

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

INTERACTIONS CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LE DEVELOPPEMENT DU  
LYMPHOME T

PAR SIMON BELANGER

THESE PRESENTEE  
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
PHILOSOPHIAE DOCTOR (PH.D.)  
EN VIROLOGIE-IMMUNOLOGIE

DIRECTEUR DE RECHERCHE

DR. YVES ST-PIERRE  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

PRESIDENT DU JURY ET  
EXAMINATEUR INTERNE

DR. ALAIN LAMARRE  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

EXAMINATEUR EXTERNE

DR. LOUIS GABOURY  
HOTEL-DIEU DU CHUM

EXAMINATEUR EXTERNE

DR. JACQUES HUOT  
CENTRE DE RECHERCHE DE L'HOTEL-DIEU DE QUEBEC



## Remerciements

Merci à mon directeur de recherche, le Dr. Yves St-Pierre, qui a su diriger mon projet avec un doigté exemplaire. Yves je te remercie pour les discussions constructives que l'on a eues ensemble, la latitude que tu m'as accordée, me laissant entièrement responsable de mon projet de doctorat, tout en m'accordant tout le support et l'accessibilité nécessaires.

Merci également à tous les membres anciens et actuels du laboratoire, avec qui des discussions autant scientifiques qu'amicales auront agrémenté l'ambiance à l'intérieur du labo. Pour tous ces conseils, vos rires, vos « petages de coches » bien drôles, et ces discussions houblonnées ou non, je vous remercie.

Merci bien sûr au soutien de l'INRS-Institut Armand-Frappier, et aux différents organismes subventionnaires, dont les Instituts de Recherche en Santé du Canada et la fondation Terry fox via L'Institut National du Cancer du Canada.

Merci à tous mes amis de l'Institut et à notre équipe de Ultimate Frisbee qui s'y est formée pour tous les agréables moments passés ensemble lors de mon séjour à l'IAF. Particulièrement, Iohann, Nicolas et François, vous êtes bien plus que des collègues et pour bien longtemps j'en ai peur! Je m'en voudrais d'oublier Véronique, dont la compagnie et le sourire ont su égayer mon séjour à l'Institut.

Merci à tous mes amis hors-campus, parmi lesquels je ne pourrais oublier Simon, M-C et le petit Josh, Marco, ainsi que Véronique malgré la distance. Merci à Hélène, dont les encouragements continus m'ont grandement supporté. Merci à Josiane, qui m'a accompagné dans la conclusion de cette aventure en ensoleillant chacune de mes journées.

Merci finalement, à ma très précieuse famille, d'avoir toujours été là, je ne saurais comment exprimer l'importance que vous avez pour moi. Peu importe les défis que j'entreprendrai, les joies et peines que je vais connaître, je sais que vous serez là pour moi comme vous l'avez toujours été et je vous en serai éternellement reconnaissant.

*Pour Julie, ...*

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>ix</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>Résumé général</b> .....	<b>xii</b>

### Chapitre I

#### Revue de littérature

<b>1.1 Le lymphome</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Introduction.....	2
1.1.2 Causes reliées au développement du lymphome non hodgkinien.....	3
1.1.3 Diagnostic .....	8
1.1.4 Traitement .....	10
<b>1.2 La métastase</b> .....	<b>14</b>
<b>1.3 Le recrutement leucocytaire</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Les sélectines</b> .....	<b>18</b>
1.4.1 P-sélectine.....	19
1.4.2 E-sélectine.....	21
1.4.3 L-sélectine .....	21
1.4.4 Ligands des sélectines .....	22
1.4.5 Modèles de knock-out des sélectines.....	26
1.4.6 Signalisation induite par les sélectines .....	28
<b>1.5 Modèles murins expérimentaux de lymphome non hodgkinien</b> .....	<b>32</b>
<b>1.6 Molécules d'adhésion dans la dissémination du lymphome non     hodgkinien</b> .....	<b>33</b>
1.6.1 Intégrines et superfamille des immunoglobulines.....	34
1.6.2 Rôle des sélectines dans la dissémination .....	37
1.6.2.1 L-sélectine dans la dissémination.....	37

1.6.2.2 E-sélectine dans la dissémination .....	38
1.6.2.3 P-sélectine dans la dissémination .....	41
1.6.2.4 Formation d'embolies tumorales via les sélectines.....	42

## **CHAPITRE II**

### **Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T lymphoma cells; Implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma.**

Contribution des auteurs.....	48
Résumé (français) .....	49
Introduction.....	50
Matériel et Méthodes .....	52
Résultats.....	56
Discussion .....	60
Références .....	64
Tableaux et figures .....	70
Légendes des tableaux et figures.....	80

## **CHAPITRE III**

### **Up-regulation of *egr-1* gene expression in endothelial cells following interaction with lymphoma cells**

Contribution des auteurs.....	84
Résumé (français) .....	85
Introduction.....	86
Matériel et Méthodes .....	87
Résultats.....	92
Discussion .....	95
Références .....	99
Tableau et figures.....	105
Légendes des figures .....	112

<b>Discussion générale et conclusion .....</b>	<b>115</b>
--	------------

<b>Annexe 1 .....</b>	<b>134</b>
-----------------------	------------

<b>Annexe 2 .....</b>	<b>135</b>
-----------------------	------------

<b>Annexe 3 .....</b>	<b>136</b>
-----------------------	------------

<b>Références.....</b>	<b>147</b>
------------------------	------------

## Liste des figures

### CHAPITRE I

Figure 1. Principales étapes menant au développement de métastases

Figure 2. Différentes étapes du recrutement leucocytaire.

Figure 3. Représentation schématique de la structure des sélectines.

Figure 4. Interactions impliquant les sélectines dans les vaisseaux sanguins.

Figure 5. Cascades de signalisation initiées par la liaison des sélectines ou de leurs ligands.

### CHAPITRE II

Figure 1. Generation of L-selectin-deficient lymphoma cells.

Figure 2. Absence of L-selectin on lymphoma cells prevents their growth in the thymuses of normal, but not L-selectin-deficient, C57BL/6 mice.

Figure 3. Expression of PSGL-1 in the thymuses of BM chimeras.

Figure 4. L-selectin expression on thymocytes of BM chimeras.

Figure 5. Dissemination of T-cell lymphoma in normal and selectin-deficient mice.

Figure 6. *In vivo* migration assays of 164T2 T-lymphoma cells in normal and E-, L-, and P-selectin-deficient mice.

### CHAPITRE III

Figure 1. Identification of differentially expressed genes in bEnd.3 endothelial cell line following contact with 164T2 T-cell lymphoma cells.

Figure 2. EGR-1-induced expression in endothelial cell lines following contact with T lymphoma cells

Figure 3. Intercellular contact between tumor cells and EC induces the transcriptional activation of EGR-1 promoter.

Figure 4. PDGF- $\beta$  induces the expression of EGR-1 in endothelial cells.

Figure 5. Activation of EGR-1 by EGF.

Figure 6. EGR-1 gene expression in lymphoid tumors *in vivo*.

## **DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION**

Figure 1. Modèle d'interaction lympho-stromale lors de la métastase.



## Liste des tableaux

### CHAPITRE I

Tableau 1. Classification REAL/WHO des lymphomes non hodgkiniens.

Tableau 2. Caractéristiques des principaux types de lymphome.

Tableau 3. Causes principales associées au développement d'un lymphome non Hodgkinien.

Tableau 4. Classification d'Ann Arbor selon le stade d'évolution du LNH.

Tableau 5. Principales molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire.

Tableau 6. Expression des sélectines.

Tableau 7. Évidences *in vitro* de l'implication de E-sélectine dans la métastase du carcinome du côlon.

Tableau 8. Études suggérant l'implication ou non de E-sélectine dans la métastase de tumeurs non colorectales.

### CHAPITRE II

Tableau 1. Sequences of primers used for genotyping of mice and lymphoma cell lines.

Tableau 2. Absence of L-selectin in the thymus overcomes the reduced tumorigenicity of L-selectin-deficient T-lymphoma cells.

Tableau 3. Growth of L-selectin-negative KOL1682 T-cell lymphoma injected intrathymically into syngeneic mice reconstituted with bone marrow cells from normal and L-selectin-deficient mice.

Tableau 4. Ability of aggressive lymphoma cells to overcome the resistance of selectin-deficient mice.

### CHAPITRE III

Tableau 1. Genes differentially expressed in endothelial cells following contact with thymocytes or T lymphoma cells

## Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN inhibiteur
ARNm	ARN messenger
CD	cluster designation
COX-2	cyclooxygénase-2
CR	consensus repeat
CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
EBV	Epstein-Barr virus
EGF	epithelial growth factor
EGR-1	early growth response protein 1
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESL-1	E-selectin ligand-1
FGF	fibroblast growth factor
fMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
FUT	fucosyltransférase
FX	fucosyl transférases
GlyCAM-1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
GM-CSF	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Gy	gray
HEV	high endothelial venules
HGF	hepatocyte growth factor
HHV-8	human herpes virus
HTLV-1	human T-cell leukemia/lymphoma virus
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF	insulin-like growth factor
IVVM	intravital video microscopy
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
kDa	kilodalton
LFA-1	leukocyte function-associated antigen 1
LMP1	latent membrane protein 1
LNH	lymphome non hodgkinien
LPS	lipopolysaccharide

mAb	monoclonal antibody
Mac-1	macrophage-associated antigen-1
MadCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MALT	mucosal associated lymphoid tissues
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MMP	matrix metalloproteinase
MT1-MMP	membrane-type 1 matrix metalloproteinase
NGFI-A	nerve growth factor induced-A
NK	natural killer
OMS	organisation mondiale de la santé
PMBC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PLCs	pre-leukemic cells
PNA <sub>d</sub>	peripheral lymph node addressin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RadLV	radiation leukemia virus
REAL	revised european-american lymphoma classification
SAPK2	stress-activated protein kinase-2
SALT	skin associated lymphoid tissues
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SIDA	syndrome d'immuno-déficience acquise
sLe <sup>a</sup>	carbohydrate sialyl Lewis A
sLe <sup>x</sup>	carbohydrate sialyl Lewis X
TdT	terminal deoxytransferase
TfR	transferrin receptor
TIEG	TGF- $\beta$ inducible early gene
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
u-PA	urokinase-type plasminogen activator
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4	very late antigen-4
WHO	world health organisation
WT-1	Wilms tumor suppressor protein 1
ZIF	zinc finger

