

2m11. 2749.11

Université de Montréal

Caractérisation du ligand pour la P-sélectine

sur les neutrophiles canins

Par

Hélène Brodeur

Département de pathologie et de 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

Mars, 1999

©Hélène Brodeur, 1999



11-11-11

SF
607
U54
1999
V.009

Université de Montréal

Faculté de médecine vétérinaire

Service de neurologie canine

Dr.

Étienne Briand

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information

Document communiqué en vertu de la Loi sur l'accès à l'information



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Caractérisation du ligand pour la P-sélectine
sur les neutrophiles canins**

Présenté par

Hélène Brodeur

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Michel Desnoyers	Président du jury
Dre Monique Doré	Directrice de recherche
Dr Jean Sirois	Codirecteur de recherche
Dr Marcelo Gottschalk	Membre du jury

Mémoire accepté le : 99-04-29

Sommaire

La P-sélectine est une molécule d'adhésion retrouvée dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules- α des plaquettes. Elle est exprimée à la surface de ces cellules suite à une stimulation par des médiateurs inflammatoires tels la thrombine et l'histamine. Lors de la réponse inflammatoire, elle joue un rôle de premier ordre dans l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire.

La P-sélectine est impliquée dans plusieurs pathologies chez l'humain, notamment les dommages liés à l'ischémie-reperfusion, les métastases de certains types de cancer et la maladie LADII («leukocyte adhesion deficiency type II»). Le ligand de la P-sélectine est le PSGL-1 («P-selectin glycoprotein ligand-1») qui est localisé à la surface des leucocytes. Cet homodimère glycoprotéique de 240 kDa a été démontré comme le ligand de haute affinité pour la P-sélectine. Cependant, très peu d'informations sont présentement connues sur cette molécule chez le chien.

Le but de cette étude était donc de caractériser le ligand pour la P-sélectine sur les neutrophiles canins afin d'en étudier éventuellement le rôle et l'implication lors de processus pathologiques.

La première stratégie a été de cribler deux bibliothèques d'expression canines, une provenant des cellules DH-82 et l'autre des cellules de rate, avec une sonde comprenant tout l'ADNc du gène PSGL-1 humain. Aucun clone n'a été obtenu lors de ces criblages.

Par la suite, une sonde canine a été générée par la technique de RT-PCR

(«reverse transcriptase polymerase chain reaction»). Un fragment de 870 paires de base (pb) a été obtenu et comprenait le domaine cytoplasmique et la région 3' non-traduite (3'UTR) du PSGL-1 canin. L'homologie, en acides aminés, de ce fragment avec le PSGL-1 humain et de souris était de 82,5% et 79,1%, respectivement. Les deux bibliothèques d'expression canines ont ensuite été recriblées avec la sonde canine générée par RT-PCR. De ce criblage, sept clones positifs ont été isolés de la bibliothèque des cellules DH-82 et un clone positif de la bibliothèque de rate. Ces clones ont été excisés du vecteur phagique UniZAP XR et certains ont été partiellement séquencés selon la technique de Sanger (1977). Tous les clones se sont révélés être de longueur moindre que la sonde canine générée par RT-PCR.

La technique de «5' rapid amplification of cDNA ends» (5'RACE) a par la suite été utilisée pour tenter d'obtenir l'extrémité 5' du gène mais sans résultat.

Finalement, une bibliothèque génomique de rate canine a été criblée avec les sondes PSGL-1 canin et humain. Dans le premier cas (sonde canine), aucun clone n'a été obtenu et dans le deuxième cas (sonde humaine), deux clones ont été isolés dont un a été sous-cloné et séquencé. Le séquençage a cependant révélé qu'il ne s'agissait pas du PSGL-1.

En conclusion, ce projet a permis d'isoler une portion du transcrite de PSGL-1 canin située en région 3'. Cette caractérisation partielle du PSGL-1 canin permettra d'éventuellement caractériser la molécule au complet et d'étudier son rôle lors du processus inflammatoire chez le chien.

Table des matières

	Pages
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE.....	xvii
REMERCIEMENTS.....	xviii
INTRODUCTION.....	1
1.1 L'inflammation.....	1
1.2 Les leucocytes.....	4
1.3 La famille des Immunoglobulines.....	7
1.4 La famille des Intégrines.....	9
1.5 La famille des Sélectines.....	11
1.5.1 La E-sélectine.....	15
1.5.2 La L-sélectine.....	16
1.5.3 La P-sélectine.....	18
1.5.3.1 La P-sélectine canine.....	21
1.5.4 Les ligands des sélectines.....	22
1.5.4.1 Le PSGL-1.....	27

1.5.4.1.1 Structure du gène.....	30
1.5.4.1.2 Structure de la protéine.....	30
1.5.4.1.3 Expression de PSGL-1.....	32
1.6 Rôle de la P-sélectine et du PSGL-1 dans les pathologies.....	33
1.7 Hypothèse.....	36
1.8 Objectif.....	36
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	37
2.1 Isolement et culture des cellules.....	37
2.1.1 Isolement de neutrophiles canins.....	37
2.1.2 Culture des cellules DH-82.....	37
2.2 Isolement de l'ARN.....	38
2.2.1 Isolement de l'ARN cytoplasmique.....	38
2.2.2 Isolement de l'ARN messager.....	38
2.3 Marquage aléatoire d'une sonde d'ADNc.....	38
2.3.1 Sondes.....	38
2.3.2 Marquage aléatoire et purification d'une sonde d'ADNc.....	39
2.4 Buvardage de type Northern.....	39
2.4.1 Échantillons d'ARN.....	39
2.4.2 Transfert de l'ARN sur une membrane de nylon.....	40
2.4.3 Hybridation.....	40
2.4.4 Lavages et autoradiographie.....	40
2.5 Production d'une librairie d'expression des cellules DH-82.....	41

2.5.1 Synthèse des premier et deuxième brins de l'ADNc.....	41
2.5.2 Empaquetage du vecteur.....	42
2.5.3 Titrage et amplification de la librairie.....	42
2.6 Criblage de librairies d'expression.....	43
2.6.1 Étalement des librairies.....	43
2.6.2 Transfert de l'ADN de phage sur une membrane de nylon....	44
2.6.3 Hybridation, lavages et autoradiographie.....	44
2.6.4 Isolement des clones positifs.....	44
2.6.5 Criblages secondaire, tertiaire et quaternaire.....	45
2.6.6 Excision <i>in vivo</i>	45
2.7 Criblage d'une librairie génomique.....	45
2.7.1 Préparation d'ADN de phage.....	46
2.7.2 Buvardage de type Southern.....	46
2.7.2.1 Échantillons d'ADN.....	47
2.7.2.2 Transfert de l'ADN sur une membrane de nylon.....	47
2.8 Séquençage.....	47
2.8.1 Échantillons.....	48
2.8.2 Électrophorèse.....	48
2.8.3 Autoradiographie.....	49
2.9 Génération d'une sonde PSGL-1 canin par RT-PCR emboîtée.....	49
2.9.1 Transcription inverse.....	50
2.9.2 Réaction de polymérase en chaîne.....	50

2.9.3 Isolement du produit de PCR.....	51
2.10 Amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ADNc (5'RACE).....	53
2.10.1 Synthèse des premier et deuxième brins de l'ADNc	53
2.10.2 Ligation des adaptateurs.....	54
2.10.3 Réaction de polymérase en chaîne.....	54
2.10.4 Isolement du produit de PCR.....	55
RÉSULTATS.....	57
3.1 Criblage de bibliothèques d'expression canines des cellules DH-82 et de rate.....	57
3.1.1 Reconnaissance de l'ARN messager canin par la sonde d'ADNc PSGL-1 humain.....	57
3.1.2 Production d'une bibliothèque d'expression canine des cellules DH-82.....	57
3.1.3 Criblage des bibliothèques d'expression des cellules DH-82 et de rate.....	57
3.2 Génération d'une sonde PSGL-1 canin par RT-PCR emboîtée et criblage des bibliothèques d'expression canines.....	60
3.2.1 Génération et caractérisation d'une sonde PSGL-1 canin.....	60
3.2.2 Criblage de deux bibliothèques d'expression canines avec la sonde PSGL-1 canin.....	65
3.3 5'RACE.....	69
3.4 Criblage de la bibliothèque génomique canine.....	69

3.4.1 Criblage avec la sonde PSGL-1 canin.....	70
3.4.2 Criblage avec la sonde PSGL-1 humain.....	70
DISCUSSION.....	78
CONCLUSION.....	83
BIBLIOGRAPHIE.....	84
ANNEXES.....	107

Liste des tableaux

	Pages
Tableau I: Liste des amorces utilisées pour le séquençage.....	49
Tableau II: Liste des amorces utilisées pour la RT-PCR emboîtée.....	52
Tableau III: Liste des amorces utilisées pour le 5'RACE.....	56

Liste des figures

	Pages
Figure 1: Différentes étapes de la réponse inflammatoire.....	5
Figure 2: La famille des Immunoglobulines.....	9
Figure 3: La famille des Intégrines.....	11
Figure 4: La famille des Sélectines.....	14
Figure 5: Interactions médiées par la P-sélectine.....	20
Figure 6: L'antigène sLewis ^x , ligand des sélectines.....	23
Figure 7: Interactions neutrophile-neutrophile médiées par la L-sélectine lors du «rolling» dans la réponse inflammatoire.....	27
Figure 8: La P-sélectine et le PSGL-1.....	29
Figure 9: Interactions médiées par le PSGL-1.....	29
Figure 10: Structure du glycan monosialylé trifucosylé avec le corps polylactosamine de PSGL-1.....	32
Figure 11: Stratégie de RT-PCR emboîtée utilisée pour générer une sonde PSGL-1 canin.....	50
Figure 12: Stratégie de 5'RACE utilisée pour générer la région 5' de PSGL-1 canin.....	55
Figure 13: Reconnaissance de l'ARN messager canin de PSGL-1 par l'ADNc de PSGL-1 humain.....	59
Figure 14: Génération de la région cytoplasmique du PSGL-1 canin par RT-PCR emboîtée.....	61

Figure 15: Séquence du fragment de 0,9 Kb de PSGL-1 canin obtenu par RT-PCR emboîtée.....	63
Figure 16: Comparaison de la séquence d'acides aminés de la région cytoplasmique du PSGL-1 de chien, de l'humain et de la souris.....	64
Figure 17: Analyse des clones isolés lors du criblage de la librairie d'expression des cellules DH-82 avec la sonde PSGL-1 canin générée par RT-PCR.....	68
Figure 18: Analyse des clones isolés lors du criblage de la librairie génomique canine avec l'ADNc de PSGL-1 humain.....	74
Figure 19 : Séquences partielles des clones 8.4 Xho et 8.4 Sac.....	77

Abréviations

A : adénosine

a.a. : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNase : ribonucléase

ARN_m : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BSA : «bovine serum albumin»

C : cytosine

CAM : «cellular adhesion molecule»

CD : «cluster of designation»

CHO : «chinese hamster ovary»

Ci : curie

coll. : collègues

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CPD : «citrate phosphate dextrose»

cpm : comptes par minute

dATP : désoxyadénosine triphosphate

dCTP : désoxycytosine triphosphate

DEPC-H₂O : eau traitée au diethyl pyrocarbonate

dGTP : désoxyguanosine triphosphate

DIF : «deionized formamide»

DMSO : diméthyl sulfoxide

dNTP : désoxynucléotide triphosphate

DO : densité optique

dTTP : désoxythymidine triphosphate

EDTA : ethylene diamine tetra acetate

EGF : «epidermal growth factor»

ELAM-1 : «endothelial leukocyte adhesion molecule-1»

ESL-1 : «E-selectin ligand-1»

EtOH : éthanol

FGF : «fibroblast growth factor»

G : guanine

Gly-CAM-1 : «glycosylated cellular adhesion molecule-1»

GMP-140 : «granule-membrane protein-140»

ICAM : «intercellular adhesion molecule»

IL-1 : interleukine-1

IPTG : isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

Kb : kilobase

kDa : kilodalton

LAD : «leukocyte adhesion deficiency»

LAM : «leukocyte adhesion molecule»

LB : Luria-Bertani

Leu-CAM : «leukocyte cellular adhesion molecule»

LHR : «lymphocyte homing receptor»

LPS : lipopolysaccharide

LRP : «leukocyte rich plasma»

MadCAM-1 : «mucosal addressin cellular adhesion molecule-1»

MHC : «major histocompatibility complex»

NaOAc : acétate de sodium

NP-40 : nonidet P-40

NZY : «NZ-amine/Yeast extract»

PADGEM : «platelet activation dependent granule external membrane»

PAF : «platelet activating factor»

pb : paire de base

PBS : «phosphate buffered saline»

PCR : «polymerase chain reaction»

PECAM-1 : «platelet endothelial cellular adhesion molecule-1»

PEG : polyethylene glycol

pfu : «plaque forming unit»

PMN : polymorphonucléaire

PSGL-1 : «P-selectin glycoprotein ligand-1»

RACE : «rapid amplification of cDNA ends»

Rnase : ribonucléase

RPM : rotations par minute

RT-PCR : «reverse transcriptase polymerase chain reaction»

SDS : «sodium dodecyl sulfate»

sLe^a : sialyl Lewis^a

sLe^X : sialyl Lewis^X

SM : «sodium chloride-magnesium sulfate»

SSC : tampon citrate de sodium

STE : tampon sodium-Tris-EDTA

TBE : tampon Tris-borate-EDTA

TE-H₂O : Tris-EDTA-H₂O

Temed : N N N', N'-tetramethylethylenediamine

TNF- α : «tumor necrosis factor- α »

U : unité

UTR : «untranslated region»

VCAM : «vascular cellular adhesion molecule»

VLA-4 : «very late antigen-4»

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactoside

À mes parents, **Colette et Jacques**

Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail mais tout spécialement :

Dre Monique Doré, ma directrice de recherche qui m'a permis de poursuivre mes études universitaires. Elle a su me donner des bases solides et me guider dans cet univers de la recherche. Merci pour ta confiance, ta disponibilité et tes conseils.

Dr Jean Sirois, mon codirecteur, pour sa disponibilité, ses conseils et ses connaissances.

Derek Boerboom et Jian Min Liu pour leur soutien technique et leur expérience.

Dre Claudine Tremblay pour son aide et sa compagnie dans le laboratoire.

Ma famille, mes amis Yannick et Sébastien, et mon amie Carol Lynn pour leurs encouragements, leur confiance et leur présence.

Finalement, mon amie la Dre Sylvette Laurent-Lewandowski pour ses conseils et son amitié.

Introduction

Les molécules d'adhésion sont des protéines, des glycoprotéines ou des glycolipides impliqués dans les interactions cellule-cellule. Elles sont donc présentes à la surface des cellules où elles interagissent sous forme ligand-récepteur. Les premières molécules d'adhésion à susciter de l'intérêt furent celles des superfamilles d'Immunoglobulines et d'Intégrines. Ces deux familles agissent en paire lors d'adhésion. Depuis quelques années une nouvelle famille s'est ajoutée au groupe des molécules d'adhésion, les Sélectines. Toutes ces molécules seront discutées dans l'optique de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire lors de l'inflammation.

1.1 L'inflammation.

L'inflammation est un phénomène important chez les animaux. La réponse inflammatoire à une blessure ou une infection est la première ligne de défense de l'organisme (Cotran et coll. 1999). Les caractéristiques macroscopiques de l'inflammation sont la chaleur, la rougeur, la douleur, la tuméfaction et, en certains cas, la perte de fonction (Jones et coll., 1997). Le phénomène microscopique est dynamique et nécessite la participation des molécules d'adhésion. Le processus inflammatoire débute d'abord par des changements observés dans la microcirculation (Cotran et coll., 1999). Ces changements incluent la vasodilatation et l'accroissement de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ce premier changement permet un plus grand volume de sang dans la région affectée et ce, par une augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins.

Cet apport accru de sang initiera les caractéristiques macroscopiques de l'inflammation telles la chaleur, la rougeur ainsi que la tuméfaction. Cela apportera localement aussi une plus grande quantité de cellules, en particulier les globules blancs qui sont directement impliqués dans la défense de l'organisme. Le second changement de la microcirculation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, permet à certains composants du plasma habituellement retenus par le vaisseau de traverser la paroi pour rejoindre le tissu extracellulaire. Cette augmentation de la perméabilité permet aussi aux cellules phagocytaires de rejoindre le tissu pour effectuer leur travail. On note également une augmentation du débit sanguin permettant l'évacuation des débris, cellules mortes et produits toxiques (Tortora et Anagnostakos, 1988). Tous ces changements sont induits par le relâchement de nombreux médiateurs tels l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, certaines prostaglandines et autres (Cotran et coll., 1999). Ces substances sont sécrétées par les cellules victimes de l'agression ou par des cellules activées par ces mêmes substances ou d'autres (Tortora et Anagnostakos, 1988). Certains des médiateurs mentionnés, dont la bradykinine, ont pour effet d'induire la douleur (Cotran et coll., 1999).

Suite aux changements dans la microcirculation, les vaisseaux sanguins ont une abondance de sang avec des cellules prêtes à émigrer vers le tissu inflammé. L'émigration des leucocytes de la microcirculation et leur arrivée dans le tissu comportent plusieurs étapes impliquant une grande participation des molécules d'adhésion (Figure 1). Tout d'abord, il y a la margination. C'est ainsi que l'on nomme le processus par lequel les cellules du sang étant au centre du vaisseau s'y

retrouvent maintenant en périphérie (Jones et coll., 1997). La margination est importante car elle permet aux leucocytes de se rapprocher de la paroi pour éventuellement la traverser. Lorsque les cellules se retrouvent en périphérie du vaisseau, il y a alors le roulement des leucocytes (Addison, 1843; Wagner, 1839). Ce phénomène a pour but de ralentir leur vitesse pour une prochaine adhésion plus ferme avec la paroi et est connu physiologiquement depuis plus de 100 ans (Addison, 1843; Wagner, 1839). Le roulement, terme connu aussi sous l'anglicisme «rolling», requiert la participation des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules, généralement après activation (Abbassi et coll., 1993A; Lawrence et Springer, 1991; Mayrovitz et coll., 1977; Smith et coll., 1991; von Adrian et coll., 1991). L'activation est habituellement générée par des médiateurs inflammatoires comme l'interleukine-1 (IL-1), le «tumor necrosis factor- α » (TNF- α), l'histamine, la thrombine et autres cytokines (Dixit et coll., 1990; Pober et Cotran, 1990). Certaines molécules d'adhésion sont exprimées de façon constitutives tandis que d'autres sont induites suite à la stimulation par divers médiateurs de l'inflammation (Jones et coll., 1997). Ces molécules sont présentes sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales. La famille des Sélectines joue un rôle important dans le phénomène de «rolling» (Doré et coll., 1993B; Lawrence et Springer, 1991; Mayadas et coll., 1993; Mayrovitz et coll., 1977). En formant un complexe ligand-récepteur, les molécules permettent une adhésion temporaire du leucocyte à la cellule endothéliale (Cotran et coll., 1999). L'adhésion dans le «rolling» étant réversible, le leucocyte s'attache et se détache de l'endothélium et roule ainsi sur la paroi vasculaire jusqu'à l'adhésion ferme (Etzioni et coll., 1995).

Cette adhésion ferme se fait par l'intermédiaire des familles d'Immunoglobulines et d'Intégrines (Jutila et coll., 1989; Kavanaugh et coll., 1991; Oppenheimer-Marks et coll., 1991). La présence de ces molécules à la surface cellulaire est de même nature que pour les Sélectines, soit qu'il y a eu activation de la cellule ou que la protéine est exprimée constitutivement (Bevilacqua et coll., 1987; Hattori et coll., 1989; McEver et coll., 1989; Tedder et coll., 1990). La cellule est maintenant prête pour la diapédèse, c'est-à-dire la migration à travers l'endothélium pour se rendre à l'endroit désiré (Harlan et Liu, 1992). La diapédèse nécessite aussi les molécules d'adhésion des familles d'Immunoglobulines et d'Intégrines (Arfors et coll., 1987). Les cellules sont par la suite guidées au site d'infection par chimiotactisme (Roitt et coll., 1996). Sur les lieux, les cellules peuvent commencer l'extermination de l'intrus. La réponse inflammatoire aigue se termine idéalement avec la complète disparition de l'intrus. Une persistance tend vers l'inflammation chronique (Cotran et coll., 1999).

1.2 Les leucocytes.

Le sang possède plusieurs constituants dont les globules rouges ou érythrocytes, les globules blancs ou leucocytes, les plaquettes ou thrombocytes et le plasma (Tortora et Anagnostakos, 1988). Les leucocytes regroupent les lymphocytes, cellules essentielles au système immunitaire, et les cellules provenant de source myéloïde (Roitt et coll., 1996). Dans cette dernière catégorie se retrouvent les monocytes et les cellules granulocytaires comme les neutrophiles, les

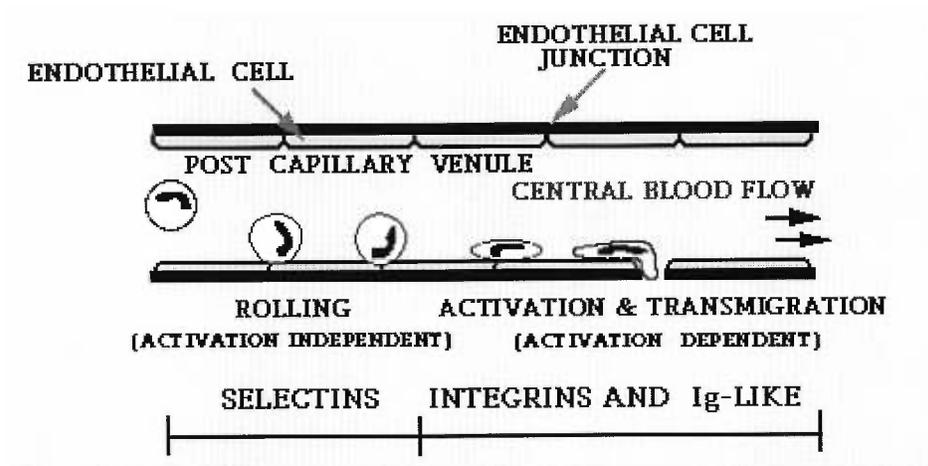


Figure 1. Différentes étapes de la réponse inflammatoire. Le «**rolling**», l'**adhésion ferme** et la **transmigration**. Tiré de <http://lewis.sfsu.edu/glyco/leuk.rol.gif>

basophiles et les éosinophiles (Roitt et coll., 1996). Les molécules d'adhésion sont présentes sur ces cellules, sur les plaquettes et sur les cellules de l'endothélium vasculaire (Harlan et Liu, 1992).

Les neutrophiles sont les premiers à intervenir lors d'une réponse inflammatoire aiguë (Cotran et coll., 1999). Ce sont des cellules phagocytaires possédant des granules cytoplasmiques et un noyau multilobé (Roitt et coll., 1996). La forme du noyau leur procure un autre nom, celui de cellule polymorphonucléaire (PMN) (Janeway et Travers, 1997). Il existe trois catégories de granules chez les neutrophiles que l'on nomme granules primaires ou azurophiles, granules secondaires ou spécifiques et granules tertiaires. Ces granules sont en partie composés d'enzymes lytiques afin de détruire les agents

infectieux lors de la phagocytose (Janeway et Travers, 1997). Les neutrophiles ont une courte vie, un ou deux jours dans les tissus.

Les monocytes sont aussi des cellules phagocytaires (Roitt et coll., 1996). Ils vont répondre après les neutrophiles lors de l'inflammation. Ils sont aussi majoritaires lors d'inflammation chronique et sont les précurseurs des macrophages tissulaires (Jones et coll., 1997). Ils sont d'excellentes cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pour les lymphocytes T et peuvent également sécréter des cytokines (Janeway et Travers, 1997). Leur vie ne se termine pas avec la phagocytose, contrairement aux neutrophiles.

Les éosinophiles ressemblent morphologiquement aux neutrophiles. Comme ces derniers, ils sont phagocytaires et ont un noyau multilobé ainsi que des granules. Ils sont surtout impliqués lors d'infections parasitaires et de certains types d'hypersensibilité. On les retrouve souvent en association avec des mastocytes (Janeway et Travers, 1997).

Les basophiles possèdent aussi un noyau multilobé et des granules mais ils ne sont pas phagocytaires. Ils peuvent sécréter certains médiateurs inflammatoires (Roitt et coll., 1996). Ce sont des cellules auxiliaires.

Les lymphocytes sont les cellules du système immunitaire. Ils sont de souche lymphoïde et peuvent se différencier en lymphocyte T ou lymphocyte B (Roitt et coll., 1996). La différenciation ne s'effectue pas au même endroit pour ces deux types de lymphocytes. Le thymus produit les lymphocytes T tandis que les lymphocytes B proviennent de la moëlle osseuse ou de la bourse de Fabricius chez les oiseaux (Roitt et coll., 1996). Ils arrivent après les neutrophiles et les

macrophages lors d'une infection. Leur durée de vie est variable car certaines cellules deviendront cellules-mémoires et auront une longue durée de vie tandis que d'autres seront de la bataille et auront une plus courte durée de vie (Roitt et coll., 1996). Les lymphocytes B produisent les anticorps et les lymphocytes T sécrètent des cytokines (Roitt et coll., 1996). Certaines de ces cytokines, dont l'IL-1, ont des effets sur l'adhésion des cellules (Pober et Cotran, 1990).

1.3 La famille des Immunoglobulines

La racine de leur appellation, immunoglobuline, provient du fait que ces protéines sont impliquées dans le système immunitaire et que leur structure protéique est globulaire (Roitt et coll., 1996). Cette famille comprend plusieurs membres avec des fonctions très diversifiées. On y retrouve les anticorps, certains récepteurs dont le récepteur Fc, CD2, CD4, CD8, MHC et des molécules d'adhésion (Janeway et Travers, 1997). Il est possible de les regrouper en famille, malgré leurs différents rôles, par la ressemblance de leur structure. Les immunoglobulines possèdent une région cytoplasmique, une région transmembranaire et une région extracellulaire variable en longueur (Hunkapillar et Hood, 1989; Williams et Barclay, 1988) (Figure 2). Les deux premières régions citées sont généralement bien conservées dans la famille (Hunkapillar et Hood, 1989; Williams et Barclay, 1988). La région extracellulaire, à l'extrémité N-terminale, se caractérise par la présence de régions homologues immunoglobulines appelées domaines (Williams et Barclay, 1988). Ces domaines consistent en des boucles liées par un pont disulfure. Il existe trois domaines possibles, C1, C2 et V

(Hunkapillar et Hood, 1989). Chaque type possède une longueur et une séquence d'acides aminés propres où les cystéines forment le lien disulfure afin de créer la boucle (Hunkapillar et Hood, 1989). La molécule ICAM-1 a été clonée chez plusieurs espèces dont l'humain et le chien et démontre un haut niveau de conservation. Il y a 61% d'identité entre la protéine humaine et celle de chien, le domaine cytoplasmique et le site de liaison au ligand étant très bien conservés (Manning et coll., 1995).

