus hâtive des molécules d'adhésion vasculaires. Les autres nécessitent une synthèse et ne sont exprimées que quelques heures après l'insulte. Cependant, la P-sélectine est rapidement éliminée de la surface, soit 30 à 60 minutes après son extériorisation²³. La protéine retourne alors dans le cytoplasme par endocytose³⁹ ou est scindée à proximité de la région transmembranaire et relâchée dans la circulation sous forme soluble²⁶.

L'expression de la P-sélectine peut aussi être régulée au niveau transcriptionnel. Tout comme la plupart des molécules d'adhésion vasculaires, dont la E-sélectine, une transcription transitoire du gène de la P-sélectine peut être induite par les lipopolysaccharides bactériens (LPS), le TNF- α et l'IL-1^{40,41,42}. Cette transcription mène à la synthèse de nouvelle P-sélectine dont l'expression peut être observée 2 à 4 heures après le signal. Les résultats de plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré à plusieurs reprises l'implication de ce mode d'activation possiblement responsable d'une expression soutenue à la surface des cellules lors de processus inflammatoires. Plus particulièrement chez le chien, Doré et collaborateurs ont démontré qu'une stimulation avec le TNF α et les LPS induisait la production d'ARN messenger pour la P-sélectine dans des cultures de cellules endothéliales provenant des veines jugulaires⁴¹. Dans cette étude, la présence d'ARN messenger était maximale trois à six heures après la stimulation et redescendait au niveau basal après 48 heures.

3.2.2 Endocytose

L'endocytose se produit lorsque la membrane cytoplasmique s'invagine pour ultimement former des vésicules cytoplasmiques. Ce processus est responsable du recyclage et de l'élimination de plusieurs types de récepteurs membranaires³⁹. L'invagination se produit généralement à des endroits recouverts de clathrines⁴³. Les clathrines sont des protéines fibreuses concentrées aux sites d'internalisation des membranes cellulaires ("coated pits"). Dans le cytoplasme, la P-sélectine est alors dirigée dans des endosomes ("early endosomes") d'où elle peut être soit recyclée à la surface ou transférée à d'autres endosomes ("late endosomes")³⁹. Des "late endosomes", elle peut être réusinée dans le réseau *Trans*-Golgi et retourner dans les corps de Weibel-Palade ou être dégradée dans les lysosomes⁴⁴. Lors d'un processus inflammatoire, une quantité importante de P-sélectine est éliminée dans les lysosomes ce qui provoque une diminution de l'expression de la protéine, empêchant son accumulation excessive dans le cytoplasme³⁹. Le domaine cytoplasmique semble en partie responsable de l'endocytose et du ciblage ("targeting") intracellulaire. La région transmembranaire pourrait aussi être impliquée en augmentant le ciblage dans les granules de sécrétion⁴⁵.

3.2.3 Distribution

Doré et collaborateurs ont généré un anticorps monoclonal spécifique pour la P-sélectine canine⁴⁶. À l'aide de cet anticorps, ils ont démontré par immunohistochimie la présence de P-sélectine dans les cellules endothéliales d'artères, de capillaires et de veines de plusieurs tissus normaux du chien. Le nombre de vaisseaux positifs était élevé dans le système digestif (foie, estomac, petit et gros intestins) tandis qu'il était modéré dans les poumons, les reins, la rate, les nœuds lymphatiques et les glandes endocrines et minimal dans le cerveau, le myocarde, les os et la peau. La distribution tissulaire et cellulaire est similaire à celle de l'humain⁴⁷.

3.2.4 Rôle

La P-sélectine joue un rôle important dans le "rolling" des leucocytes. Comme elle peut être exprimée très rapidement à la surface de la cellule, elle est primordiale à la phase initiale du "rolling"^{48,49,50}. La P-sélectine néoformée procure une extension temporelle de son rôle de recrutement des leucocytes. Chez le chien, les premières évidences de son importance *in vivo* dans le "rolling" proviennent de Doré et collaborateurs qui ont élaboré un anticorps bloquant la molécule (i.e. un anticorps inhibant les interactions plaquettes-neutrophiles et neutrophiles-cellules endothéliales)⁴⁸. Une technique consistant à extérioriser chirurgicalement le mésentère pour observer la microcirculation mésentérique par transillumination à l'aide d'un microscope a été utilisée. L'injection de l'anticorps chez le chien inhibait considérablement le nombre de leucocytes roulant sur l'endothélium des veines mésentériques. Dans cette étude, les manipulations chirurgicales du mésentère ont probablement contribué à l'activation des cellules endothéliales et à l'expression de la P-sélectine. Chez la souris, une technique similaire effectuée sur la peau du dos a démontré que le "rolling" spontané physiologique existe et qu'il est médié principalement par la P-sélectine⁴⁹.

L'importance des molécules d'adhésion dans le recrutement leucocytaire lors de différents processus pathologiques a poussé certains groupes de recherche à élaborer des souris transgéniques déficientes en une ou plusieurs molécules d'adhésion. Ces souris ont permis d'établir le rôle précis de chaque molécule dans l'extravasation des leucocytes. Plusieurs chevauchements existent entre les fonctions de la E- et de la P-sélectine. Les conséquences de la suppression d'une ou de deux sélectines sont résumées dans le Tableau I.

Tableau I: Caractéristiques des souris déficientes en sélectines:

Mutation	État de santé	Comptage	Émigration neutrophilique			Rolling
		leucocytaire	24H	48H	DTH*	
P-sélectine	N	↑	↓	N	N	↓↓
E-sélectine	N	N	N	N	N	N
L-sélectine	N	N	↓	↓	AN	↓↓
P-sélectine + ICAM-1	N	↑↑	AB	N	ND	↓↓↓
P- + E- sélectine	Infections spontanées	↑↑↑↑	AB	N	AN	↓↓↓↓

AB = Absent; AN = Anormal; N = Normal; ND = Non-déterminé

* Hypersensibilité retardée (delayed type hypersensitivity)

Les souris déficientes en P-sélectine n'ont aucune anomalie développementale ni de susceptibilité accrue aux infections. Elles ont une neutrophilie de deux à trois fois plus élevée que les souris normales et démontrent un déficit évident de "rolling" des leucocytes⁵¹. En accord avec son importance dans le recrutement de neutrophiles très tôt dans la réaction inflammatoire, les souris déficientes en P-sélectine démontrent une mobilisation réduite au site inflammatoire dans les premières heures (deux à quatre heures) suivant le dommage. Par contre, elles ont un recrutement similaire aux souris normales plus tard dans le processus inflammatoire.

Récemment, il a été démontré que l'expression de la P-sélectine sur les cellules endothéliales et le "rolling" des neutrophiles étaient plus concentrés le long des bordures cellulaires⁵². Ceci pourrait favoriser la transmigration des leucocytes qui se produit préférentiellement aux jonctions intercellulaires.

3.3 E-sélectine

3.3.1 Expression

L'expression de la E-sélectine est limitée à l'endothélium, principalement en réponse à un stimulus inflammatoire²². Le TNF- α et l'IL-1 ainsi que les LPS induisent son expression qui devient maximale trois à quatre heures après la stimulation⁴⁰. L'expression redescend au niveau basal 16 à 24 heures suivant la stimulation⁴⁰ contrairement à d'autres molécules d'adhésion vasculaires (ICAM et VCAM) induites par les cytokines et dont la présence à la surface de la cellule peut durer jusqu'à 72 heures⁵³. Dans des conditions *in vitro*, l'expression de la E-sélectine à la surface des cellules est transitoire même en présence continue de cytokines dans le milieu²². Cependant, une expression prolongée s'observe dans les vaisseaux sanguins au site inflammatoire dans certaines conditions, notamment dans la peau lors de réaction d'hypersensibilité retardée⁵⁴.

Comme pour la plupart des molécules d'adhésion vasculaires, l'induction de la E-sélectine est régulée au niveau transcriptionnel. La E-sélectine humaine a été clonée et les éléments qui régulent l'expression de son gène ont été étudiés intensivement. Une stimulation des cellules endothéliales avec le TNF- α active deux voies de signalisation ("signaling pathways"), le NF κ B et les kinases JNK1 et p38 (impliquées dans l'activation de l'AP-1)⁵⁵, les deux étant requises pour une expression maximale de la protéine.

En plus du TNF- α et de l'IL-1, plusieurs médiateurs inflammatoires sont capables d'induire l'expression de la E-sélectine. L'IL-10 induit la transcription de la E-sélectine à une intensité qui varie selon les cultures cellulaires⁵⁶; l'IL-3 démontre une cinétique similaire à l'IL-1 mais produit la moitié moins de protéine⁵⁷ et l'oncostatine M agit de façon similaire au TNF- α ⁵⁸. Les complexes immuns, par l'entremise du C1q (dérivé du complément) provoquent aussi l'expression de la E-sélectine⁵⁹. Outre les facteurs solubles, le contact des leucocytes avec les cellules endothéliales pourrait aussi moduler l'expression de la E-sélectine²³.

3.3.2 Régulation de l'expression

La disparition de la E-sélectine à la surface des cellules endothéliales activées est vraisemblablement causée par une combinaison de facteurs. Premièrement, il y a une internalisation de la molécule, similaire à celle décrite pour la P-sélectine⁴⁴. Cependant, la protéine ne peut être recyclée et subira la dégradation lysosomale comme unique sort. La transcription du gène de la E-sélectine est sévèrement diminuée ou arrêtée six à neuf heures après l'induction. La demi-vie de l'ARN messager de la E-sélectine est généralement courte⁶⁰. La protéine disparaît donc rapidement de la surface une fois la transcription arrêtée.

3.3.3 Rôle

Étant donné la nécessité d'une transcription *de novo* pour que la E-sélectine soit exprimée à la surface des cellules, cette dernière n'est pas impliquée dans le "rolling" durant les premières heures suivant l'insulte. Contrairement aux souris déficientes en P- ou L-sélectine, la souris déficiente en E-sélectine ne démontre pas d'anomalie lors de réponses inflammatoires²⁶. En effet, aucun déficit de migration de neutrophiles dans le péritoine n'est présent suite à une injection intrapéritonéale de thioglycolate⁶¹. Des analyses plus précises ont cependant démontré que le "rolling" lent était absent chez ces souris⁶². Chez ces animaux, un déficit sévère peut être provoqué en bloquant la P-sélectine avec un anticorps monoclonal, suggérant que la E- et la P-sélectine ont des fonctions qui se chevauchent⁶¹.

3.4 Les ligands des sélectines

Comme mentionné précédemment, les sélectines reconnaissent divers arrangements structuraux de carbohydrates qui ont subi une sialylation, une fucosylation ou les deux⁶³. La fucosylation est une étape essentielle à la

production de ligands fonctionnels pour les sélectines. Chez les patients souffrant d'une maladie héréditaire connue sous le nom de syndrome de déficience d'adhésion leucocytaire de type II (leucocyte adhesion deficiency II, LAD-II), le recrutement leucocytaire aux sites inflammatoires est dramatiquement diminué dû à une défaillance du métabolisme du fucose qui mène à l'incapacité de synthétiser des structures sialyl Lewis^x, un composant important des ligands des sélectines⁶⁴. Au départ, les tétrasaccharides sialyl Lewis^x ont démontré une capacité de liaison pour les trois sélectines dans des conditions *in vitro*. Pour exécuter leur fonction *in vivo*, les sélectines n'interagissent pas avec des oligosaccharides simples comme le sialyl Lewis^x mais plutôt avec une surface tridimensionnelle composée de carbohydrates attachés à des glycoprotéines spécifiques⁶³.

Le "P-selectin glycoprotein ligand-1" (PSGL-1) est probablement le ligand le mieux caractérisé pour les sélectines. Au niveau moléculaire, il possède des chaînes latérales de polylectosamine embranchées contenant du fucose et de l'acide sialique, lesquelles sont souvent terminées par une structure sialyl Lewis^x⁶⁵. Tous les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes sanguins expriment le PSGL-1 mais une glycosylation spécifique est requise pour obtenir un ligand fonctionnel⁶⁶. À la surface des leucocytes, il se localise principalement au bout des microvillosités⁶⁶. Il est le ligand majeur de la P-sélectine sur les neutrophiles^{66,67}. Le "rolling" des neutrophiles est complètement inhibé par un anticorps monoclonal dirigé contre le PSGL-1. Ce ligand peut aussi se lier à la E-sélectine⁶⁷.

En plus de se lier au PSGL-1, la E-sélectine démontre une affinité pour un second ligand, le "E-selectin ligand-1" (ESL-1)²³. Contrairement au PSGL-1 et à la L-sélectine, ce dernier se situe surtout le long des microvillosités des leucocytes plutôt qu'au bout⁶⁸. Le ESL-1 pourrait agir dans l'étape du "rolling" qui suit immédiatement la capture des leucocytes par les cellules endothéliales.

La L-sélectine sert également de ligand pour la E-sélectine. Cependant, des divergences d'espèces existent (par exemple, la L-sélectine des neutrophiles murins ne semblent pas interagir avec la E-sélectine)⁶⁹.