## Résumé général

Le lymphome non hodgkinien (LNH) représente le 5<sup>ème</sup> type de cancer le plus fréquemment rencontré chez les Canadiens. Il est notamment responsable de 8% des décès reliés au cancer chez les jeunes de moins de 19 ans. Le principal obstacle au diagnostic et au traitement du LNH est relié à la dissémination des cellules cancéreuses vers les organes périphériques et la formation de métastases. Puisque la majorité des molécules d'adhésion exprimées sur les leucocytes normaux se retrouvent également à la surface des cellules de lymphome, il a été postulé que ces molécules pourraient jouer un rôle clé dans la dissémination des cellules cancéreuses vers les organes périphériques. De plus, des travaux récents ont démontré que lors du processus métastatique, les contacts intercellulaires entre les cellules tumorales et l'endothélium vasculaire supportés par la présence de ces différentes molécules d'adhésion peuvent à leur tour moduler l'expression génique des différentes cellules stromales, notamment les cellules endothéliales.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse avaient pour objectif d'élucider le rôle d'une famille de molécules d'adhésion, les sélectines, dans la croissance et la dissémination du lymphome et d'analyser la modulation de l'expression génique des cellules endothéliales lors de leur interaction avec les cellules de lymphome. Ces travaux ont permis d'établir pour la première fois un rôle majeur de la L-sélectine dans la croissance du lymphome thymique. De plus, avec l'aide de modèles transgéniques, nous avons observé que l'absence de L-, E- ou P-sélectine chez l'hôte ralentit de façon significative le développement des métastases suite à l'injection de cellules de lymphome par voie intraveineuse. Par contre, des tests de migration *in vivo* nous ont permis de démontrer que le rôle des sélectines dans la formation de métastases se manifestait à une étape subséquente à la migration aux organes cibles, des résultats conformes à ceux obtenus lors d'études antérieures dans le cas de la molécule d'adhésion ICAM-1. L'ensemble de ces résultats suggère que les molécules

d'adhésion jouent un rôle actif lors de l'interaction entre les cellules cancéreuses et stromales, possiblement en favorisant l'échange de signaux d'activation de façon bidirectionnelle. Les expériences subséquentes entreprises pour confirmer cette hypothèse nous ont en effet permis d'observer la modulation génique de l'endothélium lors de l'interaction avec les cellules de lymphome. Parmi les gènes modulés, on retrouve EGR-1, un facteur de transcription dont l'expression est augmentée de façon significative dans les cellules endothéliales suite au contact avec les cellules de lymphome. Dans la littérature récente, ce facteur de transcription retient de plus en plus l'attention pour son implication dans l'expression de différents gènes dont VEGF, une molécule pro-angiogénique. Bien que la modulation de l'expression de EGR-1 était plus importante lors du contact direct, nous avons observé que la sécrétion de molécules solubles par les cellules de lymphome pouvait être suffisante pour amener cette modulation. Parmi ces molécules, PDGF et EGF ont stimulé l'expression de EGR-1 dans des lignées de cellules endothéliales et des fibroblastes.

En conclusion, nos résultats mettent en évidence le rôle des sélectines dans la pathologie du lymphome et font ressortir la capacité des cellules cancéreuses à moduler l'expression génique des cellules stromales, complexifiant ainsi le modèle traditionnel du processus métastatique.

## CHAPITRE I

### Revue de littérature

## 1.1 Le lymphome

### 1.1.1 Introduction

Le lymphome est un terme général désignant un groupe de cancers prenant naissance au niveau du système lymphatique. Ainsi, le préfixe "lymph-" désigne leur origine des cellules du système lymphatique, alors que le suffixe "-ome" dérive du Grec et signifie "tumeur". Le système lymphatique comprend un réseau de canaux, les vaisseaux lymphatiques longeant les artères et les veines, des ganglions lymphatiques, situés au niveau du cou, des aisselles, de la poitrine, de l'abdomen et de l'aîne ainsi que la moelle osseuse, le thymus, la rate et les plaques de Peyer des muqueuses intestinales. Plusieurs types de cellules leucocytaires peuvent donner naissance aux lymphomes. Généralement, les lymphomes sont divisés en deux grandes catégories, les lymphomes hodgkiniens, et les lymphomes non hodgkiniens (LNH).

Avec 850 nouveaux cas prévus, les lymphomes hodgkiniens comptaient pour seulement 11% de tous les cas de lymphomes au Canada en 2006 <sup>1</sup>. Quant au lymphome non hodgkinien, les 6600 nouveaux cas et 3000 décès anticipés au Canada pour cette même année représentent 4,3% de tous les cas de cancers. De plus, les lymphomes constituent 17% des nouveaux cas et représentent 8% des décès dus au cancer chez les jeunes de moins de 19 ans. Alors que l'incidence de plusieurs autres types de cancer est stable ou en diminution, les LNH sont en continuelle progression, ce qui est attribuable d'une part, à un diagnostic plus précoce et d'autre part à une augmentation des cas réels.

Le lymphome de Hodgkin fut nommé suite à la description de plusieurs cas de la maladie par le Dr. Thomas Hodgkin en 1832. Les lymphomes de Hodgkin sont caractérisés par la présence de cellules de Reed-Sternberg, possédant une morphologie particulière en facilitant le diagnostic. Les cellules de Reed-Sternberg sont en fait des cellules B immatures néoplasiques qui, dans 95% des cas, présentent un réarrangement des gènes des immunoglobulines<sup>2</sup>. Lors du développement des cellules

de Reed-Sternberg, on observe une infiltration massive de la population clonale par des leucocytes sains qui font partie intégrante de la masse tumorale. Le développement localisé accompagné de très rares cas de dissémination, jumelé à l'aspect caractéristique de la tumeur qui en facilite le diagnostic et le traitement, se distingue des lymphomes non hodgkiniens dont l'hétérogénéité des types tumoraux et la plus grande capacité à former des métastases en compliquent la détection et le traitement. Ainsi, au Canada, en 2006, 13% des patients atteints d'un lymphome de Hodgkin en décèderont, par comparaison aux 45% atteints d'un lymphome non hodgkinien<sup>1</sup>.

Les lymphomes non hodgkiniens, sont divisés en plusieurs catégories selon le type de cellules impliquées, les organes atteints et le stade d'évolution de la maladie. Plusieurs systèmes ont été établis afin de classifier les différents types de lymphomes. La classification la plus récente est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS/WHO) qui se veut en fait une mise à jour de la classification REAL (Revised European-American Lymphoma classification) établie en 1994<sup>3,4</sup>. Cette classification des différents types de lymphomes non hodgkiniens est présentée au tableau 1.

### 1.1.2 Causes reliées au développement du lymphome non hodgkinien

Plusieurs preuves confirment que des agents infectieux peuvent être responsables du développement du lymphome non hodgkinien. Ceux-ci comprennent, le virus Epstein-Barr (EBV) qui est associé étroitement au développement du lymphome de Burkitt et des lymphomes associés au VIH (virus de l'immunodéficience humaine)<sup>5</sup>. Entre 45% et 70% des lymphomes non hodgkiniens qui se développent chez des patients atteints du SIDA sont associés à l'EBV. De plus, chez ces individus infectés par le VIH, pratiquement 100% des lymphomes du système nerveux central sont associés à l'EBV. Les lymphomes à cellules NK et les lymphomes T semblables aux NK retrouvés dans le tractus aéropharyngien supérieur ainsi qu'à d'autres sites extra ganglionnaires tels que la peau sont également très souvent associés à EBV<sup>6</sup>. Ces infections sont observées surtout en Asie, en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. HTLV-1



(Human T-cell Leukemia Virus) est directement responsable du développement de la leucémie/lymphome T de l'adulte et se retrouve de façon endémique aux Caraïbes et dans le sud du Japon<sup>7</sup>. Plus récemment, les lymphomes gastriques, plus particulièrement ceux connus sous le nom de lymphomes extra ganglionnaires de la zone marginale de type MALT (mucosal associated lymphoid tissues) ont été associés à une infection par *Helicobacter pylori*<sup>8</sup>. L'herpès virus HHV-8 a également été isolé des sarcomes de Kaposi chez des individus infectés par le VIH<sup>9</sup>. Une infection par *Borrelia burgdorferi* a été associée au développement d'un lymphome extraganglionnaire de la zone marginale de la peau<sup>10</sup>.

L'exposition à divers agents à d'ores et déjà été associée à une augmentation du risque de développement de LNH. Le diphenylhydantoïne peut provoquer le développement d'une hyperplasie lymphoïde, souvent difficile à distinguer du LNH<sup>11</sup>. Dans la majorité des cas, cette hyperplasie régresse lorsque l'on cesse l'administration de la drogue, mais dans certains cas il y aura évolution vers un lymphome. On a aussi suggéré que l'exposition à divers produits chimiques, dont l'acide phénoxyacétique, un herbicide, augmente le risque de LNH<sup>12-14</sup>. D'autres associations avec l'environnement incluent l'exposition à l'arsenic, aux pesticides, fongicides, chlorophénols, halométhane, plomb, chlorure de vinyle et amiante<sup>15-18</sup>. Ainsi, plusieurs professions ont été associées avec un risque plus élevé de développement d'un LNH dont l'agriculture, la soudure et l'industrie de la coupe de bois<sup>19</sup>. L'incidence de LNH est beaucoup plus élevée chez les survivants d'accidents impliquant des réacteurs nucléaires tel que ceux survenus dans la région de Tchernobyl<sup>20</sup>. Le LNH a également été observé plusieurs années suivant un traitement de chimiothérapie ou de radiothérapie. C'est pourquoi des patients traités pour un lymphome de Hodgkin courent un risque plus élevé de développer un autre type de lymphome par la suite<sup>21</sup>.