Cette famille comprend des molécules d'adhésion, les CAMs, dont ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 («intercellular adhesion molecule»), PECAM-1 («platelet endothelial cell adhesion molecule-1») (CD31), VCAM-1 («vascular cellular adhesion molecule») et MadCAM-1 («mucosal addressin cellular adhesion molecule-1») (Janeway et Travers, 1997). Ces molécules sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et sont impliquées dans l'adhésion ferme des leucocytes à la paroi vasculaire (Rothlein et coll., 1986). ICAM-1 possède cinq domaines extracellulaires (Simmons et coll., 1988; Staunton et coll., 1988), ICAM-2 en possède deux (Staunton et coll., 1989) et VCAM-1 a six domaines (Oikawa et coll., 1987). Les deux domaines en N-terminal de ICAM-1 et de ICAM-2 sont homologues (Staunton et coll., 1989). L'expression de ces protéines est soit constitutive, comme pour ICAM-2 (Staunton et coll., 1989), ou inducible par certains stimulateurs de cellules endothéliales (Larson et Springer, 1990). Cette induction a lieu lors de réponse inflammatoire ou immunitaire comme pour ICAM-1 et VCAM-1 (Tortora et Anagnostakos, 1988; Cybulsky et Gimbrone, 1991). Cette différence dans l'expression des ICAM-1 et ICAM-2 suggère un rôle pathophysiologique différent (Harlan et Liu, 1992). ICAM-2 est présente

majoritairement sur les cellules endothéliales non-activées (Staunton et coll., 1989). Ceci lui confère une importance dans la recirculation normale des lymphocytes T et le recrutement des cellules T_{mémoires} (de Fougérolles et coll., 1991). ICAM-3 est exprimée sur la majorité des cellules de souche hématopoïétique et serait impliquée dans les interactions lymphocyte-CPA (Hauss, et coll., 1995; Hernandez-Caselles et coll., 1993). Les ligands de ces récepteurs permettent de mieux définir le rôle de ces molécules. Les ligands, généralement des membres de la famille des Intégrines, se retrouvent sur des cellules circulantes comparativement aux CAMs qui se retrouvent sur l'endothélium.

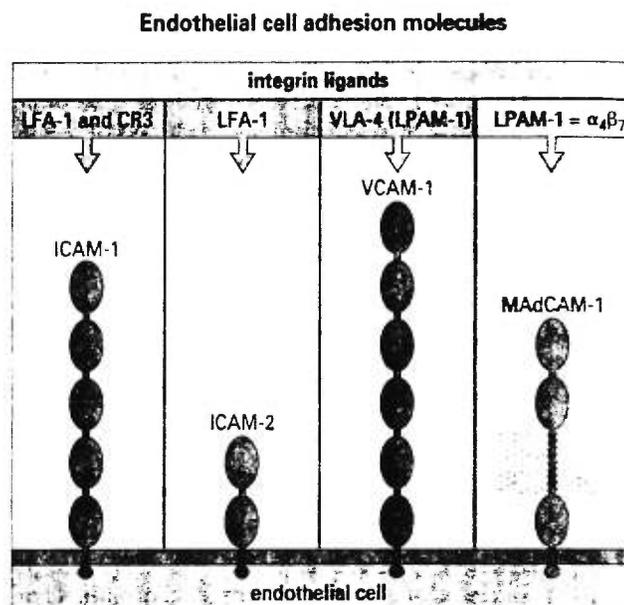


Figure 2. La famille des Immunoglobulines. ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 et MadCAM-1 (Roitt et coll., 1996).

1.4 La famille des Intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhésion présentes sur plusieurs types de cellules incluant les leucocytes (Dunon et coll., 1993). Il existe plusieurs intégrines

exprimées de façon variable sur les cellules. Les intégrines sont des hétérodimères formés d'une chaîne α et d'une chaîne β liées de manière non-covalente (Sanchez-Madrid et coll., 1983) (Figure 3). Il existe plusieurs sortes de sous-unités α et β offrant plusieurs possibilités de combinaisons (Dunon et coll., 1993). La sous-unité α possède un grand domaine extracellulaire (Pytela, 1988). Ce domaine est composé de trois à quatre sites de liaison cation-bivalent (Smith et Cheresch, 1991). La protéine possède un seul domaine transmembranaire et une petite région cytoplasmique (Pytela, 1988). Certaines sous-unités α possèdent un domaine I similaire à un domaine présent dans les protéines de liaison au collagène (Pytela, 1988). D'autres formeront une chaîne lourde et une chaîne légère liées par un pont disulfure (Dunon et coll., 1993). La sous-unité β a également un large domaine extracellulaire comprenant entre 48 et 56 résidus cystéines (Hogervost et coll., 1990). Ces cystéines sont généralement incluses dans quatre motifs répétitifs (Suzuki et Naitoh, 1990). La région cytoplasmique est aussi petite. Chaque sous-unité des intégrines est glycosylée. Cette glycosylation est variable selon le type cellulaire dans lequel la protéine est exprimée (Sonnenberg et coll., 1990).

Les complexes formés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β sont divisés en sous-familles. On les regroupe en tenant compte de leur sous-unité β . Il y a les protéines VLA («very late antigen»), les Leu-CAMs («leucocyte cellular adhesion molecules») et les cytoadhésines pour les chaînes $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ respectivement (Lipsky et coll., 1993). La sous-famille impliquée dans l'inflammation est surtout celle des leu-CAMs ou $\beta 2$ -intégrines (Lipsky et coll., 1993). Un autre nom utilisé pour identifier les

$\beta 2$ -intégrines est CD11/CD18 où CD11 représente la chaîne α et CD18 la chaîne $\beta 2$ (Lipsky et coll., 1993). Il existe trois Leu-CAMs donnant les intégrines CD11a/CD18, CD11b/CD18 et CD11c/CD18 pour, dans l'ordre, les chaînes α_L , α_M et α_X (Harlan et Liu, 1992). Une autre appellation est utilisée pour l'intégrine $\alpha_L\beta 2$ soit LFA-1 pour «lymphocyte function-associated antigen-1» ainsi que pour $\alpha_M\beta 2$ soit Mac-1 pour macrophage-1 (Harlan et Liu, 1992). Comme leur nom l'indique, Leu-CAM, ce sont des molécules exprimées par les leucocytes (Dunon et coll., 1993). Ces intégrines sont impliquées dans le phénomène de l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium vasculaire et dans la diapédèse des cellules inflammatoires lors de la réponse inflammatoire (Arnaout, 1990).

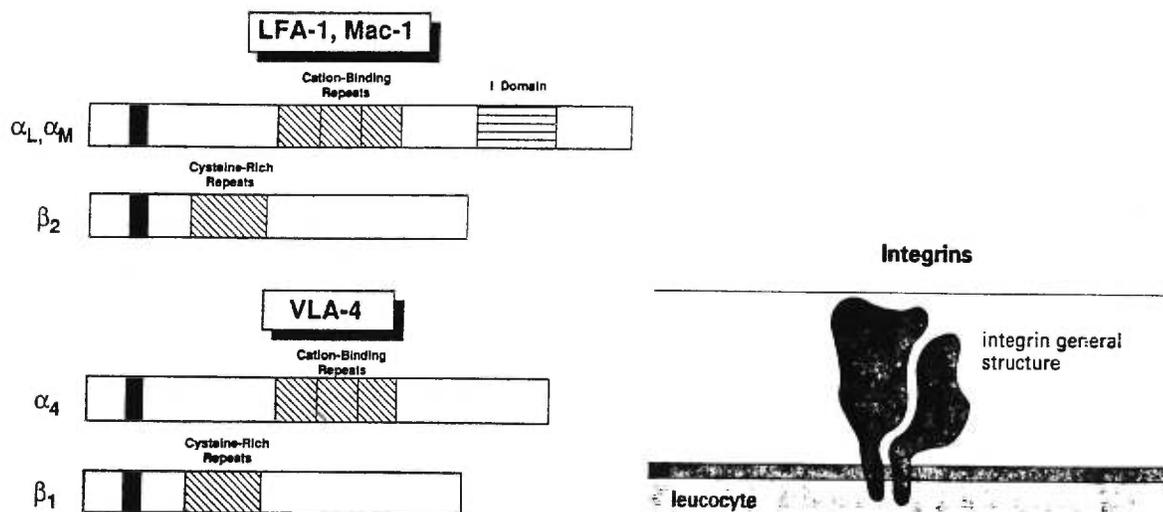


Figure 3. La famille des Intégrines. LFA-1, Mac-1 et VLA-4 (Harlan et Liu, 1992; Roitt et coll., 1996).

1.5 La famille des Sélectines

La famille des Sélectines est la plus jeune des familles de molécules

d'adhésion. Les sélectines sont impliquées principalement dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et aux plaquettes (Tedder et coll., 1995). La liaison ligand-récepteur des sélectines s'effectue par interactions glucide-protéine contrairement aux autres familles agissant par interactions protéine-protéine (McEver et coll., 1995). Le terme sélectine est la combinaison des mots sélective et lectine (Bevilacqua et coll., 1991). Effectivement, les membres de cette famille permettent des interactions sélectives entre les leucocytes et l'endothélium ou les plaquettes par l'intermédiaire de leur domaine lectine (Lipsky et coll., 1993).

La famille comprend trois membres, E-sélectine, L-sélectine et P-sélectine pour respectivement, endothélium-sélectine, leucocyte-sélectine et plaquette-sélectine, rappelant le premier type cellulaire duquel ces molécules d'adhésion furent isolées (Bevilacqua et coll., 1991). Ses membres possèdent différentes appellations: ELAM-1 («endothelial leucocyte adhesion molecule-1») et CD62E pour la E-sélectine (Bevilacqua et coll., 1987; Janeway et Travers, 1997); GMP-140 («granule-membrane-protein-140kD»), PADGEM («platelet activation dependent granule external membrane») et CD62P pour la P-sélectine (Hsu-Lin et coll., 1984; Janeway et Travers, 1997; McEver et Martin, 1984); et LAM-1 («leucocyte adhesion molecule-1»), Mel-14 (antigène de l'anticorps monoclonal Mel-14), LHR («lymphocyte homing receptor») et CD62L pour la L-sélectine (Gallatin et coll., 1983; Janeway et Travers, 1997; Tedder et coll., 1990). Ces molécules d'adhésion possèdent une structure protéique semblable comprenant un domaine lectine, un domaine ressemblant à l'EGF

(«epidermal growth factor»), des répétitions de séquences consensus, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique (Lipsky et coll., 1993) (Figure 4). Il s'agit du seul exemple où ces trois domaines extracellulaires sont juxtaposés suggérant que cette disposition spatiale est importante dans le rôle du récepteur (Tedder et coll., 1995). Ce sont des protéines rigides, asymétriques (Moore et coll., 1994) et très glycosylées (Bevilacqua et coll., 1987; Johnston et coll., 1989B; Siegelman et coll., 1986). Les gènes humains de ces protéines se retrouvent tous sur le chromosome 1 aux bandes q21 à q24 dans un intervalle de 300 kilobases (Watson et coll., 1990A). De plus, ils possèdent tous une structure génomique semblable possédant plusieurs liens introns-exons similaires. Presque tous les exons encodent des domaines distincts laissant place à l'épissage et à la production de diverses formes de sélectines, membranaires et solubles (Patthy, 1987). D'après cette organisation génomique, les sélectines résulteraient fort probablement de duplication et de réarrangement d'exons (Collins et coll., 1991; Johnston et coll., 1990; Ord et coll., 1990).

Le domaine lectine est situé à l'extrémité N-terminale de la protéine et comporte une séquence d'environ 120 acides aminés (Bevilacqua et coll., 1989; Johnston et coll., 1989A; Lasky et coll., 1989). Comme la plupart des lectines animales, le domaine est calcium-dépendant et permet les liaisons à des glycoprotéines par l'intermédiaire de leur glucides (Drickamer, 1988). Ce domaine conserve une homologie de plus de 60% entre les divers membres de la famille (Bevilacqua et coll., 1989; Johnston et coll., 1989A; Lasky et coll., 1989). C'est le site d'attachement du récepteur. Le domaine ressemblant à l'EGF contient environ

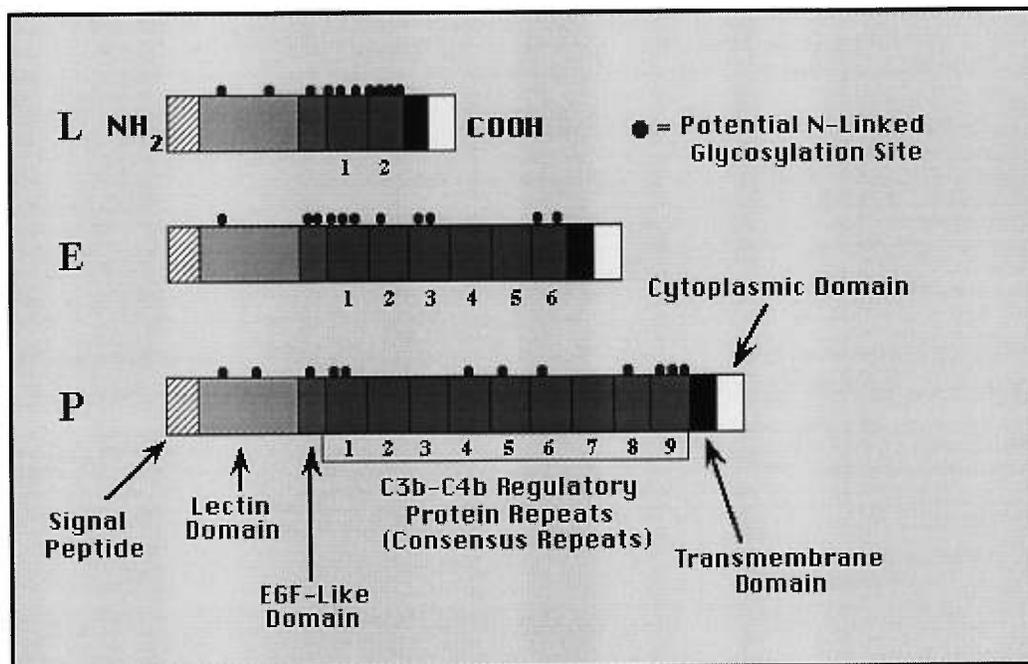


Figure 4. La famille des Sélectines. L-sélectine, E-sélectine et P-sélectine. Tiré de: <http://lewis.sfsu.edu/glyco/Lsell.gif>.

30 acides aminés (Bevilacqua et coll., 1987; Johnston et coll., 1989B; Siegelman et coll., 1986). Il semblerait impliqué dans la spécificité de la liaison (Kansas et coll., 1994). Cette spécificité envers le ligand ne serait pas due à une interaction directe entre le ligand et le domaine EGF mais plutôt à un changement dans la conformation du domaine lectine (McEver et coll., 1995).

Les séquences consensus de près de 60 acides aminés ressemblent aux protéines liant les protéines C3b et C4b que l'on retrouve dans la voie du complément (Ahearn et Fearon, 1989; Hourcade et coll., 1989). On retrouve dans ces séquences six résidus cystéines capables de former des ponts disulfures comparativement à quatre cystéines pour les protéines de la voie du complément

(Hourcade et coll., 1989; Siegelman et Weissman, 1989). L'homologie de ces séquences entre les diverses sélectines est d'environ 40% et la quantité de répétitions varie entre les sélectines (Lipsky et coll., 1993). Cette variation du nombre de répétitions est également fonction de l'espèce (Dunon et coll., 1993). On en retrouve deux chez L-sélectine (Siegelman et Weissman, 1989), six chez E-sélectine (Bevilacqua et coll., 1989) et la P-sélectine en possède neuf (Johnston et coll., 1989A) chez l'humain. Leur masse relative dépend en partie du nombre de répétitions. On retrouve alors des masses relatives de 37 000, 90 000 et 140 000 daltons pour, respectivement, L-sélectine (Siegelman et Weissman, 1989), E-sélectine (Bevilacqua et coll., 1989) et P-sélectine (Johnston et coll., 1989A). Ce domaine est probablement aussi impliqué dans la sélectivité de liaison au ligand par un mécanisme encore inconnu (Tedder et coll., 1995). Les sélectines possèdent plusieurs différences entre elles mais toutes les trois sont impliquées dans les interactions entre les leucocytes, les cellules endothéliales et les plaquettes, plus précisément dans le roulement des leucocytes sur la paroi vasculaire des veinules (Abbassi et coll., 1993B; Arbones et coll., 1994; Doré et coll., 1993B; Ley et coll., 1995; Mayadas et coll., 1993).

1.5.1 La E-sélectine.

La E-sélectine est exprimée de manière inductive à la surface des cellules endothéliales vasculaires et permet l'adhésion des leucocytes (Bevilacqua et coll., 1989; Hession et coll., 1990). Son expression est induite par des cytokines en particulier par l'IL-1 et le TNF- α , et par les endotoxines (lipopolysaccharides

[LPS]) (Bevilacqua et coll., 1987). Elle nécessite la synthèse d'ARN_m et de protéines (Bevilacqua et coll., 1987). Son expression atteint un pic quatre à six heures après la stimulation de la cellule endothéliale (Bevilacqua et coll., 1987). Il y a retour au niveau basal 24 à 48 heures suivant la stimulation (Bevilacqua et coll., 1987). Ce niveau basal est retrouvé car la E-sélectine est rapidement internalisée et digérée dans les lysosomes (Kuijpers et coll., 1994). Le niveau d'E-sélectine à la surface membranaire est en partie régulé par le taux de synthèse, d'internalisation et de dégradation (McEver et coll., 1995). Cette sélectine est principalement retrouvée à proximité des sites inflammatoires aigus mais également dans les joints arthritiques, dans certaines allogreffes du coeur et des reins sujettes au rejet, dans certaines dermatites de contact et chez les réactions d'hypersensibilité type IV (Tedder et coll., 1995). Une forme soluble d'E-sélectine est quelque fois présente et est anormalement élevée dans le sérum de patients atteints de divers syndromes inflammatoires (Gearing et Newman, 1994). La E-sélectine est impliquée dans le «rolling» des leucocytes sur l'endothélium lors de la réponse inflammatoire (Abbassi et coll., 1993B). De plus, étant exprimée tardivement, elle intervient aussi dans l'arrêt du «rolling» et l'adhésion ferme des leucocytes à la paroi vasculaire.

1.5.2 La L-sélectine

On retrouve la L-sélectine à la surface des leucocytes autant lymphoïdes que myéloïdes (Gallatin et coll., 1983; Tedder et coll., 1990). Elle est exprimée de façon constitutive à la surface des globules blancs non-activés (Gallatin et coll.,

1983; Tedder et coll., 1990). Suite à une activation par des facteurs relâchés par les cellules endothéliales activées ou provenant du site d'inflammation comme le «platelet activating factor» (PAF) et le TNF (Smith et coll., 1991), il y a changement de conformation de la L-sélectine. Ce changement permet un clivage endoprotéolytique résultant en la perte de la L-sélectine à la surface membranaire et en la formation d'une forme soluble en circulation (Chen et coll., 1995). Juste avant la perte du récepteur, une augmentation de son affinité envers le ligand est observée (Spertini et coll., 1991). Cette augmentation est associée au changement conformationnel (Lipsky et coll., 1993). La forme soluble de L-sélectine préviendrait le «rolling» aux sites d'inflammation (Tedder et coll., 1995). La L-sélectine possède une expression constitutive rapidement régulée lors d'activation et une expression qui est également cellule-spécifique régie par les modifications post-traductionnelles de la structure protéique de base. La L-sélectine fut d'abord étudiée comme «lymphocyte homing receptor», c'est-à-dire le récepteur responsable de la migration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes (Springer, 1990). La L-sélectine permet également la capture des neutrophiles par les cellules endothéliales activées pour ensuite leur permettre de rouler le long de la paroi vasculaire (Arbones et coll., 1994). Les cellules endothéliales activées sécrètent des agents chimiques qui, à leur tour, activent les neutrophiles (Harlan et Liu, 1992). Ces derniers perdent alors leur L-sélectine et se retrouvent à l'étape suivante, l'adhésion ferme. Il a été démontré que la disparition de la L-sélectine concorde avec l'apparition à la surface membranaire des leucocytes d'intégrines nécessaires pour l'adhésion ferme et la diapédèse (Harlan et Liu, 1992).

1.5.3 La P-sélectine

La P-sélectine fut d'abord isolée comme marqueur des plaquettes activées (Hsu-Lin et coll., 1984; McEver et Martin, 1984). Par la suite, on découvrit sa présence sur les cellules endothéliales vasculaires activées tout comme la E-sélectine (McEver et coll., 1989). La P-sélectine est emmagasinée dans des granules cellulaires, soit les granules- α des plaquettes et les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales, mais elle est induite à la surface membranaire (Hsu-Lin et coll., 1984; McEver et Martin, 1984; McEver et coll., 1989). Ce style d'expression permet une réponse cellulaire rapide (Berman et coll., 1986; Hattori et coll., 1989; Stenberg et coll., 1985). L'emmagasinage de la P-sélectine dans les granules est dû à une séquence signal présente en C-terminal du domaine cytoplasmique (Disdier et coll., 1992; Koedam et coll., 1992). L'histamine et la thrombine sont d'excellents médiateurs pour mobiliser la P-sélectine à la surface cellulaire et ce, en très peu de temps (Hattori et coll., 1989). La présence de la P-sélectine à la surface membranaire n'est cependant qu'éphémère (Berman et coll., 1986; Stenberg et coll., 1985) et il y a ensuite recyclage du récepteur dans de nouveaux granules (Subramaniam et coll., 1993). Une synthèse *de novo* de P-sélectine peut être induite par des cytokines telles l'IL-1, le TNF et par les LPS pour un effet à plus long terme comme pour la E-sélectine (Doré et Sirois, 1996). Une forme soluble de P-sélectine existe également mais en moins grande quantité que celle de la L-sélectine (Gearing et Newman, 1994). Contrairement à la forme soluble de la L-sélectine, celle de la P-sélectine provient d'un ARN_m dont il manque la séquence du domaine transmembranaire (Johnston et coll., 1989A, 1990). La P-sélectine soluble est

le résultat d'un épissage de l'ARN_m de base (Johnston et coll., 1990). Il a été proposé que cette forme pourrait prévenir l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium et inhiber leur activation (Gamble et coll., 1990).

La P-sélectine initie la capture et le «rolling» des leucocytes (Doré et coll., 1993B; Mayadas et coll., 1993). Suite à l'activation des cellules endothéliales par des facteurs comme la thrombine, les granules de Weibel-Palade fusionnent rapidement avec la membrane cytoplasmique et expriment en surface la P-sélectine. La P-sélectine peut alors capturer les leucocytes et les faire rouler à la surface de la paroi vasculaire tout comme le fait la L-sélectine (Doré et coll., 1993B). Cette interaction est de courte durée et le processus de «rolling» est continué avec la participation d'E-sélectine (Ley et Tedder, 1995). Un processus similaire a lieu avec les plaquettes (Frenette et coll., 1995) conduisant à un deuxième type d'interaction impliquant la P-sélectine. En effet, il a été démontré que des plaquettes au repos (non activées) sont capables de rouler sur la paroi vasculaire en utilisant la P-sélectine exprimée par l'endothélium (Frenette et coll., 1995). Ce roulement permet aux plaquettes d'adhérer à la surface endothéliale et d'interagir avec les leucocytes. De plus, les plaquettes activées adhérentes à une surface expriment la P-sélectine et par le fait même, peuvent contribuer à recruter localement des leucocytes (Doré et coll., 1995) (Figure 5).

La récente technologie des déficiences de gènes, connue aussi sous l'anglicisme de «knock-out gene», a également contribué à l'étude de la P-sélectine. Le modèle de souris déficientes en P-sélectine a démontré le rôle de cette molécule d'adhésion dans

le «rolling» des leucocytes (Mayadas et coll., 1993). Ce modèle a aussi démontré que la P-sélectine n'est pas indispensable dans le développement embryonnaire et qu'elle n'affecte pas l'expression de la E- et de la L-sélectine malgré la proximité de leur gènes (Wagner, 1995). Un problème dans l'hémostase a aussi été observé en l'absence de P-sélectine (Subramaniam et coll., 1996). Ce modèle murin est utilisé pour étudier l'effet de l'absence de la P-sélectine dans certaines maladies où l'on note un recrutement excessif de neutrophiles (Wagner, 1995).

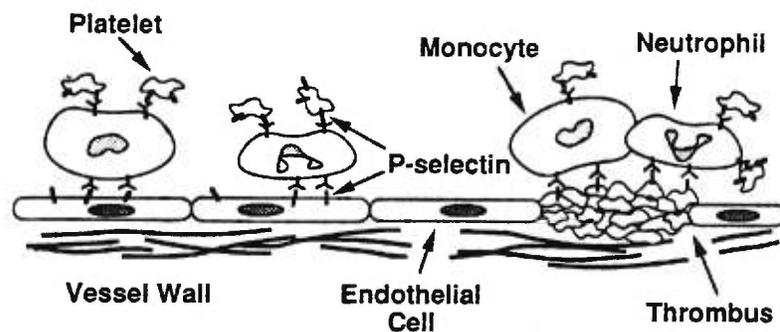


Figure 5. Interactions médiées par la P-sélectine. Interaction **neutrophile-endothélium**, interaction **neutrophile-plaquette** et interaction **plaquette-endothélium** (Lipsky et coll., 1993).

1.5.3.1 La P-sélectine canine

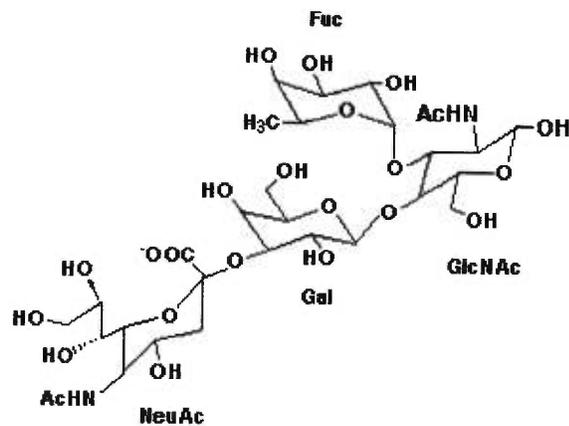
Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier le rôle de la P-sélectine. Parmi ceux-ci, le chien représente un modèle animal important, spécialement pour l'étude de la pathogénie des lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde. La P-sélectine canine diffère de celle humaine car elle n'a que huit répétitions de séquences consensus au lieu de neuf (Manning et coll., 1992). La distribution tissulaire de la P-sélectine canine est semblable à celle de l'humain (Doré et coll., 1993A). On la retrouve principalement dans les cellules endothéliales des veines et des veinules de la majorité des tissus (Doré et coll., 1993A). En moindre quantité, elle est présente au niveau des capillaires et quelques fois chez les artères et les artérioles (Doré et coll., 1993A). Elle est aussi présente sur les plaquettes activées (Doré et coll., 1993A). C'est par microscopie intravitale des veinules du mésentère de chien que l'implication *in vivo* de la P-sélectine dans le «rolling» des leucocytes sur la paroi vasculaire fut premièrement démontrée (Doré et coll., 1993B). Le chien a également servi à démontrer l'effet de médiateurs inflammatoires tels le TNF- α et les LPS, sur la synthèse *de novo* de la P-sélectine vasculaire (Doré et Sirois, 1996). Le modèle canin fut aussi utilisé pour démontrer le rôle possible de la P-sélectine plaquettaire dans le recrutement des neutrophiles par les plaquettes lors de dommages vasculaires avec rupture de l'endothélium (Doré et coll., 1995).