3.5 Plaquettes

3.5.1 Activation

Les plaquettes sont des structures discoïdes en circulation qui changent de morphologie lorsqu'elles sont activées. Elles contiennent deux sortes de granules de sécrétion: les granules alpha où est emmagasinée la P-sélectine et les corps denses. Lors de l'activation, en plus de changer de forme, les plaquettes relâchent le contenu de leurs vésicules de sécrétion et expriment plusieurs récepteurs à leur surface dont la P-sélectine¹. Plusieurs substances agonistes induisent directement l'activation des plaquettes dont la thrombine, la plasmine et la sérotonine^{1,70}. Le mécanisme d'activation des plaquettes par le TNF- α est encore obscur. Le TNF- α ne semble pas activer directement les plaquettes dans des conditions *in vitro*. Cependant, un relâchement local de TNF- α provoque une accumulation de plaquettes dans les vaisseaux sanguins aux sites inflammatoires⁷¹. Chez les humains et les souris, l'injection intraveineuse de TNF- α induit une thrombocytopenie⁷². À l'aide de souris transgéniques, un groupe de chercheurs a démontré que l'activation par le TNF- α ne se fait pas directement mais par l'entremise de récepteurs au TNF- α (TNFRs) localisés sur d'autres cellules qui elles sécrèteraient des facteurs agonistes pour l'activation des plaquettes⁷⁰.

Les plaquettes peuvent aussi être activées par le TNF- α grâce au récepteur de l'activateur de l'urokinase plasminogène ("urokinase plasminogen activator receptor")⁷³. Le rôle de ce récepteur sur les plaquettes serait critique pour l'activation et l'adhésion aux cellules endothéliales survenant lors de processus inflammatoires⁷³.

3.5.2 Plaquettes et "rolling"

Les plaquettes activées, tout comme les cellules endothéliales, sont capables de supporter le "rolling" des neutrophiles médié par la P-sélectine⁷⁴. En plus d'exprimer la P-sélectine en surface, elles expriment certains ligands des $\beta 2$

intégrines incluant le ICAM-2 et le fibrinogène et elles peuvent sécréter des substances qui activent les neutrophiles⁷⁵. Lors d'un dommage aux cellules endothéliales, elles adhèrent au collagène sous-endothélial et remplacent l'endothélium dans sa fonction de recrutement leucocytaire. Certaines études démontrent que le TNF- α pourrait causer l'adhésion et/ou la fusion des plaquettes aux cellules endothéliales à un site inflammatoire. En effet, Lou et collaborateurs ont découvert que l'addition de TNF- α à une culture de cellules endothéliales microvasculaires de cerveau de souris résulte en l'adhésion et la fusion des plaquettes aux cellules et augmente leur adhésivité pour les leucocytes⁷⁶. Il a été démontré à plusieurs reprises que les plaquettes, tout comme les neutrophiles, s'accumulent dans les tissus enflammés. La présence de plaquettes activées dans la lumière des vaisseaux et dans les tissus périvasculaires lors de divers processus inflammatoires suggère que les plaquettes pourraient contribuer au recrutement des leucocytes. Un groupe de chercheurs a démontré que les plaquettes, par l'entremise de la P-sélectine, augmenteraient la mobilité des neutrophiles lors d'inflammation. Ceci augmenterait leur mouvement dans les tissus vers le stimulus chimiotactique⁷⁷. De plus, les plaquettes activées présentes au site inflammatoire sécrètent des médiateurs puissants de l'inflammation dont le facteur activateur des plaquettes ("platelet activating factor").

4. LES MOLÉCULES D'ADHÉSION ET LA PEAU

Les problèmes dermatologiques représentent une portion importante des consultations médicales chez les humains et dans la pratique des animaux de compagnie. Ils constituent environ 20% des consultations chez le chien à la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal⁷⁸. En plus d'être très répandues, les maladies cutanées requièrent parfois des traitements qui provoquent des effets secondaires toxiques locaux ou systémiques.

Plusieurs études expérimentales ont révélé l'importance des molécules d'adhésion dans le recrutement leucocytaire lors d'inflammation dans la peau. Ces études ont permis de souligner deux points importants: 1) l'expression des

molécules d'adhésion dans le temps survient en corrélation avec l'infiltrat inflammatoire dans la plupart des cas et 2) la distribution et la dynamique d'expression varient selon les stimuli inflammatoires⁷⁹. Dans différents modèles d'inflammation cutanée aiguë ou chronique, les souris déficientes en P-sélectine démontrent un déficit du recrutement leucocytaire qui est d'autant plus marqué lorsque les souris sont doublement déficientes en P- et E-sélectines⁸². Les souris déficientes en E-sélectine seulement peuvent avoir une diminution minimale et souvent non-significative du nombre de leucocytes au site inflammatoire dans la peau^{82,83} et le rein⁸³.

4.1 Atopie et dermatites allergiques

La dermatite atopique est un désordre inflammatoire chronique de la peau caractérisé par une infiltration importante de cellules inflammatoires (cellules mémoire, lymphocytes T helper et macrophages) dans le derme. Chez les sujets atteints, une réaction aiguë peut survenir suite à un contact avec un allergène. Lors de cette réaction, on remarque un influx important de lymphocytes T, d'éosinophiles, de cellules dendritiques et de macrophages dans le derme^{1,80}.

Une augmentation de l'expression de la E-, de la P-sélectine ainsi que du VCAM-1 a été notée dans la peau ne démontrant pas de lésion chez des patients atopiques comparativement à des sujets normaux. Cette augmentation était plus marquée dans la peau avec des lésions à la suite de l'application d'un allergène sur l'épiderme. À l'aide d'immunohistochimie, on a remarqué que le TNF- α était localisé dans les mastocytes et les macrophages dermiques chez les sujets normaux. Chez les sujets atopiques, les cellules contenant du TNF- α étaient plus nombreuses, en concomitance avec l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dans la peau⁸⁰. Une augmentation de la P-sélectine a aussi été démontrée dans des sections de peau avec ou sans lésions chez des sujets souffrant d'urticaire chronique⁸¹.

Un modèle d'inflammation cutanée dépendante de la dégranulation des mastocytes et de l'action des immunoglobulines E (IgE) a été utilisé chez des

souris déficientes en sélectines. Chez ces animaux, bien que l'absence d'une ou de l'autre des sélectines n'affectait pas l'infiltrat inflammatoire, une déficience combinée en P- et en E-sélectine résultait en une abolition presque complète du recrutement leucocytaire. Par contre, les sélectines ne se sont pas avérées responsables de la tuméfaction (œdème) des tissus induite par la dégranulation des mastocytes⁸².

4.2 Hypersensibilité retardée

L'hypersensibilité retardée est un phénomène inflammatoire qui survient quelques jours après le contact avec une substance pour laquelle l'individu ou l'animal affecté a déjà été sensibilisé. L'agent sensibilisant pénètre la peau et se lie aux cellules de Langerhan (cellules dendritiques) qui présentent celui-ci aux lymphocytes T activant ainsi la prolifération d'un sous-clone de lymphocytes sensibilisés à l'allergène. Lors d'une stimulation subséquente avec le même antigène, les lymphocytes T sensibilisés réagissent ce dernier en sécrétant des cytokines qui activent l'endothélium et induisent l'expression des molécules d'adhésion à leur surface^{116,83}. Celles-ci facilitent le recrutement de monocytes, de neutrophiles et de lymphocytes supplémentaires au site inflammatoire⁸³. Ces cellules, en libérant entre autres des protéases, causent des dommages importants aux tissus (collagène, vaisseaux, annexes cutanées). De plus, on observe aussi une augmentation de la perméabilité vasculaire, similaire à celle décrite dans les phénomènes aigus, qui contribue à l'exsudation de fibrine dans les tissus produisant ainsi l'induration des zones lésées, caractéristique de ce genre de réaction¹¹⁶.

À plusieurs reprises dans des modèles expérimentaux utilisant différentes espèces, l'expression de la P-sélectine⁸⁴ et des autres molécules d'adhésion (E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1)⁸⁵ était augmentée dans les vaisseaux sanguins de la peau. Les souris déficientes en P- et E-sélectines démontrent une réduction significative du nombre de cellules inflammatoires⁸³ comparativement aux souris

normales, tant dans la phase aiguë que dans une phase plus chronique de la réaction inflammatoire cutanée.

4.3 Psoriasis

Le psoriasis est une condition cutanée chronique de cause incertaine bien que certaines évidences suggèrent l'implication de facteurs génétiques. Plusieurs hypothèses existent quant à la pathogénie de cette condition. Les lésions pourraient résulter d'une activation anormale des cellules endothéliales ou faire suite au dévoilement d'antigènes localisés à la couche cornée, produisant des lésions focales ou extensives¹¹⁷. En plus d'une infiltration de cellules inflammatoires dans le derme, on observe une prolifération marquée des kératinocytes de l'épiderme des zones lésées dans la peau des sujets atteints^{1,86}. Quelques études ont révélé qu'il y avait une augmentation considérable de l'expression des molécules d'adhésion vasculaires dans la peau des sujets souffrant de psoriasis^{86,87,88}. Plus récemment, Terajima et collaborateurs ont démontré une forte expression de P-sélectine, de E-sélectine et de ICAM-1 dans les vaisseaux sanguins des régions affectées. De plus, la plupart des spécimens avec des lésions contenaient une quantité nettement supérieure de TNF- α comparativement à la peau sans lésion des mêmes sujets.

4.4 Dermatitis canines

L'espèce canine peut être affectée de plusieurs conditions dermatologiques retrouvées chez l'homme. Parmi celles-ci, notons les dermatites allergiques, l'atopie, les maladies auto-immunes (lupus, pemphigus), les maladies endocriniennes et bien d'autres. Peu d'informations sont disponibles quant aux mécanismes menant au recrutement leucocytaires chez cette espèce.

Chénier et collaborateurs ont étudié l'expression de la P-sélectine dans différents types de dermatites chez le chien⁸⁹. Ils ont découvert que l'expression de cette molécule d'adhésion était augmentée dans les dermatites allergiques, auto-

immunes et pyogranulomateuses ainsi que dans les cas de dermatophytose et de panniculite. Ils ont aussi observé un nombre élevé de vaisseaux exprimant la P-sélectine dans les mastocytomes. Dans la majorité des cas, le nombre de vaisseaux positifs était corrélé positivement avec le nombre de leucocytes infiltrant le derme.

4.5 Modèles expérimentaux de dermatites aiguës induites par les cytokines

Quelques groupes de chercheurs ont utilisé des endotoxines ou des cytokines injectées dans le derme pour étudier la cinétique d'expression des molécules d'adhésion vasculaires et pour établir si une corrélation existe entre l'infiltrat inflammatoire et la présence de ces molécules à la surface des cellules.

Munro et collaborateurs⁹⁰ ont effectué des injections intradermiques de LPS chez des babouins ce qui provoquait une réaction inflammatoire aiguë localisée au site d'injection. À l'aide de biopsies cutanées prises à différents intervalles de temps, ils ont démontré qu'une augmentation significative de l'expression de la E-sélectine dans les vaisseaux sanguins survenait deux heures après l'injection et s'estompait graduellement pour disparaître presque complètement neuf heures après la stimulation. Cette augmentation d'expression était associée à une extravasation extensive de cellules polymorphonucléaires. La cinétique d'expression du ICAM-1 était similaire mais d'intensité moindre. Dans une étude antérieure⁹¹, le même groupe avait découvert que l'injection intradermique de TNF- α causait une expression plus soutenue de la E-sélectine et une augmentation plus prononcée et plus tardive de ICAM-1 chez la même espèce.

Quelques années plus tard, Silber et collaborateurs⁹² démontraient que les LPS injectés dans le derme de singes Rhésus provoquaient une expression rapide (30 minutes post-injection) et soutenue (jusqu'à 72 heures) de la E-sélectine sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du derme avec une expression maximale huit heures après l'injection. L'accumulation de neutrophiles au site inflammatoire suivait parallèlement la courbe d'expression de la E-sélectine mais avec un décalage de 4 à 12 heures. Ils ont aussi remarqué une augmentation de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-8 associée au recrutement neutrophilique dans le derme.

Chez le rat, le recrutement leucocytaire (monocytes et polymorphonucléaires) induit par différents stimuli (TNF- α , LPS, interféron- γ et α -thrombine) était partiellement inhibé (40% à 75%) suite à l'administration d'anticorps bloquant la P-sélectine¹¹². Un anticorps contre la E-sélectine n'affectait que partiellement le recrutement des polymorphonucléaires lors de dermatites induites par le TNF- α et l' α -thrombine. Lors de l'administration des deux anticorps ensemble (anti-E- et anti-P-sélectine), la réduction du nombre de polymorphonucléaires et de monocytes recrutés était plus marquée (70% à 90%) qu'avec l'anti-P-sélectine seule.

Ces études démontrent que l'injection de cytokines (LPS, TNF- α ou autres) dans le derme cause une réaction inflammatoire aiguë localisée chez la plupart des espèces. La cinétique d'expression des molécules d'adhésion correspond souvent, du moins partiellement, avec la quantité de leucocytes ayant migré vers le site inflammatoire. La peau est un organe volumineux et facilement accessible pour l'examen et/ou le prélèvement, un organe de choix pour l'étude des mécanismes inflammatoires. Cependant, il existe une variabilité d'espèce non-négligeable quant au déroulement des divers processus de régulation. L'étude approfondie de plusieurs espèces devient donc une nécessité. Cette étude a pour but d'approfondir les connaissances chez le chien, une espèce chez laquelle les connaissances sont peu élaborées.

L'article intitulé «*Expression of E- and P-Selectin in Tumor Necrosis Factor-Induced Dermatitis in Dogs*» a été accepté pour publication dans la revue *Veterinary Pathology*. Ce manuscript devrait être publié dans le volume 38-3 (Mai, 2001) ou 38-4 (Juillet, 2001).