Les immunodéficiences héréditaires et acquises, tout comme les maladies auto-immunes sont associées à un risque plus élevé de lymphome<sup>22-24</sup>. L'association entre

l'apparition d'un LNH et l'immunosuppression est bien établie. Lorsque l'immunosuppression est renversée, par exemple lorsqu'on cesse l'administration de drogues immunosuppressives suite à une transplantation, la plupart de ces lymphomes régressent de façon spontanée <sup>25</sup>. L'incidence de LNH est 100 fois plus élevée chez des patients transplantés nécessitant une immunosuppression chronique et l'apparition du lymphome survient souvent dès la première année suivant la transplantation. Plusieurs immunodéficiences héréditaires, tels que le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X, le syndrome de Wiskott-Aldrich, le syndrome de Chédiak-Higashi et l'ataxie télangiectasie sont compliquées par des lymphomes agressifs tels le lymphome de Burkitt et le lymphome diffus à grandes cellules B. L'incidence du lymphome lors de l'immunosuppression iatrogénique, le syndrome de l'immunodéficiência acquise (SIDA) et plusieurs maladies auto-immunes (tableau 3) appuient fortement l'implication du dérèglement immunitaire dans le développement et la pathologie de certains types de lymphomes.

Tableau 1 : Classification REAL/WHO des lymphomes non hodgkiniens

	Fréquence (%) *
<b>Néoplasmes lymphoïdes B</b>	
<b>Hémopathies lymphoïdes à précurseurs de cellules B :</b>	
<b>Leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs de cellules B/lymphome lymphoblastique</b>	
<b>Hémopathies lymphoïdes à cellules B (périphériques)</b>	
Leucémie lymphoïde chronique B/petit lymphome lymphocytaire	7
Leucémie prolymphocytaire B	
Lymphome lymphoplasmocytaire/immunocytome	1
Lymphome du manteau	6
Lymphome folliculaire	22
Lymphome B extraganglionnaire de la zone marginale de type MALT	8
Lymphome B ganglionnaire de la zone marginale (+/- monocytoïde)	
Lymphome splénique de la zone marginale (+/- lymphocytes villeux)	2
Leucémie à tricholeucocytes	
Plasmacytome/myélome plasmocytaire	
Lymphome diffus à grandes cellules B	33
Lymphome de Burkitt	2
<b>Néoplasmes lymphoïdes T et NK</b>	
<b>Hémopathies lymphoïdes à précurseurs de cellules T :</b>	
<b>Leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs de cellules T/lymphome lymphoblastique</b>	
	2
<b>Hémopathies lymphoïdes à cellules T et NK (périphériques)</b>	
	8
Leucémie lymphoïde chronique T/leucémie prolymphocytaire	
Leucémie lymphocytaire T à grains	
Leucémie agressive NK	
Leucémie/lymphome T de l'adulte (HTLV1+)	
Lymphome T/NK extraganglionnaire, de type nasal	
Lymphome T de type entéropathie	
Lymphome T sous-cutané de type panniculite	
Mycose fongoïde/syndrome de Sézary	
Lymphome T gamma/delta hépatosplénique	
Lymphome T angio-immunoblastique	
Lymphome T périphérique, non spécifié	
Lymphome anaplasique à grandes cellules, cutané primitif	
Lymphome anaplasique à grandes cellules, systémique primitif	2

\*Pour les sous-types dont la fréquence est  $\geq 1\%$ . Adapté de Harris *et al.*<sup>26</sup>

Tableau 2: Caractéristiques des principaux types de lymphome

Type de lymphome	Phénotype	Génotype
Leucémie / lymphome lymphoblastique aigu à précurseur de cellules B	Cellules pré-B exprimant TdT sans Ig de surface, CD19+, expression variable de CD10 et CD20	Différentes translocations chromosomiques, dont plusieurs impliquent le locus Ig. $t(12;21)$ dont le réarrangement <i>TEL1</i> et <i>AML1</i> . Différentes translocations chromosomiques, plusieurs impliquant le locus du récepteur des cellules T. Le réarrangement du gène <i>TAL1</i> est le plus commun.
Leucémie / lymphome lymphoblastique aigu à précurseur de cellules T	Cellules pré-T exprimant CD1 et TdT, expression variable de CD2, CD3, CD4, CD5 et CD8	
Leucémie lymphoïde chronique B/petit lymphome lymphocytaire	Tumeur de cellules B périphériques CD5+, CD23+, CD10-, faible expression d'IgM	Trisomie 12, délétion de 11q23, anomalies de 13q, $t(14;19)$
Lymphome folliculaire	Tumeur de cellules B périphériques CD10+, CD5-, expression d'IgG	$t(14;18)$ impliquant le gène <i>BCL2</i> amenant sa surexpression
Lymphome diffu à grandes cellules B	Tumeur de cellules B périphériques, CD5 et CD10 variable, Ig +, TdT -	Différentes aberrations chromosomiques, 30% impliquent $t(14;18)$ ; 20-30% présentent un réarrangement du gène <i>BCL6</i> sur le chromosome 3
Lymphome de Burkitt	Tumeur de cellules B périphériques, CD10+, IgM+	Translocations impliquant <i>c-myc</i> et le locus Ig, habituellement $t(8;14)$ , également $t(2;8)$ et $t(8;22)$ . Infection latente par EBV souvent observée en Afrique.
Lymphome du manteau	Tumeur de cellules B périphériques, CD10-, CD23-, IgM+, IgD+	$t(11;14)$ impliquant le gène <i>BCL1</i> amenant sa surexpression (aussi connue comme cycline D1)
Lymphome T périphérique	Tumeur de cellules T matures, positif pour plusieurs marqueurs de cellule T, exprime CD4 ou CD8, TdT-, CD1-	Différentes translocations chromosomiques. Réarrangement clonal du récepteur de cellule T.

TdT (terminal deoxytransferase), CD (cluster designation), Ig (immunoglobuline), EBV (Epstein-Barr virus)

Tableau 3: Principales causes associées au développement d'un lymphome non hodgkinien

---

**Agents infectieux**

- Virus Epstein-Barr
- HTLV-1 (Human T-cell leukemia/lymphoma virus)
- Helicobacter pylori*
- HHV-8 (Human herpes virus)

**Expositions et agents chimiques**

- Diphenylhydantoïne
- Dioxines, phenoxyherbicides
- Radiation
- Chimiothérapie antérieure
- Radiothérapie antérieure

**Immunodéficience héréditaire**

- Syndrome de Klinefelter
- Syndrome de Chédiak-Higashi
- Ataxie télangiectasie
- Syndrome de Wiskott-Aldrich

**Immunodéficience acquise**

- Immunodépression iatrogénique
- Syndrome d'immunodéficience acquise (VIH)
- Hypogammaglobulinémie acquise

**Maladies auto-immunes**

- Syndrome de Sjögren
  - Maladie coéliquaue
  - Arthrite rhumatoïde et Lupus érythémateux systémique
- 

### 1.1.3 Diagnostic du lymphome non hodgkinien

Au moment de la présentation du patient, un diagnostic de lymphadénopathie généralisée nécessite l'exclusion d'agents infectieux tels bactéries, virus (dont la mononucléose, le cytomegalovirus et le VIH) et parasites (toxoplasmose). On s'entend habituellement à l'effet que la présence d'un ganglion de plus de un centimètre en l'absence d'une infection et qui persiste pour quatre à six semaines devrait être considérée pour une biopsie. Contrairement aux patients atteints de la maladie de Hodgkin, qui présentent des pertes de poids, de la fièvre et des sueurs nocturnes, moins de 20% des patients aux prises avec un LNH se plaignent de tels symptômes, sauf dans

les cas de lymphomes plus agressifs affectant principalement le foie et d'autres sites extra ganglionnaires. Selon le stade de progression de la maladie, les patients présenteront différentes atteintes telles que présentées au tableau 4. Le premier test effectué consistera dans la plupart des cas en une biopsie pour confirmer la présence d'un LNH à l'échelon histologique. Par la suite, des échantillons sanguins seront prélevés afin d'effectuer le décompte cellulaire, le niveau de lactate déshydrogénase, les fonctions hépatiques, et l'étude des protéines sériques dans le but de détecter la présence de protéines monoclonales. Une radiographie de la région thoracique permet parfois de vérifier l'infiltration pulmonaire. Une biopsie de moelle osseuse est effectuée puisque l'atteinte de la moelle est relativement fréquente. L'imagerie par résonance magnétique s'avère également très efficace pour détecter une atteinte de la moelle osseuse, du cerveau et de la moelle épinière, tout comme la tomographie par émission de positrons qui se veut un outil d'imagerie très efficace pour établir le stade de progression du lymphome <sup>27</sup>.

De nouvelles techniques sont maintenant utilisées pour le diagnostic et l'évaluation du stade d'évolution, dont l'analyse de marqueurs de la surface cellulaire, la cytogénétique et la biologie moléculaire. Ainsi, pour les lymphomes présentant des translocations chromosomiques, l'utilisation de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) permet la détection rapide et très sensible d'une seule cellule tumorale présente parmi  $10^5$  à  $10^6$  cellules saines <sup>28-31</sup>. Ki-67, un antigène nucléaire, est exprimé par les cellules tumorales en division. L'expression élevée de cette molécule signe un très mauvais pronostic (18% de survie/an); au contraire, les LNH ayant une faible expression de Ki-67 présenteront un taux de survie de 82 % pour la même période <sup>32</sup>. Plusieurs études ont démontré que l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire et l'apoptose (p53, p21, Rb, p27, bcl-2) peut être reliée au pronostic des patients atteints de LNH <sup>33-38</sup>. Au plan cytogénétique, plusieurs anomalies sont synonymes d'un mauvais pronostic, incluant la complexité du caryotype, la présence de translocations chromosomiques (bcl-2, c-myc, etc.), des anomalies du bras court du chromosome 1, la

trisomie 7, trisomie 18 et la délétion du chromosome 6<sup>39-41</sup>. Finalement, certaines corrélations ont pu être établies entre l'agressivité et le potentiel de dissémination du LNH et l'expression de diverses molécules d'adhésion. Cet aspect sera abordé plus en détail dans la prochaine section<sup>42</sup>.