1.5.4 Les ligands des sélectines

Comme les sélectines interagissent via leur domaine lectine et que les liaisons ligand-récepteur sont calcium-dépendantes, la recherche de ligands s'est dirigée vers les hydrates de carbone (Bevilacqua et coll., 1991). Les sélectines reconnaissent des glycoprotéines par l'intermédiaire d'oligosaccharides lactosaminyl sialylés fucosylés rattachés au corps protéique (Berg et coll., 1992; Varki, 1992). Le motif de base de l'oligosaccharide est l'antigène sialylé Lewis X (sLe^X), $Sia\alpha 2-3 Gal\beta 1-4 (Fuc\alpha 1-3)GlcNAc$ (Figure 6) ou son isomère l'antigène sialylé Lewis a (sLe^a), $Sia\alpha 2-3 Gal\beta 1-3 (Fuc\alpha 1-4) GlcNAc$ (Berg et coll., 1992; Foxall et coll., 1992; Handa et coll., 1991; Polley et coll., 1991). Cet isomère est présent surtout sur les cellules cancéreuses (Takada et coll., 1991). L'oligosaccharide sLe^X ne représente pas le ligand au complet mais la terminaison d'une structure glucidique d'une protéine (McEver et coll., 1995). sLe^X est retrouvé à la surface de plusieurs glycoprotéines et glycolipides des cellules endothéliales et des leucocytes et les trois sélectines sont capables de le lier (McEver et coll., 1995).

Quelques glycoprotéines des leucocytes et des cellules endothéliales ont été reconnues comme ligands des sélectines (McEver et coll., 1995). La majorité d'entre elles sont de type mucine comprenant plusieurs sérines et thréonines, sites potentiels d'attachement O-glycosyl (McEver et coll., 1995). Les mucines sont caractérisées par une haute densité locale d'O-glycosyl (Carraway et Hull, 1991). Elles possèdent une très grande variété de terminaisons glucidiques dont sLe^X (McEver et coll., 1995; Shimizu et Shaw, 1993). Leur arrangement spatial leur permet une extension maximale

pour une meilleure exposition au contre-récepteur (Shimizu et Shaw, 1993). Ces deux facteurs font des mucines une excellente barrière répulsive autour de la cellule en plus de leur conférer la propriété d'être anti-adhésif et pro-adhésif envers les différentes molécules d'adhésion (Shimizu et Shaw, 1993). Les ligands mucines ont tendance alors à lier le bon récepteur et à repousser les autres molécules (Shimizu et Shaw, 1993).



Sialyl Lewis^x
Tetrasaccharide

Figure 6. L'antigène sLewisX, ligand des sélectines. Tiré de <http://lewis.sfsu.edu/glyco/c-type.sLex.page.html>

Cette forte et rapide attraction entre les sélectines et les mucines aura pour effet de ralentir les leucocytes et leur permettre de rouler le long de la paroi vasculaire jusqu'à l'adhésion ferme (Williams, 1991). La complexité de régulation de ces protéines permet une grande variété de récepteurs et d'expression (Shimizu et Shaw, 1993). Le premier niveau de régulation se fait au niveau du corps de la protéine; le second se trouve au niveau des domaines mucines de la protéine, ces domaines pouvant être sujet d'épissage et être régulés de manière indépendante du reste de la molécule; le troisième degré de régulation permet une spécificité cellulaire car elle se trouve au niveau de la chaîne glycosylée et est dépendante de l'expression des glycosyl/transférases (Shimizu et Shaw, 1993). Dans les mucines, les oligosaccharides sont regroupés sur une distance restreinte donnant une forme rigide aux différentes chaînes latérales de sucres et diminuant ainsi la mobilité de ces chaînes (Cyster et coll., 1991; Jentoft, 1990). Il a été suggéré que ces regroupements d'oligosaccharides communs serviraient d'épitopes non-communs. Cet épitope non-commun serait généré par combinaison de groupe d'oligosaccharides multiples et de chaînes latérales (Norgard et coll., 1993). L'arrangement spatial des chaînes latérales, d'oligosaccharides et des combinaisons serait important à la reconnaissance par le récepteur (Norgard et coll., 1993). Le corps protéique serait responsable, dans ce cas, de la bonne mise en place de ces éléments (Shimizu et Shaw, 1993). La très grande variété de combinaisons possibles et de régulation offre une possibilité immense de ligands pour les sélectines mais aussi une spécificité dans les interactions (Norgard et coll., 1993). Malgré leur ressemblance, les sélectines ne partagent pas nécessairement le ou les

mêmes ligands (Bevilacqua et Nelson, 1993). La molécule d'adhésion E-sélectine a une bonne affinité pour sLe^X et aussi pour sLe^a (Berg et coll., 1991). Tout récemment, un ligand spécifique à E-sélectine a été identifié et semble être une variante du récepteur FGF («fibroblast growth factor») (Steehmaier et coll., 1995). Cette molécule possède une masse relative de 150 kDa et serait le ligand majeur de la E-sélectine sur les cellules myéloïdes (Lenter et coll., 1994; Levinovitz et coll., 1993). La ressemblance entre ESL-1 («E-selectin ligand-1») et le récepteur FGF du poulet est d'environ 94% (Steehmaier et coll., 1995). Seule une région de 70 acides aminés de la région N-terminale de la protéine mature est différente (Steehmaier et coll., 1995). La grande similitude entre ESL-1 et le récepteur FGF suggère que ESL-1 pourrait être le résultat d'épissage du gène du récepteur FGF (Steehmaier et coll., 1995). Ce récepteur transmembranaire possède cinq sites potentiels N-glycosyl et de faibles possibilités d'O-glycosyl (Steehmaier et coll., 1995). La fucosylation du récepteur est nécessaire pour la liaison à E-sélectine (Steehmaier et coll., 1995). ESL-1 est un récepteur distribué à grande échelle mais la forme liant E-sélectine se retrouve sur les cellules myéloïdes comme les neutrophiles (Steehmaier et coll., 1995). Le ligand majeur de E-sélectine (ESL-1) n'est peut être pas le seul ligand à médier l'adhésion des cellules myéloïdes à E-sélectine (Steehmaier et coll., 1995).

La L-sélectine est aussi capable de lier sLe^X mais elle préfère une forme sulfatée de ce sucre, le 6'-O-sulfate sLe^X (Tsuboi et coll., 1996). La sialylation, la fucosylation et la sulfatation de la glycoprotéine semblent requises pour lier L-sélectine (Tedder et coll., 1995). Trois molécules ont été identifiées comme ligands

de la L-sélectine. Il s'agit de Gly-CAM-1 («glycosylated cellular adhesion molecule-1»), CD34 et MadCAM-1 («mucosal addressin cellular adhesion molecule-1») (Tedder et coll., 1995). Ces trois ligands sont des protéines hautement glycosylées de type mucine et sont aussi sialylées, fucosylées et sulfatées (Tedder et coll., 1995). Le ligand MadCAM-1 est également un ligand pour l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ (Berlin et coll., 1993). Ce ligand particulier qu'est MadCAM-1 comprend un domaine mucine permettant la liaison à L-sélectine et des domaines immunoglobulines pour la liaison à l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ (Shimizu et Shaw, 1993). Ce ligand contribue donc au «rolling» et à l'adhésion ferme des cellules leucocytaires (Shimizu et Shaw, 1993). Tout récemment, un contre-récepteur pour la L-sélectine, le «neutrophil L-selectin ligand», fut découvert à la surface des neutrophiles. Celui-ci permet le roulement des neutrophiles avec des neutrophiles (Fuhlbrigge et coll., 1996). Ce ligand ne serait pas de nature mucine et l'acide sialique serait une composante importante de ce dernier (Fuhlbrigge et coll., 1996). Ce nouveau ligand permet une amplification du recrutement des neutrophiles lors de l'inflammation (Alon et coll., 1996). Par interactions L-sélectine et «neutrophil L-selectin ligand», les neutrophiles peuvent s'agréger et ensuite rouler ensemble sur la paroi ou encore libérer leur compagnon afin qu'il roule seul sur la paroi vasculaire (Alon et coll., 1996) (Figure 7). La L-sélectine est également capable de lier d'autres sucres comme le mannose-6-phosphate et des polysaccharides sulfatés comme l'héparine et le fucoidan (Imai et coll., 1992; Watson et coll., 1990B; Yednock et coll., 1987).

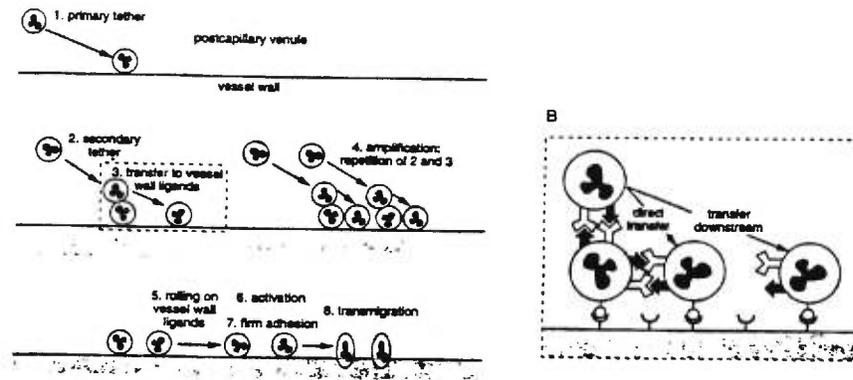
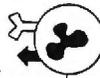


Figure 7. Interactions neutrophile-neutrophile médiées par la L-sélectine lors du «rolling» dans la réponse inflammatoire (Alon et coll., 1996).

L-sélectine -->

«Neutrophil L-selectin ligand» -->



1.5.4.1 Le PSGL-1.

Comme les deux autres membres de la famille des Sélectines, la P-sélectine interagit avec la structure sLe^X (Figure 6) qui est abondamment présente à la surface des neutrophiles (Moore, 1998). Des études ont démontré que le sLe^X était nécessaire à la liaison de la P-sélectine avec son ligand mais non suffisant pour des interactions de haute affinité. D'abord, le traitement de neutrophiles avec des protéases diminue considérablement leur liaison à la P-sélectine sans toutefois altérer de manière notable l'expression de sLe^X à leur surface (Moore et coll., 1991; Norgard et coll., 1993). Également, certaines cellules transfectées avec l' $\alpha 1,3$ -

fucosyltransferase expriment beaucoup de sLe^X à leur surface et lient la P-sélectine avec une faible affinité comparativement aux neutrophiles (Zhou et coll., 1991). Le traitement de neutrophiles avec des sialidases abolit aussi la liaison à la P-sélectine (Moore et coll., 1991; Corral et coll., 1990). La P-sélectine peut aussi interagir avec des polysaccharides sulfatés polyanioniques comme l'héparine et le fucoidan (Bevilacqua et Nelson, 1993). Toutes ces observations ont orienté la recherche d'un ligand pour la P-sélectine vers des glycoprotéines sialylées. Pour le moment, un seul contre-récepteur de haute affinité pour la P-sélectine a été isolé, le «P-selectin glycoprotein ligand-1» (PSGL-1). Ce dernier, en interagissant avec la P-sélectine, contribue au «rolling» des leucocytes sur la paroi vasculaire (Figure 8). Le tout fut démontré d'abord *in vitro* avec des cellules humaines (Moore et coll., 1995) et ensuite *in vivo* avec des neutrophiles humains dans des veinules de mésentère de rat (Norman et coll. 1995). Pour la démonstration *in vitro*, les conditions de flux de la microcirculation ont été reproduites et des cellules CHO exprimant la P-sélectine ont été cultivées et mises dans une chambre de flux. Par la suite des neutrophiles ont été injectés dans la chambre de flux et ont pu rouler sur les cellules exprimant la P-sélectine. La préincubation des neutrophiles avec un anticorps contre le PSGL-1 a résulté en une diminution du «rolling» (Moore et coll., 1995). Le modèle *in vivo* est similaire au modèle *in vitro* à la différence que l'expérimentation a été faite dans les veinules d'un mésentère de rat extériorisé au lieu de la chambre à flux (Norman et coll., 1995). Ce ligand majeur de haute affinité pour la P-sélectine permet aussi la liaison d'E-sélectine mais avec une affinité moindre (Moore et coll., 1994). La Figure 9 illustre les interactions

médiées par le PSGL-1. Ce dernier fut d'abord isolé et cloné chez l'humain (Moore et coll., 1992; Sako et coll., 1993) puis chez la souris (Yang et coll., 1996).

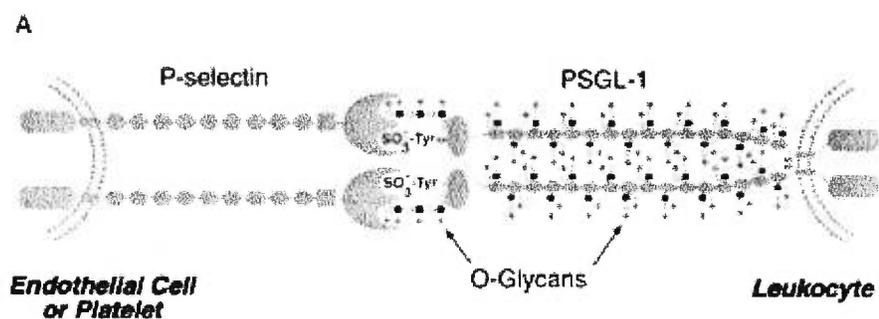


Figure 8. La P-sélectine et le PSGL-1. Tiré de: <http://www.jci.org/content/vol100/issue3/images/medium/JCI.9700924f1a.gif>.

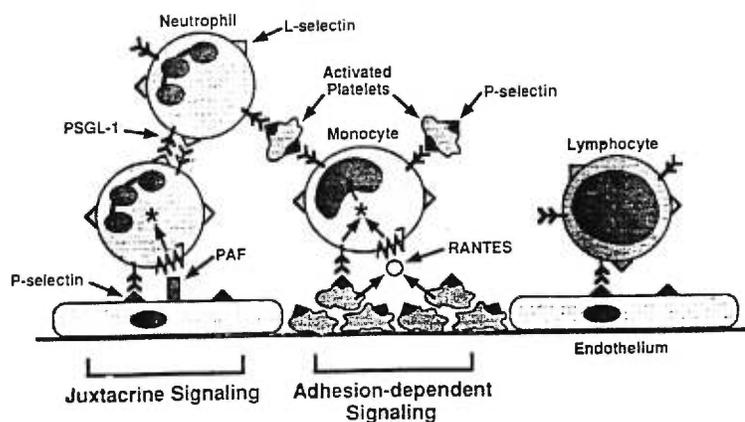


Figure 9. Interactions médiées par le PSGL-1 (Moore et coll., 1998).

1.5.4.1.1 Structure du gène

Le gène de PSGL-1 localisé sur le chromosome 12q24 chez l'humain se compose de deux exons séparés par un intron de 9 Kb (Veldman et coll., 1995). Le premier exon comprend la région 5' non traduite et les nucléotides 1 à 54 tandis que l'on retrouve dans l'exon 2 (nucléotides 55 à 2075) toute la région codant pour la protéine ainsi que la région 3' non traduite (Veldman et coll., 1995). En amont du site d'initiation, on ne retrouve aucune boîte TATA ni de boîte CAAT. Par contre, il y a une région riche en GC et un site possible pour les éléments régulateurs SP1 et Ets (Veldman et coll., 1995). Un signal de polyadénylation au nucléotide 2075 suivi d'une séquence Alu se trouve en région 3' (Veldman et coll., 1995). L'ADN complémentaire comprend 1649 paires de bases et prédit une protéine de 402 acides aminés (Sako et coll., 1993). Chez la souris, le gène se situe sur le chromosome 5 et l'ADNc comprend 1661 paires de bases pour une protéine de 397 acides aminés (Yang et coll., 1996).

1.5.4.1.2 Structure de la protéine

PSGL-1 est un homodimère formé de deux sous-unités de 120 kDa chacune (Moore et coll., 1992). Cette protéine transmembranaire de type I fait partie de la famille des mucines caractérisée par une région riche en proline, thréonine et sérine. La protéine comprend un peptide signal (acides aminés 1-18), un propeptide (a.a. 19-41), un domaine extracellulaire (a.a. 42-308), une région transmembranaire (a.a. 309-333) et une queue cytoplasmique (a.a. 334-402). Le peptide signal et le propeptide ne font pas partie de la protéine mature. Dans le domaine extracellulaire, on retrouve en

N-terminal trois sites potentiels pour une tyrosine sulfate aux positions 46, 48 et 51 (Sako et coll., 1993), des répétitions décāmériques (16 chez l'humain [Sako et coll., 1993] et 10 chez la souris [Yang et coll., 1996]) et trois sites pour une N-glycosylation. La dimérisation nécessaire pour la reconnaissance à la P-sélectine (Snapp et coll., 1998) s'effectue par un pont disulfure à la cystéine extracellulaire en position 320 (Li et coll., 1996). L'homologie entre la protéine humaine et la protéine murine est d'environ 50%. La plus grande similitude se retrouve dans la région transmembranaire avec 83% d'homologie alors qu'il y en a 76% dans la queue cytoplasmique (Yang et coll., 1996).

Plusieurs modifications post-traductionnelles sont apportées à la protéine de base, principalement l'ajout de sucres O-glycans et au moins un N-glycan non nécessaire à la reconnaissance par P-sélectine (Moore et coll., 1994). La majorité des O-glycans arbore soit la forme disialylée ou la forme neutre du *core-2* tétrasaccharide Gal β 1-4 GlcNac β 1-6 (Gal β 1-3)GalNacOH (Wilkins et coll., 1996). Contrairement aux attentes, PSGL-1 est faiblement fucosylé. Environ 14% des O-glycans sont fucosylés et contiennent l'antigène sLe^x (Wilkins et coll., 1996). Deux types d'O-glycans fucosylés sont présents chez la molécule soit l'heptasaccharide disialylé sans le corps polylectosamine et un glycan monosialylé trifucosylé unique avec le corps polylectosamine (Wilkins et coll., 1996). Ce dernier est une nouvelle structure récemment découverte du *core-2* (Wilkins et coll., 1996) (Figure 10).

Les O-glycans ne sont pas sulfatés mais PSGL-1 possède trois sites potentiels pour une tyrosine sulfate aux résidus 46, 48 et 51. La tyrosine sulfate est

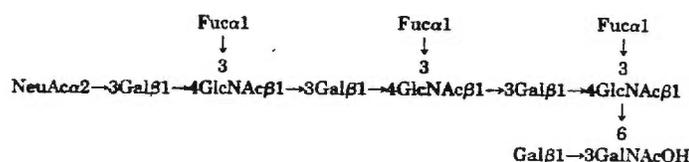


Figure 10. Structure du glycan monosialylé trifucosylé avec le corps polylactosamine de PSGL-1 (Wilkins et coll., 1996).

essentielle pour l'interaction avec la P-sélectine mais non avec la E-sélectine (Wilkins et coll., 1996). Il est suggéré qu'un ou deux glycans à proximité des tyrosines et en collaboration avec la tyrosine sulfate sont responsables de la haute affinité de liaison avec la P-sélectine (Li et coll., 1996; Pouyani et Seed, 1995; Sako et coll., 1995; Wilkins et coll., 1995). Il est à noter que les autres O-glycans contribuent aux interactions de PSGL-1 avec la P- et la E-sélectine (Wilkins et coll., 1996). La molécule possède également un N-glycan non nécessaire à la reconnaissance de la P-sélectine (Moore et coll., 1994). L'antigène sLe^X est nécessaire au ligand pour la liaison mais n'est pas suffisant pour une grande affinité (Norgard et coll., 1994).

1.5.4.1.3 Expression de PSGL-1.

Le PSGL-1 est présent à la surface des cellules myéloïdes, lymphoïdes et dendritiques. On le retrouve plus précisément localisé sur les microvillosités, tout comme la L-sélectine (McEver et coll., 1995). L'activation des leucocytes ne

modifie pas l'expression de PSGL-1 qui reste la même (Vachino et coll., 1995) mais induit un changement de forme de la cellule et une redistribution du PSGL-1 à leur uropode. Ceci a pour effet de diminuer les interactions possibles entre la P-sélectine et le PSGL-1 (Bruehl et coll., 1997; Doré et coll., 1996). Cette redistribution fut démontrée chez l'humain (Lorant et coll., 1995) et chez le chien (Doré et coll., 1996). Le PSGL-1 est présent à la surface de plusieurs cellules mais ce ne sont pas toutes ces cellules qui lieront la P-sélectine. Ceci dépend des modifications post-traductionnelles subies par la protéine. Dans certains cas, le ligand préférera la E-sélectine ou la L-sélectine à la P-sélectine. La liaison PSGL-1-L-sélectine a pour but de promouvoir les interactions entre neutrophiles (Walcheck et coll., 1996). Ces interactions neutrophile-neutrophile auraient pour conséquence un meilleur recrutement de ces cellules au site inflammatoire (Walcheck et coll., 1996). Donc, le PSGL-1 est une protéine hautement régulée (Moore et coll., 1995) et des modifications additionnelles de chaque chaîne oligosaccharidique sont essentielles pour sa reconnaissance maximale (Moore et coll., 1994).

1.6 Rôle de la P-sélectine et du PSGL-1 dans les pathologies.

La P-sélectine est une molécule clé pour le «rolling» des leucocytes en diverses occasions. Elle est présente lors de l'inflammation aigue, phénomène favorable pour l'organisme. Par contre, elle est aussi présente dans certaines pathologies. Même si peu est connu jusqu'à présent sur sa présence et son rôle lors de pathologies, l'expression de la P-sélectine a été impliquée dans la pathogénie de

maladies telles l'athérosclérose, l'arthrite, le diabète, l'asthme et les troubles reliés à l'ischémie-reperfusion (Winn et coll., 1995). L'implication de la P-sélectine dans ces maladies fut mise en évidence par l'emploi d'anticorps monoclonaux anti-P-sélectine qui réduisent les effets néfastes de ces désordres (Wagner, 1995).

Quatre modèles animaux ont été utilisés afin d'étudier le rôle *in vivo* de la P-sélectine lors de l'ischémie-reperfusion, soit le modèle du myocarde félin (Weyrich et coll., 1993), de l'oreille de lapin (Winn et coll., 1993), du myocarde du chien (Lefer et coll., 1996) et du myocarde de rat (Seko et coll., 1996). Chacun des modèles a démontré la présence de la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales vasculaires lors de l'ischémie-reperfusion (Lefer et coll., 1996; Seko et coll., 1996; Weyrich et coll., 1993; Winn et coll., 1993). Le modèle canin a démontré sa présence lors de la reperfusion (Lefer et coll., 1996). La P-sélectine ne serait pas exprimée lors d'ischémie. Tous les modèles impliquent la P-sélectine dans l'adhérence des neutrophiles à la paroi vasculaire ainsi que leur infiltration, le tout ayant comme conséquence des dommages vasculaires (Lefer et coll., 1996; Seko et coll., 1996; Weyrich et coll., 1993; Winn et coll., 1993). Chez les modèles félin, canin et chez le lapin, un anticorps monoclonal anti-P-sélectine a été utilisé afin de démontrer son importance dans les dommages causés lors de la reperfusion. Effectivement, l'injection d'anticorps peu avant la reperfusion diminue considérablement les dommages vasculaires causés par l'infiltration des neutrophiles (Lefer et coll., 1996; Weyrich et coll., 1993; Winn et coll., 1993). Le modèle d'ischémie-reperfusion du myocarde de rat a utilisé un oligopeptide

synthétique de sélectine plutôt qu'un anticorps mais les résultats obtenus sont similaires (Seko et coll., 1996).

La P-sélectine et son ligand semblent impliqués dans d'autres pathologies, notamment le processus métastatique de certains cancers (Stone et coll., 1993). Certaines cellules cancéreuses expriment à leur surface le ligand PSGL-1 (Wagner, 1995) et peuvent ainsi lier les plaquettes et l'endothélium activés. Ces interactions avec les plaquettes et l'endothélium pourraient jouer un rôle dans le processus métastatique et la dissémination systémique des cellules cancéreuses.

Finalement, une déficience du ligand pour la P-sélectine résulte en la maladie maintenant connue sous le nom de LADII («leucocyte adhesion deficiency type II») (Etzioni et coll., 1992). Cette rare déficience est associée avec le phénotype sanguin de Bombay (Frydman et coll., 1996). Ce phénotype est caractérisé par une défectuosité de métabolisme du fucose causant l'absence de l'antigène H sur les érythrocytes et surtout, dans le cas présent, de l'antigène sLe^X ainsi que plusieurs autres molécules fucosylées (Etzioni et coll., 1995). Comme les sélectines se lient en majorité au sLe^X de leur contre-récepteur et que celui-ci est absent, la déficience affecte aussi la E- et la L-sélectine dans leurs liaisons (Etzioni et coll., 1995). Les leucocytes des patients atteints de LADII démontrent peu de «rolling» et leur émigration des vaisseaux sanguins est sévèrement compromise. Le tout résulte en une réponse inadéquate contre les agresseurs par les cellules du système inflammatoire et en la présence d'infections récurrentes (Etzioni et coll., 1995).

1.7 Hypothèse

L'objectif de ce travail est de caractériser le ligand pour la P-sélectine sur les neutrophiles canins. L'hypothèse de départ est que la P-sélectine canine possède un ligand sur les neutrophiles et que cette molécule ressemble au PSGL-1 humain.

1.8 Objectif

La caractérisation du PSGL-1 canin a comme but de pouvoir ultérieurement étudier son rôle lors de différentes pathologies chez le chien.

Matériel et Méthodes

2.1 Isolement et culture de cellules.

2.1.1 Isolement de neutrophiles canins.

Le sang de chiens adultes en santé a été recueilli dans une seringue contenant un anticoagulant, le citrate phosphate dextrose (CPD, Abbott Laboratories; 1,4 ml CPD/10 ml de sang). Les neutrophiles ont été isolés des érythrocytes par sédimentation au dextran (1 ml dextran/10 ml de sang) suivie d'un gradient Ficoll-Hypaque (Ficoll type 400, Sigma; 10% Hypaque-Sodium 50%, Winthrop-Breon) selon le protocole expérimental retrouvé en Annexe 1. Le nombre et la pureté des neutrophiles ont été déterminés à l'aide de l'appareil Cell-Dyn 3500 (Abbott).

2.1.2 Culture des cellules DH-82.

Les cellules DH-82 sont une lignée de monocytes-macrophages canins provenant des cellules d'un chien souffrant d'histiocytose maligne (ATCC CRL-10389). Elles sont de morphologie semblable à celle des macrophages et sont capables de phagocyter des particules de latex. Elles possèdent le récepteur *Fc γ* mais pas les récepteurs *Fc μ* et C3b. De plus, elles ne produisent pas d'interleukine-1. Les cellules ont été cultivées en monocouche dans un milieu de culture MEM (Gibco) contenant 15% de sérum de bovin foetal inactivé ainsi que de la pénicilline/streptomycine (5000 U/ml). Elles ont été incubées à 37°C dans une atmosphère 5% CO₂/95% air. L'isolement des cellules a été fait par trypsinisation (trypsine 0,25%, Gibco) tel que décrit à l'Annexe 2.

2.2 Isolement de l'ARN.

2.2.1 Isolement de l'ARN cytoplasmique.

L'ARN cytoplasmique des neutrophiles et des cellules DH-82 a été isolé à l'aide d'un tampon d'extraction contenant 1% Nonidet P-40 (NP-40). L'ARN a été extrait avec du phénol/chloroforme, précipité dans l'éthanol et resuspendu dans de l'eau traitée au diethyl pyrocarbonate 0,1% (DEPC-H₂O) selon le protocole en Annexe 3. La quantification de l'ARN a été faite par absorbance à 260 nm dans un spectrophotomètre (Spectronique 1001 plus, Milton Roy).

2.2.2 Isolement de l'ARN messenger.

L'ARN messenger a été isolé de l'ARN cytoplasmique par passage sur une colonne PolyA Quick mRNA (Stratagene) selon le manuel de la compagnie et rapporté dans l'Annexe 4. Environ 100 µg d'ARN cytoplasmique ont été nécessaires pour obtenir 1 µg d'ARN messenger.