Expression of E- and P-Selectin in Tumor Necrosis Factor-Induced
Dermatitis in Dogs

Claudine Tremblay¹, Manon Paradis² and Monique Doré¹

¹Département de pathologie et microbiologie and ²Département de sciences
cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal,
C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Running title: Selectins in TNF-Induced Dermatitis

To whom all correspondence should be addressed: Dr. M. Doré, Département de
pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de
Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, P. Québec, Canada J2S 7C6. 450-773-8521
ext. 8237 (phone), 450-778-8116 (fax), doremo@medvet.umontreal.ca (e-mail).

ABSTRACT

Adhesion molecules on endothelial cells play an important role in leucocyte recruitment in several inflammatory processes. Vascular selectins mediate the initial adhesion of leucocytes to the blood vessel wall during their extravasation into inflamed tissues, and *in vitro* studies in dogs have shown that selectin expression can be induced by cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1). The objective of this study was to determine if vascular selectins are induced by cytokines *in vivo* in a cutaneous model of inflammation in dogs. Skin biopsies were collected from nine dogs at various intervals of time after an intradermal injection of TNF- α (10 ng/site) or phosphate-buffered saline containing 0.1% bovine serum albumin (PBS/BSA), and immunohistochemistry was performed using anti-P-selectin (MD3) and E-selectin (CL37) monoclonal antibodies. In all animals, TNF- α induced an inflammatory reaction which was maximal at 12 hours, and decreased at 24 and 48 hours. Control skin displayed no expression of E- and P-selectin, whereas TNF- α induced the expression of P-selectin and E-selectin on dermal vessels that was highest at 12 hours and 3 hours, respectively ($P < 0.05$). Numerous platelet aggregates recognized by the anti-P-selectin antibody were present in the lumen of vessels and in perivascular tissues. These results demonstrate that TNF- α can induce the expression of P- and E-selectin *in vivo* in dog skin, and suggest that these selectins are involved in leucocyte recruitment in canine dermatitis.

Key words: E-selectin, P-selectin, Tumor Necrosis Factor, Dermatitis, Dogs,
Adhesion molecules

INTRODUCTION

The accumulation of inflammatory cells into injured tissues results from a tightly controlled cascade of interactions between endothelium and leucocytes. The first adhesive event involves the margination and rolling of leucocytes along endothelial cells (14, 28). Leukocyte slowing is required for subsequent firmer adhesion and for their selective exit into the tissues. The selectins are adhesion molecules that mediate rolling, and are present in endothelial cells, platelets and on the surface of some leucocytes (5, 11, 14, 28, 37, 48, 52). They are transmembrane glycoproteins with a terminal lectin domain that is the binding site for their specific sialylated carbohydrate ligands (27, 52). P-selectin is stored in the Weibel-Palade bodies of endothelial cells and in the alpha-granules of platelets, and a number of proinflammatory signals can induce its rapid translocation to the cell surface (23, 30, 31). Also, inflammatory mediators such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and bacterial lipopolysaccharide (LPS) can induce the synthesis of P-selectin *in vitro* and *in vivo*, providing a means of sustaining leucocyte recruitment for longer periods (1, 4, 13, 16, 20, 41, 55, 58). In contrast, E-selectin is not found in unstimulated endothelial cells, but its expression can be induced by several inflammatory mediators (27, 48). The third member of the family of Selectins, L-selectin, is constitutively expressed by granulocytes, monocytes and most lymphocytes, and its expression is downregulated upon stimulation (14).

In humans, increased expression of endothelial adhesion molecules has

been demonstrated in various skin diseases (2, 3, 9, 18, 19, 26, 51, 54, 59). Increased expression of E-selectin, P-selectin, ICAM-1 or VCAM-1 has been reported in patients with psoriasis, allergic contact dermatitis, atopic dermatitis and chronic or dermographic urticaria (2, 3, 9, 18, 19, 26, 51, 54, 59). Experimentally, involvement of selectins in skin inflammation has been studied using different models, notably with animals genetically-deficient in these molecules (8, 24, 25, 44, 46, 56). For example, P-selectin-deficient mice exhibit a significantly lower baseline level of leukocyte rolling in skin postcapillary venules compared to wild-type animals (56). In models of cutaneous contact hypersensitivity, accumulation of CD4⁺ T lymphocytes, monocytes and neutrophils is reduced significantly in P-selectin-deficient mice and in rats treated with anti-P-selectin antibodies (44, 46, 50). Moreover, induction of an acute dermal inflammation by injection of zymosan in E- and P-selectin-deficient mice has shown that both selectins are required for neutrophil accumulation, and that there is considerable overlap in their functions (25). Catalina *et al* also recently demonstrated that both E- and P-selectin are critical in acute and chronic skin inflammation (6). In contrast, L-selectin does not appear to play a significant role in leukocyte recruitment in the skin (6, 37).

In dogs, we have recently reported that blood vessels expressing P-selectin are increased in cases of allergic dermatitis, autoimmune dermatitis, pyogranulomatous dermatitis, dermatophytosis and panniculitis compared to normal skin, and that there is a positive correlation between P-selectin expression and the accumulation of leucocytes in the dermis (7). This suggests that P-selectin

on dermal vessels participate in the local recruitment of inflammatory cells in skin diseases in dogs. We have also previously shown that stimulation of canine endothelial cells *in vitro* by proinflammatory mediators such as LPS and TNF- α increases both P-selectin mRNA levels and protein synthesis (13). However, *in vivo* induction of P-selectin synthesis and the role of TNF- α in dermatitis have not been investigated in dogs. Therefore, the objective of the present study was to characterize the cellular response and the expression of vascular selectins following TNF- α injection in canine skin.

MATERIALS AND METHODS

Skin inflammatory model

Healthy adult Beagle dogs (n=9) were used. Skin on one side of the thorax was shaved. Sterile recombinant human TNF- α (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN) (10 ng/site) reconstituted in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA; PBS/BSA) (n=6 dogs) or PBS/BSA alone (n=3 dogs) was administered intradermally using a 27 ½ gauge needle. Punch biopsies (6mm) were taken under local anesthesia (subcutaneous injection of 0.7ml of lidocaine 2% with epinephrine [Austin, division of Vetoquinol Canada Inc., Joliette, Canada]) 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours following injection of TNF- α or PBS/BSA. Biopsies were bisected; one half was snap-frozen in OCT (Sakura Finetek USA Inc, Torrance, CA) using isopentane/liquid nitrogen, and the other half was fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Hematoxylin-eosin-saffron (HES)-stained sections were prepared for histologic examination. The hematoxylin-eosin-saffron stain is the stain routinely used at the Faculty of Veterinary Medicine in St-Hyacinthe. The saffron gives a yellow to orange color to collagen.

Antibodies

The anti-canine P-selectin monoclonal antibody (MD3) was produced in mice that had been immunized with thrombin-stimulated dog platelets (10). MD3 recognizes a non-blocking epitope of P-selectin in paraffin-embedded tissues, and was used as tissue culture supernatant (1:10 dilution in PBS). Monoclonal

antibody directed against E-selectin (CL37) was generated by immunization of mice with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) stimulated with recombinant human interleukin-1 β (IL-1 β) (35). CL37 recognizes human (35) and canine (Dr. C.W. Smith, personal communication) endothelial E-selectin in frozen tissue sections. PBS was used as negative control.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), as previously described (7, 10, 13). Paraffin-embedded 3- μ m sections were deparaffined through graded alcohol series, and used for the P-selectin staining with antibody MD3. Frozen sections were air-dried at room temperature for 2 hours, fixed for 30 seconds in acetone, rinsed in PBS for 15 minutes, and used for the E-selectin staining with antibody CL37. Endogenous peroxidase was quenched by incubating the slides in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 minutes. After rinsing in PBS for 15 minutes, sections were incubated with diluted normal horse serum for 20 minutes at room temperature. Primary antibody diluted in PBS (MD3: 1:10 dilution; CL37: 1 μ g/ml) was applied, and sections were incubated overnight at 4°C. Control sections were incubated with PBS. After rinsing in PBS for 10 minutes, a biotinylated horse anti-mouse antibody (1:222 dilution) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was applied, and sections were incubated for 45 minutes at room temperature. Sections were washed in PBS for 10 minutes and incubated with the avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H reagents for 45 minutes at room

temperature. After washing with PBS for 10 minutes, the reaction was revealed using diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as the peroxidase substrate. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin stain and mounted.

Microscopic evaluation

HES-stained tissue sections were evaluated using a light microscope to quantify the inflammatory reaction in the dermis and the panniculus. Inflammatory cells (including neutrophils, macrophages, lymphocytes, plasma cells and eosinophils) were counted in nine representative fields in the dermis and nine representative fields in the panniculus. Immunostained tissue sections were examined to determine the number of vessels immunoreactive for MD3 and CL37. The total number of positively-stained blood vessels was evaluated on each section.

Statistical analysis

The effect of time on the number of infiltrating leukocytes and on the number of E- and P-selectin-positive vessels was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparisons of means with the Tukey-Kramer method; statistical significance was set at $P < 0.05$. All values are given as mean \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

TNF-induced inflammatory reaction.

Histological examination revealed that injection of TNF- α (10 ng/site) induced an acute inflammatory reaction in all dogs (n=6). While normal skin (from dogs injected with PBS/BSA alone) displayed no or rare inflammatory cells (Figure 1), neutrophils were seen adherent to and extravasating from dilated dermal and subcutaneous venules by 3 hours after injection of TNF- α (Figure 2). Thereafter, there was a progressive increase in the number of extravascular neutrophils at 6 and 12 hours accompanied in some areas by a perivascular exudation of fibrin (Figures 3 and 4), and the number of leukocytes peaked at 12 hours ($p < 0.05$; Figures 4 and 7). At 24 and 48 hours, the leukocyte infiltration had decreased (Figure 7), and some macrophages were observed among the population of neutrophils. Few eosinophils were observed in one animal.

Expression of P- and E-selectin in TNF- α -induced dermatitis.

No significant P-selectin expression was detected in endothelial cells from blood vessels in the normal skin (Figures 5 and 8). However, following TNF- α injection, P-selectin-expressing blood vessels were observed in the dermis at all time-points, with a maximal number of positive blood vessels observed at 12 hours post- TNF- α administration ($p < 0.05$; Figures 6 and 8). In three of the six dogs, several positive vessels were present at 12 hours (20 ± 6) while the other three dogs showed very few positive vessels (1 ± 1). P-selectin-positive blood vessels were often associated with the presence of leukocytes in the area surrounding the

vessels, but leukocyte infiltration was not always associated with P-selectin-reactive vessels in the area. In addition to endothelial cells, P-selectin-expressing platelets were present both within the lumen of blood vessels and in the perivascular dermis at all time-points post- TNF- α injection (data not shown).

Similarly to P-selectin, blood vessels in the normal skin did not contain E-selectin (data not shown). However, TNF- α injection induced E-selectin expression on dermal vessels at 3, 6 and 12 hours ($p < 0.05$; Figure 8) with a subsequent decrease to negligible levels by 24 hours.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time the *in vivo* induction of P-selectin expression in dog tissues by an inflammatory mediator such as TNF- α . We have previously shown that TNF- α was able to induce P-selectin mRNA and protein in canine endothelial cells *in vitro*, but *in vivo* induction had never been reported in dogs. P-selectin is prestored in Weibel-Palade bodies of endothelial cells, and is therefore readily available to be expressed on the cell surface in the very early phases of an inflammatory reaction. However, its expression is only transient as it is soon either proteolytically released into the circulation or rapidly endocytosed (17, 22, 42, 45). Endocytosed P-selectin can be recycled to the Weibel-Palade bodies or degraded in lysosomes (17, 22, 42, 45). However, increased transcription and translation of P-selectin due to the effect of proinflammatory cytokines could represent a means of sustaining P-selectin expression and the recruitment of leukocytes at latter stages of inflammation.

Important species differences have recently been reported in the induction of P-selectin by inflammatory mediators such as TNF- α and LPS. Studies have shown that TNF- α , IL-1 β and LPS increase expression of P-selectin mRNA and protein in mouse endothelial cells both *in vitro* and *in vivo*, as well as in bovine endothelial cells *in vitro* (4, 20, 41, 55). However, these same mediators do not increase P-selectin mRNA in human endothelial cells *in vitro* (57). Interestingly, it has been shown that the binding sites for NF-kappa B and ATF-2, two transcription factors necessary for the activation of the murine P-selectin gene, are

not present in the promotor of the human P-selectin gene (38, 39). A recent study also found that intravenous administration of *Escherichia coli*, which markedly elevates plasma LPS and TNF- α , did not increase mRNA for P-selectin in baboons (29). These results suggest that important species differences exist, and that caution is needed when extrapolating the function of P-selectin from one species to another. The results of the present study indicate that the expression of canine P-selectin is more similar to the murine and bovine species since both *in vitro* and *in vivo* upregulation of P-selectin have been demonstrated in these species.

In the present study, some P-selectin-positive blood vessels were observed at 3 hours post- TNF- α injection, but maximal expression was reached only at 12 hours. This time-course of expression is different from the time-course observed *in vitro* with canine endothelial cells where induction of P-selectin mRNA by TNF- α and LPS occurred between 3 and 6 hours (13). Previous *in vitro* studies have also shown P-selectin protein in canine endothelial cells at 3.5 hours following LPS stimulation (13). These results suggest that there are differences in the time-course of induction of P-selectin between *in vitro* and *in vivo* conditions. The reasons for the maximal P-selectin expression at 12 hours are unclear. One could speculate that P-selectin expression *in vivo* appeared early, and was missed in the present study. However, the skin from one animal was analyzed at one hour post-injection, and there were no P-selectin-expressing vessels (data not shown). Also, *in vitro* studies were performed using endothelial cells derived from jugular veins, and there might be differences in the response of endothelium depending on the localization of the vascular bed (small dermal vessels vs jugular vein).