Tableau 4: Classification d'Ann Arbor selon le stade d'évolution du LNH

Stade I	Atteinte d'une seule région ganglionnaire ou d'un seul organe ou site extra ganglionnaire (I <sub>E</sub> ).
Stade II	Atteinte de plus d'une région ganglionnaire du même côté du diaphragme ou atteinte localisée d'un organe ou site extra ganglionnaire (II <sub>E</sub> ) et d'une ou plusieurs régions ganglionnaires ipsilatérales.
Stade III	Atteinte de régions ganglionnaires des deux côtés du diaphragme pouvant s'accompagner d'une atteinte localisée d'un organe ou d'un site extra ganglionnaire (III <sub>E</sub> ), de la rate(III <sub>S</sub> ) ou les deux(III <sub>SE</sub> ).
Stade IV	Atteinte disséminée de sites extra ganglionnaires, incluant toutes atteintes du foie, de la moelle osseuse et des ganglions pulmonaires.

#### 1.1.4 Traitements

La radiothérapie est particulièrement utilisée dans le cas de lymphomes de stades peu avancés et localisés. La localisation de la tumeur est importante afin de préserver les tissus sains lors de l'irradiation, tissus qui toutefois guériront plus facilement en raison de mécanismes de réparation de l'ADN plus efficaces que ceux observés chez les cellules cancéreuses. Dans d'autres cas, la radiothérapie néo-adjuvante sera utilisée pour réduire la taille de la tumeur et empêcher la dissémination des cellules cancéreuses avant une opération chirurgicale ayant pour but l'ablation de la

tumeur. La chirurgie est parfois utilisée pour exposer la tumeur et faciliter l'irradiation plus précise de la masse tumorale de façon à épargner les cellules saines. Dans le cas du LNH, alors que les masses tumorales seront souvent accompagnées d'une dissémination des cellules cancéreuses, les traitements jumelant radiothérapie et chimiothérapie sont fréquemment utilisés. L'administration des agents chimiothérapeutiques par voie intraveineuse permettra d'atteindre différents organes dont la moelle osseuse qui constitue une cible potentielle de dissémination. La chimiothérapie affectera les cellules en division, dont les cellules cancéreuses, mais également d'autres cellules saines, d'où l'importance des effets secondaires. Les molécules chimiothérapeutiques utilisées dans le traitement du LNH appartiennent à plusieurs classes de substances. On retrouve des agents alkylants créant des dommages à l'ADN (cisplatine, cyclophosphamide), des agents antibiotiques interagissant avec l'ADN (doxorubicine), des antimétabolites empêchant la croissance cellulaire (fludarabine, pentostatine), des inhibiteurs d'enzymes de réparation de l'ADN (etoposide), des inhibiteurs de microtubules empêchant la division cellulaire (vinblastine, vincristine), des analogues de nucléotides empêchant la réplication de l'ADN (2'-deoxycoformin, 2-chlorodeoxyadenosine) et des hormones stéroïdiennes connues pour leur effet anti-inflammatoire agissant sur les leucocytes, donc également sur les cellules de lymphome (dexaméthasone, prednisone). Le traitement le plus couramment utilisé pour les différentes formes de lymphome comprend un cocktail de quatre de ces agents chimiothérapeutiques, soit la cyclophosphamide, la doxorubicine, la vincristine et la prednisone (CHOP) <sup>43</sup>.

Des protocoles d'administration d'agents chimiothérapeutiques à très fortes doses se sont montrés efficaces dans le traitement des lymphomes agressifs, mais ces traitements présentent des effets indésirables sur les cellules saines du système immunitaire et nécessiteront une greffe de moelle osseuse <sup>44</sup>. Ainsi, prélevée chez le même patient avant le traitement (autologue) ou provenant d'un donneur (syngénique ou allogénique), la moelle osseuse greffée permettra de remplacer les cellules du système immunitaire détruites par ces puissantes doses d'agents chimiothérapeutiques.



Malgré les progrès qui ont été réalisés avec les thérapies conventionnelles pour le traitement du LNH, plusieurs patients ne sont pas totalement guéris. Contrairement à plusieurs autres types de cancer, la majorité des patients atteints du LNH peuvent espérer une rémission complète. L'obstacle majeur à la guérison demeure les sous populations résiduelles de cellules néoplasiques résistantes aux traitements et qui persistent dans l'organisme. Pour pallier ce problème, de nouveaux traitements alternatifs et innovateurs sont présentement à l'étude et dans certains cas déjà disponibles aux patients. L'efficacité des doses chimiothérapeutiques conventionnelles peut ainsi être augmentée par l'utilisation simultanée de facteurs de croissance hématopoïétiques. Plusieurs cytokines telles que les interférons et le TNF ont également été identifiées pour leur pouvoir cytostatique ou cytotoxique sur les cellules cancéreuses <sup>45</sup>. Des oligonucléotides anti-sens pouvant bloquer l'expression de différents gènes, comme des anti-bcl-2, sont présentement en études cliniques et pourraient se révéler un moyen efficace pour induire l'apoptose des cellules néoplasiques <sup>46</sup>. À l'opposé, le transfert d'un gène p53 sauvage par vecteur adénoviral est présentement à l'étude et pourrait trouver application dans le traitement du LNH <sup>47</sup>. Des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules cancéreuses, tel un anti-CD20 contre les cellules du lymphome B, sont présentement utilisés dans le traitement du LNH, soit sous forme non conjugués ou encore liés à des radio-isotopes <sup>48</sup>. Plus récemment, un anti-CD30 couplé à une forme mutante de l'exotoxine de *Pseudomonas* et qui pourrait être utilisé dans le traitement du LNH a été produit. Un anticorps monoclonal dirigé contre TfR (human transferrin receptor) des cellules infectées par HTLV-1 (mAb A24) est en développement et pourrait s'avérer efficace contre la leucémie/lymphome T de l'adulte (HTLV-1+) <sup>49</sup>. La combinaison de ces immunothérapies avec la chimiothérapie actuelle s'est avérée très efficace, démontrant un effet de synergie <sup>50</sup>. Des lymphocytes activés de façon endogène ou exogène peuvent également être utilisés pour attaquer spécifiquement les cellules de lymphome. L'utilisation de cytokines augmentant l'immunité anti-tumorale comme l'IL-12 et l'IL-15

représente également une forme d'immunothérapie <sup>45,51</sup>. D'autres moyens d'améliorer l'immunité de l'hôte contre les cellules tumorales consiste en la vaccination contre le déterminant idiotypique des immunoglobulines pour induire une réponse spécifique contre les cellules résiduelles qui ont résisté au traitement conventionnel <sup>52-55</sup>. Malgré tout, la plus grande percée thérapeutique viendra d'une meilleure compréhension des évènements génétiques et des mécanismes de développement et de dissémination des cellules cancéreuses. Des cibles plus spécifiques aux cellules cancéreuses et moins toxiques pour les cellules normales pourront être ainsi identifiées. Les études en cours seront donc une source de thérapies nouvelles et complémentaires aux traitements conventionnels présentement utilisés.

## 1.2 Métastase

La métastase est la cause principale de morbidité et de mortalité dans la majorité des cancers. La métastase, du Grec *methistanai*, signifiant changement de position, est un processus par lequel les cellules cancéreuses migrent vers des sites éloignés pour former des tumeurs secondaires appelées métastases. Depuis les travaux de Paget il y a plus de 100 ans, certaines recherches continuent de démontrer que la migration des cellules cancéreuses ne s'effectue pas au hasard et que différentes cellules cancéreuses auront différentes destinations et sites de croissance<sup>56,57</sup>. Pour expliquer ces observations, la théorie du "seed and soil" suggère que différents organes offrent des conditions de croissances appropriées à certains types de cancer spécifiques alors que la théorie du "homing" propose que les organes possèdent différentes capacités d'attraction et d'arrêt spécifiques à différents types de cellules cancéreuses. Le processus métastatique est très sélectif et consiste en une série d'étapes séquentielles toutes aussi importantes dans la réussite des cellules cancéreuses à former des tumeurs secondaires dans les organes périphériques (Figure 1). Après la transformation initiale des cellules et la croissance tumorale, la vascularisation est nécessaire pour assurer la survie des masses tumorales excédant 1mm de diamètre. La synthèse et la sécrétion de plusieurs facteurs proangiogéniques par la tumeur et les cellules de l'hôte ainsi que l'absence de facteurs antiangiogéniques sont les éléments clés pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des tissus environnants. Par la suite, l'invasion du stroma entourant la tumeur est la conséquence de l'expression de diverses enzymes, incluant les métalloprotéinases de la matrice (MMPs)<sup>58</sup>. Alors que les cellules cancéreuses ont pénétré les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, elles peuvent directement s'y développer ou encore être entraînées dans le système circulatoire. Les cellules tumorales doivent dès lors survivre à la surveillance du système immunitaire et à la turbulence engendrée par le flux circulatoire. Elles peuvent alors arrêter leur course par des contraintes mécaniques de taille, comme l'a observé l'équipe de Chambers par microscopie intravitale<sup>59-61</sup>, ou encore, à la façon des cellules circulantes saines, par le biais des molécules d'adhésion

exprimées par les cellules cancéreuses elles mêmes et l'endothélium vasculaire <sup>62</sup>. Par la suite, les cellules cancéreuses sortiront des vaisseaux sanguins par l'extravasation à travers la barrière de cellules endothéliales et pénétreront le parenchyme des organes cibles, où elles se multiplieront et donneront lieu à la formation de métastases.