2.3 Marquage aléatoire d'une sonde d'ADNc.

2.3.1 Sondes.

Les sondes PSGL-1 humain utilisées pour l'hybridation du buvardage de type Northern, des criblages des différentes librairies et du buvardage de type Southern provenaient du Dr Rodger McEver, University of Oklahoma, Health Sciences Center, Oklahoma City, OK et de la compagnie Genetics Institute, Andover, MA.

2.3.2 Marquage aléatoire et purification d'une sonde.

La marquage radioactif des différentes sondes d'ADNc utilisées a été fait à l'aide de la trousse Prime-a-gene labeling system (Promega), en suivant le protocole du détaillant décrit à l'Annexe 5. Le radionucléotide $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Mandel) a été utilisé afin de marquer radioactivement la sonde. Celle-ci a été purifiée sur une colonne de Séphadex G-50 tel que décrit à l'Annexe 5. L'activité spécifique a été déterminée en mesurant le nombre de comptes par minute obtenus par le compteur β LS 6500 (Beckman).

2.4 Buvardage de type Northern.

Lors de buvardage de type Northern, l'ARN est séparé sur un gel dénaturant, transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec une sonde d'intérêt. Le tout est décrit en détails à l'Annexe 6.

2.4.1 Échantillons d'ARN.

Les échantillons ont été lyophilisés (Speed-Vac, SAVANT) et resuspendus dans un tampon de resuspension (tampon dénaturant 1X; formamide déionisée(DIF); formaldéhyde 6%). Ensuite, l'ARN a été dénaturé pendant 15 minutes à 55°C. Du bromure d'éthydiium (0,5 $\mu\text{g/ml}$) a été ajouté à chaque échantillon pour la détection de l'ARN à l'aide de rayons ultra-violet à l'issue de la migration. Les échantillons d'ARN ont été séparés sur un gel d'agarose-

formaldéhyde (Hepes 0,05M; NaPO₄ 0,02M; formaldéhyde 6,6%; agarose 1,2%) dans un tampon de migration (0,02M NaPO₄ et 0,05M Hepes).

2.4.2 Transfert de l'ARN sur une membrane de nylon.

L'ARN séparé par électrophorèse a été transféré par capillarité sur une membrane de nylon (Biotrans nylon membrane, ICN) toute la nuit à 25°C. Suite au transfert, l'ARN a été fixé à la membrane de nylon par irradiation aux rayons ultraviolets de 150 mJoules émis par l'appareil GS-gene linker (Bio-Rad).

2.4.3 Hybridation.

La membrane a d'abord été préhybridée en présence de 10 à 15 ml de solution d'hybridation Quick-Hyb (Stratagene) pendant une heure à 60°C. La sonde d'ADNc marquée à l' $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP et dénaturée à 100°C en présence d'ADN de sperme de saumon a ensuite été ajoutée à la solution d'hybridation (10^6 cpm/ml de solution d'hybridation). L'hybridation a été faite de 1 à 3 heures à 60°C dans un four à hybridation (Hybridization incubator model 400, Robbins Scientific).

2.4.4 Lavages et autoradiographie.

Suite à l'hybridation, la membrane a été lavée afin d'éliminer la radioactivité non-spécifique. Elle a été lavée deux fois avec la solution A (2X SSC; 0,1% SDS) pendant 15 minutes à 25°C et une fois avec la solution B (0,2X SSC; 0,1% SDS) pendant 30 minutes à 50°C. La membrane a été enveloppée dans une

pellicule de plastique et exposée à un film radiographique Kodak X-Omat-AR à -70°C pour 24 heures.

2.5 Production d'une librairie d'expression des cellules DH-82.

Une librairie d'expression a été produite à partir de 5 µg d'ARN_m des cellules DH-82 à l'aide de la trousse ZAP-cDNA Gigapack II Gold Cloning Kit (Stratagene) et selon le protocole du commerçant détaillé à l'Annexe 7. Les fragments d'ADNc ont été clonés dans le site *Xho* I/*Eco*R I du vecteur Uni-ZAP XR (Stratagene). Pour la croissance de la librairie, les bactéries hôtes utilisées étaient XL1 Blue MRF'. Il s'agit d'une souche de *E. coli* RecA⁻ McrA⁻ et McrCB⁻ Mrr⁻ qui ne restreint pas l'ADN méthylé. Pour l'excision *in vivo*, les bactéries utilisées étaient les SOLR. Ces cellules sont également de souche *E. coli* mais non suppressives, ainsi le codon d'arrêt ambre présent dans le phage ExAssist (M13) évite la réplication de ce phage lors de la transformation des bactéries par le clone positif. Les 2 types de bactéries, XL1 Blue MRF' et SOLR sont cultivés dans un milieu liquide Luria-Bertani (LB) (1% NaCl; 1% tryptone; 0,5% extrait de levure) en présence de 10mM MgSO₄ et 0,2% maltose toute la nuit à 30°C avec agitation.

2.5.1 Synthèse des premier et second brins de l'ADNc.

À partir de l'ARN_m des cellules DH-82, l'ADNc a été synthétisé en deux étapes. D'abord la synthèse du 1^{er} brin a été effectuée à l'aide d'une transcriptase inverse. L'oligonucléotide utilisé à cette étape comprenait une séquence 18-bases

polydT, un site de restriction *Xho* I et une séquence GAGA pour protéger le site de restriction. La transcription inverse a été faite en présence de 5-méthyl dCTP pour protéger des enzymes de restriction et du radionucléotide $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Mandel) pour suivre la synthèse. La synthèse du second brin a été effectuée par l'ADN polymérase I. L'enzyme Rnase H a coupé l'ARN_m lié au premier brin d'ADNc en fragments qui ont servi d'amorces pour la synthèse du second brin. Ensuite, des adaptateurs possédant un site *EcoR* I ont été ajoutés à chaque extrémité du nouvel ADNc. Une digestion *Xho* I a été effectuée afin d'avoir la bonne orientation pour le clonage dans le vecteur UniZAP. Ces ADNcs ont été séparés sur une colonne de fractionnement de Sepharose CL-2B. Seulement les fragments d'une longueur approximative entre 500 pb et 5000 pb ont été conservés. Finalement, les ADNcs ont été insérés dans le vecteur Uni-ZAP XR à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase et en incubant à 12°C pour une nuit.

2.5.2 Empaquetage du vecteur.

L'empaquetage du vecteur UniZap XR a été fait avec des extraits commerciaux de phagemide pendant 2 heures à 25°C. Des bactériophages contenant les ADNcs ont ainsi été générés.

2.5.3 Titrage et amplification de la librairie.

Une sélection bleu/blanc a été effectuée lors du titrage de la librairie pour déterminer l'efficacité de l'empaquetage. En présence d'IPTG (25mM) et de X-

Gal (4 mg/ml), les plaques recombinantes étaient blanches tandis que les plaques bleues étaient celles ayant incorporé un plasmide sans insert. Suite au titrage, la librairie a été amplifiée pour obtenir 10^6 plaques. Les bactériophages ont été recueillis dans du milieu SM (0,1M NaCl; 8mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05M Tris-Cl pH 7,5; 0,01% gélatine), aliquotés et conservés à $-70^\circ C$ en présence de diméthylsulfoxyde 7% (DMSO 7%). Le titre était approximativement $1,43 \times 10^{10}$ pfu/ml.

2.6 Criblage de librairies d'expression.

Deux librairies d'expression, la librairie générée à partir des cellules DH-82 et une autre provenant de la rate de chien (fournie par le Dr Richard A. Nash, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) ont été criblées. Le criblage a été effectué selon le protocole du détaillant qui est décrit à l'Annexe 8.

2.6.1 Étalement des librairies.

L'étalement primaire a été fait sur des boîtes de pétri contenant du NZamine/Yeast extract (NZY) agar frais (0,5% NaCl; 0,2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5% extrait de levure; 1% NZamine; 1,5% agar) de 25 cm^2 . La densité désirée était d'environ 150 000 pfu/plaque. Les bactéries hôtes, XL1 Blue MRF', ont été transformées par les bactériophages pendant 15 minutes à $37^\circ C$ avec agitation. Le tout a été incubé pendant 6 à 8 heures à $37^\circ C$.

2.6.2 Transfert de l'ADN de phage sur une membrane de nylon.

L'ADNc des plages de lyse a été transféré sur une membrane de nylon par capillarité pendant 2 minutes et en duplicata pendant 4 minutes. Il a été dénaturé dans une solution NaCl 1,5M; NaOH 0,2N pendant 2 minutes à 25°C, neutralisé dans une solution de NaCl 1,5M; Tris-Cl 0,5M pH 8,0 pendant 5 minutes à 25°C et finalement, la membrane a été rincée dans une solution Tris-Cl 0,5M; 0,2X SSC pendant 30 secondes à 25°C.

2.6.3 Hybridation, lavages et autoradiographie.

L'hybridation, les lavages ainsi que l'autoradiographie ont été effectués comme pour le buvardage de type Northern décrit à l'Annexe 6. Les températures d'hybridation étaient de 45°C lors du criblage des librairies avec la sonde PSGL-1 humain et de 50°C avec la sonde PSGL-1 canin.

2.6.4 Isolement des clones positifs.

Suite au développement des films radiographiques, l'analyse des clones positifs a été effectuée en superposant les films correspondants. Lorsqu'un point apparaissait sur un film et sur son duplicata, il était alors aligné sur la boîte de pétri correspondante et le clone était isolé à l'aide de l'extrémité supérieure d'un embout bleu. Ce morceau d'agar était mis dans du tampon SM et du chloroforme et était incubé toute la nuit à 4°C.

2.6.5 Criblages secondaire, tertiaire et quaternaire.

Les criblages secondaire, tertiaire et quaternaire ont été faits comme le criblage primaire à l'exception que les phages ont poussé sur une boîte de pétri de 100 mm contenant du NZY-agar. Les membranes n'ont pas été faites en duplicata.

2.6.6 Excision *in vivo*.

Les bactéries XL1 Blue MRF'ont été co-infectées par le phage M13 et le phage positif pendant 15 minutes à 37°C avec agitation. Les protéines du phage M13 reconnaissent le site d'initiation présent à l'extrémité 5' du vecteur pBlueScript SK- et le répliquent jusqu'au site de terminaison à l'extrémité 3' du même vecteur. Ce simple brin se recircularise et est sécrété sous forme de phagemide par les cellules hôtes. Cette étape requiert 2 à 2,5 heures à 37 °C avec agitation. Pour recouvrer le plasmide double brin pBlueScript SK- contenant l'insert, des bactéries SOLR ont été transformées 15 minutes à 37°C puis étalées sur une boîte de pétri contenant du LB-agar-ampicilline (100 µg/ml) et incubées toute la nuit à 37°C. Une préparation plasmidique (Annexe 9) a permis d'isoler le plasmide pour le séquençage (Annexe 11).

2.7 Criblage d'une librairie génomique.

Cette librairie génomique provenait de la compagnie Stratagene. Il s'agissait d'une librairie de rate de chien de race mixte de 10 livres. Les inserts avaient une longueur entre 9 et 23 Kb suite à une digestion de l'ADN génomique

par l'enzyme de restriction *Sau3* A1. Ils étaient insérés dans le site *Bam*H 1 du phage Lambda Dash 1. Le titre de la librairie était de 3×10^6 pfu/ml. Le criblage de cette librairie génomique a été effectué comme celui des librairies d'expression jusqu'à l'obtention d'un clone pur. Par la suite, l'excision *in vivo* a été remplacée par une préparation de phages et une analyse des positifs par buvardage de type Southern. Pour la croissance de la librairie, les bactéries hôtes utilisées étaient XL1 Blue MRA P2. C'est une souche de bactéries *E.coli* permettant la croissance des phages recombinants *red/gam*. Ces bactéries sont cultivées dans un milieu liquide LB en présence de 10mM $MgSO_4$ et 0,2% maltose toute la nuit à 30°C avec agitation.

2.7.1 Préparation de phages.

L'ADN de phages a été obtenu à partir d'un lysat de boîtes de pétri comme décrit à l'Annexe 10. Il a été précipité en présence de NaCl et de polyéthylène glycol (PEG) et purifié par extraction phénol/chloroforme. L'ADN isolé était alors prêt pour l'analyse par buvardage de type Southern.

2.7.2 Buvardage de type Southern.

Les différentes étapes du buvardage de type Southern sont similaires à celles du buvardage de type Northern. Les seules différences sont que la migration de l'ADN se fait sur un gel d'agarose 1%-TBE 0,5X (0,045M Tris-borate; 1mM EDTA pH 8,0) dans un tampon TBE 0,5X à très bas voltage (25 volts) et que, préalablement à son transfert, l'ADN doit être dénaturé et neutralisé. Les étapes

d'hybridation, de lavages et d'autoradiographie sont comme celles du buvardage de type Northern décrites à l'Annexe 6.

2.7.2.1 Échantillons d'ADN.

Les plasmides ont été digérés pour libérer l'insert et les fragments obtenus ont migré sur un gel d'agarose 1%-TBE 0,5X en présence de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) pour colorer l'ADN.

2.7.2.2 Transfert de l'ADN sur une membrane de nylon.

L'ADN doit être dénaturé et neutralisé avant d'être transféré. La dénaturation a été faite en immergeant le gel dans une solution NaCl 1,5M; NaOH 0,2N pendant 4 minutes à 25°C, la neutralisation dans une solution de NaCl 1,5M; Tris-Cl 0,5M pH 8,0 pendant 10 minutes à 25°C et finalement, le gel a été rincé dans une solution Tris-Cl 0,5M; 0,2X SSC pendant une minute à 25°C. Le transfert s'est effectué comme celui du buvardage de type Northern décrit au point 2.4.2 et à l'Annexe 6 mais dans un tampon de transfert 10X SSC.

2.8 Séquençage.

La méthode de séquençage utilisée est dérivée de la méthode de Sanger (1977) en suivant le protocole expérimental du T7 Sequencing Kit (Pharmacia Biotech) comme décrit à l'Annexe 11. Le radionucléotide $\alpha^{35}\text{S-ATP}$ (Mandel) a été utilisé pour les réactions de séquençage. Les amorces utilisées pour séquencer

les produits obtenus par PCR et clonés dans le vecteur pGEM-T étaient dérivées du promoteur T7 et du promoteur pUC/M13 inverse. Pour les clones des libraires d'expression insérés dans le vecteur pBlueScript SK -, les amorces étaient dérivées du promoteur T7 et du promoteur T3. Les séquences des différentes amorces sont listées dans le Tableau I.

2.8.1 Échantillons.

Les échantillons à séquencer ont d'abord été dénaturés dans du NaOH 0,4M pendant 10 minutes à 25°C. Par la suite, ils ont été précipités en présence de NaOAc 3M pH 5,2 et d'EtOH 100% pendant 15 minutes à -20°C et lyophilisés. L'amorce désirée a été ajoutée et incubée 20 minutes à 37°C, puis 10 minutes à 25°C et toute la nuit à 4°C. La réaction d'élongation a été effectuée grâce à l'enzyme T7 DNA polymerase en présence du radionucléotide $\alpha^{35}\text{S}$ -ATP pendant 5 minutes à 25°C et poursuivie pendant 5 minutes à 37°C en présence de didéoxy nucléotides. La réaction a été terminée par l'ajout d'une solution d'arrêt.

2.8.2 Électrophorèse.

Les réactions de séquençage ont migrées sur un gel 6 % acrylamide-bisacrylamide 19:1; TBE 1X; urée 7M. Le gel a d'abord été préchauffé une heure à 1800 volts (environ 50°C). Les échantillons ont été bouillis trois minutes à 100 °C avant d'être chargés sur le gel.

Tableau I. Liste des amorces utilisées pour le séquençage.

amorce anti-sens pUC/M13	5' CAG GAA ACA GCT ATG AG 3'
amorce du promoteur T3	5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG G 3'
amorce du promoteur T7	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

2.8.3 Autoradiographie.

Pour l'autoradiographie, le gel a été transféré sur un papier Whatman (3M) et séché sous vide dans un séchoir à gel (SGD 450, Savant) pendant une heure à 80°C. Le gel a ensuite été exposé à un film Kodak X-Omat-AR à 25°C pendant 24 heures.

2.9 Génération d'une sonde PSGL-1 canine par RT-PCR emboîtée.

Cette technique a utilisé une amorce non-spécifique présente dans tous les ADNcs produits par la transcriptase inverse et une amorce spécifique déterminée d'après l'homologie existant entre le PSGL-1 humain et celui de souris dans les régions les plus conservées. Les séquences d'amorces sélectionnées provenaient de la région transmembranaire du PSGL-1 humain et sont listées dans le Tableau II. Afin d'augmenter la spécificité des produits obtenus, une réaction de polymérase emboîtée a été effectuée. L'amorce interne utilisée augmentait les probabilités d'obtenir un produit spécifique. La stratégie utilisée est schématisée à la Figure 11 et le protocole est détaillé en Annexe 12.

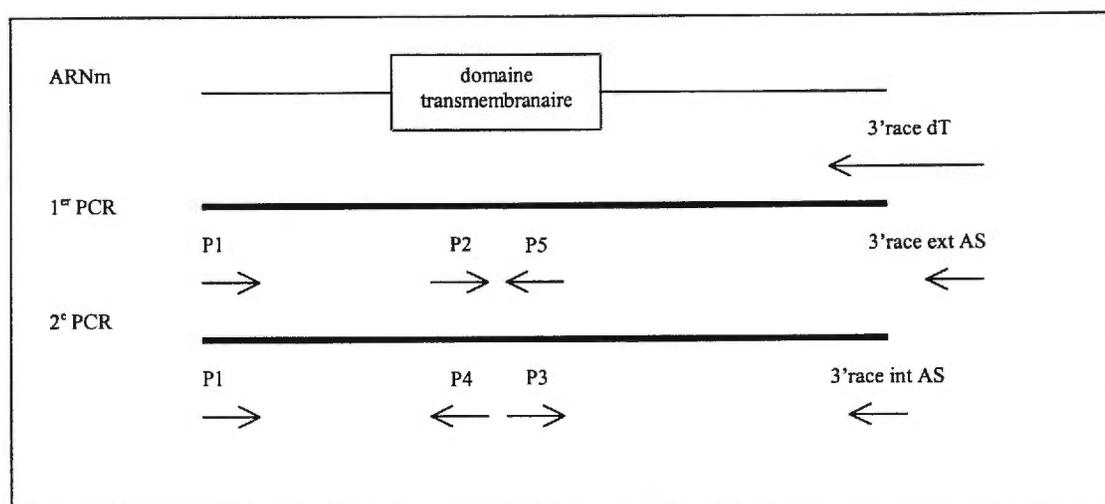


Figure 11. Stratégie de RT-PCR emboîtée utilisée pour générer une sonde PSGL-1 canin.

2.9.1 Transcription inverse.

À partir d'ARN de neutrophiles canins, une transcription inverse a été effectuée pour obtenir l'ADNc. Une amorce polyT (20 μ M) comprenant aussi la séquence des amorces pour la réaction de polymérase en chaîne a été hybridée à l'ARN pendant 10 minutes à 70°C. La réaction d'élongation générée par l'enzyme AMV RT a été faite pendant 1 heure à 42°C.

2.9.2 Réaction de polymérase en chaîne.

L'enzyme Taq polymerase a été utilisée pour l'élongation. La séquence des amorces utilisées est représentée dans le Tableau II.

Le programme de réaction en chaîne était le suivant:

- 1) dénaturation initiale 4 minutes à 94°C
- 2) «touch-down» 72°C à 50°C avec une décroissance de 2°C /cycle
- 3) 30 cycles 1 minute à 94°C
 1 minute à 50°C
 1 minute à 72°C
- 4) élongation finale 5 minutes à 72°C

2.9.3 Isolement du produit de PCR.

Les produits de PCR ont été séparés par migration sur un gel d'agarose 1,2% à 60 volts. Les fragments désirés ont été purifiés de l'agarose par GeneClean (Bio 101) selon le guide du détaillant. Ils ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM-T. La ligation a été faite pendant 16 à 18 heures à 16°C tel que décrit par Sambrook et coll. (1989). Des bactéries *E.coli* DH5 α -compétentes ont été transformées avec le produit de ligation suivant le protocole décrit à l'Annexe 13. Un choc thermique a permis l'entrée du vecteur dans les bactéries. Les bactéries transformées ont été cultivées sur une boîte de pétri contenant du LB-agar-ampicilline (100 μ g/ml) en présence de X-Gal (4 μ M) et d'IPTG (2,4mM). Ceci a

Tableau II. Liste des amorces utilisées pour la RT-PCR emboîtée.

3'race dT	5' GTA CCG GAT CCT CTA GAG AGC TCG TCG ACC TCG AGG AAT TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT TTT T 3'
3'race ext AS	5' GTA CCG GAT CCT CTA GAG AGC TC 3'
3'race int AS	5' GTC GAC CTC GAG GAA TTC AAG CTT 3'
P1	5' TGC TGA ctg cag TGG GCC CTG GCA ACA GCT TGC A 3'
P2	5' GTG AAG ctg cag CTG CTG GCC ATC CTA ATC TTG GC 3'
P3	5' CTA TCT ctg cag TGT GCA CTG TGG TGC TGG CGG 3'
P4	5'CCA GCG gaa ttc TTA GGA TGG CCA GCA GGC ACT G 3'
P5	5' CCC TTG gaa ttc AGG CGG ACC GCC AGC ACC AC 3'

* les nucléotides en lettre minuscule représentent des sites de restriction

permis une sélection par coloration bleu/blanc. Les bactéries ayant acquis le vecteur poussaient sur ce milieu sélectif et les colonies blanches étaient celles qui possédaient l'insert dans le vecteur. Finalement, l'ADN plasmidique a été isolé tel que décrit dans l'Annexe 9 et l'insert a été séquencé selon la méthode décrite à la section 2.7.

2.10 Amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ADNc (5'RACE).

L'amplification rapide de l'extrémité 5' de l'ADNc a été effectuée en utilisant la trousse Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech) selon le protocole du détaillant décrit à l'Annexe 14. La stratégie utilisée est schématisée à la Figure 12.

2.10.1 Synthèse des premier et second brins de l'ADNc.

L'ADNc a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARNm de neutrophiles canins. Le premier brin a été généré par l'enzyme AMV Reverse Transcriptase. La séquence de l'oligonucléotide utilisé est trouvée au Tableau III et comprenait une queue polydT, des sites de restriction *EcoR* I et *Not* I et une séquence dégénérée. Cette synthèse a été faite en présence du radionucléotide $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (1 µCi/µl) (Mandel) afin de suivre la synthèse de l'ADNc du début à la fin. La réaction a procédé pendant une heure à 42°C. Le deuxième brin a été synthétisé en présence du «second-strand enzyme cocktail» (*E.coli* Rnase H, *E.coli* DNA polymerase I et *E.coli* DNA ligase) fourni par le détaillant. Ces enzymes ont dégradé l'ARN et

permis la synthèse du nouveau brin pendant 1h30 à 16°C. La T4 DNA polymerase ajoutée par la suite a terminé en bouts francs l'extrémité de l'ADNc pendant 45 minutes à 16°C. L'ADNc a été extrait par phénol/chloroforme et précipité en présence d'acétate d'ammonium 4M et d'éthanol 95%. Un gel d'agarose 1,2 % a permis d'évaluer la synthèse effectuée.

2.10.2 Ligation des adaptateurs.

Des adaptateurs ont été ajoutés à chacune des extrémités des ADNcs. La T4 DNA ligase a lié les adaptateurs dont la séquence apparaît dans le Tableau III.

2.10.3 Réaction de polymérase en chaîne.

Le mélange d'enzymes Advantage cDNA polymerase inclus dans la trousse a été utilisé pour la réaction de polymérase en chaîne. L'enzyme principale utilisée pour l'élongation était la KlenTaq-1 DNA Polymérase. Le mélange d'enzymes comprenait aussi une quantité minimale de polymérase ayant la qualité de correction d'épreuve et l'anticorps TaqStart. Les séquences des amorces utilisées sont représentées dans le Tableau III.

Le programme de réaction en chaîne était le suivant:

- | | |
|--------------------------|---|
| 1) dénaturation initiale | 1 minute à 94°C |
| 2) «touch-down» | 60°C à 52°C avec une décroissance de 2°C /cycle |
| 3) 20 cycles | 45 secondes à 94°C |
| | 1 minute à 50°C |

2.10.4 Isolement du produit obtenu.

Le produit obtenu a été isolé de l'agarose à l'aide de GENO-BIND suspension contenu dans la trousse de Marathon cDNA Amplification Kit et analysé tel que décrit en 2.9.3.

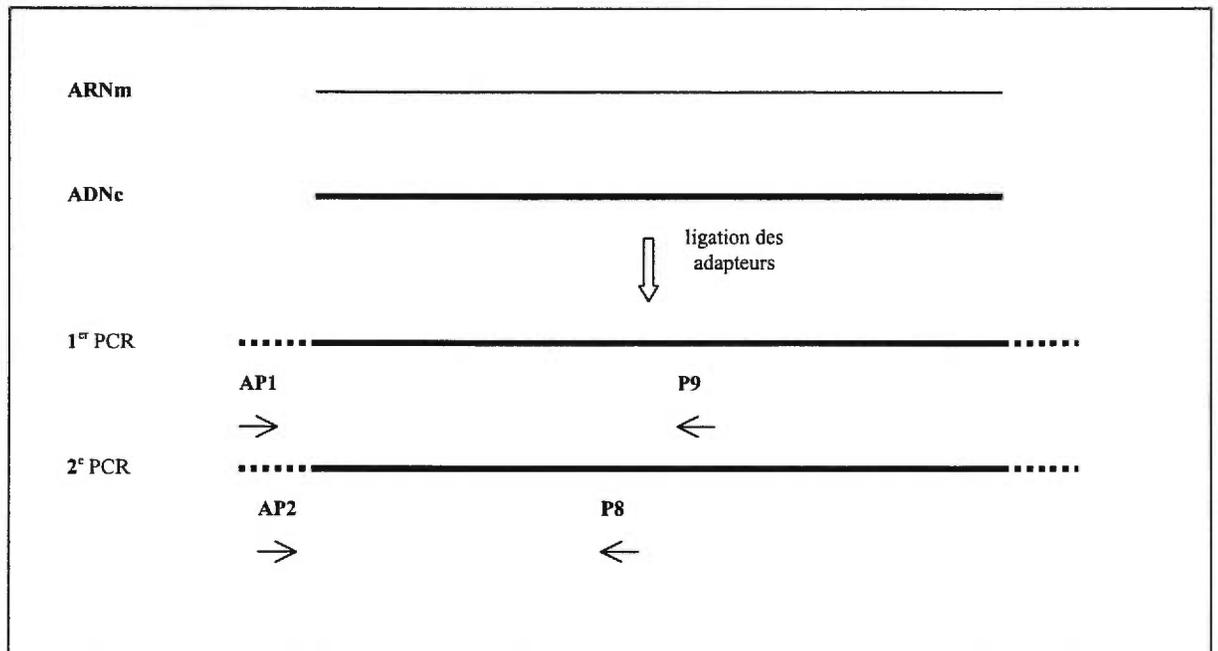


Figure 12. Stratégie de 5'RACE utilisée pour générer la région 5' de PSGL-1 canin.

Tableau III. Liste des amorces utilisées pour le 5'RACE.

«Marathon cDNA synthesis primer»

5' TTC Tag aat tcA GCG GCC GC(T)₃₀ N₁N 3'

AP1 5' CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC 3'

AP2 5' ACT CAC TAT AGG GCT CGA GCG GC 3'

P8 5' GTA ACT GCG CAC GGG GTA CAC GTG GG 3'

P9 5' TGA GAT GCA GAC CAT CTC GGT GGG G 3'

*les nucléotides en lettre minuscule représentent des sites de restriction.