P-selectin expression has been documented in various skin diseases in humans and in some forms of dermatitis in dogs, including allergic dermatitis, autoimmune dermatitis, pyogranulomatous dermatitis, dermatophytosis and panniculitis (2, 3, 7, 9, 18, 19, 26, 51, 54, 59). In humans, evidence of an important role for TNF- α in the induction of adhesion molecules, including P-selectin, in inflammatory skin diseases has recently been presented in patients with psoriasis (49). In these patients, large amounts of TNF- α were detected in the supernatant of freeze-thawed specimen, and there was strong staining for TNF- α on keratinocytes and endothelial cells, and for P-selectin on endothelial cells from involved skin (49). A rapid and transient expression of TNF- α mRNA and protein has also been shown in experimental skin sensitization in mice, suggesting that this cytokine plays a role in the initiation of cutaneous immune responses (15). Moreover, the importance of P- and E-selectin in the early phases of leukocyte recruitment in contact hypersensitivity has been highlighted by studies using mice deficient in these adhesion molecules (6, 46). A recent study also reported the persistence of both E- and P-selectin expression in mice *in vivo* in a model of immune-mediated inflammatory response of the skin (21).

In the present study, platelet aggregates were observed in the lumen of many blood vessels as well as in the perivascular interstitial tissues. These platelets could be readily identified by their positive reactivity with the anti-P-selectin antibody MD3 (12). The clumping of these platelets in the vessel lumen and around blood vessels likely results from the administration of TNF- α . In humans and mice, intravenous injection of TNF- α induces a thrombocytopenia that

appears to be due to an increase in platelet consumption (47). Platelet consumption is believed to be the result of platelet activation, with the surface expression of molecules such as P-selectin (12, 32, 33). It has been recently shown that the TNF-induced thrombocytopenia is mainly mediated by the TNF receptor I (p55), acting not on platelets directly but on other cells (47). Indeed, Piguet *et al.* recently demonstrated that an important pathway of the TNF-induced thrombocytopenia involves mast cells and the generation of monoamines (40). The presence of platelets in blood vessels and in the dermis suggests that the platelets could participate in leukocyte recruitment, as *in vitro* studies have shown that P-selectin-expressing canine platelets can mediate the rolling and firm arrest of flowing canine neutrophils (12).

The time-course of E-selectin expression observed in the present study (between 3 and 12 hours) is comparable to previously reported *in vivo* expression of E-selectin in rhesus monkeys and baboons (36, 43). Several reports suggest that E- and P-selectin are both necessary for neutrophil accumulation in the skin (34, 53). For example, in models of acute and chronic dermal inflammation, mice deficient in both E- and P-selectin exhibit a significantly reduced neutrophil accumulation whereas neutrophil accumulation in mice deficient in only E- or P-selectin is unchanged (25, 34). Also, E-selectin expression has been documented in the lesional skin of patients with atopic dermatitis compared to non-atopic individuals (9). This expression was more pronounced after epicutaneous application of aeroallergen (atopy patch test). In psoriasis, as in other chronic dermatoses, persistent E-selectin expression on endothelium has also been reported

(49, 51).

In conclusion, we have shown that TNF- α injected intradermally in dog skin induces an acute inflammatory reaction characterized by an increased expression of vascular selectins. E- and P-selectin have distinct patterns of expression on endothelial beds, and their precise regulation permits the initial phase of leukocyte recruitment. New anti-adhesive therapies based on the inhibition of the selectin-dependent leukocyte infiltration could contribute to diminish the tissue damage in skin inflammatory processes. Further investigations will be necessary to precise the role of vascular selectins in the canine species.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (M. D.) and the Fonds du Centenaire de l'Université de Montréal (M. D. and M. P.). We thank Dr. C. W. Smith, Baylor College of Medicine, Houston, Texas for kindly providing antibody CL37.

REFERENCES

1. Auchampach JA, Oliver MG, Anderson DC, Manning AM: Cloning, sequence comparison and in vivo expression of the gene encoding rat P-selectin. *Gene* **145**:251-255, 1994
2. Barker JNWN: Adhesion molecules in cutaneous inflammation. *Ciba Foundation Symp* **189**:91-106, 1995
3. Bennion SD, Middleton MH, David-Bajar KM, Brice S, Norris DA: In three types of interface dermatitis, different patterns of expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) indicate different triggers of disease. *J Invest Derm* **105**: 71S-79S, 1995
4. Bischoff J, Brasel C: Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun* **210**:174-180, 1995
5. Burns AR, Bowden RA, Abe Y, Walker DC, Simon SI, Entman ML, Smith CW: P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol* **65**:299-306, 1999
6. Catalina MD, Estess P, Wiegelman MH: Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* **93**:580-589, 1999
7. Chénier S, Doré M: P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. *Vet Pathol* **35**:85-93, 1998
8. de Mora F, Williams CMM, Frenette PS, Wagner DD, Hynes RO, Galli SJ:

- P- and E-selectins are required for the leukocyte recruitment, but not the tissue swelling, associated with IgE- and mast cell-dependent inflammation in mouse skin. *Lab Invest* **78**:497-505, 1998
9. de Vries IJM, Langeveld-Wildshut EG, van Reijssen FC, Dubois GR, van den Hoek JA, Bihari IC, van Wichen D, de Weger RA, Knol EF, Thepen T, Bruijnzeel-Koomen CAFM: Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: effects of TNF- α and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* **102**:461-468, 1998
 10. Doré M, Hawkins HK, Entman ML, Smith CW: Production of a monoclonal antibody against canine GMP-140 (P-selectin) and studies of its vascular distribution in canine tissues. *Vet Pathol* **30**:213-222, 1993
 11. Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW: P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* **82**:1308-1316, 1993
 12. Doré M, Simon SI, Hughes BJ, Entman ML, Smith CW: P-selectin- and CD18-mediated neutrophil recruitment under conditions of shear stress. *Vet Pathol* **32**:258-268, 1995
 13. Doré M, Sirois J: Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. *Vet Pathol* **33**:662-671, 1996
 14. Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR: Cell adhesion molecules- Update. *Vet Pathol* **34**:61-73, 1997
 15. Flint MS, Deartman RJ, Kimber I, Hotchkiss SA: Production and in situ localization of cutaneous tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) following skin sensitization. *Cytokine* **10**:213-219,

1998

16. Gotsch U, Jäger U, Dominis M, Vestweber D: Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF- α in vivo. *Cell Adhesion Communic* **2**:7-14, 1994
17. Green SA, Setiadi H, McEver RP, Kelly RB: The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J Cell Biol* **124**:435-448, 1994
18. Groves RW, Allen MH, Barker JNWN, Haskard DO, MacDonald DM: Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* **124**:117-123, 1991
19. Groves RW, Ross EL, Barker JNWN, MacDonald DM: Vascular Cell Adhesion Molecule-1: expression in normal and diseased skin and regulation in vivo by interferon gamma. *J Am Acad Dermatol* **29**:67-71, 1993
20. Hahne M, Jäger U, Isenmann S, Hallmann R, Vestweber D: Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol* **121**:655-664, 1993
21. Harari OA, McHale JF, Marshall D, Ahmed S, Brown D, Askenase PW, Haskard DO: Endothelial cell E- and P-selectin up-regulation in murine contact sensitivity is prolonged by distinct mechanisms occurring in sequence. *J Immunol* **163**:6860-6866, 1999
22. Hartwell DM, Mayadas TN, Berger G, Frenette PS, Rayburn H, Hynes RO,

- Wagner DD: Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J Cell Biol* **143**:1129-1141, 1998
23. Hattori R, Hamilton KK, McEver RP, Sims PJ: Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* **264**:9053-9060, 1989
24. Hickey MJ, Kanwar S, McCafferty D-M, Granger DN, Eppihimer MJ, Kubes P: Varying roles of E-selectin and P-selectin in different microvascular beds in response to antigen. *J Immunol* **162**:1137-1143, 1999
25. Homeister JW, Zhang M, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Lowe JB, Marks RM: Overlapping functions of E- and P-selectin in neutrophil recruitment during acute inflammation. *Blood* **92**:2345-2352, 1998
26. Jung K, Linse F, Heller R, Moths C, Goebel R, Neumann CH: Adhesion molecules in atopic dermatitis: VCAM-1 and ICAM-1 expression is increased in healthy-appearing skin. *Allergy* **51**:452-460, 1996
27. Kansas GS: Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**:3259-3287, 1996
28. Ley K: Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardio Res* **32**:733-742, 1996
29. Longbiao Y, Setiadi H, Xia L, Laszik Z, Taylor FB, McEver RP: Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates.

- Blood **94**:3820-3828, 1999
30. 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 Biol* **115**:223-234, 1991
 31. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF: 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* **84**:92-99, 1989
 32. McEver RP, Martin MN: A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* **259**:9799-9804, 1984
 33. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR: In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:11877-11882, 1996
 34. Mizgerd JP, Bullard DC, Hicks MJ, Beaudet AL, Doerschuk CM: Chronic inflammatory disease alters adhesion molecule requirements for acute neutrophil emigration in mouse skin. *J Immunol* **162**:5444-5448, 1999
 35. Mulligan MS, Varani J, Dame MK, Lane CL, Smith CW, Anderson DC, Ward PA: Role of endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) in neutrophil-mediated lung injury in rats. *J Clin Invest* **88**:1396-1406, 1991
 36. Munro JM, Pober JS, Cotran RS: Recruitment of neutrophils in the local

- endotoxin response: association with de novo endothelial expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Lab Invest* **64**:295-299, 1991
37. Nolte D, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D: Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol* **267**:H1637-H1642, 1994
38. Pan J, McEver RP: Characterization of the promotor for the human P-selectin gene. *J Biol Chem* **268**:22600-22608, 1993
39. Pan J, Xia L, McEver RP: Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J Biol Chem* **273**:10058-10067, 1998
40. Piguet PF, Vesin C, Guo J, Donati Y, Barazzone C: Role of mast cells and monoamines in the thrombocytopenia and mortality elicited by tumour necrosis factor in mice. *Immunology* **95**:111-116, 1998
41. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL: Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* **80**:795-800, 1992
42. Setiadi H, Disdier M, Green SA, Canfield WM, McEver RP: Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J Biol Chem* **270**:26818-26826, 1995
43. Silber A, Newman W, Reimann KA, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ: Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to

- leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. *Lab Invest* **70**:163-175, 1994
44. Staite ND, Justen JM, Sly LM, Beaudet AL, Bullard DC: Inhibition of delayed-type contact hypersensitivity in mice deficient in both E-selectin and P-selectin. *Blood* **88**:2973-2979, 1996
45. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD: Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **4**:791-801, 1993
46. Subramaniam M, Saffaripour S, Watson SR, Mayadas TN, Hynes RO, Wagner DD: Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. *J Exp Med* **181**:2277-2282, 1995
47. Tacchini-Cottier F, Vesin C, Redard M, Buurman W, Piguet PF: Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J Immunol* **160**:6182-6186, 1998
48. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P: The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* **9**:866-873, 1995
49. Terajima S, Higaki M, Igarashi Y, Nogita T, Kawashima M: An important role of tumor necrosis-factor- α in the induction of adhesion molecules in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **290**:246-252, 1998
50. Tipping PG, Huang XR, Berndt MC, Holdsworth SR: P-selectin directs T lymphocyte-mediated injury in delayed-type hypersensitivity responses: studies in glomerulonephritis and cutaneous delayed-type hypersensitivity.