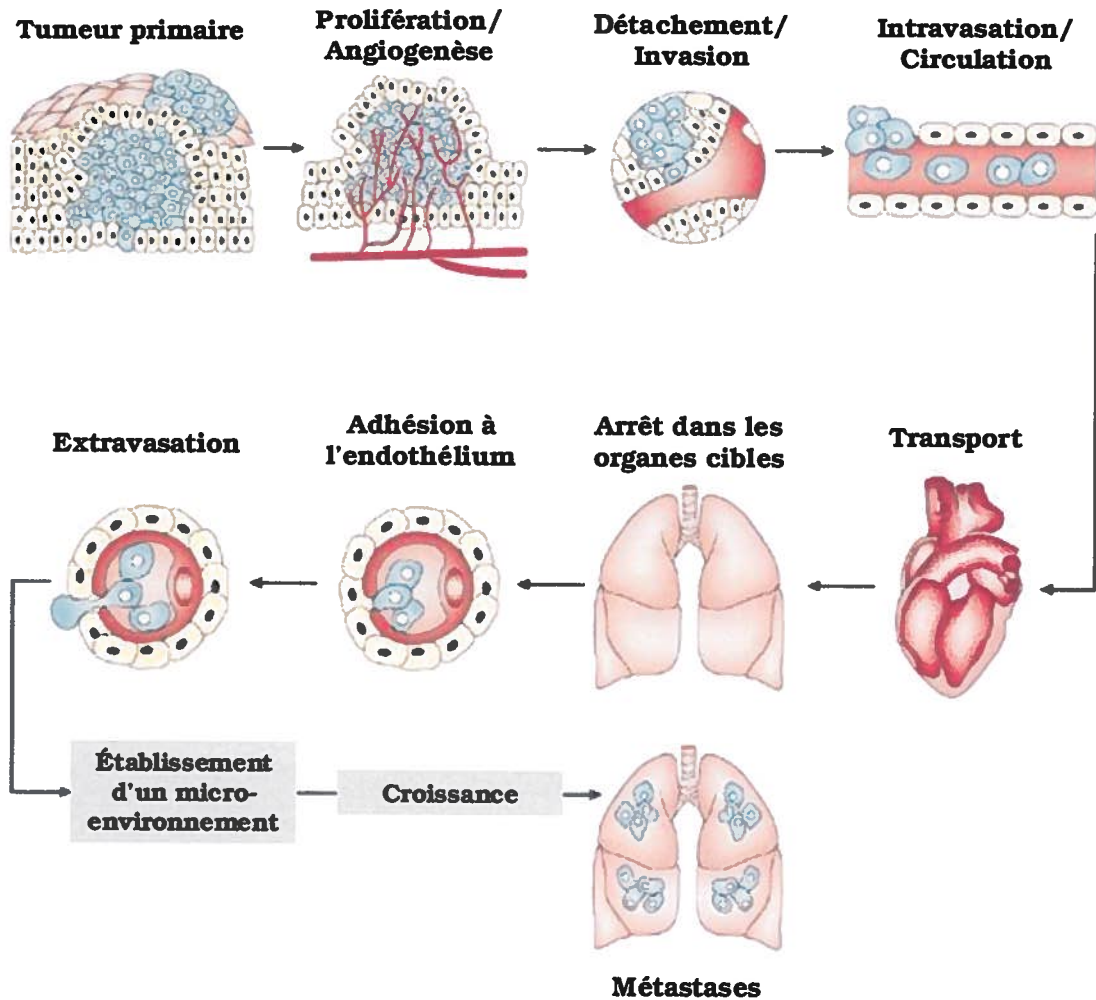


Figure 1 : Principales étapes menant au développement de métastases <sup>57</sup>.

D'autres découvertes viennent enrichir les anciennes théories liées au développement du cancer et au processus métastatique et démontrent la complexité et l'hétérogénéité des mécanismes impliqués dans le processus métastatique. Ainsi, des travaux récents effectués par l'équipe de Muschel suggèrent que les cellules

cancéreuses, une fois arrêtées au niveau des vaisseaux sanguins, s'y développeront localement et formeront une microembolie. L'atteinte des organes sera observée lorsque la masse tumorale aura atteint une taille suffisante pour créer une brèche dans le vaisseau sanguin, ce qui entraînera l'invasion de l'organe <sup>63</sup>. Dans un autre ordre d'idées, le rôle des cellules du système immunitaire semble maintenant paradoxal. D'un côté, leur aspect protecteur pour l'hôte par la reconnaissance d'antigènes tumoraux et la destruction des cellules néoplasiques est connu depuis bien longtemps. Par contre, l'implication des cellules du système immunitaire pour promouvoir la métastase est un concept récent mis de l'avant par l'équipe de Werb <sup>64,65</sup>. Ainsi, par la sécrétion d'enzymes protéolytiques dont les MMPs dégradant la matrice extracellulaire, les leucocytes faciliteraient la migration des cellules cancéreuses à travers le stroma dans les étapes précédant l'intravasation et suivant l'extravasation. La sécrétion de différentes chimiokines par les leucocytes joue également un rôle dans le développement tumoral <sup>65</sup>.

Les cellules tumorales ne prennent pas seulement avantage des facteurs sécrétés par les cellules inflammatoires, mais elles utilisent également les mêmes molécules d'adhésion pour faciliter la dissémination à travers l'organisme. Plusieurs preuves indiquent en effet que les mécanismes de migration des leucocytes sont également utilisés dans la dissémination des cellules cancéreuses via les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ceci est d'autant plus pertinent dans le cas du lymphome, constituant la contrepartie maligne des lymphocytes et exprimant à sa surface des molécules d'adhésion similaires <sup>62</sup>.

### 1.3 Recrutement leucocytaire

Basé sur des observations *in vitro* et *in vivo*, le recrutement leucocytaire peut être décrit comme un processus séquentiel comportant trois étapes distinctes: 1.- l'attachement transitoire (culbutage) et le roulement, au cours desquels on observe également l'activation des leucocytes; 2.-l'adhésion ferme; 3.-la transmigration (Figure

2) <sup>66</sup>. Les molécules d'adhésion de la famille des sélectines sont essentielles pour les premières étapes consistant en l'attachement transitoire des leucocytes à la surface de l'endothélium <sup>66,67</sup>.

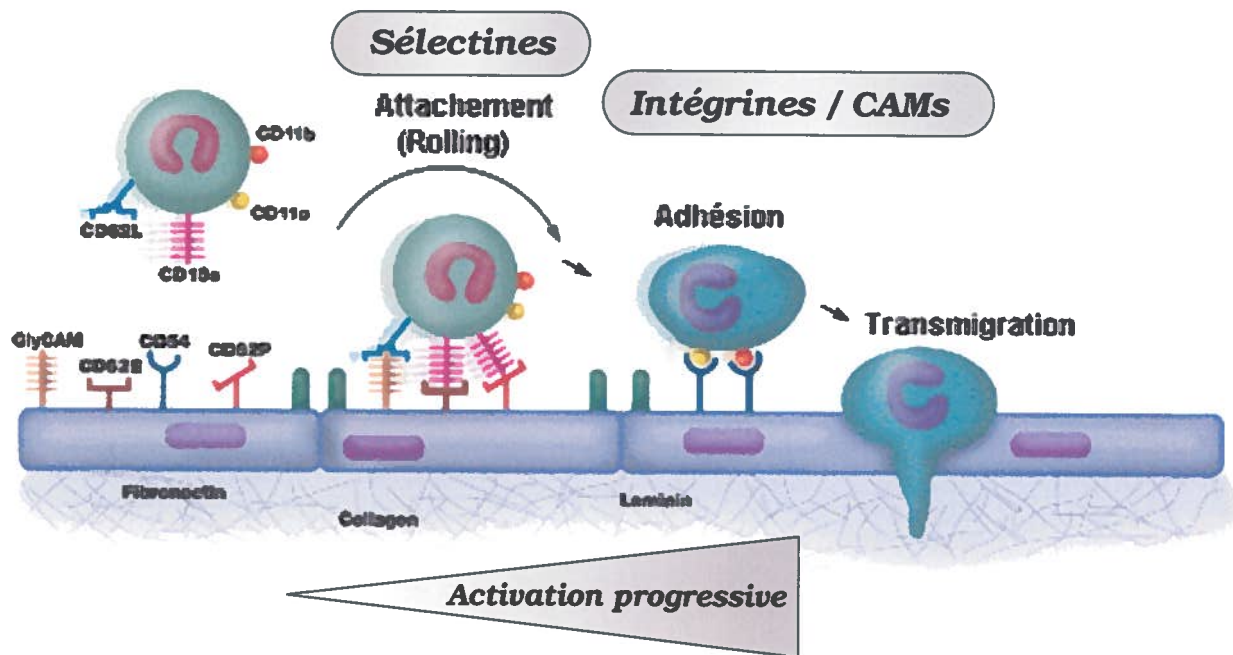


Figure 2 : Différentes étapes du recrutement leucocytaire. Adapté de R&D systems, ([www.rndsystems.com](http://www.rndsystems.com)) et de Klaus F. Ley ([bme.virginia.edu/ley/](http://bme.virginia.edu/ley/))

L'attachement transitoire entre les sélectines et leurs ligands mènera à un mouvement rotatoire des leucocytes. Cette adhésion transitoire orchestrée par les sélectines et l'expression de chimiokines, aura également pour effet d'activer une autre classe de molécules d'adhésion, les intégrines, exprimées à la surface des leucocytes. Ces intégrines, principalement LFA-1 et VLA-4 permettront l'adhésion ferme des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire, où elles reconnaîtront leurs ligands spécifiques de la grande famille des immunoglobulines soit ICAM-1 et VCAM-1. L'expression de

PECAM-1 à la fois sur la surface des cellules leucocytaires et endothéliales permettra une liaison homotypique également impliquée dans l'adhésion ferme et la transmigration. Ainsi, lors de cette transmigration, les leucocytes se déplaceront à travers la couche de cellule endothéliale pour atteindre l'organe cible. Le tableau 5 présente un résumé des molécules d'adhésion exprimées à la surface leucocytaire et endothéliale et impliquées dans le recrutement.

Tableau 5 : Principales molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement leucocytaire.