Résultats

3.1 Criblage de bibliothèques d'expression canines des cellules DH-82 et de rate.

3.1.1 Reconnaissance de l'ARN messager canin par la sonde d'ADNc PSGL-1 humain.

Une sonde d'ADNc PSGL-1 humain complet a été utilisée pour cribler deux bibliothèques d'expression canines. Un buvardage de type Northern sur de l'ARN extrait de neutrophiles canins et de cellules DH-82 a été effectué pour confirmer la reconnaissance de l'ARN messager PSGL-1 canin par la sonde. Les résultats de cette analyse ont révélé que la sonde d'ADNc PSGL-1 humain reconnaissait une bande unique d'approximativement 1,5 Kb chez les neutrophiles et les cellules DH-82 (Figure 13). Le message détecté dans les neutrophiles était plus abondant que celui dans les cellules DH-82 (Figure 13).

3.1.2 Production d'une bibliothèque d'expression canine des cellules DH-82.

Une bibliothèque d'expression a été produite à partir de 5 µg d'ARNm des cellules DH-82. Le titre de la bibliothèque était de $1,43 \times 10^{10}$ pfu/ml.

3.1.3 Criblage des bibliothèques d'expression canines des cellules DH-82 et de rate.

Trois rondes de criblage de la bibliothèque des cellules DH-82 (totalisant 450 000 plages) et deux rondes de criblage de la bibliothèque de rate (totalisant 300 000 plages) ont été effectuées à l'aide de l'ADNc complet de PSGL-1 humain. Aucun clone positif n'a été isolé lors de ces criblages.

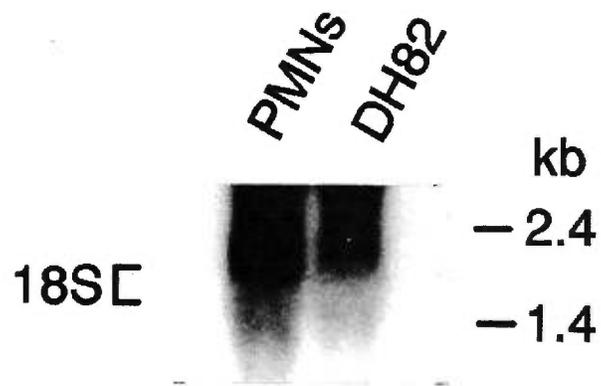


Figure 13. Reconnaissance de l'ARN messenger canin de PSGL-1 par l'ADNc de PSGL-1 humain. Un buvardage de type Northern a été effectué sur de l'ARN extrait de neutrophiles canins et de cellules DH-82 pour confirmer la reconnaissance de l'ARN messenger PSGL-1 canin par l'ADNc de PSGL-1 humain. Un message de 1,5 Kb a été détecté lors de cette analyse. Chez les neutrophiles, le message est plus abondant que dans les cellules DH-82.

3.2 Génération d'une sonde PSGL-1 canin par RT-PCR emboîtée et criblage des bibliothèques d'expression canines.

Aucun clone positif n'ayant été obtenu lors du criblage des bibliothèques d'expression des cellules DH-82 et de rate avec la sonde d'ADNc PSGL-1 humain, une sonde PSGL-1 canin générée par RT-PCR a été utilisée pour cribler à nouveau ces bibliothèques d'expression canines.

3.2.1 Génération et caractérisation d'une sonde PSGL-1 canin.

La technique de RT-PCR a été effectuée sur de l'ARN de neutrophiles canins à l'aide d'amorces non spécifiques et spécifiques au PSGL-1. Pour les réactions de PCR, les amorces non spécifiques, 3'race ext AS et 3'race int AS (Tableau II), correspondaient à l'extrémité 3' de l'ADNc produit lors de la réaction de transcription inverse. Les amorces spécifiques, P2 et P3, provenaient de la région transmembranaire de la séquence humaine. Elles ont été choisies en raison de la grande homologie présente au niveau de cette région chez le PSGL-1 humain et de souris (Tableau II et Figure 11). Une première réaction de PCR a été effectuée sur le produit de la transcription inverse avec les amorces P2 et 3'race ext AS. Une deuxième réaction de PCR (PCR emboîtée) a été effectuée sur le produit de la première amplification en utilisant les amorces internes P3 et 3'race int AS. Ceci a permis de générer un fragment d'environ 900 paires de bases (pb) (Figure 14). Ce fragment a été sous-cloné dans le vecteur pGEM-T et séquencé entièrement (Figure 15).



Figure 14. Génération de la région cytoplasmique du PSGL-1 canin par RT-PCR emboîtée. Les puits 1 à 5 représentent la première amplification en utilisant différentes amorces et sur l'ARN de neutrophiles canins et de cellules DH-82 (1= P2 et 3'race ext AS [PMN]; 2= P2 et 3'race ext AS [DH-82]; 3= contrôle négatif; 4= P1 et P5; 5= P1 et P4) et les puits 6 à 10 représentent la deuxième amplification des puits 1 à 5, respectivement (6= P3 et 3'race int AS [PMN]; 7= P3 et 3'race int AS [DH-82]; 8= contrôle négatif; 9= P1 et P4; 10= P1 et P4). La bande d'environ 900 pb du puit 6 (identifiée par la flèche), représente le fragment de PSGL-1 canin amplifié lors d'une première réaction de PCR avec les amorces 3'race ext AS et P2 (puit 1) suivie d'une amplification emboîtée avec les amorces 3'race int AS et P3 (puit 6). Le puit M indique l'échelle de poids moléculaire (1 Kb DNA ladder). Les nombres 1636, 1018, 506 indiquent le poids moléculaire de ces trois marqueurs.

L'analyse de la séquence obtenue à l'aide du logiciel Dnasis v2.0 a révélé que le fragment comprenait la région cytoplasmique de PSGL-1 canin ainsi que la région 3' non traduite (3'UTR). L'homologie entre cette séquence et celle de l'humain et de la souris est de 58,8% et 55,5%, respectivement. La séquence d'acides nucléiques a été traduite en séquence d'acides aminés avec le logiciel Dnasis v2.0 afin de la comparer avec les protéines humaines et de souris (Figure 16). Cette comparaison a révélé que la région cytoplasmique démontre un grand degré de conservation entre les trois espèces. En effet, la région cytoplasmique du PSGL-1 canin démontre 82,5% et 79,1% d'homologie avec l'humain et la souris, respectivement.

La technique de RT-PCR emboîtée a aussi été utilisée afin de tenter de générer tout l'ADNc de la région 5' à la région 3'. L'amplification de l'extrémité 5' du PSGL-1 canin a été tentée en utilisant les amorces P1 et P5 suivie d'une amplification emboîtée avec les amorces P1 et P4 (Figure 11 et Tableau II). La même stratégie a été tentée avec les amorces P1 et 3'race ext, et P1 et 3'race int. Un programme d'amplification à une seule température d'hybridation (50°C) et un autre programme décroissant («touch-down») allant de 72°C à 50°C ont été essayés afin de générer un fragment comprenant la région 5'. Ces différentes tentatives se sont révélées infructueuses.

```

1 GTGCGCCTCT CCCGCAAGAC CCACGTGTAC CCCGTGCGCA 40
41 GTTACTCCCC CACCGAGATG GTCTGCATCT CATCCCTGCT 80
81 GCCCCGAGGGG GGCGAACGCA CGCCCACCGT GGCGGCCAAC 120
121 GGGGGCCTGC CCGACGCCAA GAGCCAGGGC CTGAGGGCCG 160
161 AGCCCAGGGA GGGCCGGGAT GGGGACGACC TCACCCTGCA 200
201 GAGCTTCCTC CCTTAAcgcc ccgcccggc tccgcaccga 240
241 gcgccccctg acctccgcag ccttcccagg cccctccgg 280
281 ccgcggtga ggggagcggg gcctggggag ctgtaggaca 320
321 gggcggttgc cccaggacgg gaagcagctg aactcccaca 360
361 gccaaagcag gaccggtgag cgagccacct tgctctccct 400
401 cctgcctccc tggctcacac ctggccgggc tccctctcgg 440
441 cctccgccac tgaggtctcg tccccgtgca ccaaggaaga 480
481 cccaaagtct tctggtggct gtggtcacca tacaggaagg 520
521 aggctctggg gggagaagtg ccaggttcct gaggccattc 560
561 ctggtcaccc ctgcccccca ctgggaggca gtttggggtt 600
601 tccttgggta tctctcaagg gaaccaggt gagatcctag 640
641 ccatggggtc tgggtggctt ggagagccca gggttatata 680
681 atccttcttt gggaccatgt gtaccaatgg gcttcttccg 720
721 ggagtaaccc ccatcctgcc ctctctcaac tgcccctgtg 760
761 tccacathtt aaggtggact ctgacttgct cactccccag 800
801 cccacgctgg cacaggccct caaataaatc tttgatgaac 840
841 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 870

```

Figure 15. Séquence du fragment de 0,9 Kb de PSGL-1 canin obtenu par RT-PCR. Les nucléotides en lettres majuscules représentent une partie de la région codante.

```

Chien          VRLSRKTHVYPVRSYSPTMVCISSLLPEGGERTPTVAANG
Humain(352)    .....G.M....N.....D...GPSAT ...
Souris(332)    .....M....N.....I.....DGA.VT ...

```

```

Chien          GLPDAKSQGLRAEPREGRDGDDLTLQSFLP*
Humain(377)    ..SK..SP..TP....D.E.....H....*
Souris(381)    ...KV  .D.KT..SGD.....H....*

```

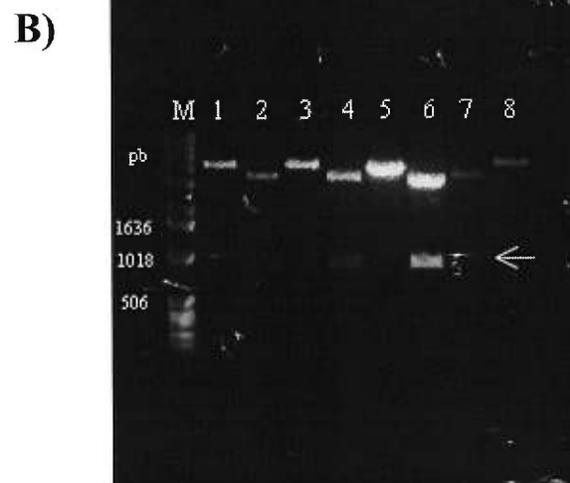
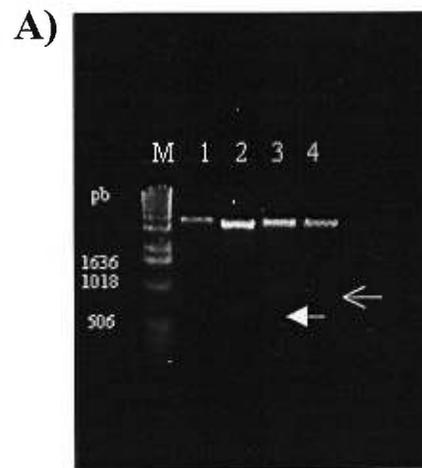
Figure 16. Comparaison de la séquence d'acides aminés de la région cytoplasmique du PSGL-1 de chien, de l'humain et de la souris. Les points représentent des acides aminés identiques. La région cytoplasmique de PSGL-1 canin démontre 82,5% et 79,1% d'homologie avec l'humain et la souris, respectivement. Les nombres entre parenthèses indiquent la position du premier acide aminé du PSGL-1 humain et de souris s'alignant à la séquence du fragment de PSGL-1 canin.

3.2.2 Criblage de deux librairies d'expression canines avec la sonde PSGL-1 canin.

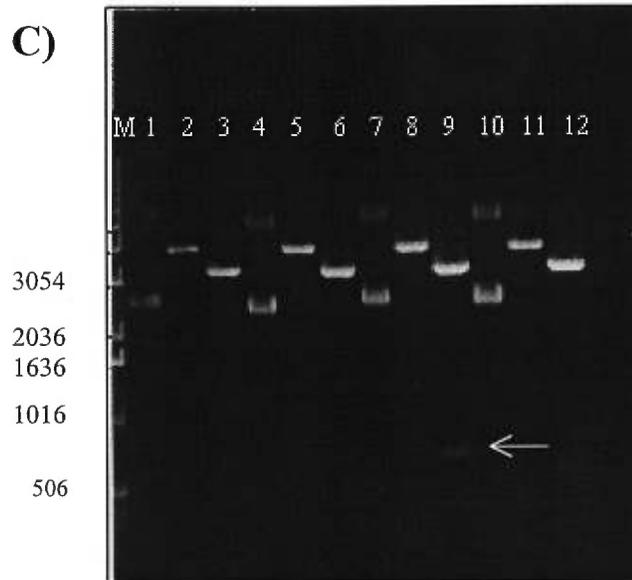
Ayant généré par RT-PCR un fragment de l'ADNc de PSGL-1 canin, les deux librairies d'expression canines ont de nouveau été criblées avec cette sonde homologue.

Lors du criblage de la librairie d'expression des cellules DH-82, 600 000 plages ont été criblées et sept clones positifs ont été obtenus. Suite à l'excision *in vivo*, l'analyse par digestion avec des enzymes de restriction a révélé qu'ils étaient tous de grandeur inférieure à la sonde PSGL-1 canin. Le clone 1 était d'une grandeur d'environ 700 pb (Figure 17A). Les clones 2 et 3 étaient de grandeur approximative de 900 pb (Figure 17A et 17B). Les clones 4, 5, 6 et 7 étaient d'une grandeur approximative de 800 pb (Figure 17C). De ces clones, trois ont été partiellement séquencés et l'analyse de ces séquences à l'aide du logiciel Dnasis v2.0 a montré que le clone 1 débutait au nucléotide 312 de la sonde PSGL-1 canin pour se terminer à l'extrémité 3' de la sonde canine. Les clones 2 et 3 étaient identiques et débutaient au nucléotide 336 de la sonde canine. Par contre, leur terminaison dépassait en 3' la sonde canine (Figure 17D). Par conséquent, le criblage de la librairie des cellules DH-82 n'a pas permis d'isoler un clone complet.

Pour la librairie d'expression des cellules de rate, 300 000 plages ont été criblées avec la sonde PSGL-1 canin. Un clone positif a été obtenu lors de ce criblage. Suite à l'excision *in vivo*, l'analyse par digestion avec des enzymes de restriction a révélé qu'il était d'une grandeur approximative de 500 pb. Étant donné sa taille inférieure à la sonde, il n'a pas été séquencé.



C)



D)

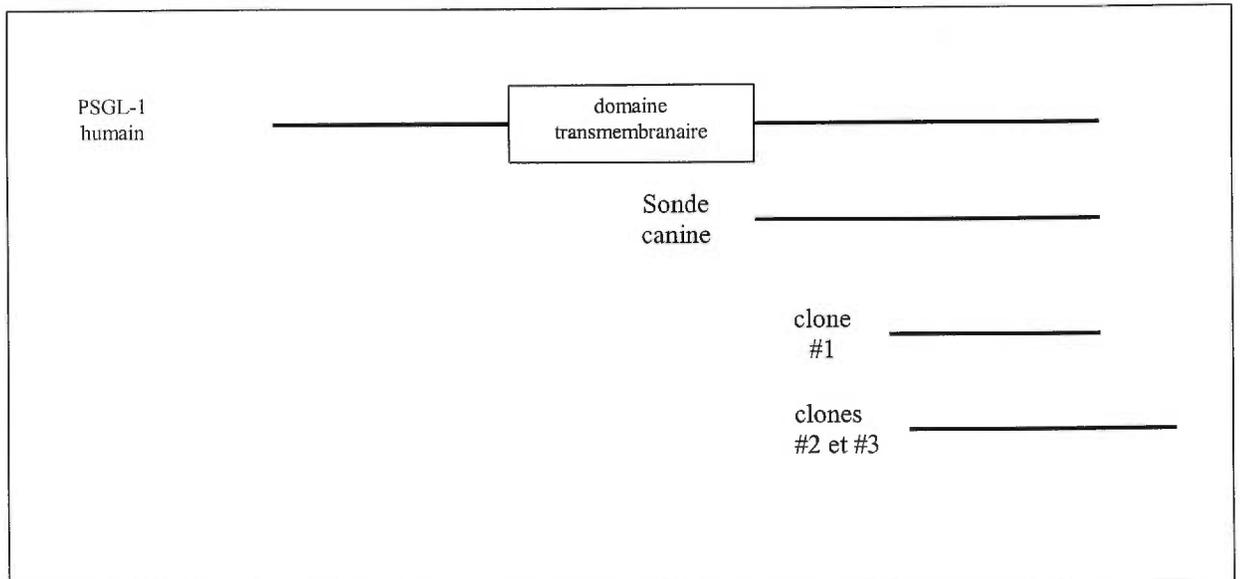


Figure 17. Analyse des clones isolés lors du criblage de la librairie d'expression des cellules DH-82 avec la sonde PSGL-1 canin générée par RT-PCR. Sept clones ont été isolés et analysés sur gel d'agarose 1,2% suite à des digestions avec différentes enzymes de restriction. A) le clone 1 (puits 1 et 2, flèche fermée) et le clone 3 (puits 3 et 4 flèche ouverte) ont été digérés avec les enzymes *Xho I/EcoR I*. B) le clone 2 (flèche) a été digéré à l'aide des enzymes *EcoR I* (puits 1, 3, 5 et 7) et *Xho I/EcoR I* (puits 2, 4, 6, et 8). C) Les clones 4, 5, 6, et 7 ont été digérés avec l'enzyme *Apa I* (puits 2, 5, 8 et 11) et *Apa I/EcoR I* (puits 3, 6, 9 et 12). Les puits 1, 4, 7, et 10 représentent les clones non-digérés. D) La localisation des clones 1, 2 et 3 en comparaison avec le PSGL-1 et la sonde canine générée par RT-PCR. Le puit M indique l'échelle de poids moléculaire (1 Kb DNA ladder). Les nombres indiquent le poids moléculaire des marqueurs.

3.3 5' RACE.

Pour tenter d'obtenir la région 5' de l'ADNc, la technique de 5'RACE a été utilisée à l'aide d'une trousse commerciale (Clontech). L'ADNc a été transcrit à partir d'ARN messager de neutrophiles canins et les adaptateurs ont été liés à l'ADNc pour effectuer la PCR. Les amorces utilisées sont listées dans le Tableau III. Les amorces AP1 et AP2 comprises dans la trousse étaient spécifiques pour les adaptateurs ajoutés à l'ADNc tandis que les amorces P8 et P9 ont été déterminées selon la séquence partielle de PSGL-1 canin obtenue par RT-PCR. Suite à une réaction de PCR emboîtée, aucun fragment n'a été obtenu et ce, en modifiant à plusieurs reprises les conditions de PCR. Les programmes utilisaient différentes combinaisons des températures d'hybridation. Ils variaient de 72°C à 68°C, de 72°C à 50°C et de 44°C à 72°C pour la première amplification et comprenaient un programme à une seule température d'hybridation à 50°C pour l'amplification emboîtée.

3.4 Criblage d'une librairie génomique canine.

La structure génomique de PSGL-1 chez l'humain est simple avec seulement deux exons dont le deuxième comprend toute la région codante pour la protéine (Veldman et coll., 1995). En se basant sur l'hypothèse que la structure génomique de PSGL-1 chez le chien s'apparente à celle de l'humain, il a été tenté de cloner le PSGL-1 canin à partir d'une librairie génomique canine. Une librairie

génomique canine a été achetée (Stratagene) et criblée avec les sondes PSGL-1 canin et PSGL-1 humain.

3.4.1 Criblage avec la sonde PSGL-1 canin.

Six rondes de criblages, pour 900 000 plages, ont été effectuées sur la librairie génomique avec la sonde PSGL-1 canin. Aucun clone positif n'a été isolé.

3.4.2 Criblage avec la sonde PSGL-1 humain.

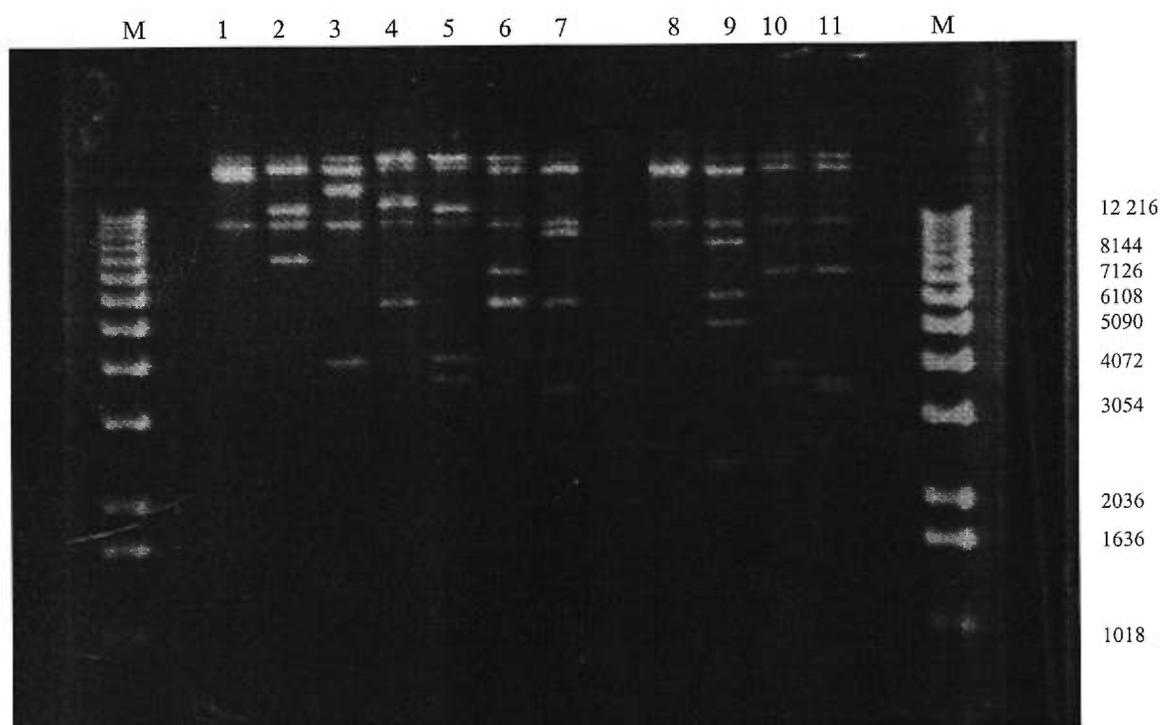
Deux rondes de criblage, pour 300 000 plages, ont permis d'isoler deux clones positifs qui ont été désignés clone 8.2 et clone 8.4. Ces clones ont été analysés par buvardage de type Southern et sous-clonés dans le vecteur pBlueScript SK- pour leur séquençage .

Le clone 8.2 a été digéré avec l'enzyme de restriction *EcoR* I pour sortir l'insert d'environ 19 Kb. Cet insert a été par la suite digéré avec les enzymes *Xho* I, *BamH* I, *Sac* I et des combinaisons de ces enzymes. La digestion par *Xho* I a donné des fragments d'environ 8 Kb et 11Kb. La digestion avec *BamH* I a généré des fragments d'environ 4 Kb et 14 Kb. L'insert digéré par *Sac* I a donné des fragments d'environ 6 et 12 Kb. Les doubles digestions de l'insert du clone 8.2 ont donné pour *Xho* I/*BamH* I des fragments d'environ 3,5 , 4 et 11 Kb, pour *Xho* I/*Sac* I deux fragments d'environ 6 Kb et un d'environ 7 Kb et finalement, la double digestion *BamH* I/*Sac* I a donné des fragments de 3,5 , 6 et 9 Kb environ (Figure 18A). Lors de l'analyse par buvardage de type Southern, les bandes de haut poids moléculaire des différentes digestions se sont hybridées à la sonde PSGL-1 humain

mais faiblement (Figure 18B). Ces fragments étant de haut poids moléculaire (environ 9-10 Kb) n'ont pas été sous-clonés.

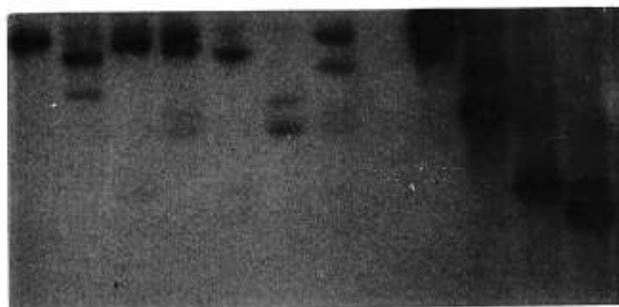
Le clone 8.4 a été digéré avec l'enzyme *EcoR* I pour sortir l'insert d'environ 23 Kb du phage Lambda DASH I. L'insert a été digéré avec l'enzyme de restriction *Xho* I pour générer des fragments de 2,5 , 5 , 6 et 9 Kb environ. Lorsque digéré avec *Sac* I, des bandes visibles de 1,5 , 2 , 2,5 , 3,5 , 4 et 7 Kb ont été obtenues. La double digestion *Xho* I/*Sac* I a généré des fragments visibles d'environ 1,5 , 2 , 3,5 , 3,5 et 7 Kb (Figure 18A). Les autres enzymes utilisées, *BamH* I et *Hind* III, ne coupaient pas dans l'insert. L'analyse par buvardage de type Southern a permis d'identifier deux fragments reconnus par la sonde PSGL-1 humain (Figure 18B). Le premier d'une grandeur d'environ 4 Kb était le résultat d'une digestion par *Sac* I et a été identifié 8.4 Sac. Le deuxième fragment d'environ 3,5 Kb a été obtenu par une digestion avec les enzymes *Xho* I/*Sac* I. Il a été identifié 8.4 Xho. Ces deux fragments ont été séquencés partiellement et l'analyse de leur séquence à l'aide du programme Dnasis v2.0 a révélé qu'elles ne s'apparentaient pas avec le PSGL-1 humain ou de souris (Figure 19).

A)



B)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



← 8.4 *Sac* I
← 8.4 *Xho* I

Figure 18. Analyse des clones isolés lors du criblage de la librairie génomique canine avec l'ADNc de PSGL-1 humain. Deux clones ont été isolés et analysés sur gel d'agarose 1,2% suite à des digestions avec différentes enzymes de restriction ainsi que par buvardage de type Southern. A) Le clone 8.2 a été digéré avec *EcoR* I (puit 1), *Xho* I (puit 2), *BamH* I (puit 3), *Sac* I (puit 4), *Xho* I/*BamH* I (puit 5), *Xho* I/*Sac* I (puit 6) et *BamH* I/*Sac* I (puit 7). Le clone 8.4 a aussi été digéré avec les enzymes *EcoR* I (puit 8), *Xho* I (puit 9), *Sac* I (puit 10) et *Xho* I/*Sac* I (puit 11). B) Le buvardage de type Southern montre que la sonde PSGL-1 humain reconnaît des fragments de haut poids moléculaire pour le clone 8.2 et des fragments de 4 Kb (digéré avec *Sac* I, flèche ouverte) et de 3,5 Kb (digéré avec *Xho* I/*Sac* I, flèche fermée) pour le clone 8.4. Le puit M indique l'échelle de poids moléculaire (1 Kb DNA ladder). Les nombres indiquent le poids moléculaire des marqueurs.