- Eur J Immunol **26**:454-460, 1996
51. Veale D, Rogers S, Fitzgerald O: Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *Br J Dermatol* **132**:32-38, 1995
 52. Vestweber D, Blanks JE: Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**:181-213, 1999
 53. Walter UM, Issekutz AC: Role of E- and P-selectin in migration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes to cytokine and chemoattractant-induced cutaneous inflammation in the rat. *Immunol* **92**:290-299, 1997
 54. Wakita H, Sakamoto T, Tokura Y, Takigawa M: E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as critical adhesion molecules for infiltration of T-lymphocytes and eosinophils in atopic dermatitis. *J Cutan Pathol* **21**:33-39, 1994
 55. Weller A, Isenmann S, Vestweber D: Cloning of mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P- selectin is inducible by tumor necrosis factor α . *J Biochem Chem* **267**:15176-15183, 1992
 56. Yamada S, Mayadas TN, Yuan F, Wagner DD, Hynes RO, Melder RJ, Jain RK: Rolling in P-selectin-deficient mice is reduced but not eliminated in the dorsal skin. *Blood* **86**:3487-3492, 1995
 57. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP: Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* **184**:81-92, 1996

58. Yao L, Setiadi H, Xia L, Laszik Z, Taylor FB, McEver RP: Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* **94**:3820-3828, 1999
59. Zuberbier T, Schadendorf D, Haas N, Hartmann K, Henz B: Enhanced P-selectin expression in chronic and dermagraphic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* **114**:86-89, 1997

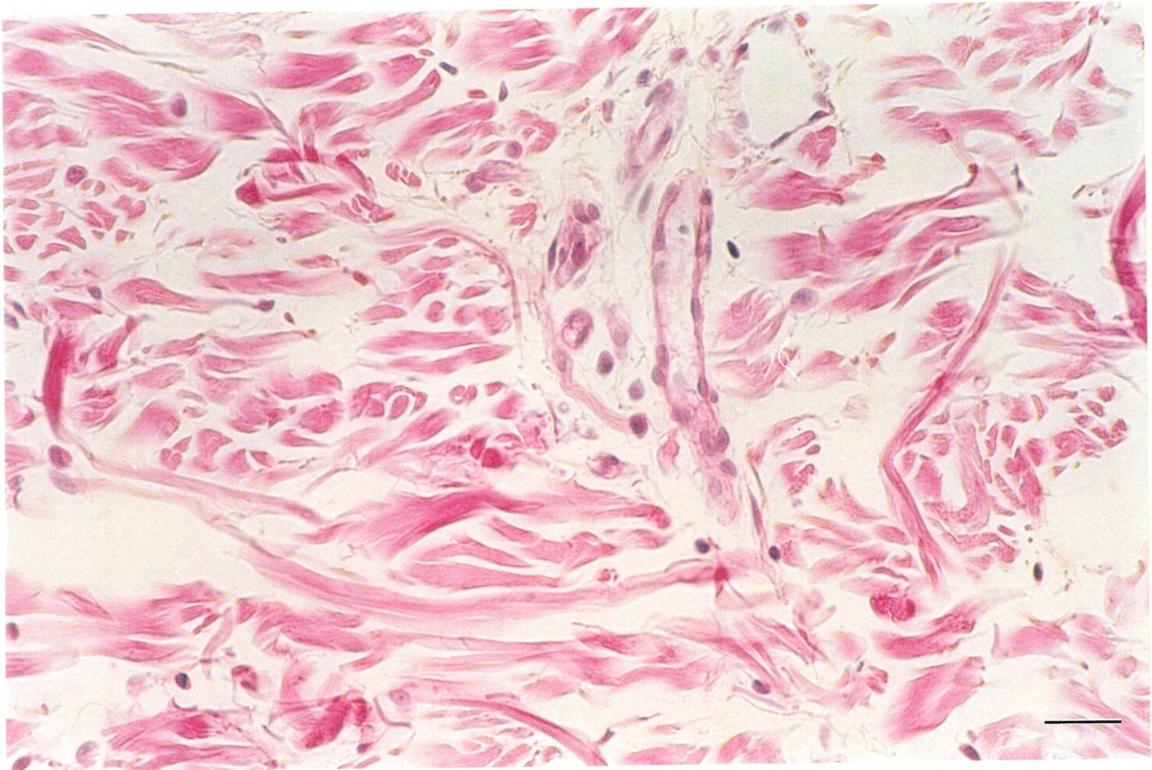


Figure 1 : Skin; dog. Control skin (injected with PBS/0.1%BSA) shows only rare inflammatory cells. HES. Scale bar = 25 μ m.

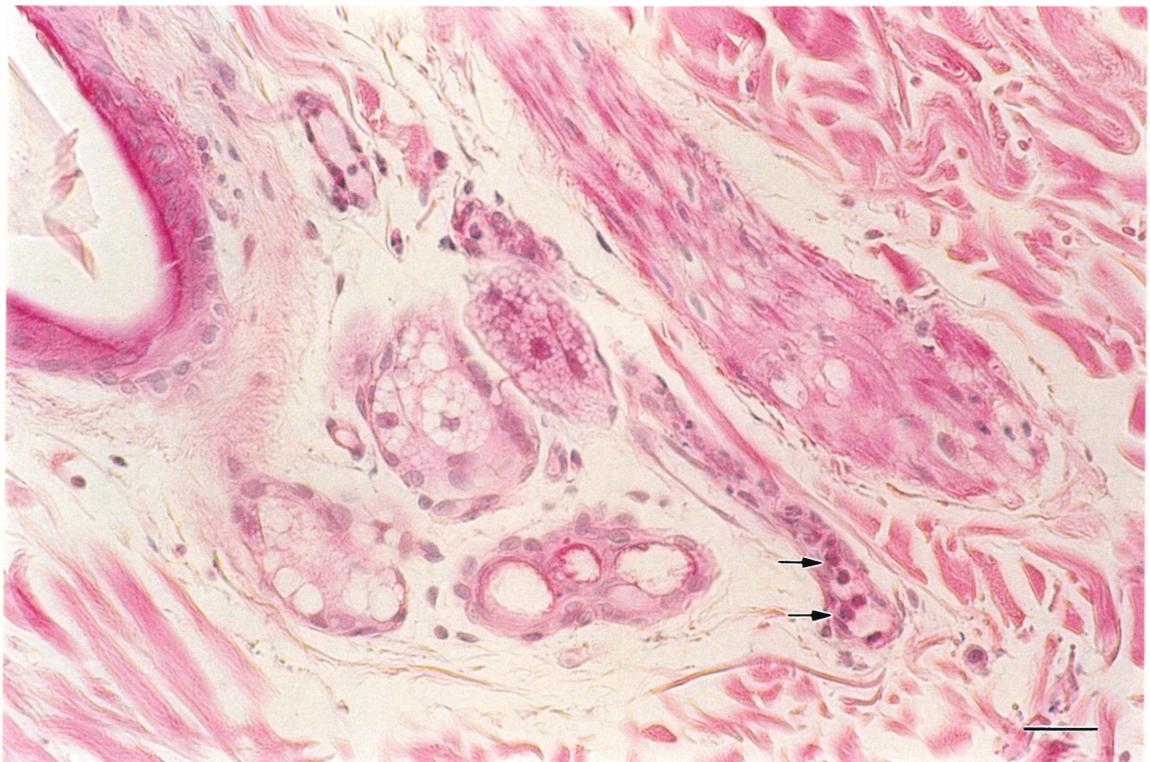


Figure 2: **Skin; dog.** Three hours after intradermal injection of TNF- α , neutrophils (arrows) are adherent to venular endothelium and are starting to extravasate. HES. Scale bar = 25 μ m.

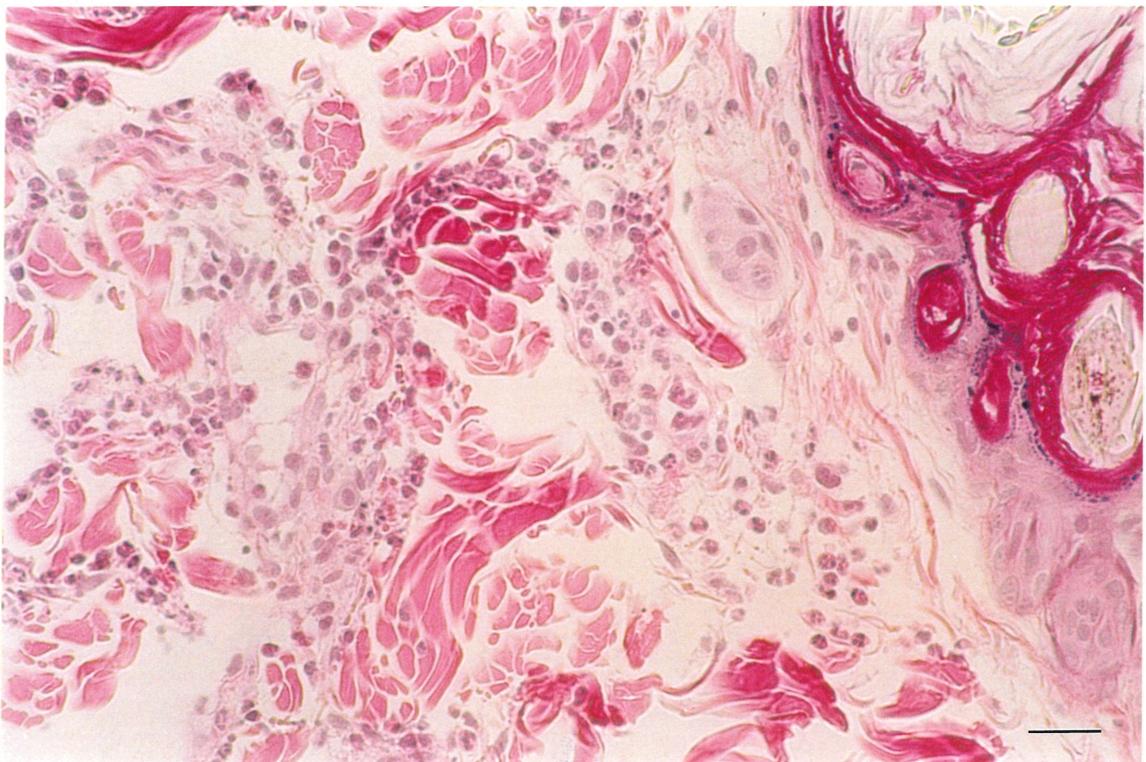


Figure 3: Skin; dog. Six hours after intradermal injection of $\text{TNF-}\alpha$, more neutrophils are present within blood vessels and in interstitial tissues. HES. Scale bar = $25\mu\text{m}$.

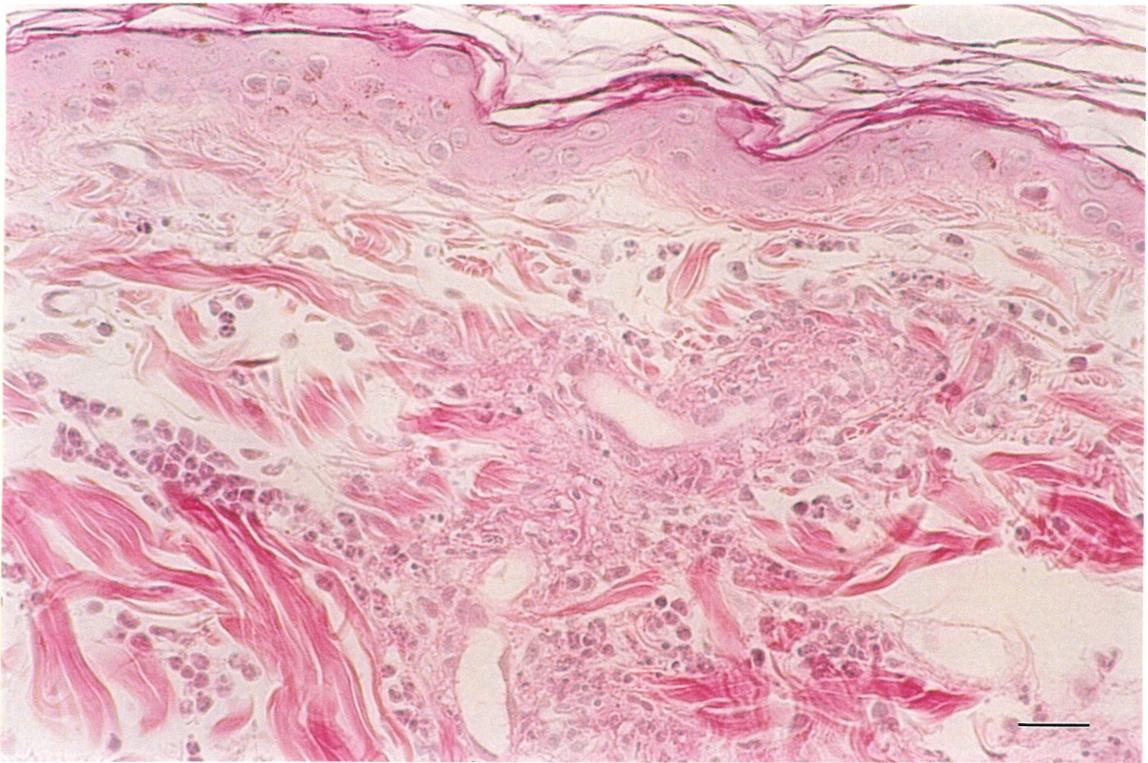


Figure 4: **Skin; dog.** Twelve hours after intradermal injection of $\text{TNF-}\alpha$, the leukocyte infiltration is composed mostly of neutrophils and is accompanied by perivascular exudation of fibrin. HES. Scale bar = $25\mu\text{m}$.

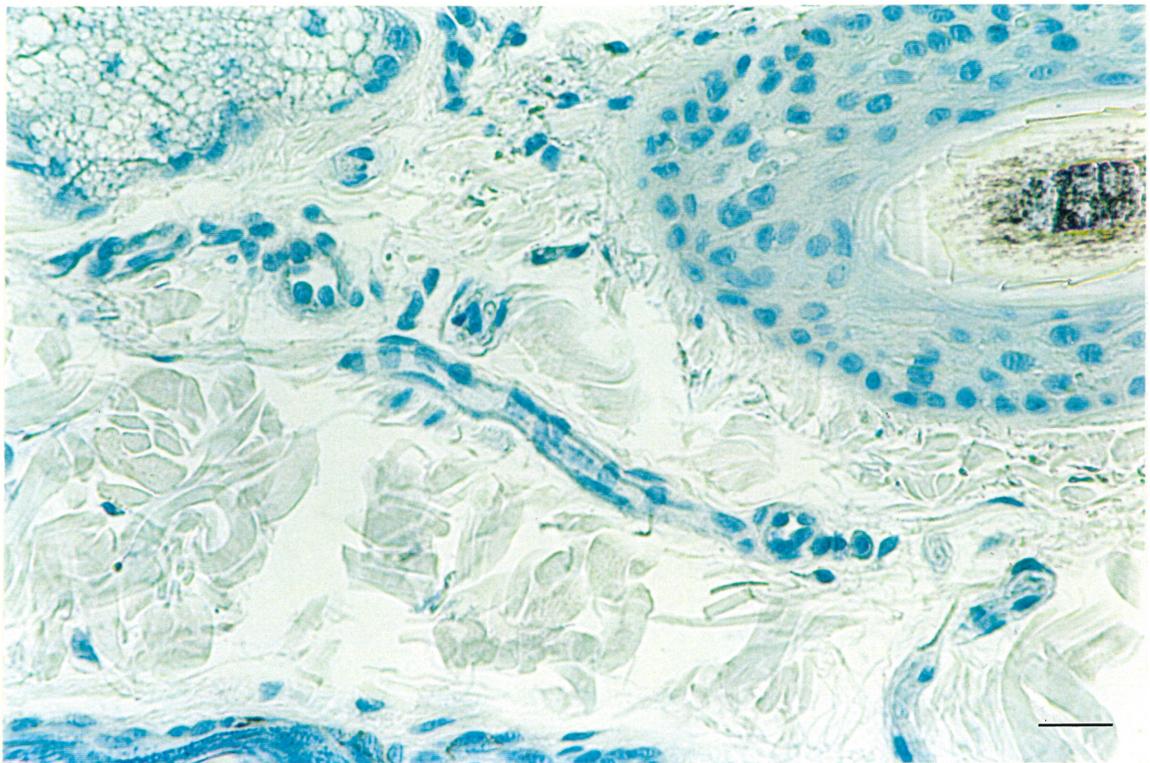


Figure 5: **Skin; dog.** Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed tissues using the anti-canine P-selectin monoclonal antibody MD3. No P-selectin expression is present in normal skin. Avidin biotin peroxidase complex method, Gill's hematoxylin counterstain. Scale bar = 25 μ m.