<b>Leucocytes</b>	<b>Endothélium</b>	<b>Fonction</b>
L-sélectine	GlyCAM-1, CD34, MadCAM-1	Adhésion transitoire / Roulement
ESL-1, PSGL-1	E-sélectine	Adhésion transitoire / Roulement
PSGL-1	P-sélectine	Adhésion transitoire / Roulement
CD44	Hyaluronate, E-sélectine	Adhésion transitoire / Roulement
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)	ICAM-1, ICAM-2	Adhésion ferme
$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	VCAM-1	Roulement / Adhésion ferme
$\alpha_4\beta_7$	MadCAM-1	Roulement / Adhésion ferme
CD31 (PECAM-1)	CD31 (PECAM-1)	Adhésion ferme / Transmigration

#### 1.4 Les sélectines

Les sélectines<sup>67-70</sup> sont des glycoprotéines transmembranaires dépendantes du calcium se liant à des protéines spécifiques présentant des groupements carbohydrates sialylés. Il existe trois types de sélectines soit L-, E- et P-sélectines. Au plan structural, les sélectines sont très similaires, tel que l'on peut voir à la figure 3. Ainsi, elles possèdent toutes un domaine lectine à l'extrémité NH<sub>2</sub> conférant aux sélectines leurs capacités d'adhésion. Cette région est suivie d'un domaine similaire à EGF et de domaines consensus répétés (CR). Les sélectines sont ancrées à la membrane par un court domaine transmembranaire et contiennent une courte queue cytoplasmique leur conférant certaines capacités de signalisation. La différence principale au niveau

structural repose sur le nombre de domaines CR. Les trois gènes codant pour les sélectines se retrouvent dans la même région du chromosome 1 (q21-24) <sup>71,72</sup>. Les sélectines partagent une homologie de 40 à 60 % au niveau nucléotidique et protéique, alors que les domaines lectine et EGF sont homologues chez les trois membres de la famille de 60 à 70 % <sup>73</sup>. Au niveau inter-espèces les sélectines possèdent respectivement entre elles une homologie qui se situe entre 70 et 80% <sup>74-81</sup>.

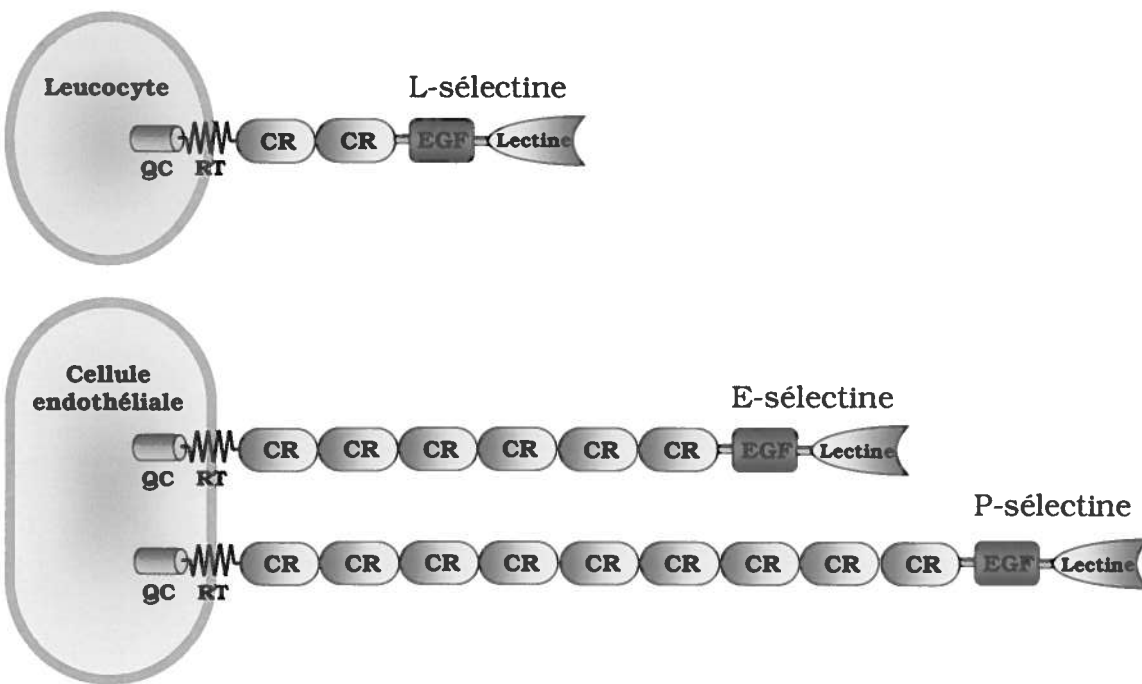


Figure 3 : Représentation schématique de la structure des sélectines. QC (queue cytoplasmique); RT (région transmembranaire); CR (consensus repeat); EGF (Epithelial growth factor-like domain).

#### 1.4.1 P-sélectine

P-sélectine (CD62P, GMP-140, PADGEM, LECAM-3) est une protéine de 140 kDa découverte sur les plaquettes sanguines et également exprimée par les cellules endothéliales <sup>82,83</sup> (Tableau 6). Dans les deux types cellulaires, P-sélectine est



exprimée de façon constitutive dans des granules sécrétoires, soit les granules- $\alpha$  des plaquettes et les corps de Weibel-Palade dans les cellules endothéliales<sup>82-84</sup>. Suite à la stimulation, ces granules fusionneront à la membrane plasmique, ce qui permettra l'expression de P-sélectine à la surface cellulaire en quelques minutes. Elle est impliquée dès le départ dans le recrutement leucocytaire<sup>85,86</sup>. P-sélectine peut également être régulée au niveau transcriptionnel. IL-4, IL-13 et l'oncostatin M augmentent la synthèse de l'ARNm et l'expression protéique de P-sélectine dans les cellules endothéliales humaines<sup>87-89</sup>. Au contraire, le TNF- $\alpha$ , le lipopolysaccharide (LPS) et l'IL-1 n'augmentent pas la synthèse d'ARNm, probablement en raison de l'absence d'un site de liaison pour NF- $\kappa$ B dans le promoteur humain de P-sélectine<sup>90</sup>. Par contre, la présence de site de liaison pour NF- $\kappa$ B dans le promoteur murin rend possible la régulation par le TNF- $\alpha$  et le LPS<sup>90,91</sup>. Une fois exprimé par les cellules endothéliales, P-sélectine est rapidement internalisée par endocytose<sup>92</sup>.

Tableau 6 : Expression des sélectines

Sélectine	Cellules/tissus	Expression	Références
P-sélectine	Plexus choroïde	Constitutif	93
	Endothélium pulmonaire	Constitutif	94
	Plaquettes	Suite à l'activation	84
	Microparticules plaquettaires	Constitutif	95
	Macrophages péritonéaux	Constitutif	96
	Endothélium (Inflammation)	Inductible dans plusieurs organes	68,97
E-sélectine	Endothélium cutané	Constitutif	98
	Endothélium (Inflammation)	Inductible dans plusieurs organes	68
L-sélectine	Cellules myéloïdes	Constitutif	68
	Cellules T naïves	Constitutif	68
	Cellules T effectrices	Faible/négatif	99
	Cellules T mémoires effectrices	Absent	99
	Cellules T mémoires centrales	Conservée ou ré-exprimée	99

#### 1.4.2 E-sélectine

E-sélectine (CD62E, ELAM-1, LECAM-2), une protéine de 115 kDa, est également exprimée par les cellules endothéliales <sup>100,101</sup>. Contrairement à P-sélectine, E-sélectine n'est pas exprimée de façon constitutive; son expression est régulée de façon transcriptionnelle par différentes molécules, dont le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 <sup>100</sup>. Cette régulation transcriptionnelle est dépendante de plusieurs facteurs de transcription dont NF- $\kappa$ B et AP-1. Une fois exprimée à la surface, E-sélectine est par la suite internalisée et redirigée vers les lysosomes pour la dégradation <sup>102</sup>. Comme pour les autres sélectines, il a été démontré que le domaine lectine était le plus important pour la reconnaissance des ligands <sup>103,104</sup>. Des preuves additionnelles indiquent toutefois qu'une région dans les domaines consensus répétés de E- et L-sélectines serait également impliquée dans l'adhésion <sup>105</sup>.

#### 1.4.3 L-sélectine

L-sélectine (CD62L, LAM-1, LECAM-1, gp90<sup>MEL</sup>, DREG) est exprimée à la surface de la majorité des leucocytes et fut à prime abord identifiée chez la souris comme un récepteur de migration des lymphocytes à l'aide de l'anticorps monoclonal MEL-14 <sup>106</sup>. Contrairement à E- et P-sélectine, L-sélectine peut également permettre le recrutement lymphocytaire au niveau des tissus lymphatiques. Malgré qu'elle fut initialement reconnue comme un récepteur spécifique pour la migration dans les vaisseaux lymphatique, on observa par la suite son expression à la surface de la majorité des leucocytes du sang périphérique et son rôle dans la migration des leucocytes de la circulation systémique <sup>107,108</sup>. Le clonage de L-sélectine humaine démontra qu'elle possède la même organisation des domaines extracellulaires que P- et E-sélectine <sup>109-112</sup>. La masse moléculaire de L-sélectine varie entre les lymphocytes (75 kDa), les neutrophiles (95 à 105 kDa) et les monocytes (110 kDa). Cette variabilité est due aux différences dans la glycosylation post-traductionnelle parmi les différents leucocytes. L-sélectine comporte 22 résidus cystéines, 19 se retrouvant dans les domaines consensus répétés et dans le domaine EGF, suggérant la formation de ponts disulfures et leur

importance dans la conformation du domaine lectine et l'efficacité de la molécule dans la liaison à ses récepteurs <sup>113</sup>. L-sélectine est exprimée de façon constitutive mais suite à l'activation cellulaire, elle subit rapidement un clivage protéolytique de sa portion extracellulaire près de la membrane <sup>114-116</sup>. La concentration de L-sélectine en circulation est suffisante pour inhiber partiellement l'adhésion leucocytaire à l'endothélium et pourrait donc jouer un rôle de modulateur dans la migration leucocytaire lors de l'inflammation <sup>117,118</sup>.

#### 1.4.4 Ligands des sélectines

Immédiatement après la découverte des sélectines, il a été établi que toutes trois liaient le carbohydrate sialyl Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>). Par contre, il fut beaucoup plus ardu de découvrir les réels ligands *in vivo* <sup>119</sup>. On identifia plusieurs enzymes, des glycosyltransférases et fucosyltransférases, impliquées dans la biosynthèse des ligands des sélectines <sup>70</sup>. On observa également que certains glycolipides ont la propriété de lier les sélectines et supporter le roulement des leucocytes *in vitro*.