A)8.4 Xho T3

TCAATTCGCCCTATAGTGABBBBBBBBBBBBYMRAGCCCTGCTGGTGGGGACAT
 CAGCCTTCTT CACAAGCCCTGCACCTTGGGAGCCCCAAGGATGAGCCCAGCTGA
 TGCTAGCTCAGTGCTTTCGTGTGCAAACTCATAAGTGTGGGAAAAATGCTCTC
 ATCTTGAGAAAGGGTCATCTTGTCACTTAAGAAGTCCCTGGTCCAGCTCTGCCC
 CAGACTAGGCGGCGTCTACACCACAGGAGCTTCTGCTTCTCTCTCCTTAATT
 GTCAGGGACAGAGAAGACGCTCCCAGTATCACACCATGTCCACCCCTTTGGGAA
 AACTCTCGGTGGCACAGTGCTGTGATTCCCTGCCTATAAAAAAGTAAGTTGGT
 ATCACCTACCTCATTGGGTGGGATGGGGATGAGCCTGCTGCCCGGTGTTAGGAA
 CCATGCCTAGAACATGATACCCACCACAGTGTGGGCTGTCATTATTTGCTAAG
 GAGGAGATGTGCAGATACTCTGAGCATGTGGGGGGTCCATGCAGGAGGAGATCT
 GTGCAGTAATGGTGGTCTGTGTTGTGAGGGAAGTCTGTAAAGTGAAGCGGAAT
 GTGCTGTGTGGGAGGTCTGTATAGTGTAGGTGGTCTGTGCAGT

B)8.4 Xho T7

GACTGCTTCACCTTCTGATTAAGTGGACAAAAGATGCCTTGAAATAAACAATGAG
 TGTATCCATTCCCAAGATCAACAAAAGTGGTCAGGTCAGCAAAGTCTTTCCATG
 CTGTGGAGCTGAAAAGGGGCAGAGAGAGAATGAGCAAAGGAGGGGCCTCTGTGCC
 TGGTGGCCCCGCGAAGAAGCAACTGTCCTGCCACCTGCTGGAGAACCGCTGCTTC
 CCTGGGCCTCAGCTGGCCCCAGTCAGGGTGGGAGGAGTGCCCAGTGGTCACGTCC
 TGGCTGAGACGCAAGGGTGTGAAGCCATGAACCCACAGTGCGGGCAGAGGAAGG
 GACTGATGCCTCTATGGTCAGCTTCCCCTCTGCCCCAGACCCACACTTCCAG
 CCCATCCATCACCTGTGCAGACTACCTCACTGGACATAACCACCTCACTGCACA
 GAC

C)8.4 Sac T7

TCAATACTCTTTATAAGAGGTCGTTGGAATCAGGCAAACCTTGATAACACTCTACA
 TCTTTCTTATCTTAATCTCATCGAGGCTGGATGGTCAGTTTCTAATTTAATATGA
 TACCATATTTCCCAGATTATTTACCCTTAGGGCTGAATTAAGTCTGCTCTGCAGTTT
 TACCAAGAGGTACATACTTTACAAGGAATAAACACAAATTCAGACTCTGCTAATT
 TGAAATTTGTGGAAACATGGGGCGTTTGACGTTAATCATACTCAATATAAAACAG
 GCTAAATGAATGCACCAAGAGGTTGCAGGGGAGGTGCAAGGGACACAACCCTCCT
 TGTGCACTTGTGCCAGACACAGGGGCCAGGCACGTGGGCCCTCACCAGGGGCTG
 CATCAGGTGGACACCTTGGCTAGTGTAGTGGAAATTTTAGTTAACAGCTAAATAC
 TCTAACAACTGTTCTCTGTGCTCACATGGGCCATCTCACCCCAGAGGGTCTTTGA
 TGGATGGGCTGGAAGTGCAGGCCTTGGCCTGCCTCCTCTTGCCCCACTGGGTGT
 CAGAGTCCCAGAGTACATGGAGGGGACACTGAGTGACCAGGGCTCATCGCCTGCT
 CCCCAGGGGTCTTAGAGGCTGTTTGCCCTTCTGGAAGAACAGTACCCTCCCAAGA
 ATATTTCCAAGGCTCAAGGAATTGTGAAACAAAACCAAAAAAACTCTGTTGATGG
 AACCAGAGCACACACTGTGGCGACTTGTTTACGAACAAGAGTGGGGACCTCTGAC
 CGACACGACATGCTTACCCAGGAGGGATGAGAGGGCCACCAGGGTCCACAGGGCG
 ACGTAGGAAGGGGCCCCACACAGAGGGCCGCGGACGACTGGCCACTGGGGTCCCG
 GTGCCATTTCCGGATGAGTGTAGGCCCAATCCCCTGGCCCTGGCTGATGAGCCTCT
 GGGAGTGGATGGTGGCCGTGAGCCAGGCCACCAGCACAAAGACACACGGGCCCTG
 TGCCACATGCTGTGTGTGGGGTGCCAGGCTCCCAACAGGGTCTGGATATCCACT
 GTGGGCTTCAACACTTGTGGTGGTGACCTTGTCTGCGCAGCTCATCCCAAAGCTG
 AGCCTGCTCTGCCCACAACCTCCACCTGCCTTCCCTCGACTAACTGTAAGCCCAG
 CCTTGTCTTGGGCAGCCTGTGAGCCCCAGGCCACCCCAGATAAGCTCCTGCTT
 CCTTCCTTCTTACTCTGCAGCGGACTTCCCTTGGGGCTGCACCGCAGAGTTCAA
 AGTCTTTGCTGGGAAGGGTTGTCCATGTCCCTGTGCTGGGAAGATAAGGGGCC
 GCCCGTCCCTCCACAAGATTAGGTGTTGCCTGTACATAAAAATAAAGCAGATGA
 AGGAAAGGGGTTAATTGCTTCTTTATCAGGTGTTTCAGTCTTTGGAAAACGGCG
 TGGGATGGGGAAAGCACACCCAGTAATACCTGCAAACCCAGAGTGGCAGCCAAGT
 TACCCTGTGGGGTCTGCAGCAGGATGTCCCTCCAGACCCCCTCACCTCCCTGGG
 TGTCA

D) 8.4 Sac T3

CTGCATGGGGACTCATGACTCTATTGGGGGGGGGGTTTCCCTGTGTTTACATC
 ACTTGATTGACATCATCTGTTGGTTTTTGGAGGTTCTTGGGCCTCAGTTTCTCAA
 GTCTCACTCCTGAGACATTCTTGTGGTCTCCTGGGCTGGGGCCCTCCTGGGTGC
 AAGAGCTTCAATCATGTGACAATTCTCCTCTCCTCTTCCCCGGGCACTCTGACGT
 GCCTGCCGTGCTGGGCCACATCAGCCCCAACCCACCCGCCGGTGGGAACCATTT
 CTCTATGGCTGCCTACACTGTGTGTGGTGCAGGGGCAAGAGTGTGTGTGTGTTTT
 AAATATATAAACTGCTTTATTTGTAGATTTTTTTTTCTGTCTATTTTTAAAT
 GTTACTCTTGACAGAAATACTGCAAGAACAGTCCAAGAACTTTCTCTCATGCG
 ACGGTGTAAGAATAAGCTTCCCCTGTGATCACCCCCACCCACGAGTCAGGATGCG
 TGTGCCACGTGCTCGCTCTGACCTTACACAGACGTAGTGTGTTTCAGGCATCTT
 CACTGTGAACTGACTTTCTCCACTATGTCATTAATAAGCGTTGTGTGGCAGGCT
 TTCGAGGATGAAAACATCATGTTCCCTCBTCAGATTTTCCACACATGGACTTGAGT
 AAGAATGGACTCATGGGCTCCAGTTTTATTTCGATAGCTTATAAATCATTACTATT
 ATTATTTGTTTCCATGATCGAATTGTCCCACTTCAGCTGGCATGTGCTGGCTTCG
 CACAGCCTCATCATTGTTAAGATAATTCTTCACTTTCTGACATGGGTTCCCTGATT
 TATCTTCCCAGGGGTGCAGGGCTTCTTCTGGGGGGAAGTGGGACTTGAAAGCCA
 GGCCCCGGCACTGGATGTGCTCGTGGCTGAGGGGGCGATGCCGAGGTGGGGGCACG
 CACGCTCACTCACACCTACGGTTTTtYTYtGTATCTGCTTGTGTTTACTTGTGAAG
 GATTTTATTCATTTGCTCGACAGAGAGAGGGCACGAGCAGCAGGAAGAGGCAGAT
 GCCCCACTGAGCGGAGAGCCCTACGGGGGACTCGATTCCAGGACCAGAGCCCCCA
 GGTGCCCGAGCCACCTGTGTATTTTGAAAATGATCCATTACACAGATACTATC
 AGTTCCAATCCTGACTTGAATTTGCTTTTCTTTTTTCCC

Figure 19. Séquences partielles des clones 8.4 Xho et 8.4 Sac. Suite à l'analyse par buvardage de type Southern, deux fragments du clone 8.4, identifiés 8.4 Xho (A et B) et 8.4 Sac (C et D), ont été isolés, sous-clonés dans le vecteur pBlueScript SK- et partiellement séquencés.

Discussion

La P-sélectine est une molécule d'adhésion qui joue un rôle important dans l'adhésion des neutrophiles à la paroi vasculaire lors de la réponse inflammatoire. Elle est impliquée dans plusieurs pathologies humaines, notamment les dommages reliés à l'ischémie-reperfusion (Winn et coll., 1993), les métastases de certains types de cancer (Stone et coll., 1993; Wagner, 1995) et la maladie LADII (Etzioni et coll., 1992). Chez le chien, il a récemment été démontré que l'expression de la P-sélectine est augmentée lors de plusieurs types de dermatites et qu'il existe une corrélation significative entre l'expression de la P-sélectine et l'infiltration locale de cellules inflammatoires (Chénier et Doré, 1998). Ces observations suggèrent que la P-sélectine pourrait être impliquée dans la pathogénie de certaines dermatites chez le chien. Le ligand de la P-sélectine est le PSGL-1 qui est localisé à la surface des leucocytes. Il a été démontré comme ligand de haute affinité pour la P-sélectine. Très peu d'informations étant présentement connues sur le PSGL-1 chez le chien, le but de cette étude était de caractériser le ligand pour la P-sélectine sur les neutrophiles canins afin d'en étudier éventuellement le rôle et l'implication lors de processus pathologiques.

Afin de cribler les bibliothèques d'expression canines, deux sondes d'ADNc de PSGL-1 humain étaient disponibles. La première étape a consisté à vérifier si ces sondes reconnaissaient l'ARN messager de PSGL-1 canin. Chez l'humain, le PSGL-1 est exprimé par plusieurs types de leucocytes, notamment les neutrophiles, et par certaines lignées cellulaires dont les cellules HL-60 qui sont des précurseurs des neutrophiles et des monocytes (Sako et coll., 1993). On le retrouve aussi chez

différentes lignées de cellules lymphocytaires comme les cellules Jurkat et les Namalwa (Fujimoto et coll., 1996; Laszik et coll., 1996). L'ARN extrait de neutrophiles canins et de cellules DH-82 (lignée de monocytes canins) a donc servi à vérifier la reconnaissance des sondes humaines. Un message unique d'environ 1,5 Kb a été détecté dans les neutrophiles et dans les cellules DH-82. En comparaison, les neutrophiles humains renferment deux messages de grandeur différente pour le PSGL-1, soit un message plus abondant de 2,5 Kb et un deuxième message mineur de 4 Kb (Sako et coll., 1993). Chez la souris, le message est d'une longueur de 1,8 Kb mais il existe une forme mineure de l'ARN messager d'environ 3,4 Kb dans les lignées cellulaires 32DC13 (lignée de neutrophiles), PU5-1.8 (lignée de monocytes-macrophages) et les cellules myélomonocytiques WEHI-3B de souris (Yang et coll., 1996). La différence de longueur entre les messages de l'humain et de la souris est due au nombre de répétitions décameriques, soit 15 chez l'humain et 10 chez la souris (Sako et coll., 1993; Yang et coll., 1996). La grandeur du message de PSGL-1 canin (1,5 Kb) suggère que le nombre de répétitions décameriques chez le chien se rapproche plus de celui de la souris que de celui de l'humain. Veldman et coll., (1995) a démontré qu'il y aurait une utilisation différentielle des sites de polyadénylation pour générer les deux messages humains de taille différente sans toutefois préciser le rôle de ces deux messages. Chez la souris, l'utilisation différentielle est peu probable car les deux sites de polyadénylation sont adjacents et ne peuvent faire la distinction entre les deux messages (Yang et coll., 1996).

Le criblage de deux bibliothèques d'expression a été effectué avec la sonde complète

d'ADNc de PSGL-1 humain mais aucun clone positif n'a été obtenu. Une des raisons pouvant expliquer ce résultat négatif est une faible homologie entre le PSGL-1 humain et canin. Bien qu'un message ait été détecté dans les cellules canines par buvardage de type Northern, ce message était de faible intensité. Une faible intensité peut être due à une petite quantité de message présent ou encore à un faible degré d'homologie entre la sonde utilisée et le message à détecter. L'homologie entre le PSGL-1 humain et celui de la souris est approximativement de 50% (Yang et coll., 1996).

Compte tenu des résultats négatifs du criblage des bibliothèques d'expression, une méthode alternative a été tentée. En se basant sur les régions de PSGL-1 présentant la plus forte homologie entre l'humain et la souris, des amorces ont été synthétisées et utilisées pour tenter de générer par RT-PCR une sonde canine. Un fragment de 870 pb a été obtenu et l'analyse de sa séquence a révélé qu'il correspondait à la région cytoplasmique du PSGL-1 et à tout le 3'UTR. Cette région du PSGL-1 canin présente 58,8% et 55,5% d'homologie au niveau des acides nucléiques avec le PSGL-1 humain et de souris, respectivement. Lorsque la séquence est traduite en acides aminés, l'homologie du domaine cytoplasmique est de 82,5% avec la protéine humaine et de 79,1% avec celle de souris. Une forte homologie (76%) dans la région cytoplasmique a aussi été rapportée entre la protéine humaine et celle de souris (Yang et coll., 1996). Généralement, les acides aminés les mieux conservés dans une protéine sont ceux qui sont directement impliqués dans la fonction biologique de cette protéine (Creighton, 1993). On peut donc supposer que la région cytoplasmique de PSGL-1 joue un rôle important, possiblement dans la voie de signalisation. Il a récemment été démontré que

l'interaction de la P-sélectine avec les monocytes entraîne l'augmentation de l'expression du gène pour le facteur tissulaire dans les monocytes (Celi et coll., 1994).

On peut supposer que le PSGL-1 est possiblement impliqué dans les voies de signalisation conduisant à l'expression de ce facteur.

Le criblage des librairies d'expression canines avec la sonde PSGL-1 canine générée par RT-PCR a permis d'isoler sept clones de la librairie des cellules DH-82 et un clone de la librairie de rate. Il est connu que les molécules d'ARN messager peuvent prendre des structures secondaires très stables et que la dénaturaion peut devenir difficile (Lehninger et coll., 1993). Il est donc possible que la réaction de transcription inverse ayant généré des fragments d'ADNc de grandeurs diverses n'ait pu transcrire le message de PSGL-1 au complet dû à la présence de telles structures secondaires.

Ayant réussi à séquencer partiellement en région 3' le PSGL-1 canine, la technique de 5'RACE a été tentée pour obtenir la région 5' et ce, à l'aide d'une trousse commerciale. Des amorces spécifiques ont été générées en se basant sur la séquence partielle de PSGL-1 canine obtenue par RT-PCR. Suite à plusieurs essais, aucun résultat n'a été obtenu. La trousse commerciale utilise des adaptateurs non spécifiques qui sont liés à l'ADNc suite à sa synthèse. Il est possible que la ligation de ces adaptateurs ne se soit pas produite correctement, empêchant ainsi la réaction de polymérase en chaîne.

Finalement, la dernière tentative a été de cribler une librairie génomique de rate canine avec la sonde PSGL-1 canine et la sonde PSGL-1 humain complet. Lors de ce criblage, deux clones positifs ont été isolés à l'aide de la sonde humaine. Bien que ces clones étaient reconnus par la sonde par buvardage de type Southern, l'analyse de leur

séquence a révélé qu'ils ne correspondaient pas au PSGL-1. L'identité de ces clones n'a pu être déterminée car ils ne correspondaient à aucun gène connu et représentent probablement des artéfacts de criblage. Une faible homologie entre le PSGL-1 humain et le PSGL-1 canin pourrait expliquer les résultats négatifs du criblage de la librairie génomique. Alternativement, il est possible que la librairie génomique utilisée n'était pas représentative.

Conclusion

Ce projet a permis de caractériser partiellement le PSGL-1 canin par la technique de RT-PCR emboîtée. Un fragment de 870 pb comprenant la région cytoplasmique et le 3'UTR a été généré. L'analyse de sa séquence a révélé une homologie de 58,8% et 55,5% avec la séquence de nucléotides de PSGL-1 humain et de souris, respectivement. Au niveau de la séquence protéique, l'homologie est de 82,5% avec la protéine humaine et de 79,1% avec celle de souris.

Certaines autres approches pourraient être tentées pour compléter le clonage du PSGL-1 canin. Par exemple, le criblage d'une nouvelle librairie d'expression canine pourrait être tenté. Aussi, le criblage des librairies avec une nouvelle sonde canine (tel l'un des clones obtenus lors du criblage de la librairie des cellules DH-82) pourrait également être essayé. Finalement, une approche au niveau protéique pourrait être tentée par l'isolement de la protéine PSGL-1 à partir de membranes de neutrophiles sur une colonne d'affinité de P-sélectine canine. Le clonage complet du PSGL-1 canin permettra éventuellement d'étudier les interactions entre la P-sélectine et le PSGL-1 dans divers processus pathologiques chez le chien.

Bibliographie

- Abbassi, O., Kishimoto, T.K., McIntire, L.V., and Smith, C.W. (1993A) Neutrophil adhesion to endothelial cells. *Blood Cells* **19**, 245-259.
- Abbassi, O., Kishimoto, T.K., McIntire, L.V., Anderson, D.C., and Smith, C.W. (1993B) E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J. Clin. Invest.* **92**, 279-2730.
- Addison, W. (1843) *Trans. Provinc. Med. Surg. Assoc.* **11**, 223-306.
- Ahearn, J.M., and Fearon, D.T. (1989) Structure and function of the complement receptor CR1 (CD35) and CR2 (CD21). in: *Advances in Immunology*. FJ Dixon, Academic Press, New York. Vol 46, 183-219.
- Alon, R., Fuhlbrigge, R.C., Finger, E.B., and Springer, T.A. (1996) Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *J. Cell Biol.* **135**, 849-865.
- Arbones, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Radich, H., Maynard-Curry, C., Capon, D.J., and Tedder, T.F. (1994) Lymphocyte homing and leucocyte rolling and migration are impaired in L-selectin (CD62L) deficient mice. *Immunity* **1**, 247-260.
- Arfors, K.E., Lundberg, D., Lundberg, K., Beatty, P.G., and Harlan, J.M. (1987) A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leucocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* **69**, 338-340.

- Arnaout, M.A. (1990) Structure and function of the leucocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* **75**, 1037-1050.
- Berg, E.L., Robinson, M.K., Mansson, O., Butcher, E.C., and Magnani, J.L. (1991) A carbohydrate domain common to both sialyl Le (a) and sialyl Le (X) is recognized by the endothelial cell leucocyte adhesion molecule ELAM-1. *J. Biol. Chem.* **266**, 14869-14872.
- Berg, E.L., Magnani, J., Warnock, R.A., Robinson, M.K., and Butcher, E.C. (1992) Comparison of L-selectin and E-selectin ligand specificities: the L-selectin can bind the E-selectin ligands sialyl Le (X) and sialyl Le (a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1048-1055.
- Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C. (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MadCAM-1. *Cell* **74**, 185-195.
- Berman C.L., Yeo, E.L., Wencel-Drake, J.D., Furie, B.C., Ginsberg, M.H., and Furie, B. (1986) A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *J. Clin Invest.* **78**, 130-137.
- Bevilacqua, M.P., Poher, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S., and Gimbrone M.A. Jr. (1987) Identification of an inducible endothelial-leucocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 9238-9242.

- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A. Jr., and Seed, B. (1989) Endothelial leucocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **243**, 1160-1165.
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R., Paulson, J., Rosen, S., Seed, B., Siegelman, M., Springer, T., Stoolman, L., Tedder, T., Varki, A., Wagner, D., Weissman, I., and Zimmerman, G. (1991) Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell* **67**, 233.
- Bevilacqua, M.P., and Nelson, R.M. (1993) Selectins. *J. Clin. Invest.* **91**, 379-387.
- Bruehl, R.E., Moore, K.L., Lorant, D.E., Borregaard, N., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., and Bainton, D.F. (1997) Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 489-499.
- Carraway, K.L., and Hull, S.R. (1991) Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology* **1**, 131-138.
- Celi, A., Pelligrini, G., Lorenzet, R., DeBlasi, A., Ready, N., Furie, B.C., and Furie, B. (1994) P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8767-8771.
- Chen, A., Engel, P., and Tedder, T.F. (1995) Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leucocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 519-530.

- Chénier, S., and Doré, M. (1998) P-selectin expression in canine cutaneous inflammatory diseases and mast cell tumors. *Vet. Pathol.* **35**, 85-93.
- Collins, T., Williams, A., Johnston, G.I., Kin, J., Eddy, R., Gimbrone, M.A. Jr., and Bevilacqua, M.P. (1991) Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leucocyte adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* **266**, 2466-2473.
- Corral, L., Singer, M.S., Macher, B.A., and Rosen, S.D. (1990) Requirement for sialic acid on neutrophils in a GMP-140 (PADGEM) mediated adhesive interaction with activated platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 1349-1356
- Cotran, R.S., Kumar, V., and Robbins, S.L. (1999) *Pathologic basis of disease*. 6th ed. W.B. Saunders company, USA.
- Creighton, T.E. (1993) *Proteins: structures and molecular properties*. 2nd ed. W.H. Freeman, USA.
- Cybulsky, M.I., and Gimbrone, M.A.Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**, 788-791.
- Cyster, J.G., Shotton, D.M., and Williams, A.F. (1991) The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* **10**, 893-902.
- de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Schwarting, R., and Springer, T.A. (1991) Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J. Exp. Med.* **174**, 253-267.

- Disdier, M., Morrissey, J.H., Fugate, R.D., Bainton, D.F., and McEver, R.P. (1992) Cytoplasmic domain of P-selectin (CD62) contains the signal for sorting into the regulated secretory pathway. *Mol. Biol. Cell.* **3**, 309-321.
- Dixit, V.M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L.B., Wolf, F.W., O'Rourke, K., Ward, P.A., Prochownik, E.V., and Marks, R.M. (1990) Tumor necrosis factor-alpha induction of a novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J. Biol.Chem.* **265**, 2973-2978.
- Doré, M., Hawkins, H.K., Entman, M.L., and Smith, C.W. (1993A) 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.
- Doré, M., Korthuis, R.J., Granger, D.N., Entman, M.L., and Smith, C.W. (1993B) P-selectin mediates spontaneous leucocyte rolling in vivo. *Blood* **82**, 1308-1316.
- Doré, M., Simon, S.I., Hughes, B.J., Entman, M.L., and Smith, C.W. (1995) P-selectin- and CD18-mediated recruitment of canine neutrophils under conditions of shear stress. *Vet. Pathol.* **32**, 258-268.
- Doré, M., Burns, A.R., Hughes, B.J., Entman, M.L., and Smith, C.W. (1996) Chemoattractant-induced changes in surface expression and redistribution of a functional ligand for P-selectin on neutrophils. *Blood* **87**, 2029-2037.
- Doré, M., and Sirois, J. (1996) Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. *Vet. Pathol.* **33**, 662-671.
- Drickamer, K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in

animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560.

Dunon, D., Mackay, C.R., and Imhof, B.A. (1993) *Adhesion in leucocyte homing and differentiation*. Springer-Verlag, New York.

Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1988) Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J. Cell Biol.* **107**, 321-331.

Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M.E., and Lobb, R.R. (1990) VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leucocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**, 577-584.

Etzioni, A., Frydman, M., Pollack, S., Avidor, I., Phillips, M.L., Paulson, J.C., and Gershoni-Baruch, R. (1992) Recurrent severe infections caused by a novel leucocyte adhesion deficiency. *N. Engl. J. Med.* **327**, 1789-1792.

Etzioni, A., Phillips, L.M., Paulson, J.C., and Harlan, J.M. (1995) Leukocyte adhesion deficiency (LAD) II. in: *Cell adhesion and human disease*. Wiley, Chichester. 51-62

Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B.K. (1992) The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Le (X) oligosaccharide. *J. Cell Biol.* **117**, 895-902.

Frenette, P.S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (1995) Platelets roll

on stimulated endothelium in vivo: An interaction mediated by P-selectin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 7450-7454.

Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.

Frydman, M., Vardimon, D., Shalev, E., and Orlin, J.B. (1996) Prenatal diagnosis of LADII syndrome. *Prenatal diagnosis* **16**, 266-269.

Fuhlbrigge, R.C., Alon, R., Puri, K.D., Lowe, J.B., and Springer, T.A. (1996) Sialylated, fucosylated ligands for L-selectin expressed on leukocytes mediate tethering and rolling adhesions in physiologic flow conditions. *J. Cell Biol.* **135**, 837-848.

Fujimoto, T.T., Masaaki, N., Takafuta, T., Shimomura, T., Fujimura, K., and Kuramoto, A. (1996) Expression and functional characterization of the P-selectin glycoprotein ligand-1 in various cells. *International J. Hematology* **63**, 231-239.

Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983) A cell-surface molecule involved in organ specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**, 30-34.

Gamble, J.R., Skinner, M.P., Berndt, M.C., and Vadas, M.A. (1990) Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein GMP-140. *Science* **249**, 414-417.

Gearing, A.J., and Newman, W. (1994) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol. Today* **14**, 506-512.

- Handa, K., Nudelman, E.D., Stroud, M.R., Shiozawa, T., and Hakomori, S. (1991)
Selectin GMP-140 (CD62; PADGEM) binds to sialosyl-Le (a) and sialosyl-
Le (X), and sulfated glycans modulate this binding. *Biochem. Biophys. Res.
Commun.* **181**, 1223-1230.
- Harlan, J.M., and Liu, D.Y. (1992) *Adhesion: its role in inflammatory disease*. W.H.
Freeman and Company, New York.
- Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., and Sims, P.J. (1989)
Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied
by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule
membrane protein GMP-140. *J. Biol. Chem.* **264**, 7768-7771.
- Hauss P., Selz F., Cavazzana-Calvo M., Fischer A. (1995) Characteristics of
antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells
with CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2285-2294.
- Hernandez-Caselles T., Rubio G., Campanero M.R., del Pozo M.A., Muro M.,
Sanchez-Madrid F., Aparicio P. (1993) ICAM-3, the third LFA-1
counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated
T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2799-2806.
- Hession, C., Osborn, L., Goff, D., Chi-Rosso, G., Vassallo, C., Pasek, M., Pittack,
C., Tizard, R., Goelz, S., McCarthy, I.L., Hopple, S., Lobb, R. (1990)
Endothelial leucocyte adhesion molecule-1: direct expression cloning and
functional interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1673-1677.
- Hogervost, F., Kuikman, I., von dem Borne, A.E.G.Kr., and Sonnenberg, A. (1990)

Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contain a unique 118 kD cytoplasmic domain. *EMBO J.* **9**, 765-770.

Hourcade, D., Holers, V.M., and Atkinson, J.P. (1989) The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. in: *Advances in Immunology*. FJ Dixon, Academic Press, New York. Vol 45, 381-416.