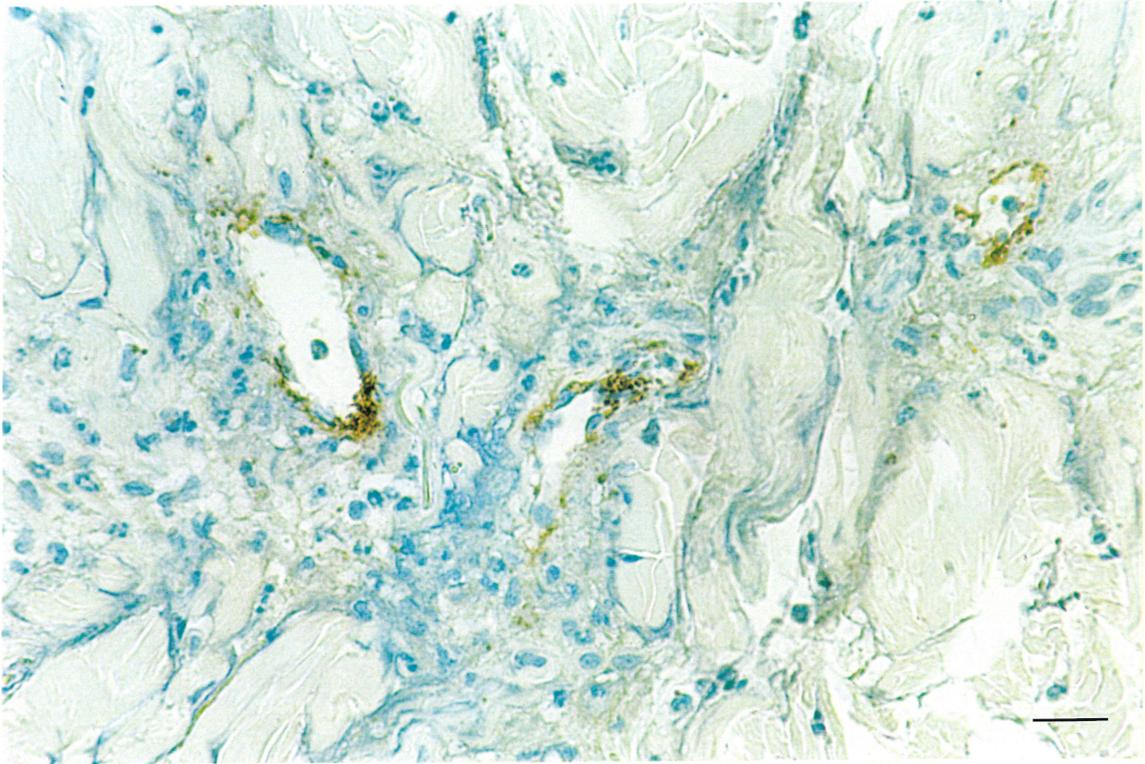


Figure 6: Skin; dog. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed tissues using the anti-canine P-selectin monoclonal antibody MD3. Many blood vessels are immunoreactive for P-selectin at twelve hours following $\text{TNF-}\alpha$ injection. Avidin biotin peroxidase complex method, Gill's hematoxylin counterstain. Scale bar = $25\mu\text{m}$.

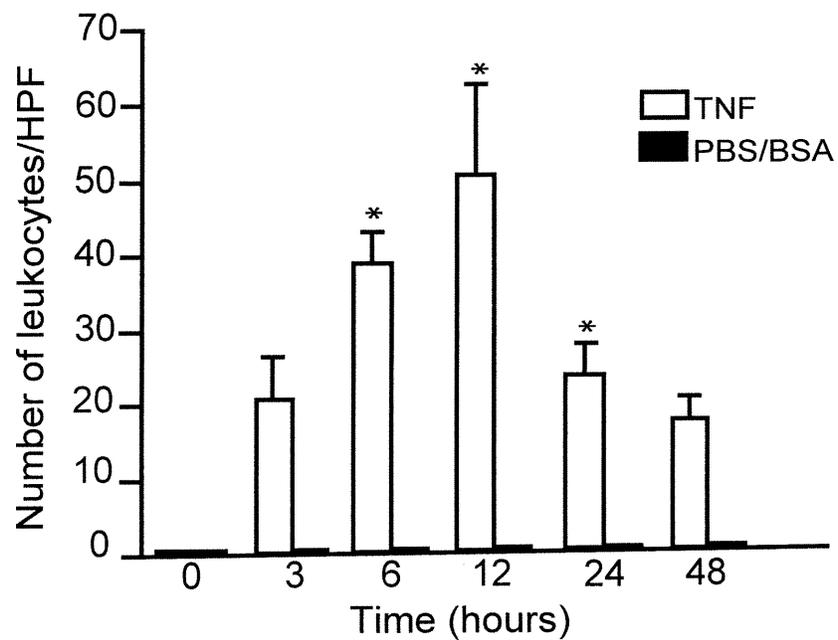


Figure 7: Leukocyte infiltration in TNF- α -induced dermatitis. The number of leukocytes (neutrophils, macrophages, plasma cells, lymphocytes and eosinophils) infiltrating the lesions per high power field (HPF) was determined. Results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). * Significantly different from control skin (PBS/BSA), $P < 0.05$.

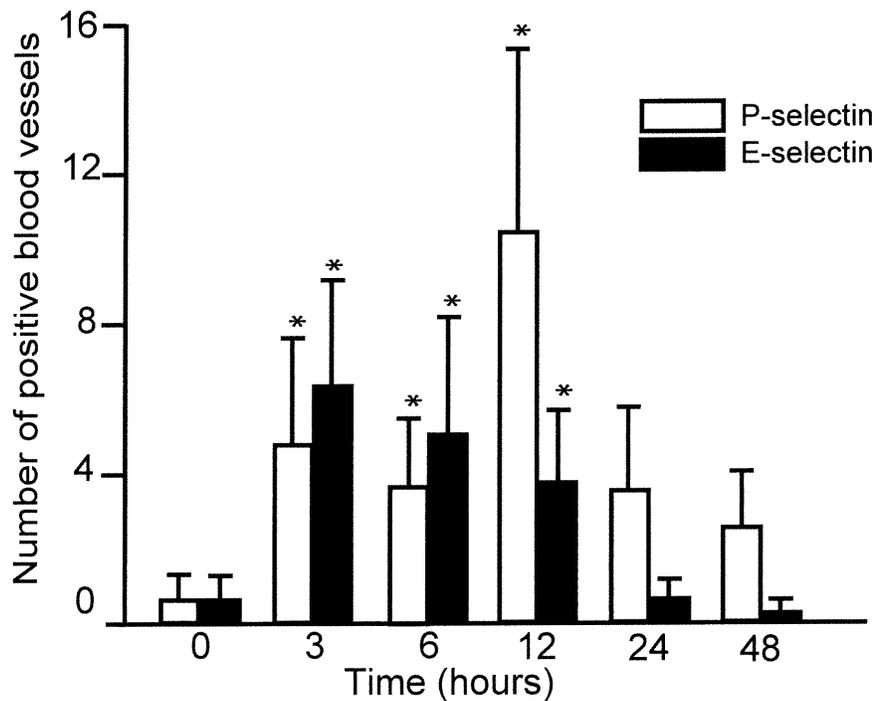


Figure 8: E- and P-selectin expression in TNF- α -induced dermatitis.

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed or frozen tissues using the anti-canine P-selectin monoclonal antibody MD3 or the anti-E-selectin monoclonal antibody CL37. Blood vessels staining positively were counted and expressed as the number of E- or P-selectin-expressing blood vessels per tissue section. * Significantly different from 0h, $P < 0.05$.

DISCUSSION

Cette étude démontre pour la première fois l'induction de l'expression de la P- et de la E-sélectine *in vivo* dans les tissus de chien par un médiateur inflammatoire, le TNF- α . Doré et collaborateurs ont démontré précédemment que le TNF- α était capable d'induire la transcription de l'ARN messager et de la protéine P-sélectine dans les cellules endothéliales canines *in vitro*⁴¹ mais l'induction *in vivo* n'avait jamais été rapportée chez le chien. La P-sélectine est préfabriquée et emmagasinée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Elle est donc disponible pour être exprimée à la surface des cellules très rapidement et dans une phase très hâtive de la réaction inflammatoire. Cependant, son expression est seulement transitoire. Elle est rapidement relâchée en circulation par une séparation protéolytique de la molécule ou reintégrée dans le cytoplasme par endocytose^{39,44,43,93}. La P-sélectine ayant subi l'endocytose peut être soit recyclée dans les corps de Weibel-Palade ou éliminée dans les lysosomes^{39,44,43,93}. Cependant, l'augmentation de la transcription de nouvelle P-sélectine et sa translocation vers la surface sous l'effet des cytokines proinflammatoires pourraient permettre une expression soutenue de P-sélectine à la surface des cellules ainsi que le recrutement des leucocytes à des stades plus avancés de l'inflammation.

Récemment, des différences importantes entre les espèces ont été rapportées en ce qui a trait à l'induction de la P-sélectine par les médiateurs inflammatoires comme le TNF- α et les LPS. Ces études ont démontré que le TNF- α , l'IL-1 β et les LPS augmentent l'expression de l'ARN messager et de la protéine P-sélectine dans les cellules endothéliales de souris dans des conditions *in vitro* et *in vivo* ainsi que dans les cellules endothéliales bovines dans des conditions *in vitro*^{40,94,95,96}. Cependant, ces mêmes médiateurs n'augmentent pas la production d'ARN messager de P-sélectine dans les cellules endothéliales humaines dans des conditions *in vitro*⁹⁷. Il a été démontré que les sites de liaison pour le NF-kappa B et le ATF-2, deux facteurs de transcription nécessaires pour l'activation du gène de la P-sélectine chez la souris, ne sont pas présents dans la

zone promotrice du gène de la P-sélectine humaine^{98,99}. Une étude récente a aussi démontré que l'administration intraveineuse de *Escherichia coli*, laquelle provoque une augmentation marquée des LPS et du TNF- α plasmatiques, ne cause pas l'augmentation d'ARN messager de P-sélectine chez les babouins¹⁰⁰. Ces résultats suggèrent qu'une différence importante existe entre les espèces. L'extrapolation de résultats concernant la fonction de la P-sélectine d'une espèce à l'autre demande une connaissance approfondie des distinctions d'espèces et de la régulation de la molécule chez chacune d'elles. Les résultats de cette étude indiquent que l'expression de la P-sélectine chez le chien est plus proche de celle de la souris et de l'espèce bovine qu'à celle de l'humain. Les mécanismes de régulation de la P-sélectine *in vitro* et *in vivo* se sont avérés semblables à ceux de ces deux espèces.

Dans cette étude, bien que quelques vaisseaux sanguins exprimant la P-sélectine aient été observés trois heures après l'injection de TNF- α , l'expression maximale de P-sélectine a été atteinte seulement après 12 heures. La courbe d'expression dans le temps est différente de celle observée *in vitro* avec des cellules endothéliales canines où l'induction de l'ARNm de P-sélectine par le TNF- α et les LPS survenait entre trois et six heures après l'addition de cytokine dans le milieu⁴¹. Des études *in vitro* précédentes ont également démontré la détection de la protéine P-sélectine dans les cellules endothéliales est possible trois heures et demi suivant la stimulation par les LPS⁴¹. Ces résultats suggèrent qu'il y a des différences dans les courbes temporelles d'induction de la P-sélectine entre les conditions *in vitro* et *in vivo*. Les raisons pour lesquelles l'expression maximale de P-sélectine est survenue 12 heures après la stimulation par le TNF- α ne sont pas claires. Dans la présente étude, l'expression de la P-sélectine dans la phase de début de la réaction inflammatoire a pu ne pas être détectée. Cependant, les tissus cutanés d'un animal ont été analysés une heure après l'injection de TNF- α (résultat non-démonstré) et aucun vaisseau sanguin du derme ou du pannicule n'exprimait de P-sélectine. De plus, les études *in vitro* chez le chien ont été effectuées avec des cellules endothéliales isolées à partir de veines jugulaires. Il est fort probable qu'il existe des différences dans la réponse de l'endothélium

dépendamment de la localisation du lit vasculaire (vaisseaux dermiques de petit calibre vs veine jugulaire).