Un des ligands les mieux caractérisés est le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) exprimé à la surface des cellules myéloïdes, lymphoïdes et dendritiques <sup>120</sup>. Afin d'acquies ses propriétés adhésives, PSGL-1 doit préalablement s'enrichir de résidus oligosaccharides O-liés fucosylés et sialylés <sup>121</sup>. De plus, un ou plusieurs résidus tyrosine en N-terminal doit être sulfaté <sup>122</sup>. Un rôle dans l'interaction entre P-sélectine et PSGL-1 au plan du recrutement leucocytaire a déjà été démontré tant *in vitro* que *in vivo* <sup>123,124</sup>. L'inhibition de PSGL-1 par l'utilisation d'anticorps monoclonaux élimine complètement le roulement des neutrophiles sur P-sélectine alors que la délétion génétique de PSGL-1 diminue également le roulement des leucocytes. Un autre ligand de P-sélectine est CD24, une glycoprotéine présentant plusieurs oligosaccharides O-liés associée à la membrane plasmique via une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol) <sup>67</sup>. Chez les cellules exprimant à la fois CD24 et PSGL-1, dont les neutrophiles, PSGL-1 joue un rôle prédominant dans l'interaction avec P-

sélectine <sup>123</sup>. Par contre, chez les cellules n'exprimant que CD24, ce dernier est suffisant pour permettre le roulement sur P-sélectine <sup>125</sup>. Ainsi, pour un carcinome mammaire CD24-positif, PSGL-1-négatif, on observe un roulement dépendant de P-sélectine sur l'endothélium activé *in vivo*, démontrant l'efficacité de ce ligand.

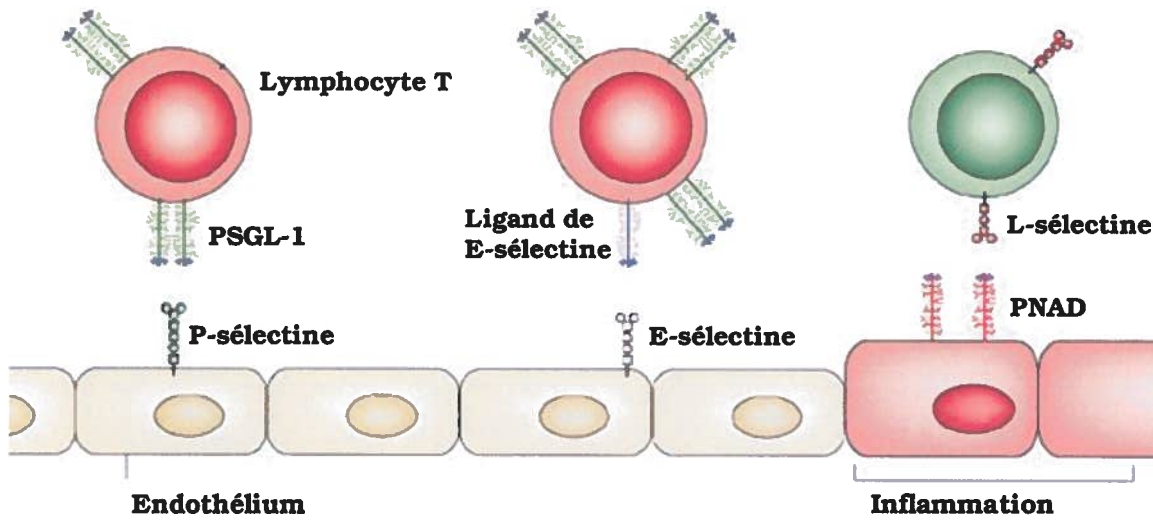
Un des premiers ligands de E-sélectine à être identifié fut ESL-1 (E-sélectine ligand-1) sur la lignée de neutrophiles murins 32Dc13 <sup>126</sup>. L'utilisation d'anticorps contre ESL-1 permet d'inhiber partiellement l'adhésion des cellules 32Dc13 à E-sélectine, confirmant les fonctions biologiques de ce ligand <sup>127</sup>. Récemment, ESL-1 et PSGL-1 furent tout deux identifiés à la surface de cellules de cancer de la prostate et on démontra le rôle de PSGL-1 dans la métastase vers la moelle osseuse <sup>128</sup>. Deux autres ligands possibles de E-sélectine sont PSGL-1 et L-sélectine <sup>127,129-131</sup>. Des anticorps contre PSGL-1 et L-sélectine diminuent le roulement des neutrophiles sur E-sélectine <sup>130,132</sup>. Une autre étude supporte l'implication de PSGL-1 dans le roulement de lymphocytes T sur E-sélectine *in vivo* <sup>133</sup>.

L-sélectine est impliquée dans l'adhésion des leucocytes à la fois sur l'endothélium vasculaire lors de l'inflammation et au niveau des HEV (high endothelial venules) des vaisseaux lymphatiques <sup>134</sup>. La majorité des ligands des sélectines ont été identifiés dans les vaisseaux lymphatiques, d'où leur appellation d'adressines des ganglions lymphatiques périphériques (PNADs), et comprennent GlyCAM-1, MAdCAM-1, CD34 et Sgp200. En plus de son rôle dans l'adhésion, GlyCAM-1 a été identifiée comme induisant la signalisation dans les leucocytes, via L-sélectine, ce qui mènerait à l'activation des intégrines à la surface leucocytaire pour permettre par la suite l'adhésion ferme à l'endothélium tel que présenté plus tôt <sup>135,136</sup>. Quant à MAdCAM-1, il supporte l'attachement transitoire et le roulement en interagissant à la fois avec L-sélectine et l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  <sup>137,138</sup>. Des modifications post-traductionnelles appropriées sont nécessaires pour permettre le roulement via L-sélectine, tel que démontré par des observations où les lymphocytes s'attachaient seulement sur MAdCAM-1 isolé de

sources exprimant l'épitope MECA-79 <sup>137</sup>. MECA-79 est un anticorps monoclonal détectant le N-acetylglucosamine sulfaté (GlcNAc-6-SO<sub>4</sub>) souvent utilisé pour vérifier la présence de ligands de L-sélectine <sup>139</sup>. Cet anticorps reconnaît également un autre ligand de L-sélectine, CD34. Lors de l'inflammation, certains ligands de L-sélectine peuvent être détectés par MECA-79 à la surface de l'endothélium vasculaire <sup>134</sup>. Outre les ligands au niveau des endothéliums lymphatiques et vasculaires, L-sélectine permet l'interaction leucocyte-leucocyte puisqu'elle se lie également à PSGL-1 <sup>140,141</sup> (Figure 4). Ainsi, une variation dans le mécanisme classique de la migration leucocytaire peut être soulevée par ces observations, tandis que les leucocytes peuvent alors effectuer le roulement sur d'autres leucocytes déjà adhérents à l'endothélium, d'où le rôle potentiel de L-sélectine dans la migration à travers les vaisseaux sanguins vers les sites d'inflammation, ou dans le processus métastatique.

Dans cet ordre d'idée, les cellules tumorales présentent fréquemment un patron de glycosylation altéré à leur surface cellulaire <sup>142</sup>. L'expression de sLe<sup>x</sup>/sLe<sup>a</sup> présente une corrélation positive avec la progression tumorale et la métastase <sup>143</sup>. Ces molécules étant des ligands spécifiques des sélectines, il est permis de suggérer un rôle pour ces molécules d'adhésion dans le processus métastatique. Une revue des travaux effectués suggérant un rôle des molécules d'adhésion dans la dissémination des cellules cancéreuses sera ainsi présentée dans une prochaine section.

### Interactions *In vitro*



### Interactions additionnelles *In vivo*

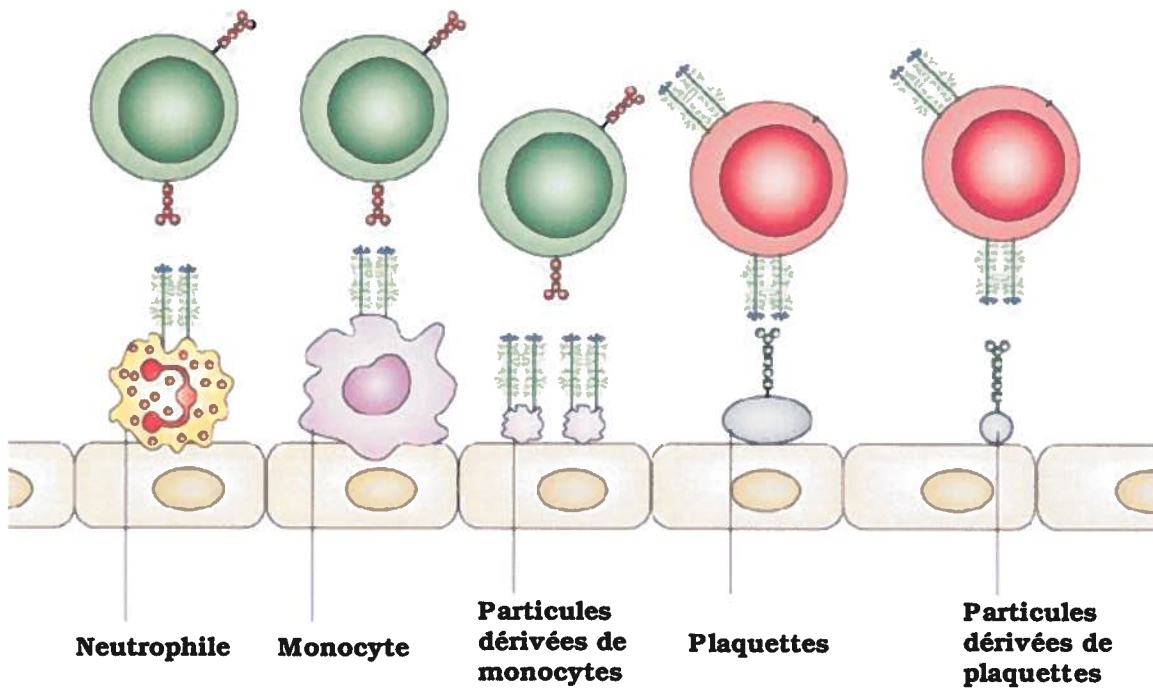


Figure 4 : Interactions impliquant les sélectines dans les vaisseaux sanguins. Adapté de Ley et al. <sup>97</sup>.