Hsu-Lin, S., Berman, C.L., Furie, B.C., August, D., and Furie, B. (1984) A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J. Biol. Chem.* **259**, 9121-9126.

Hunkapillar, T., and Hood, L. (1989) Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv. Immunol.* **44**, 1-63.

Imai, Y., Lasky, L.A., and Rosen, S.D. (1992) Further characterization of the interaction between L-selectin and its endothelial ligands. *Glycobiology* **2**, 373-381.

Janeway, C.A.Jr., and Travers, P. (1997) *The immune system in health and disease*. 3rd ed. Current Biology Ltd, UK/Garland Publishing Inc., USA

Jentoft, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem. Sci.* **15**, 297-294.

Johnston, G.I., Cook, R.G., and McEver, R.P. (1989A) Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* **56**, 1033-1044.

Johnston, G.I., Kurosky, A., and McEver, R.P. (1989B) Structural and biosynthetic

studies of the granule membrane protein, GMP-140, from human platelets and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 1816-1823.

Johnston, G.I., Bliss, G.A., Newman, P.J., and McEver, R.P. (1990) Structure of the human gene encoding GMP-140, a member of the selectin family of adhesion receptor for leucocytes. *J. Biol. Chem.* **265**, 21381-21385.

Jones, T.C., Hunt, R.D., and King, N.W. (1997) *Veterinary pathology*. 6th ed. Williams and Wilkins, USA.

Jutila, M.A., Rott, L., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1989) Function and regulation of the neutrophil Mel-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and Mac-1. *J. Immunol.* **143**, 3318-3324.

Kansas, G.S., Saunders, K.B., Ley, K., Zakrzewicz, A., Gibson, R.M., Furie, B.C., Furie, B., and Tedder, T.F. (1994) A role for the epidermal growth factor-like domain of P-selectin in ligand recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* **124**, 609-618.

Kavanaugh, A.F., Lightfoot, E., Lipsky, P.E., and Oppenheimer-Marks, N. (1991) Role of CD11/CD18 in adhesion and transendothelial migration of T cells. *J. Immunol.* **146**, 4149-4156.

Koedam, J.A., Cramer, E.M., Briend, E., Furie, B., Furie, B.C., and Wagner, D.D. (1992) P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J. Cell Biol.* **116**, 617-625.

Kuijpers, T.W., Raleigh, M., Kavanagh, T., Janssen, H., Calafat, J., Roos, D., and

- Harlan, J.M. (1994) Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculotubular shape. A tubulin-driven process. *J. Immunol.* **152**, 5060-5069.
- Larson, R.S., and Springer, T.A. (1990) Structure and function of leukocyte integrins. *Immunol. Rev.* **114**, 181-217.
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Yednock, T.A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., NGuyen, T., Stachel, S., and Rosen, S.D. (1989) Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* **56**, 1045-1055.
- Laszik, Z., Jansen, P.J., Cummings, R.D., Tedder, T.F., McEver, R.P., and Moore, K.L. (1996) P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* **88**, 3010-3021.
- Lawrence, M.B., and Springer, T.A. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**, 859-873.
- Lefer, D.J., Flynn, D.M., and Buda, A.J. (1996) Effects of a monoclonal antibody directed against P-selectin after myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* **270**, H88-H98.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., and Cox, M.M. (1993) *Principles of biochemistry*, 2nd ed. Worth Publishers, USA.
- Lenter, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1994) Monospecific and common glycoprotein ligand for E- and P-selectin on myeloid cells. *J.*

Cell Biol. **125**, 471-481.

- Levinovitz, A., Muhlhoff, J., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1993) Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J. Cell Biol.* **121**, 449-459.
- Lewinsohn, D.M., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C. (1987) Leucocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leucocytes. *J. Immunol.* **138**, 4313-4321.
- Ley, K., Bullard, D., Arbones, M.L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T.F., and Beaudet, A.L. (1995) Sequential contribution of L- and P-selectin to leucocyte rolling in vivo. *J. Exp. Med.* **181**, 669-675.
- Ley, K., and Tedder, T.F. (1995) Leucocyte interactions with vascular endothelium: New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J. Immunol.* **155**, 525-528.
- Li, F., Wilkins, P.P., Crawley, S., Weinstein, J., Cummings, R.D., and McEver, R.P. (1996) Visualization of P-selectin glycoprotein ligand-1 as a highly extended molecule and mapping of protein epitope for monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **271**, 3255-3264.
- Lipsky, P.E., Rothlein, R., Kishimoto, T.K., Faanes, R.B., and Smith, C.W. (1993) *Structure, function and regulation of molecules involved in leucocyte adhesion*. Springer-Verlag, New York.
- Lorant, D.E., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Prescott, S.M., and Zimmerman, G.A. (1995) Activation of polymorphonuclear leucocytes

reduces their adhesion to P-selectin and causes redistribution of ligands for P-selectin on their surface. *J. Clin. Invest.* **96**, 171-182.

Manning, A.M., Kukielka, G.L., Doré, M., Hawkins, H.K., Sanders, W.E., Michael, L.H., Entman, M.L., Smith, C.W., and Anderson, D.C. (1992) Regulation of GMP-140 mRNA in a canine model of inflammation. *FASEB J.* **6**, 1060A.

Manning, A.M., Lu, H.F., Kukielka, G.L., Oliver, M.G., Ty, T., Toman, C.A., Drong, R.F., Slightom, J.L., Ballantyne, C.M., Entman, M.L., et al. (1995) Cloning and comparative sequence analysis of the gene encoding canine intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Gene* **156**, 291-295.

Mayadas, T.N., Johnston, R.C., Rayburn, I.T., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (1993) Leucocyte rolling and extravasation are severely compromised in P-selectin-deficient mice. *Cell* **74**, 541-554.

Mayrovitz, H.N., Wiedeman, M.P., and Tuma, R.F. (1977) Factors influencing leukocyte adherence in microvessels. *Thromb. Haemost.* **38**, 823-830.

McEver, R.P., and Martin, M.N. (1984) A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J. Biol. Chem.* **259**, 9799-9804.

McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall, C.L., and Bainton, D.F. (1989) 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.

McEver, R.P. (1991) Selectins: Novel receptors that mediate leucocyte adhesion

during inflammation. *Thrombosis and Haemostasis* **65**, 223-228.

- McEver, R.P., Moore, K.L., and Cummings, R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **270**, 11025-11028
- Moore, K.L., Varki, A., and McEver, R.P. (1991) GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils: Evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.* **112**, 491-499.
- Moore K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., and McEver, R.P. (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J. Biol. Chem.* **118**, 445-456.
- Moore, K.L., Eaton, S.F., Lyons, D.E., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., and McEver, R.P. (1994) The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* **269**, 23318-23327.
- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Fugang, L., Johnston, D.A., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., and McEver, R.P. (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J. Cell Biol.* **128**, 661-671.
- Moore, K.L. (1998) Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leukemia and lymphoma* **29**, 1-15.
- Norgard, K.E., Moore, K.L., Diaz, S., Stults, N.L., Ushiyama, S., McEver, R.P., Cummings, R.D., and Varki, A. (1993) Characterization of a specific ligand

for P-selectin on myeloid cells: a minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **268**, 12764-12774.

Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., and Ley, K. (1995) Leucocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* **86**, 4417-4421.

Oikawa, S., Nakazato, H., and Kosaki, G. (1987) Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 511-518.

Oppenheimer-Marks, N., Davis, L.S., Bogue, D.T., Ramberg, J., and Lipsky, P.E. (1991) Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J. Immunol.* **147**, 2913-2921.

Ord, D.C., Ernst, T.J., Zhou, L.-J., Rambaldi, A., Spertini, O., Griffin, J., and Tedder, T.F. (1990) Structure of the gene encoding the human leucocyte adhesion molecule-1 (TQ1, Leu-8) of lymphocytes and neutrophils. *J. Biol. Chem.* **265**, 7760-7767.

Patthy, L. (1987) Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. *FEBS Lett.* **214**, 1-7.

Picker, L.J., Warnock, R.A., Burns, A.R., Doerschuk, C.M., Berg, E.L., and Butcher, E.C. (1991) The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell* **66**, 921-933.

Pober, J.S., and Cotran, R.S. (1990) Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol.*

- Rev.* **70**, 427-451.
- Polley, M.J., Phillips, M.L., Wayner, E., Nudelman, E., Singhal, A.K., Hakomori, S., and Paulson, J.C. (1991) CD62 and endothelial cell-leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis X. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6224-6228.
- Pouyani, T., and Seed, B. (1995) PSGL-1 recognition of P-selectin is controlled by a tyrosine sulfation consensus at the PSGL-1 amino terminus. *Cell* **83**, 333-343.
- Pytela, R. (1988) Amino acid sequence of the murine Mac-1 α chain reveals homology with the integrin family and an additional domain related to von Willebrand factor. *EMBO J.* **7**, 1371-1378.
- Roitt, I., Brostoff, J., and Male, D. (1996) *Immunology*. 4th ed. Mosby, USA.
- Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., and Springer, T.A. (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* **137**, 1270-1274.
- Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., Cummings, D., and Larsen, G.R. (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* **75**, 1179-1186.
- Sako, D., Comess, K.M., Barone, K.M., Camphausen, R.T., Cummings, D.A., and Shaw, G.D. (1995) A sulfated peptide segment at the amino terminus of PSGL-1 is critical for P-selectin binding. *Cell* **83**, 323-331.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory press, USA.
- Sanchez-Madrid, F., Nagy, J.A., Robbins, E., Simon, P., and Springer, T.A. (1983) A human leucocyte differentiation antigen family with distinct α -subunits and a common β -subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J. Exp. Med.* **158**, 1785-1803.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Seko, S., Enokawa, Y., Nakao, T., Yagita, H., Okumura, K., and Yazaki, Y. (1996) Reduction of rat myocardial ischemia-reperfusion injury by synthetic selectin oligopeptide. *J. Pathol.* **178**, 335-342.
- Shimizu, Y., and Shaw, S. (1993) Mucins in the mainstream. *Nature* **366**, 630-631.
- Siegelman, M., Bond, M.W., Gallatin, W.M., St John, T., Smith, H.T., Fried, V.A., and Weissman, I.L. (1986) Cell surface molecule associated with lymphocyte homing is a ubiquitinated branched-chain glycoprotein. *Science* **231**, 823-829.
- Siegelman, M.H., and Weissman, I.L. (1989) Human homologue of mouse lymph node homing receptor: evolutionary conservation at tandem all interaction domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5562-5566.
- Simmons, D., Makgoba, M.W., and Seed, B. (1988) ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature*

331, 624-627.

- Smith, C.W., Kishimoto, T.K., Abbassi, O., Hughes, B.J., Rothlein, R., McIntire, L.V., Butcher, E.C., and Anderson, D.C. (1991) Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule-1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.* **87**, 609-618.
- Smith, J.W., and Cheresch, D.A. (1991) Labelling of integrin $\alpha v \beta 3$ with $^{58}\text{Co(III)}$. Evidence of metal ion coordination sphere involvement in ligand binding. *J. Biol. Chem.* **266**, 11429-11432.
- Snapp K.R., Craig, R., Herron, M., Nelson, R.D., Stoolman, L.M., and Kansas, G.S. (1998) Dimerization of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) required for optimal recognition of P-selectin. *J. Cell Biol.* **142**, 263-270.
- Sonnenberg, A., Linders, C.T.J., Daams, J.H., and Kennel, S.J. (1990) The $\alpha 6 \beta 1$ (VLA-6) and $\alpha 6 \beta 4$ protein complexes: tissue distribution and biochemical properties. *J. Cell Sci.* **96**, 207-217.
- Spertini, O., Kansas, G.S., Munro, J.M., Griffin, J.D., and Tedder, T.F. (1991) Regulation of leucocyte migration by activation of the leucocyte adhesion molecule-1 (LAM-1) selectin. *Nature* **349**, 691-694.
- Springer, T.A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434.
- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of

the immunoglobulins and integrin supergene families. *Cell* **52**, 925-933.

- Staunton, D.E., Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**, 61-64.
- Steedmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., and Vestweber, D. (1995) The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* **373**, 615-620.
- Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., and Bainton, D.F. (1985) A platelet alpha granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J. Cell Biol.* **101**, 880-886.
- Stone, J.P., and Wagner, D.D. (1993) P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J. Clin. Invest.* **92**, 804-813.
- Subramaniam, M., Koedam, J.A., and Wagner, D.D. (1993) Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **4**, 791-801.
- Subramaniam, M., Frenette, P.S., Saffaripour, S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., and Wagner, D.D. (1996) Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* **87**, 1238-1242.
- Suzuki, S., and Naitoh, Y. (1990) Amino acid sequence of a novel integrin β 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* **9**, 757-763.
- Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., and

Hasegawa, R. (1991) Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by carbohydrate antigen, sialyl Lewis a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 713-719.

Tedder, T.F., Penta, A.C., Levine, H.B., and Freedman, A.S. (1990) Expression of the human leucocyte adhesion molecule, LAM-1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J. Immunol.* **144**, 532-540.

Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., and Engel, P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**, 866-873.

Tortora, G.J., and Anagnostakos, N.P. (1988) *Principes d'anatomie et de physiologie*. 5th ed. Centre Educatif et Culturel, Montréal.

Tsuboi, S., Isogai, Y., Hada, N., King, J.K., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (1996) 6'-sulfo sialyl Le^X but not 6-sulfo sialyl Le^X expressed on the cell surface supports L-selectin-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* **271**, 27213-27216.

Vachino, G., Chang, X.J., Veldman, G.M., Kumar, K., Sako, D., Fouser, L.A., Berndt, M.C., and Cummings D.A. (1995) P-selectin glycoprotein ligand-1 is the major counter-receptor for P-selectin on stimulated T cells and is widely distributed in non-functional form of many lymphocytic cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 21966-21974.

Varki, A. (1992) Selectins and other mammalian sialic-binding lectins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 257-266.

Veldman, G.M., Bean, K.M., Cumming, D.A., Eddy, R.L., Sait, S.N.J., and Shows, T.B. (1995) Genomic organization and chromosomal localization of the gene

encoding human P-selectin glycoprotein ligand-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 16470-16475.

von Adrian, U.H., Chambers, J.D., McEvoy, L.M., Bargatze, R.F., Arfors, K.E., and Butcher, E.C. (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte $\beta 2$ integrin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7538-7542.

Wagner, D.D. (1995) P-selectin knock-out: a mouse model for various human diseases. in: *Cell adhesion and human disease*. Wiley, Chichester. 2-16

Wagner, R. (1839) *Erlauterungstafeln zur physiologie und entwicklungsgeschichte*. Leopold Voss, Leipzig, Germany.

Walcheck, B., Moore, K.L., McEver, R.P., and Kishimoto, T.K. (1996) Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. *J. Clin. Invest.* **98**, 1081-1087.

Watson, M.L., Kingsmore, S.F., Johnston, G.I., Siegelman, M.H., LeBeau, M.M., Lemons, R.S., Bora, N.S., Howard, T.A., Weissman, I.L., McEver, R.P., and Seldin, M.F. (1990A) Genomic organization of the selectin family of leucocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J. Exp. Med.* **172**, 263-272.

Watson, S.R., Imai, Y., Fennie, C., Geoffroy, J.S., Rosen, S.D. and Lasky, L.A. (1990B) A homing receptor-IgG chimera as a probe for adhesive ligands of lymph node high endothelial venules. *J. Cell Biol.* **110**, 2221-2229.

Weller, A., Isenmann, S., and Vestebler, D. (1992) Cloning of the mouse endothelial

selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* **267**, 15176-15183.

Weyrich, A.S., Ma, X.L., Lefer, D.J., Albertine, K.H., and Lefer, A.M. (1993) In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **91**, 2620-2629.

Wilkins, P.P., Moore, K.L., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1995) Tyrosine sulfation of P-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to P-selectin. *J. Biol. Chem.* **270**, 22677-22680.

Wilkins, P.P., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1996) Structure of the O-glycans on P-selectin glycoprotein ligand-1 from HL-60 cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 18732-18742.

Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988) The immunoglobulin superfamily-domain for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* **6**, 381-405.

Williams, A.F. (1991) Cellular interactions. Out of equilibrium. *Nature* **352**, 473-474.

Winn, R.K., Liggitt, D., Vedder, N.B., Paulson, J.C., and Harlan, J.M. (1993) Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J. Clin. Invest.* **92**, 2042-2047.

Winn, R.K., Sharar, S.R., Vedder, N.B., and Harlan, J.M. (1995) Leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia/reperfusion injuries. in: *Cell adhesion and human disease*. Wiley, Chichester. 63-76

Yang, J., Galipeau, J., Korak, C.A., Furie, B.C., and Furie, B. (1996) Mouse P-

selectin glycoprotein ligand-1: molecular cloning, chromosomal localization, and expression of a functional P-selectin receptor. *Blood* **87**, 4176-4186.

Yednock, T.A., Butcher, E.C., Stoolman, L.M., and Rosen, S.D. (1987) Receptors involved in lymphocyte homing: relationship between a carbohydrate-binding receptor and the MEL-14 antigen. *J. Cell Biol.* **104**, 725-731.

Zhou, Q., Moorer, K.L., Smith, D.F., Varki, A., McEver, R.P., and Cumming, R.D. (1991) The selectin GMP-140 binds to sialylated, fucosylated lactosaminoglycans on both myeloid and nonmyeloid cells. *J. Cell Biol.* **115**, 557-564.

Annexe 1. Isolement de neutrophiles canins

- Recueillir le sang de chien dans une seringue contenant 1,4 ml d'anticoagulant, le citrate phosphate dextrose (CPD, Abbott Laboratories), par 10 ml de sang.
- Ajouter à la seringue 1 ml de dextran 6% par 10 ml de sang recueilli.
Mélanger doucement par inversion.
- Laisser sédimenter dans une position verticale de 45 à 60 minutes à la température de la pièce.
- Recueillir le plasma riche en leucocytes (LRP) dans un tube 15 ml en utilisant une aiguille 16 ga courbée.
- Centrifuger le LRP 5 minutes à 300 g.
- Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans du PBS (phosphate buffer saline, 0,13M NaCl; 30mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄) (pH 7,4) contenant 0,2% glucose.
- Déposer cette suspension sur 5 ml de solution Ficoll-Hypaque (Ficoll type 400, Sigma; 10% Hypaque-Sodium 50%, Wyntrop-Breon).
- Centrifuger 20 minutes à 675 g.
- Resuspendre le culot contenant les globules rouges et les PMNs dans 1 ml de PBS.
Transférer dans un nouveau tube.
- Laver le culot dans 10 ml de PBS et centrifuger 5 minutes à 300 g.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de PBS et compter les cellules sur l'appareil Cell-Dyn 3500 (Abbott).

Annexe 2. Trypsinisation des cellules DH-82
(selon le protocole de American Type Culture Collection [ATCC])

- Enlever le milieu de culture et laver avec du PBS sans calcium et sans magnésium.
- Ajouter la trypsine 0,25% (Gibco) et laisser agir 1 minute.
- Enlever la trypsine et frapper doucement le flacon de culture afin de décoller les cellules.
- Ajouter du milieu de culture et resuspendre les cellules.
- Transférer dans un nouveau flacon de culture pour le passage des cellules ou dans un tube 15 ml pour l'isolement des cellules.
- Pour l'isolement, centrifuger les cellules 5 minutes à 675 g.
- Enlever le milieu et resuspendre dans du PBS.
- Compter les cellules sur l'appareil Cell-Dyn 3500 (Abbott).

Annexe 3. Isolement de l'ARN cytoplasmique
(selon le protocole de Sambrook et coll., 1989)

-Cuire les homogénéisateurs 2 heures à 200°C.

Dans une chambre à 4°C:

-Ajouter le tampon de lyse (NP-40 1%; 126mM NaCl; 4,5mM KCl; 2,7mM MgCl₂; 22,5mM Tris) et homogénéiser.

-Transférer l'homogénat dans un microtube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et centrifuger 2 minutes à 13 000 g.

-Transférer le surnageant dans un nouveau microtube et ajouter 1/10 volume de SDS 10%.

À la température de la pièce:

-Ajouter du phénol, même quantité que le tampon de lyse, bien mélanger et centrifuger 5 minutes à 13 000 g.

-Transférer la phase supérieure dans un microtube contenant du phénol/chloroforme:isoamyl (24:1) (vol/vol), même quantité que le phénol précédemment et centrifuger 5 minutes à 13 000 g.

-Transférer la phase supérieure dans un microtube contenant du chloroforme:isoamyl (24:1) (vol/vol) (même quantité que le phénol précédemment) et centrifuger 5 minutes à 13 000 g.

-Transférer la phase supérieure dans un nouveau microtube, ajouter 1/10 volume d'acétate de sodium 3M et 1 ml d'éthanol (EtOH) 100 % et incuber toute la nuit à -20°C.

-Centrifuger 15 minutes à 13 000 g à 4°C.

-Laver le culot avec 1 ml d'EtOH 75% et centrifuger 10 minutes à 13 000 g à 4°C.

-Sécher dans le lyophilisateur (Speed-Vac, Savant).

-Resuspendre dans H₂O traitée au diethyl pyrocarbonate (0.1% solution DEPC dans 1 L H₂O) (bien laisser resuspendre).

-Mesurer l'absorbance à 260 nm, 280 nm et 310 nm avec un spectrophotomètre (Spectronique 1001 plus, Milton Roy).

Annexe 4. Isolement de l'ARN messager
(selon le protocole de Poly(A) Quick mRNA isolation kit,
Stratagene)

- Chauffer le tampon d'éluion à 65°C jusqu'à utilisation.
- Chauffer l'ARN 5 minutes à 65°C et mettre sur la glace.
- Ajouter du tampon d'échantillon 10X (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA; 5M NaCl) afin d'obtenir une concentration finale de 1X.
- Placer la colonne de cellulose oligodT sur un support.
- Enlever le tampon de conservation avec une seringue Luer-Lock 10 cc (1 goutte/2 secondes).
- Laver 2 fois la colonne avec du tampon haute salinité (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA; 0,5M NaCl) (2x200 µl).
- Passer le filtrat d'ARN sur la colonne.
- Laver la colonne 2 fois avec du tampon haute salinité (2x200 µl).
- Laver 3 fois la colonne avec du tampon faible salinité (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA; 0,1M NaCl) (3x200 µl).
- Éluer l'ARNm avec le tampon d'éluion (10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA) (4x200 µl).
- Recueillir dans un microtube stérile et mettre sur la glace.
- Ajouter du tampon d'échantillon 10X afin d'obtenir une concentration finale de 1X. Diviser l'échantillon en 2 tubes si nécessaire.
- Ajouter 2,5 volumes d'EtOH 100% froid et mélanger.
- Incuber toute la nuit à -20°C.
- Centrifuger 1 heure à 13 000 g à 4°C.
- Laver avec 500 µl d'EtOH 70% (fait avec DEPC-H₂O).
- Sécher dans le lyophiliseur.

-Resuspendre dans DEPC-H₂O et mélanger.

-Chauffer 2 minutes à 50°C.

-Déterminer l'absorbance à 260nm, 280nm et 310nm et congeler à -70°C jusqu'à utilisation.

Annexe 5. Marquage aléatoire d'une sonde d'ADNc
(selon le protocole de Prime-a-Gene[®] labeling system, Promega)

Marquage de la sonde:

-Dénaturer 25 ng d'ADN 10 minutes à 100°C et mettre sur la glace.

-Ajouter sur la paroi du tube sous forme de goutte:

- 10 µl 5X labeling buffer (250mM Tris-HCl pH 8,0; 25mM MgCl₂; 10mM DTT; 1M Hepes pH 6,6; 26A₂₆₀ U/ml random hexadeoxyribonucleotides)
- 2 µl dNTPs mix (dATP, dGTP, dTTP)
- 2 µl BSA
- 5 µl αP³²-dCTP (Mandel)
- 1 µl enzyme Klenow.

-Mélanger doucement et incuber 2 heures ou toute la nuit à 25°C.

Purification de la sonde:

-Mettre de la laine de verre à l'extrémité inférieure d'une seringue 1 ml et mettre la seringue dans un tube 15ml.

-Remplir la seringue avec du Sephadex G-50 et centrifuger dans une centrifugeuse clinique 1 minute au niveau 5.

-Ajouter du Sephadex G-50 et centrifuger à nouveau jusqu'à l'obtention de 1 ml de résine.

-Équilibrer la colonne avec 100 µl de TE-H₂O (10mM Tris-Cl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; H₂O).

-Mettre la colonne dans un nouveau tube 15ml afin de recueillir la sonde dans un milieu stérile.

-Ajouter à la réaction de marquage 60 µl de TE-H₂O.

-Mettre la réaction de marquage sur la colonne (110 µl).

-Centrifuger 1 minute au niveau 5 de la centrifugeuse clinique.

-Compter les CPMs sur un compteur β LS 6500 (Beckman) et déterminer l'activité spécifique (CPM/ug ADN).

Annexe 6. Buvardage de type Northern
(selon le protocole de Sambrook et coll., 1989)

Échantillons d'ARN:

- Sécher les échantillons d'ARN dans le lyophilisateur.
- Resuspendre les échantillons dans 15 µl de tampon de resuspension (tampon dénaturant 1X, formamide déionisée, formaldéhyde 6%) et chauffer 15 minutes à 55°C.
- Ajouter 1 µl de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) et 5 µl de tampon de chargement.
- Charger les échantillons sur un gel d'agarose 1,2%-formaldéhyde 6% et faire migrer à 40 Volts.

Transfert de l'ARN sur membrane de nylon par capillarité:

- Dans un plat de verre, mettre le support du gel inversé.
- Remplir le plat de verre de tampon de transfert 20X SSC (3M NaCl; 0,3M Na citrate).
- Couper 2 feuilles de papier Whatman (3M) selon les dimensions du support du gel pour la largeur mais plus long pour la longueur.
- Mouiller les papiers dans la solution 20X SSC jusqu'à saturation.
- Mettre sur le support du gel en laissant tremper dans le 20X SSC les 2 extrémités plus longues du papier Whatman et éliminer les bulles d'air.
- Rincer le gel dans le 20X SSC.
- Déposer le gel inversé (fond des puits vers le haut) sur les papiers Whatman et éliminer les bulles d'air.
- Couper une membrane de nylon des dimensions du gel et tremper la membrane dans l'eau.
- Tremper la membrane dans la solution 20X SSC et déposer sur le gel.
- Ajouter 2 papiers Whatman des mêmes dimensions que la membrane de nylon préalablement trempée dans le 20X SSC.

- Mettre 3 pouces d'épaisseur de papier absorbant.
- Ajouter une plaque de verre sur le dessus et recouvrir d'une pellicule de plastique pour éviter l'évaporation du tampon de transfert.
- Laisser transférer toute la nuit à 25°C.
- Fixer l'ARN transféré par irradiation aux rayons ultra-violet de 150 mJoles émis par l'appareil GS-gene linker (Bio-Rad).

Hybridation:

- Laver la membrane dans l'eau.
- Préhybrider la membrane dans une bouteille à hybridation 1 heure à 60°C en présence de solution d'hybridation Quick-Hyb (6 ml/petite bouteille et 15 ml/grande bouteille).
- Chauffer la sonde radioactive (10^6 CPM/ml solution d'hybridation Quick-Hyb) ainsi que de l'ADN de sperme de saumon (100 µg/ml) pendant 15 minutes à 100°C.
- Ajouter la sonde à la solution d'hybridation et hybrider 3 heures à 60°C.