L'expression de la P-sélectine a été documentée dans plusieurs maladies cutanées chez les humains et quelques formes de dermatites chez les chiens, incluant des dermatites allergiques, auto-immunes, pygranulomateuses ainsi que dans les panniculites et dans les cas de dermatophytose^{79, 80, 81, 88, 89, 101, 102, 103, 104, 105}. Chez les humains, des évidences de l'importance du TNF- α dans l'induction des molécules d'adhésion, incluant la P-sélectine, lors de maladies inflammatoires de la peau ont récemment été rapportées chez des patients souffrant de psoriasis⁸⁶. Chez ces patients, une grande quantité de TNF- α a été détectée dans le surnageant de broya de spécimens congelés. Par immunohistochimie, les kératinocytes et les cellules endothéliales étaient fortement positifs pour le TNF- α et les cellules endothéliales exprimaient la P-sélectine dans la peau lésée⁸⁶. Une expression rapide et transitoire de l'ARN messager et de la protéine TNF- α a aussi été démontrée dans la peau de souris lors d'une sensibilisation expérimentale, suggérant que cette cytokine joue un rôle dans l'initiation de la réponse immune cutanée¹⁰⁶. De plus, l'importance de la P- et de la E-sélectine dans les premières phases du recrutement leucocytaire lors d'hypersensibilité de contact a été soulignée par des études en utilisant des souris déficientes en ces molécules d'adhésion^{54, 83}. Une étude récente rapporte aussi la persistance de l'expression *in vivo* de la P- et de la E-sélectine chez les souris dans un modèle de réponse inflammatoire à médiation immunitaire dans la peau¹⁰⁷.

Dans la présente étude, des agrégats de plaquettes ont été observés dans la lumière de plusieurs vaisseaux sanguins ainsi que dans le tissu interstitiel périvasculaire. Ces plaquettes ont pu être identifiées à l'aide de leur réaction positive avec l'anticorps anti-P-sélectine MD3¹⁰⁸. L'agrégation de ces plaquettes dans la lumière des vaisseaux et dans les tissus environnants résulte vraisemblablement de leur activation suite à l'administration de TNF- α . Chez les humains et les souris, l'injection intraveineuse de TNF- α induit une thrombocytopenie qui semble due à une augmentation de la consommation des plaquettes⁷⁰. La consommation des plaquettes semble le résultat de leur activation

qui amène aussi l'expression de molécules à la surface comme la P-sélectine^{108,109,110}. Récemment, il a été démontré que la thrombocytopenie induite par le TNF- α est principalement médiée par le TNFR1 (p55)⁷⁰. Dans ces cas, le TNF- α n'agirait pas directement sur les plaquettes mais plutôt sur d'autres cellules⁷⁰. En effet, Piguet et collaborateurs démontraient récemment qu'une voie importante de la thrombocytopenie induite par le TNF- α impliquant les mastocytes et leur production de monoamines¹¹¹. Tel que démontré dans des études *in vitro*, les plaquettes de chien exprimant la P-sélectine peuvent produire le rolling et l'adhésion ferme des neutrophiles canins dans des conditions de flux¹⁰⁸. La présence de plaquettes dans les vaisseaux sanguins et dans le derme suggère que les plaquettes pourraient participer au recrutement leucocytaire lors de réaction inflammatoire dans la peau.

La courbe temporelle d'expression de la E-sélectine observée dans la présente étude (soit entre 3 et 12 heures) est comparable à l'expression de la E-sélectine *in vivo* précédemment rapportée chez les singes rhésus et les babouins^{91,92}. Certains rapports suggèrent que la présence des deux sélectines (P- et E-sélectine) est requise pour mener à l'accumulation de neutrophiles dans la peau^{111,112}. Par exemple, dans des modèles d'inflammation cutanée aiguë et chronique, les souris doublement déficientes en P- et en E-sélectine démontrent une réduction significative de l'accumulation de neutrophiles tandis que cette accumulation chez les souris déficientes en seulement une sélectine (P- ou E-sélectine) est comparable à celle des souris normales^{111,113}. L'expression de E-sélectine a également été documentée dans la peau de patients souffrant de dermatite atopique comparée à des individus non-atopiques⁸⁰. Cette expression était plus prononcée après l'application d'un aéroallergène sur l'épiderme (atopy patch test). Dans le psoriasis comme dans les autres affections cutanées chroniques (par exemple l'hypersensibilité retardée), l'expression persistante de E-sélectine sur l'endothélium a aussi été rapportée^{86,88}.

En conclusion, nous avons démontré que le TNF- α injecté dans le derme chez le chien induit une réaction inflammatoire aiguë. Cette dernière se caractérise par une augmentation de l'expression des sélectines vasculaires dans les vaisseaux

du derme et du pannicule. La E- et la P-sélectine ont des patrons d'expression distincts sur les cellules endothéliales. Leur mécanisme de régulation précis permet la phase initiale du recrutement des leucocytes. Les nouvelles thérapies anti-adhésives basées sur l'inhibition de l'infiltration leucocytaire produite par les sélectines pourraient contribuer à diminuer les dommages tissulaires dans les processus inflammatoires cutanés. Des investigations supplémentaires seront nécessaires pour préciser le rôle des sélectines vasculaires chez l'espèce canine.

CONCLUSION

L'injection de cytokines ou de LPS dans le derme est reconnue pour induire une réaction inflammatoire aiguë chez certaines espèces (rats, primates, etc.). Dans cette étude, nous avons démontré pour la première fois que l'injection intradermique de TNF- α chez le chien induit une réaction inflammatoire aiguë locale. Cette réaction inflammatoire se caractérise par une infiltration du derme et du pannicule par des neutrophiles et de moins nombreuses cellules mononucléées qui apparaissent trois heures après l'injection, augmentent jusqu'à un point maximal 12 heures après l'injection et disparaissent graduellement en 72 heures. L'infiltrat inflammatoire est accompagné d'une exsudation légère à modérée de fibrine et d'œdème qui sont vraisemblablement le reflet de la dynamique vasculaire induite par les cytokines de la réaction inflammatoire.

Cette étude avait pour but de déterminer la cinétique d'expression des sélectines vasculaires lors d'une réaction inflammatoire aiguë. Nous avons découvert que, lors d'une stimulation avec le TNF- α chez le chien, les vaisseaux sanguins du derme et du pannicule expriment la P- et la E-sélectine à leur surface. Cette expression est maximale à 12 heures et à 6 heures, respectivement. L'intensité d'expression des sélectines correspond généralement à la sévérité de l'infiltrat inflammatoire bien qu'il y ait un petit délai entre l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et l'apparition des leucocytes dans les tissus.

La P-sélectine est la première molécule d'adhésion à être exprimée à la surface lors d'une inflammation soit dès 5 à 15 minutes après l'insulte. Dans cette étude, l'apparition des molécules d'adhésion survient seulement quelques heures après la stimulation, ce qui suppose que la transcription et la synthèse *de novo* des sélectines sont essentielles pour le recrutement des leucocytes même dans des phases plus tardives (jusqu'à 24 heures) de la réaction inflammatoire aiguë. Des études ultérieures seraient nécessaires afin de caractériser la synthèse de ces molécules d'adhésion à l'aide de techniques comme l'hybridisation *in situ* ou le PCR *in situ*.

Un bon nombre de plaquettes activées ont été démontrées dans la lumière des vaisseaux sanguins et dans les tissus périvasculaires. Le TNF- α est une des cytokines capables d'activer les plaquettes. Dans cette étude, la présence des plaquettes au sein de la réaction inflammatoire suggère que celles-ci pourraient avoir été activées par le TNF- α ou par une autre cytokine produite au site inflammatoire. Le rôle exact des plaquettes dans le recrutement leucocytaire lors d'inflammation est encore obscure. Certaines évidences suggèrent qu'elles auraient peut-être un rôle à jouer dans l'extravasation des leucocytes dans les tissus au site inflammatoire. Les plaquettes retrouvées dans les lumières vasculaires et dans le derme chez les chiens de cette étude ont pu contribuer au recrutement des neutrophiles et des autres leucocytes en procurant une adhésion complémentaire aux sélectines des cellules endothéliales.

L'ampleur des dommages produits par les réactions inflammatoires peut être diminuée en utilisant des médicaments anti-inflammatoires comme les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et les corticostéroïdes (cortisone). Cependant, ces produits pharmaceutiques produisent parfois des effets secondaires qui peuvent être inconfortables ou même toxiques. De plus en plus de recherches sont effectuées sur les mécanismes d'action des molécules d'adhésion. Ces molécules sont en effet la cible de nouveaux agents pharmaceutiques anti-inflammatoires qui pourraient avoir moins d'effets secondaires. L'élaboration de différents modèles expérimentaux d'inflammation chez différentes espèces et la caractérisation de la cinétique d'expression des molécules d'adhésion dans ces modèles deviennent donc d'une utilité indéniable pour comprendre de même que pour évaluer le potentiel thérapeutique de tels produits.

RÉFÉRENCES

1. Collins T. Acute and chronic inflammation. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic basis of disease. Sixth Edition. Philadelphia. WB Saunders. 1999 pp.50-88
2. Bottman JB. Key role of chemokines and chemokines receptor in inflammation, immunity, neoplasia and infectious disease. *Vet Pathol* **36**:357-367, 1996
3. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukine-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* **15**:675-705, 1994
4. Luster AD. Chemokines – cytokines that mediate inflammation. *New England J Med* **338**(7):436-445, 1998
5. Carswell EA, Old LJ, Dassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**:3666-3670, 1975
6. Beutler B. TNF, immunity and inflammatory disease: lesson of the past decade. *J Invest Med* **43**:227-235, 1995
7. Ledgerwood EC, Pober JS, Bradley JR. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction. *Lab Invest* **79**(9):1041-1051, 1999
8. Pober JS, Cotran RS. Overview: The role of endothelial cell in inflammation. *Transplantation* **50**:537, 1990
9. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Ann Rev Immunol* **11**:767-804, 1993
10. Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* **12**:1-9, 1996
11. Erickson SL, de Sauvage FJ, Diddly D, Carver-Moore K, Pitts-Meek S, Gillett N, Shehan KCF, Schreiber RD, Goedel DV, Moore MW. Decrease sensitivity to tumor-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2 deficient mice. *Nature* **372**:560-563, 1994

12. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B – A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England J of Med* **336(15)**:1066-1071, 1997
13. Baeuerle PA. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle? *Current Biol* **8**:R19-R22, 1998
14. Karin M, Liu Z-G, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**:240-246, 1997
15. Reimhold AM, Grusby MJ, Kosaras B, Fries JWU, Mori R, Maniwa S, Clauss IM, Collins T, Sidman RL, Climcher MJ, Glimcher LH. Chondrodysplasia and neurological abnormalities in ATF-2-deficient mice. *Nature* **379**:262-265, 1996
16. Brett J, et al. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G protein. *J Exp Med* **169**:1977, 1989
17. Feng D, et al. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine and serotonin. *J Exp Med* **183**:1981, 1996
18. Cotran RS, Briscoe DM. Endothelial cells in inflammation. In: Kelly W et al. (eds): *Textbook of Rheumatology*. 5th edition. Philadelphia. WB Saunders, 1997 pp. 183-198
19. Lipowsky HH. Leukocyte margination and deformation in post capillary venules. In: Granher DN, Schind-Schonbein GW (eds): *Physiology and Pathophysiology of leukocyte adhesion*. New York. Oxford University Press, 1996 pp. 130-147
20. Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules – Update. *Vet Pathol* **34**:61-73, 1997
21. McEver RP. GMP-140, a receptor that mediates interactions of leukocytes with activated platelets and endothelium. *Trends Cardiovasc Med* **1**:152-156, 1991
22. Kansas GS. Selectins and their ligands: Currents concepts and controversies. *Blood* **88(9)**:3259-3287, 1996

23. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the Selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79(1)**:181-213, 1999
24. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest* **102(8)**:1526-1533, 1998
25. Von andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* **82**:989-999, 1995
26. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The Selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* **9**:866-873, 1995
27. Moore KL, Varki A, McEver RP. GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: evidence for a lectin-like interaction. *J Cell Biol* **112**:491, 1991
28. Walz G, Aruffo A, Kolanus W, Bevilacqua MP, Seed B. Recognition by ELAM-1 of the sialyl Le^x determinant on myeloid and tumor cells. *Science* **250**:1130, 1990
29. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *J Clin Invest* **91**:379, 1993
30. Kansas GS, Saunders KB, Ley K, Zakrzewicz A, Gibson RM, Furie BC, Furie B, Tedder TF. A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol* **124**:609-618, 1994
31. Kansas GS, Pavalko FM. The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha actinin and are not essential for leukocyte adhesion. *J Immunol* **157**:321-325, 1996
32. Yashida M, Westlin WF, Wang N, Ingber DE, Rosenzweig A, Resnick N, Gimbrone MA. Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **133**:445-455, 1996
33. Lo SK, Lee S, Ramos RA, Lobb R, Rosa M, Chi-Rosso B, Wright SD. Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1 a M b 2) on human neutrophils. *J Exp Med* **173**:1493-1500, 1991