Lavages et autoradiographie:

- Laver la membrane 2 fois avec la solution A (2X SSC; 0,1% SDS) pendant 15 minutes à 25°C.
- Laver la membrane 1 fois avec la solution B (0,1X SSC; 0,1% SDS) pendant 30 minutes à 60°C.
- Envelopper la membrane d'une pellicule de plastique et exposer à un film autoradiographique Kodak X-Omat-AR à -70°C pour 24 heures.

Annexe 7. Production d'une librairie d'expression

(selon le protocole de ZAP-cDNA Gigapack II Gold cloning kit, Stratagene)

Synthèse des 1^{er} et 2^e brins de l'ADNc:

-Mélanger dans un tube libre d'ARNase:

	5 µl 10X first-strand buffer
	3 µl first-strand methyl nucleotide mixture (10mM dATP, dGTP, dTTP; 5mM 5-methyl dCTP)
	2 µl linker-primer (1,4 µg/µl)
	DEPC-H ₂ O
	1 µl Rnase Block Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl).

-Ajouter l'ARNm, volume final 50 µl et mélanger doucement.

-Incuber 10 minutes à 25°C.

-Ajouter 1,5 µl de MMLV-RT (50 U/µl) et mélanger doucement.

-Transférer 5 µl de cette réaction dans un tube contenant 0,5 µl de α -³²PdATP (Mandel), c'est l'échantillon contrôle de la synthèse du 1^{er} brin.

-Incuber les 2 tubes (contrôle et 1^{er} brin) pendant 1 heure à 37°C.

-Conserver le tube contrôle à -20°C.

-Placer le tube du 1^{er} brin sur la glace.

-Ajouter :

	20 µl 10X second-strand buffer
	6 µl second-strand dNTP mixture (10 mM dATP, dGTP, dTTP; 26mM dCTP)
	114 µl H ₂ O stérile
	2 µl α - ³² PdATP.

-Ajouter :

	2 µl Rnase H (1,5 U/µl)
	11 µl DNA polymerase I (9,0 U/µl).

-Incuber 2,5 heures à 16°C et mettre sur la glace.

Terminaison des bouts francs de l'ADNc:

1 μ l T4 polynucleotide kinase (10 U/ μ l).

-Incuber 30 minutes à 37°C.

-Inactiver la kinase à 70°C pendant 30 minutes.

-Équilibrer la réaction à 25°C pendant 5 minutes.

Digestion avec *Xho* I:

-Ajouter: 28 μ l *Xho* I buffer supplement
 3 μ l *Xho* I (40 U/ μ l).

-Incuber 1,5 heures à 37°C.

-Ajouter 48 μ l 1X tampon STE (0,1M NaCl; 20mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA).

-Extraire avec du phenol-chloroforme.

-Extraire avec du chloroforme.

-Ajouter: 10 μ l 10X tampon STE
 250 μ l EtOH 100%.

-Précipiter à -20°C toute la nuit.

-Centrifuger à 13 000 g pendant 60 minutes à 4°C.

-Resuspendre le culot dans 14 μ l tampon 1X STE.

-Ajouter 3,5 μ l de tampon de chargement pour la colonne de fractionnement.

Colonne de fractionnement:

-Équilibrer le Sepharose CL-2B ainsi que le tampon 10X STE à 25°C.

-Préparer 50 ml de tampon 1X STE à partir de la solution concentrée 10X.

-Resuspendre le Sepharose CL-2B en inversant son contenant.

-Remplir la colonne avec du tampon 1X STE.

-Ajouter immédiatement une suspension uniforme de Sepharose CL-2B dans la

colonne à l'aide d'une pipette Pasteur.

- Équilibrer la colonne avec 10 ml de tampon 1X STE.
- Charger l'échantillon sur la colonne .
- Collecter le filtrat en fraction de 3 gouttes lorsque le colorant de l'échantillon arrive à la graduation 0,4 ml sur la colonne.
- Terminer la récolte des échantillons lorsque l'extrémité supérieure du colorant atteint la graduation 0,3 ml sur la colonne (environ 15 fractions).
- Analyser 8 µl de chaque fraction sur un gel acrylamide 5% non-dénaturant.
- Extraire avec du phenol-chloroforme des fractions d'intérêts.
- Extraire avec du chloroforme.
- Ajouter 2 volumes EtOH 100%.
- Précipiter toute la nuit à -20°C.
- Centrifuger 60 minutes à 4°C à 13 000g.
- Évaluer la radioactivité présente dans le précipité avec un compteur Geiger
 si <10 comptes, resuspendre dans 3,5 µl H₂O stérile
 si >10 comptes, resuspendre dans 5 µl H₂O stérile.

Ligation des ADNcs dans le vecteur Uni-ZAP XR:

- Ajouter dans un tube:
 - X µl ADNc resuspendu (100 ng)
 - 0,5 µl 10X ligase buffer
 - 0,5 µl 10mM rATP pH 7,5
 - 1,0 µl vecteur Uni-ZAP XR (1 µg/µl)
 - H₂O pour un volume final de 4,5 µl.
- Ajouter 0,5 µl T4 DNA ligase (4 U/µl).
- Incuber la réaction toute la nuit à 12°C.

Préparation des bactéries hôtes:

- Pour la croissance de la librairie, les bactéries hôtes utilisées étaient XL1 Blue MRF'. Il s'agit d'une souche de *E coli* RecA⁻ McrA⁻ et McrCB⁻ Mrr⁻ qui ne restreint

pas l'ADN méthylé.

-Pour l'excision *in vivo*, les bactéries utilisées étaient les SOLR. Ces cellules sont également de souche *E coli* mais non suppressives, ainsi le codon d'arrêt ambre présent dans le phage ExAssist (M13) évite la réplication de ce phage lors de la transformation des bactéries par le clone positif.

-Croître les 2 types de bactéries, XL1 Blue MRF' et SOLR dans un milieu liquide Luria-Bertani (LB) (1% NaCl; 1% tryptone; 0,5% extrait de levure) en présence de 10mM MgSO₄ et 0,2% maltose toute la nuit à 30°C avec agitation.

-Centrifuger 10 minutes à 500g.

-Resuspendre dans 10mM MgSO₄ à la densité optique désirée à 600 nm.

Empaquetage:

-Dégeler les extraits commerciaux de phagemid sur la glace sèche.

-Ajouter 0,1-1,0 µg d'ADN de la ligation au tube rouge immédiatement lorsque ce dernier commence à dégeler.

-Ajouter rapidement 15 µl de l'extrait soniqué du tube jaune.

-Incuber 2 heures maximum à 22°C.

-Ajouter 500 µl tampon SM (0,1M NaCl; 8mM MgSO₄-7H₂O; 0,05M Tris-Cl pH 7,5; 0,01% gélatine), 20 µl de chloroforme et conserver à 4°C.

Étalement et titrage:

-Pour titrer la réaction d'empaquetage (donc la librairie), diluer la réaction 1:10.

-Mettre 1 µl de réaction d'empaquetage non diluée dans 200 µl de bactéries XL1 Blue MRF' OD₆₀₀ de 0,5.

-Mettre 1 µl de réaction d'empaquetage diluée dans 200 µl de bactéries XL1 Blue MRF' OD₆₀₀ de 0,5.

-Incuber 15 minutes à 37°C.

-Ajouter ce mélange à 3 ml d'agarose de surface NZamine/Yeast extract (NZY) (0,5% NaCl; 0,2% MgSO₄-7H₂O; 0,5% extrait de levure; 1% NZamine; 0,7% agarose) contenant 25mM IPTG et X-Gal (4 mg/ml).

-Couler le tout sur une boîte de pétri 100 mm NZY agar (0,5% NaCl; 0,2% MgSO₄-7H₂O; 0,5% extrait de levure; 1% NZamine; 1,5% agar).

-Incuber toute la nuit à 37°C.

Amplification de la librairie:

-Préparer les bactéries hôtes XL1 Blue MRF⁺.

-Incuber les bactéries (600 µl) avec la librairie pour avoir 50 000 plages par boîte de pétri NZY agar de 150mm 15 minutes à 37°C.

-Couler sur la boîte de pétri dans 8 ml d'agarose de surface NZY refroidi à 50°C.

-Incuber 6-8 heures à 37°C.

-Recouvrir les plaques de 8-10 ml de tampon SM et mettre les plaques pour la nuit à 4°C.

-Recueillir le tampon SM et laver les plaques avec 2 ml de tampon SM.

-Ajouter du chloroforme pour une concentration finale de 5%.

-Bien mélanger et incuber à 25°C pendant 15 minutes.

-Centrifuger 10 minutes à 500g.

-Décanner le surnageant dans une bouteille de verre, si la solution est claire, ajouter du chloroforme pour une concentration finale de 0,3%.

-Aliquoter en présence de DMSO 7% et conserver à -70°C.

Annexe 8. Criblage d'une librairie d'expression
(selon le protocole de ZAP-cDNA Gigapack II Gold cloning kit,
Stratagene)

Étalement de la librairie:

- Croître les bactéries hôtes, XL1 Blue MRF', toute la nuit à 30°C avec agitation dans un milieu LB contenant 0,2% maltose et 10mM MgSO₄.
- Centrifuger les cellules 10 minutes à 500g.
- Diluer les cellules DO₆₀₀ à 0,5 dans du tampon SM.
- Dans 1800 µl de bactéries hôtes diluées, ajouter la librairie pour obtenir 150 000 pfu.
- Incuber 15 minutes à 37°C avec agitation.
- Mettre dans 30 ml d'agarose de surface NZY à 50°C.
- Couler sur une plaque de 25 cm² NZY agar.
- Incuber à 37°C pendant 6-8 heures jusqu'à ce que les plaques aient environ 1 mm de diamètre.
- Mettre à 4°C toute la nuit.

Transfert de l'ADNc sur membrane de nylon:

- Déposer sur l'agar une membrane de nylon bien identifiée (l'ADN se retrouvant sur le côté d'écriture) pendant 2 minutes.
- Pour les duplicatas, laisser transférer l'ADN pendant 4 minutes et utiliser les mêmes trous que précédemment pour identifier la membrane.
- Identifier le sens de la membrane en perçant des trous à l'aide d'une aiguille 16 ga. D'abord 1 trou sur un des côtés, 2 trous côte-à-côte sur un autre et finalement sur un troisième côté percer 3 trous côte-à-côte.
- Dénaturer l'ADN dans une solution 1,5M NaCl; 0,5M NaOH pendant 2 minutes.
- Neutraliser l'ADN dans une solution 1,5M NaCl; 0,5M Tris-HCl pH 8,0 pendant 5 minutes.

-Rincer la membrane dans une solution 0,2M Tris-Hcl pH 7,5; 2X SSC.

-Irradier la membrane aux ultra-violets dans l'appareil GS-gene linker à 150 mJoules.

Hybridation:

-Voir Annexe 6.

-L'hybridation se fait à 50°C avec la sonde PSGL-1 humain et à 60°C avec la sonde PSGL-1 canin.

Alignement des membranes:

-Suite au développement des films, les films sont alignés avec les membranes correspondantes et les trous marqués sur le film.

-Un film et son duplicata sont superposés pour détecter la présence de clones positifs. Ces clones positifs sont des points retrouvés sur les deux membranes au même endroit.

-Une fois des clones positifs repérés, ils sont encerclés sur le film pour bien les identifier.

-Aligner le film avec la plaque en alignant les trous de la plaque et du film.

-Piquer la colonie positive avec l'extrémité supérieure d'un embout bleu.

-Mettre ce morceau d'agar dans 1 ml de tampon SM et 20 µl de chloroforme.

-Conserver à 4°C.

Criblages secondaire, tertiaire et quaternaire:

-Faire une dilution 1/100 du clone positif dans le tampon SM.

-Étaler sur des petris NZY agar de 100 mm 1 µl, 5 µl et 10 µl de la dilution du positif. Utiliser 200 µl de bactéries hôtes diluées à DO₆₀₀ 0,5. Couler dans 3 ml d'agarose de surface NZY à 50°C.

-Incuber à 37°C.

-Répéter les étapes de transfert, d'hybridation, d'alignement des membranes et de criblages 2^{aire}, 3^{aire}, 4^{aire} jusqu'à l'obtention d'un clone pur.

Excision *in vivo*:

- Croître les bactéries XL1 Blue MRF' et SOLR dans un milieu LB contenant 0,2% maltose et 10mM MgSO₄ toute la nuit à 30°C avec agitation.
- Diluer ces bactéries à DO₆₀₀ 1,0 dans 10mM MgSO₄.
- Combiner dans un tube polypropylène 15 ml: 200 µl bactéries XL1 Blue MRF'
250 µl solution de phage (clone positif contenant >10⁵ phages)
1 µl ExAssist helper phage (>10⁶ pfu/µl).
- Incuber à 37°C pendant 15 minutes et ajouter 3 ml de milieu LB.
- Incuber à 37°C pendant 2,5-3 heures avec agitation.
- Chauffer à 65-70°C pendant 20 minutes.
- Centifuger 15 minutes à 2500 RPM et conserver le surnageant (contient le plasmide excisé).
- Ajouter à 200 µl de bactéries SOLR 100 µl de surnageant pour un microtube et 10 µl pour un deuxième microtube.
- Incuber 15 minutes à 37°C.
- Étaler 200 µl de ce mélange sur une boîte de pétri LB-ampicilline (100 µg/ml).
- Incuber toute la nuit à 37°C.
- Pour analyser les clones obtenus, se référer à mini-préparation d'ADN (Annexe 9).

Annexe 9. Mini-préparation d'ADN

(modifié selon le protocole de Sambrook et coll., 1989)

- Amplifier dans un milieu liquide LB+ampicilline (100µg/ml), une colonie transformée pendant 18 heures à 37°C.
- Centrifuger 1 minute à 13 000 g à 4°C.
- Resuspendre les cellules dans 100 µl de solution I froide (50mM glucose; 25mM Tris-Cl pH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0).
- Ajouter 200 µl de solution II fraîche (0,2 N NaOH; SDS 1%) et inverser 5 fois doucement.
- Mettre sur la glace pendant 5 minutes.
- Ajouter 150 µl de solution III (3M potassium acetate; 11,5% acide acétique glaciale).
- Centrifuger 10 minutes à 25 °C à 13 000 g et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Ajouter 900 µl EtOH 100% et laisser 2 minutes à 25 °C.
- Centrifuger 15 minutes à 25 °C et laver avec 1 ml EtOH 70% froid.
- Sécher dans le lyophiliseur, resuspendre dans 50 µl H₂O et RNase A (20 µg/ml) et conserver à -20 °C.
- Digérer l'ADN obtenu afin de sortir l'insert du vecteur.
- Faire migrer sur un gel d'agarose 1% à 60 Volts.
- Prendre une photo et analyser les résultats obtenus.

Annexe 10. Préparation d'ADN de phage

(modifié selon le protocole Library protocol Handbook 1, Clontech)

- Faire pousser le clone positif sur 4 boîtes de pétri 150mm NZY agar à une densité de 10^5 pfu/ml.
- Recouvrir les petris de 12 ml de λ dilution buffer (1M Tris-Cl pH 7,5; 8mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$).
- Incuber toute la nuit à 4°C.
- Recueillir le tampon.
- Laver avec 4 ml de λ dilution buffer.
- Centrifuger 10 minutes à 10 000 RPM à 25°C.
- Ajouter au surnageant de la DNase (1 μ g/ml) et de la RNase (libre de DNase) (1 μ g/ml).
- Ajouter NaCl solide pour une concentration finale de 1M et mettre sur la glace 1 heure.
- Centrifuger 10 minutes à 10 000 RPM à 4°C.
- Dissoudre du PEG 8000 pour une concentration finale de 10% avec agitation légère d'un barreau magnétique et mettre sur la glace 1 heure.
- Centrifuger 10 minutes à 10 000 RPM à 4°C.
- Resuspendre le culot dans 500 μ l de λ dilution buffer.
- Extraire avec du phénol/chloroforme.
- Extraire avec chloroforme.
- Ajouter
5 μ l SDS 10%
5 μ l EDTA 0,5M pH 8,0
2,5 μ l RNase A (1 mg/ml).
- Incuber 10 minutes à 65°C.
- Extraire avec du phénol/chloroforme.

- Extraire 2 fois avec du chloroforme.
- Ajouter 1/10 volume NaOAc 3M et 2 volumes EtOH 100%.
- Incuber à -20°C pour 20 minutes ou toute la nuit.
- Centrifuger à 7 000 RPM pour 5 minutes à 4°C.
- Laver le culot avec EtOH 70%, sécher et resuspendre dans H₂O.

Annexe 11. Séquençage

(selon le protocole de T7 DNA sequencing™ kit, Pharmacia Biotech)

Dénaturation:

- Ajouter 2 µl de NaOH 2M à 2-3 µg d' ADN plasmidique.
- Compléter avec de l'eau jusqu'à 10 µl et incuber 10 minutes à 25 °C.

Précipitation:

- Ajouter à la réaction précédente:
 - 3 µl NaOAc 3M pH 5,2
 - 7 µl H₂O
 - 60 µl EtOH 100%.

- Incuber 15 minutes à -20 °C.
- Centrifuger 10 minutes à 4 °C à 13 000g.
- Laver avec 165 µl EtOH 70% et lyophiliser.

Annealing:

- Ajouter:
 - 2 µl amorce
 - 2 µl tampon d'annealing (1M Tris-HCl pH 7,6; 100mM MgCl₂; 160mM DDT)
 - 10 µl H₂O.
- Incuber à 37 °C pendant 20 minutes, à 25 °C pendant 10 minutes et à 4°C toute la nuit.

Extension:

- Ajouter à la réaction d'annealing équilibrée à 25°C:
 - 3 µl labeling mix A (1,375µM dCTP; 1,375µM dGTP; 1,375µM dTTP; 333,5mM NaCl)
 - 1 µl S³⁵-dATP
 - 0,4 µl T7 DNA polymerase
 - 1,6 µl enzyme dilution buffer (20mM Tris-HCl pH 7,5; 5mM DTT; 100ug BSA/ml; 5% glycerol).
- Incuber 5 minutes à 25 °C.

- Aliquoter 4,5 µl de cette réaction dans chaque puits d'une plaque multipuits préalablement aliquotée avec 2,5 µl de didéoxy nucléotide (un puits didéoxyA, un puits didéoxyG, un puits didéoxyT et un puits didéoxyC).
- Incuber 5 minutes à 37 °C.
- Ajouter 5 µl de solution d'arrêt (0,3% bleu de bromophenol; 0,3 xylene cyanol FF; 10mM EDTA pH 7,5; 97,5% formamide déionisée) à chaque puits.
- Bouillir la réaction 2 à 5 minutes à 100 °C.
- Polymériser le gel 6% acrylamide-bisacrylamide 19:1; TBE 1X (0,09M Tris-borate; 2mM EDTA pH 8,0); urée 7M par l'ajout de TEMED et d'ammonium persulfate 10% pendant un minimum de deux heures à 25 °C.
- Charger les échantillons sur un gel préchauffé une heure à 1800 volts (50 °C).
- Faire migrer pendant deux heures (sortie du bleu de bromophenol) pour une courte migration. Pour une longue migration, faire migrer jusqu'à la sortie du bleu xylene cyanol FF et ensuite recharger l'échantillon et laisser migrer jusqu'à la sortie du bleu de bromophenol du nouvel échantillon. La migration s'effectue à 1800 Volts (50°C) dans un tampon TBE 1X.
- Une fois la migration terminée, défaire l'appareil pour transférer le gel sur un papier Whatman.
- Recouvrir d'une pellicule de plastique.
- Sécher dans un séchoir à gel sous vide à 80 °C (SGD 450, Savant) pendant une heure et exposer le gel séché à un film Kodak X-Omat AR à 25 °C pendant 24 heures.

Annexe 12. Génération d'une sonde PSGL-1 canine par RT-PCR emboîtée

Transcription inverse:

-Mélanger: 5 µg ARN cytoplasmique
1 µl polyT primer (20 µM)
DEPC-H₂O jusqu'à 10 µl.

-Incuber 10 minutes 70°C et mettre sur la glace.

-Ajouter: 10,75 µl DEPC-H₂O
6 µl 5X AMV RT buffer
1 µl RNAsin
1,25 µl dNTP (25mM)
1 µl AMV RT.

-Incuber 1 heure à 42°C.

PCR:

-Mélanger: 5 µl Taq polymerase buffer
34 µl H₂O.

-Ajouter 1 µl Taq polymerase à 10 µl de ce mélange.

-Ajouter au 29 µl restant: 2 µl ADNc
1 µl amorce sens (50 pmol)
1 µl amorce anti-sens (50 pmol)
6 µl dNTP (2,5mM).

-Programme PCR: 1) dénaturation initiale 4 minutes à 94°C

Ajouter 11 µl mélange H₂O-tampon-Taq polymerase

2) touch-down 72°C à 50°C avec une décroissance de 2°C /cycle

3) 30 cycles 1 minute à 94°C
1 minute à 50°C
1 minute à 72°C

4) élongation finale 5 minutes à 72°C.

- Répéter les étapes de PCR en remplaçant l'ADNc par le produit de PCR et les amorces sens et anti-sens par les amorces internes correspondantes ainsi qu'éliminer le touch-down pour la PCR emboîtée.
- Analyser les produits de PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Annexe 13. Transformation de cellules compétentes
(modifié selon le protocole de Sambrook et coll., 1989)

- Étaler sur des boîtes de pétri LB-ampicilline (100 µg/ml) de l'IPTG (2,4 mM) ainsi que du X-Gal (4µM).
- Dégeler les cellules compétentes sur la glace.
- Ajouter 15 µl de ligation dans 200 µl de bactéries E. Coli DH5α compétentes et mettre sur la glace 30 minutes.
- Mettre 2 minutes à 42°C puis sur la glace 5 minutes.
- Ajouter 600 µl de LB régulier et incuber 30 minutes à 37°C.
- Étendre 200 µl de transformation sur une boîte de pétri LB-ampicilline-IPTG-X-gal et incuber toute la nuit à 37°C.

Annexe 14. 5'RACE

(selon le protocole de Marathon cDNA amplification kit, Clontech)

Synthèse des 1^{er} et 2^e brins:

-Combiner: 1 µg ARNm

1 µl cDNA synthesis primer (10 µM)

H₂O jusqu'à 5 µl.

-Incuber 2 minutes à 70°C et mettre sur la glace pendant 2 minutes.

-Ajouter: 2 µl 5X first-strand buffer (250mM Tris pH 8,5; 40mM MgCl₂; 150mM KCl; 5mM dithiothreitol [DTT])

1 µl dNTP mix (10mM)

1 µl α³²P-dCTP (1 µCi/µl)

1 µl AMV reverse transcriptase (20 U/µl).

-Incuber 1 heure à 42°C et mettre sur la glace.

-Ajouter: 48,4 µl H₂O stérile16 µl 5X second-strand buffer(500 mM KCl; 50mM ammonium sulfate; 25mM MgCl₂; 0,75mM β-NAD; 100mM Tris pH 7,5; 0,25 mg/ml BSA)

1,6 µl dNTP mix (10mM)

4 µl 20X second-strand enzyme cocktail (*E.coli* DNA polymerase I [6 U/µl]; *E.coli* DNA ligase [1,2 U/µl]; *E.coli* Rnase H [0,25 U/µl]).

-Incuber 1,5 heures à 16°C.

-Ajouter 2 µl T4 DNA polymerase (5 U/µl) et incuber 45 minutes à 16°C

-Ajouter 4 µl du mélange EDTA/glycogen (0,2M EDTA; 2 mg/ml glycogene) et extraire avec 100 µl de phenol/chloroforme:alcool isoamyl (25/24:1).

-Extraire avec 100 µl de chloroforme:alcool isoamyl (24:1).

-Précipiter l'ADNc en ajoutant 0,5 volume 4M ammonium acetate et 2,5 volumes EtOH 95%.

-Centrifuger 20 minutes à 14 000 RPM à 25°C.

-Laver avec 300 µl EtOH 80%, sécher, resuspendre dans 10 µl H₂O et conserver à -20°C.

-Vérifier la synthèse d'ADNc sur un gel d'agarose 1,2% en présence de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml).

Ligation des adapteurs:

-Combiner: 5 µl ADNc double brin
 2 µl Marathon cDNA adaptor
 2 µl 5X DNA ligation buffer (250mM Tris-HCl pH 7,8; 50mM MgCl₂; 5mM DTT; 5mM ATP; 25% PEG 8000)
 1 µl T4 DNA ligase (1 U/µl).

-Incuber 3-4 heures à 25°C ou toute la nuit à 16°C et chauffer 5 minutes à 70°C.

-Diluer 1 µl de cette réaction dans 250 µl tampon Tricine-EDTA (10mM tricine-KOH pH 8,5; 0,1mM EDTA) et conserver le restant à -20°C.

-Chauffer l'ADNc-adapteur dilué pendant 2 minutes à 94°C et mettre sur la glace.

PCR:

-Mélanger: 5 µl ADNc-adapteur dilué
 1 µl AP1 primer (10 µM)
 1 µl amorce antisens spécifique pour PSGL-1 (10 µM)
 43 µl Master mix (36 µl H₂O; 5 µl 10X cDNA PCR reaction buffer; 1 µl dNTP mix (10mM); 1 µl 50X Advantage cDNA polymerase mix).

Programme PCR: 1) dénaturation initiale	1 minute à 94°C
2) touch-down	60°C à 52°C avec une décroissance de 2°C /cycle
3) 20 cycles	45 secondes à 94°C 1 minute à 50°C 2 minutes à 72°C
4) élongation finale	5 minutes à 72°C.

-Répéter les étapes de PCR en remplaçant l'ADNc par le produit de PCR et les amorces sens et anti-sens par les amorces internes correspondantes ainsi qu'éliminer le touch-down pour la PCR emboîtée.

-Analyser les produits de PCR sur gel d'agarose 1,2%.

Annexe 15. Maxi préparation d'ADN
(modifié selon le protocole de Sambrook et coll., 1989)

- Piquer 1 colonie et la mettre dans 250 ml de LB-ampicilline (100 µg/ml).
- Laisser pousser 16-18 heures à 37°C avec agitation.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 RPM à 4°C.
- Resuspendre dans 10 ml de solution I (50mM glucose; 25mM Tris-Cl pH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0).
- Ajouter 20 ml de solution II fraîche (0,2 N NaOH, 1% SDS).
- Mélanger doucement en inversant la bouteille quelques fois et laisser reposer 5-10 minutes à 25°C.
- Ajouter 15 ml de solution III (3M potassium acetate; 11,5% acide acétique glaciale) et mettre sur la glace 10 minutes.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 RPM à 4°C.
- Filtrer le surnageant à travers 4 couches de coton fromage.
- Ajouter 0,6 volume de 2-propanol et centrifuger 15 minutes à 5000 RPM à 25°C.
- Rincer avec 10 ml d'EtOH 70%.
- Centrifuger 15 minutes à 5000 RPM à 25°C.
- Inverser la bouteille sur un papier pour bien éliminer toutes traces d'EtOH.
- Dissoudre le culot dans 500 µl H₂O-RNase (20 µg/ml) et incubé 30 minutes à 37°C.
- Ajouter 500 µl NaCl 1,6M/ PEG 13%, bien mélanger et mettre sur la glace 10-15 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 15 000 RPM à 4°C.
- Dissoudre dans 400 µl H₂O.
- Extraire avec du phénol.

- Extraire avec du phénol/chloroforme.
- Extraire avec du chloroforme.
- Ajouter 100 µl NaOAc 3M pH 4,7-5,2 et 2 volumes d'EtOH 100%.
- Incuber 10 minutes à 25°C.
- Centrifuger 5 minutes à 13 000 g à 4°C.
- Laver avec 200 µl EtOH 70% froid, lyophiliser et dissoudre dans H₂O.