34. Repo H, Fochon YP, Schwartz BR, Sharar SR, Winn RK, Harlan JM. Binding of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes to E-selectin (cd62e) does not promote their activation. *J Immunol* **159**:943-951, 1997
35. Bruijn JA, Heer De E. Adhesion molecules in renal disease. *Lab Invest* **72**:387-394, 1995
36. Yager JA. The skin as an immune organ. *Adv Vet Dermatol* **2**:3-31, 1993
37. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* **262**:1580-1582, 1993
38. Geng J-G, Bevilacqua MP, Moore KL, Mc Intyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* **343**:757-760, 1990
39. Green SA, Setiadi RP, McEver RP, Kelly RB. The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J Cell Biol* **124**(4):435-448, 1994
40. Hahne M, Jäger U, Isenmann S, Hallmann R, Vestweber D. Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *J Cell Biol* **121**(3):655-664, 1993
41. Doré M, Sirois J. Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. *Vet pathol* **33**:662-671, 1996
42. Gotsh U, Jäger U, Dominis S, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhesion Commun* **2**:7, 1994
43. Setiadi H, Disdier M, Green SA, Canfield WM, McEver RP. Residues throughout the cytoplasmic domain affect the internalization efficiency of P-selectin. *J Biol Chem* **270**:26818-26826, 1995
44. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **4**:791-801, 1993

45. Disdier M, Morrissey JH, Jugate RD, Bainton DF, McEver RP. Cytoplasmic domain of P-selectin contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Mol Biol Cell* **3**:309-321, 1992
46. Doré M, Hawkins HK, Entman ML, Smith CW. Production of a monoclonal antibody against canine GMP-140 (P-selectin) and studies of its vascular distribution in canine tissues. *Vet Pathol* **30**:213-222, 1993
47. McEver RP, Beckstead JG, Morore KL, Marshall-Carlson L, Minton 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* **84**:92-99, 1989
48. Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood* **82**(4):1308-1316, 1993
49. Nolte Dirk, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D. Leukocyte rolling in venules of striated muscles and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol* **267**:H1637-H1642, 1994
50. Yamada S, Mayadas TN, Yuan F, Wagner DD, Hynes RO, Melder RJ, Jain RK. Rolling in P-selectin-deficient mice is reduced but not eliminated in the dorsal skin. *Blood* **86**(9):3487-3492, 1995
51. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* **74**:541-554, 1993
52. Burns AR, Bowden RA, Abe Y, Walker DC, Simon SI, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates neutrophil adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol* **65**:299-306, 1999
53. Wertheimer SJ, Myers CS, Wallace RW, Parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. *J Biol Chem* **267**:12030, 1992
54. Catalina MD, Estess P, Siegelman MG. Selective requirements for leukocyte adhesion molecules in models of acute and chronic cutaneous inflammation: Participation of E- and P- but not L-selectin. *Blood* **93**(2):580-589, 1999

55. Whitley MZ, Thanos D, Read MA, Maniatis T, Collins T. A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol* **14**:6464-6475, 1994
56. Vora M, Romero LI, Karasek MA. Interleukine-10 induces E-selectin on small and large blood vessel endothelial cells. *J Exp Med* **184**:821-829, 1996
57. Brizzi MF, Garbarino G, Rossi PR, Pagliardi GL, Archino C, Avanci GC, Pegoraro L. Interleukine-3 stimulates proliferation and triggers endothelial leukocyte adhesion molecule-1 gene activation on human endothelial cells. *J Clin Invest* **91**:2887-2892, 1993
58. Moden V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Oncostatin M is a proinflammatory mediator: in vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest* **100**:158-168, 1997
59. Lozada C, Levin RI, Huie M, Hirschhorn R, Naime D, Whitlow SM, Recht PA, Golden B, Cronstein BN. Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecule E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:8378-8382, 1995
60. Ghersa P, van Huijsduijnen RH, Whelan J, DeLamarter F. Labile proteins play a dual role in the control of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) gene regulation. *J Biol Chem* **367**:19226, 1996
61. Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, Lombard-Gillooly KM, Shuster DJ, Hubbard J, Bertko R, Knask PA, Terry RW, Harbison ML, Kontgen F, Stewart CL, McIntyre KW, Will PC, Burns DK, Wolitzky BA. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping functions of endothelial selectins. *Immunity* **1**:709-720, 1994
62. Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice: E-selectin is required for slow rolling in vivo. *Circ Res* **79**:1196-1204, 1996
63. Varki A. Selectin Ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:7391, 1994

64. Harlan JM. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: Insights into the molecular basis of leukocyte emigration. *Clin Immunol Immunopathol* **67**:S16-24, 1993
65. Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults N, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **268**:12764, 1993
66. Moore KL, Patel KD, Breuhl RE, Fugang L, Johnson Da, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* **128**:661-671, 1995
67. Asa D, Raycroft L, Ma L, Adde PA, Kaytes PS, Elhammer AP, Geng JG. The P-selectin glycoprotein ligand junctions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J Biol Chem* **270**:11662-11670, 1995
68. Steegmaier M, Borges E, Berger J, Schwartz H, Vestweber D. The E-selectin ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J Cell Sci* **110**:687-694, 1997
69. Laurence MB, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil tethering to and rolling on E-selectin are separable by requirement for L-selectin. *Immunity* **1**:137-145, 1994
70. Tacchini-Cottier F, Vesin C, Redar M, Buurman W, Piguet PF. Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J Immunol* **160**:6182-6186, 1998
71. Senaldi B, Piguet PF. Platelets play a role in the pathogenesis of the irritant reaction in mice. *J Invest Dermatol* **108**:248, 1997
72. Renard N, Nooijen PT, Schalkwijk L, DeWall RM, Eggermont AM, Lienard D, Kroon BB, Lejeune FJ, Ruiter DJ. VWF release and platelet aggregation in human melanoma after perfusion with TNF-alpha. *J Pathol* **176**:279, 1995
73. Piguet PF, Vesin C, Dontai Y, Tacchini-Cottier F, Belin D, Barazzoni C. Urokinase receptor (uPAR, CD87) is a platelet receptor important for kinetics

- and TNF-induced endothelial adhesion in mice. *Circulation* **99**:3315-3321, 1995
74. Yeo EL, Sheppard J-AK, Feuerstein IA. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherant activated platelet under shear condition. *Blood* **83**:2498, 1994
75. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni D, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependant CD11b/CD18 adhesion: Role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood* **93**(1):876-885, 1999
76. Lou J, Donati Y, Juillard P, Giroud C, Vesin C, Mili N, Grau GE. Platelets play an important role in TNF-induced microvascular endothelial cell pathology. *Am J Pathol* **151**:1397-1405, 1997
77. Bengtsson T, Fryden A, Zalavary S, Whiss PA, Orselius K, Grenegard M. Platelets enhance neutrophil locomotion: evidence for a role of P-selectin. *Scand J Clin Lab Invest* **59**:439-450, 1999
78. Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: small animal clinic, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec (1987-1988). *Can Vet J* **31**:830, 1990
79. Barker J. Adhesion molecules in cutaneous inflammation. Ciba foundation symposium **189**:91-106, 1995
80. DeVris JM, Langeveld-Wildschut EG, van Reijssen FC, Dubois GR, van den Hoek JA, Bihari IC, van Wichen D, de Weger RA, Knol EF, Thepen T, Bruijnzeel-Koomen C. Adhesion molecule expression on skin endothelia in atopic dermatitis: Effects of TNF- α and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* **102**:461-468, 1998
81. Zuberbier T, Schadendorf D, Haas N, Hartman K, Henz BM. Enhanced P-selectin expression in chronic and dermographic urticaria. *Int Arch Allergy Immunol* **114**:86-89, 1997
82. De Mora F, Williams CM, Frenette PS, Wagner DD, Hynes RO, Galli SJ. P- and E-selectins are required for the leukocyte recruitment, but not the tissue

- swelling, associated with IgE- and mast cell-dependant inflammation in mouse skin. *Lab Invest* **78**:497, 1998
83. Subramaniam M, Saffipour S, Watson SR, Mayadas TN, Hynes RO, Wagner DD. Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. *J Exp Med* **181**:2277-2282, 1995
84. Tipping PG, Huang XR, Berndt MC, Holdsworth SR. P-selectin directs T lymphocyte mediated injury in delayed-type hypersensitivity responses: Studies in glomerulonephritis and cutaneous delayed-type hypersensitivity. *Eur J Immunol* **26**:454-460, 1996
85. Norris P, Poston RN, Thomas S, Thornhill M, Hawk J, Haskard DO. The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: A comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **96**:763-770, 1991
86. Terajima S, Higaki M, Igarashi Y, Nogita T, Kawashima M. An important role of tumor necrosis factor- α in the induction of adhesion molecules in psoriasis. *Arch Dermatol Res* **290**:246-252, 1998
87. Petzelbauer P, Pober JS, Keh A, Braverman IM. Inducibility and expression of microvascular endothelial adhesion molecules in lesional, perilesional and uninvolved skin of psoriatic patients. *J Invest Dermatol* **103**:300-305, 1994
88. Veale D, Rogers S, Fitzgerald O. Immunolocalization of adhesion molecules in psoriatic arthritis, psoriatic and normal skin. *British J Dermatol* **132**:32-38, 1995
89. Chénier S, Doré M. P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. *Vet Pathol* **35**:85-93, 1998
90. Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Recruitment of neutrophils in the local endotoxin response: Association with *de novo* endothelial expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1. *Lab Invest* **64**:295-299, 1994

91. Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Tumor necrosis factor and interferon- γ induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol* **135**:121, 1989
92. Silber A, Newman W, Reimann KA, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ: Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. *Lab Invest* **70**:163-175, 1994
93. Hartwell DM, Mayadas TN, Berger G, Frenette PS, Rayvurn H, Hynes RO, Wagner DD. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J Cell Biol* **143**:1129-1141, 1998
94. Bischoff J, Brasel C. Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun* **210**:174-180, 1995
95. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* **80**:795-800, 1992
96. Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor- α . *J Biochem Chem* **267**:15176-15183, 1992
97. Yao L, Pan J, Stiadl H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* **184**:81-92, 1996
98. Pan J, McEver RP. Characterization of the promoter for the human P-selectin gene. *J Biol Chem* **268**:22600-22608, 1993
99. Pan J, Wia L, McEver RP. Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J Biol Chem* **273**:10058-10067, 1998
100. Longbiao Y, Stiadl H, Wia L, Ladzik Z, Taylor FB, McEver RP. Divergent inducible expression of P-selectin and E-selectin in mice and primates. *Blood* **94**:3820-3828, 1999

101. Bennion SD, Middleton MH, David-Bajar KM, Brice S, Norris DA. In three types of interface dermatitis, different patterns of expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) indicate different triggers of disease. *J Invest Derm* **105**: 71S-79S, 1995
102. Groves RW, Allen MH, Barker JNWN, Haskard DO, MacDonald DM. Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule-1 (ELAM-1) expression in cutaneous inflammation. *Br J Dermatol* **124**:117-123, 1991
103. Groves RW, Ross EL, Barker JNWN, MacDonald DM. Vascular Cell Adhesion Molecule-1: expression in normal and diseased skin and regulation in vivo by interferon gamma. *J Am Acad Dermatol* **29**:67-71, 1993
104. Jung K, Linse F, Heller R, Moths C, Goebel R, Neumann CH. Adhesion molecules in atopic dermatitis: VCAM-1 and ICAM-1 expression is increased in healthy-appearing skin. *Allergy* **51**:452-460, 1996
105. Wakita H, Sakamoto T, Tokura Y, Takigawa M. E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as critical adhesion molecules for infiltration of T-lymphocytes and eosinophils in atopic dermatitis. *J Cutan Pathol* **21**:33-39, 1994
106. Flint MS, Deartman RJ, Kimber I, Hotchkiss SA. Production and in situ localization of cutaneous tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) following skin sensitization. *Cytokine* **10**:213-219, 1998
107. Harari OA, McHale JF, Marshall D, Ahmed S, Brown D, Askenase PW, Haskard DO. Endothelial cell E- and P-selectin up-regulation in murine contact sensitivity is prolonged by distinct mechanisms occurring in sequence. *J Immunol* **163**:6860-6866, 1999
108. Doré M, Simon SI, Hughes BJ, Entman ML, Smith CW. P-selectin- and CD18-mediated neutrophil recruitment under conditions of shear stress. *Vet Pathol* **32**:258-268, 1995
109. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem* **259**:9799-9804, 1984

110. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valeri CR. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:11877-11882, 1999
111. Mizgerd JP, Bullard DC, Hicks MJ, Beaudet AL, Doerschuk CM. Chronic inflammatory disease alters adhesion molecule requirements for acute neutrophil emigration in mouse skin. *J Immunol* **162**:5444-5448, 1999
112. Walter UM, Issekutz AC. Role of E- and P-selectin in migration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes to cytokine and chemoattractant-induced cutaneous inflammation in the rat. *Immunol* **92**:290-299, 1997
113. Homeister JW, Zhang M, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, Lowe JB, Marks RM. Overlapping functions of E- and P-selectin in neutrophil recruitment during acute inflammation. *Blood* **92**:2345-2352, 1998
114. Fantone JC, Ward PA. Inflammation. In: Rubin E and Farber JL: *Pathology*. Philadelphia. Lippincott Company, 1988 pp.34-64
115. Cline DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91**(10):3527-3561, 1998
116. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Diseases of immunity. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic basis of disease*. Sixth Edition. Philadelphia. WB Saunders. 1999 pp.50-88
117. Murphy GF, Mihm MC. The skin. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic basis of disease*. Sixth Edition. Philadelphia. WB Saunders. 1999 pp.1170-1213