#### 1.4.5 Modèles de knock-out des sélectines

Plusieurs travaux ont été effectués pour déterminer le rôle physiologique précis des sélectines dans la migration leucocytaire. À cette fin, des souris génétiquement déficientes en P-, E- et L-sélectine ont été générées<sup>85,144,145</sup>. Parmi les souris présentant une déficience pour une seule des sélectines, les souris déficientes en L-sélectine possèdent le phénotype comportant le plus d'altérations. Ainsi, les lymphocytes provenant de ces souris ne peuvent adhérer aux HEV, le recrutement des lymphocytes dans des modèles d'inflammation est altéré et elles présentent de plus petits ganglions lymphatiques périphériques où l'on retrouve une plus faible cellularité<sup>145,146</sup>. Chez les souris déficientes en P-sélectine, on observe une neutrophilie et elles sont mieux protégées lors de transplantation pulmonaire et d'artériosclérose<sup>85,147-149</sup>. Le recrutement leucocytaire est également altéré suite à un stimuli inflammatoire, mais dans ce cas il ne s'agit que d'un délai qui se rétablit avec le temps<sup>85</sup>. Par contre, les souris déficientes en E-sélectine ne démontrent pas de diminution au niveau du recrutement leucocytaire dans des modèles d'inflammation et d'hypersensibilité de contact<sup>144</sup>. On observe toutefois chez ces souris un affaiblissement des défenses immunitaires suite à une infection par *Streptococcus pneumoniae* et un taux de mortalité et de bactériémie plus élevée que chez les souris normales ou déficientes en P-sélectine<sup>150</sup>.

Malgré que E-sélectine ne semble pas jouer de rôle prédominant dans le recrutement lymphocytaire, son rôle en synergie avec P-sélectine est très différent. Les souris déficientes en E- et P-sélectine (E/P<sup>-/-</sup>) démontrent un phénotype plus altéré que toutes les souris déficientes pour une seule sélectine<sup>151,152</sup>. Ces souris présentent une leucocytose, des niveaux de GM-CSF et d'IL-3 élevés, une atteinte de l'hématopoïèse, une splénomégalie et des infections cutanées spontanées<sup>151,153</sup>. Les souris E/P<sup>-/-</sup> ont aussi une hypersensibilité réduite en réponse à l'oxalozone, une efficacité de guérison de blessures diminuée et une plus grande résistance à l'artériosclérose<sup>154-156</sup>. Suite à une stimulation par le TNF- $\alpha$ , les souris E/P<sup>-/-</sup> présentent une réduction du roulement

leucocytaire de 46 fois, en comparaison des souris normales et de 20 fois par rapport aux souris P-sélectine<sup>-/-</sup> <sup>151-153</sup>. Dans un modèle de péritonite induite par le thioglycolate, l'influx de neutrophiles à 2 et 4 h chez les souris E/P<sup>-/-</sup> est similaire à celui des souris P-sélectine<sup>-/-</sup>; par contre, à 8 h cet influx est nettement diminué par comparaison aux souris P-sélectine<sup>-/-</sup> et aux souris normales <sup>151</sup>. Cela pourrait s'expliquer par l'expression immédiate de P-sélectine suite à une stimulation suivie d'une expression tardive d'E-sélectine et d'une seconde vague de P-sélectine. Les différences principales observées entre les souris E-sélectine<sup>-/-</sup>, P-sélectine<sup>-/-</sup> et E/P<sup>-/-</sup> reflètent bien le chevauchement du rôle de ces deux sélectines dans le recrutement leucocytaire.

Des souris déficientes en L- et P-sélectine (L/P<sup>-/-</sup>) et en L- et E-sélectine (L/E<sup>-/-</sup>) ont également été générées <sup>153,157</sup>. Chez les souris L/P<sup>-/-</sup> on remarque une forte diminution du roulement leucocytaire suite à une stimulation au TNF- $\alpha$  alors qu'aucune différence marquée n'a pu être observée chez les souris L/E<sup>-/-</sup>. Ces résultats indiquent qu'E-sélectine est incapable à elle seule de promouvoir l'adhésion et le roulement des leucocytes contrairement à P-sélectine. Par contre, pour les lignées de souris L/P<sup>-/-</sup> et L/E<sup>-/-</sup>, on observe un délai de recrutement de neutrophiles dans le modèle de péritonite induite par le thioglycolate. Malgré les diminutions observées dans l'efficacité du recrutement leucocytaire chez les souris déficientes pour deux sélectines, elles peuvent toujours supporter jusqu'à un certain point le roulement et l'adhésion. Pour poursuivre les études en ce sens, des souris déficientes pour les trois sélectines (E/L/P<sup>-/-</sup>) ont été générées <sup>153,157,158</sup>. Viabiles et fertiles, elles présentent une leucocytose et développent des infections cutanées. Chez des souris E/L/P<sup>-/-</sup> non traitées ou stimulées au TNF- $\alpha$ , on remarque une réduction significative des leucocytes en roulement ou adhérents à la surface des veinules mésentériques et ce de façon beaucoup plus marquée que pour les autres souris doublement déficientes. Le roulement minimal observé après 6 h de traitement au TNF- $\alpha$  peut complètement être supprimé après administration d'un anticorps bloquant contre l'intégrine  $\alpha_4$ . En réponse à la péritonite induite par le thioglycollate, la migration des neutrophiles est diminuée durant toute l'expérimentation.



Forlow et Ley ont par la suite été encore plus loin en générant des souris déficientes pour les trois sélectines ainsi que pour ICAM-1 (E/L/P/I<sup>-/-</sup>)<sup>159</sup>. On observa chez ces souris encore une fois une diminution du roulement leucocytaire mais à un niveau similaire à celui observé chez les souris E/L/P<sup>-/-</sup>, alors que la différence principale observée consiste en une diminution de l'adhésion. Le faible niveau de roulement et d'adhésion leucocytaire observé est presque complètement inhibé par l'administration d'un anticorps bloquant l'intégrine  $\alpha_4$ , démontrant ainsi l'importance de cette molécule dans ce système et la complémentarité des diverses molécules d'adhésion. Ces modèles de souris déficientes ont donc permis de mieux comprendre le rôle respectif de chacune de ces molécules dans la migration leucocytaire. On peut supposer que des travaux utilisant ces mêmes modèles permettraient d'élucider le rôle des sélectines et d'autres molécules d'adhésion dans la dissémination des cellules cancéreuses. Quelques études récentes ont déjà permis l'évolution des connaissances à ce sujet, telles que les travaux de l'équipe du Dr. St-Pierre démontrant l'importance de ICAM-1 dans la métastase du lymphome T<sup>160</sup>. Ces différents travaux sont discutés dans la revue du chapitre I de la présente thèse et le sujet fait également l'objet d'expérimentations présentées dans le chapitre II portant sur le rôle des trois sélectines dans le développement et la dissémination du lymphome T.

#### 1.4.6 Signalisation induite par les sélectines

Tel que discuté ci-haut, les sélectines ont tout d'abord été identifiées comme des molécules d'adhésion cellulaire. Par contre, plus récemment, plusieurs travaux ont permis d'identifier les capacités de signalisation des sélectines et de leur ligands, tel que présenté à la figure 5. L'activation de L-sélectine chez les neutrophiles par réticulation d'anticorps ou par l'utilisation de sulfatides, induit une variété de réponses cellulaires, incluant un flux de calcium, une augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1 et l'activation de l'explosion respiratoire<sup>161-163</sup>. L'activation de L-sélectine potentialise également la réponse des neutrophiles à d'autres stimuli tels que le formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) et l'IL-8. Ces réponses ne sont pas limitées aux neutrophiles car L-sélectine

peut aussi induire le flux de calcium chez les cellules mononuclées du sang périphérique, les PBMC (peripheral blood mononuclear cells), et augmenter l'expression des intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_2$  par les lymphocytes T <sup>164</sup>. D'autres équipes se sont également penchées sur l'étude des événements de signalisation intracellulaire qui suivent l'activation de L-sélectine. Chez les neutrophiles, la réticulation de L-sélectine amène la phosphorylation de tyrosines et l'activation des MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) <sup>165</sup>. Plus spécifiquement, on observe l'activation d'Erk 1 et 2 et de p38, cette activité de p38 étant responsable de l'augmentation de l'expression de l'intégrine Mac-1. Dans les cellules T Jurkat, la stimulation de L-sélectine, active la kinase p56<sup>lck</sup> de la famille Src. Ceci implique une cascade de signalisation allant de la phosphorylation de L-sélectine, au recrutement de Grb2/Sos, puis à l'activation de Ras, Erk 1 et 2 et Rac2 <sup>166</sup>. L'activité fonctionnelle de p56<sup>lck</sup>, Ras et Rac2 est nécessaire pour la production de superoxide. La réticulation de L-sélectine amène également l'activation dépendante de p56<sup>lck</sup>, de la MAP kinase JNK et l'activation de la sphingomyélinase neutre <sup>167,168</sup>. Plus récemment, on démontra que la stimulation de L-sélectine par réticulation ou par l'intermédiaire des ligands fucoidan ou sulfatide augmentait l'expression à la surface du récepteur de chimiokine CXCR4 <sup>169</sup>. Cette stimulation empêche entre autres l'internalisation de CXCR4 suite à la liaison de la chimiokine SDF-1 (stromal cell-derived factor 1), augmentant le potentiel de stimulation via SDF-1/CXCR4. On observe dans ce modèle une polymérisation de l'actine, une plus grande adhésion et une transmigration des leucocytes stimulés via L-sélectine.

Moins de données sont disponibles quand au potentiel de signalisation via E- et P-sélectine mais certaines indications laissent croire à leurs capacités de transmettre des signaux d'activation. La réticulation de P-sélectine induit une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans les HUVEC, ce qui laisse croire que P-sélectine peut transmettre des signaux à travers la membrane plasmique <sup>170</sup>. Cette possibilité est appuyée par l'association constitutive de P-sélectine avec p60<sup>src</sup> dans les plaquettes <sup>171</sup>. La réticulation de E-sélectine dans les HUVEC induit aussi une augmentation de  $Ca^{2+}$  et la

polymérisation de l'actine, de même que la phosphorylation de tyrosines de E-sélectine<sup>170,172</sup>. E-sélectine phosphorylée peut alors recruter la phosphatase SHP2, amenant l'activation d'Erk 1 et 2.

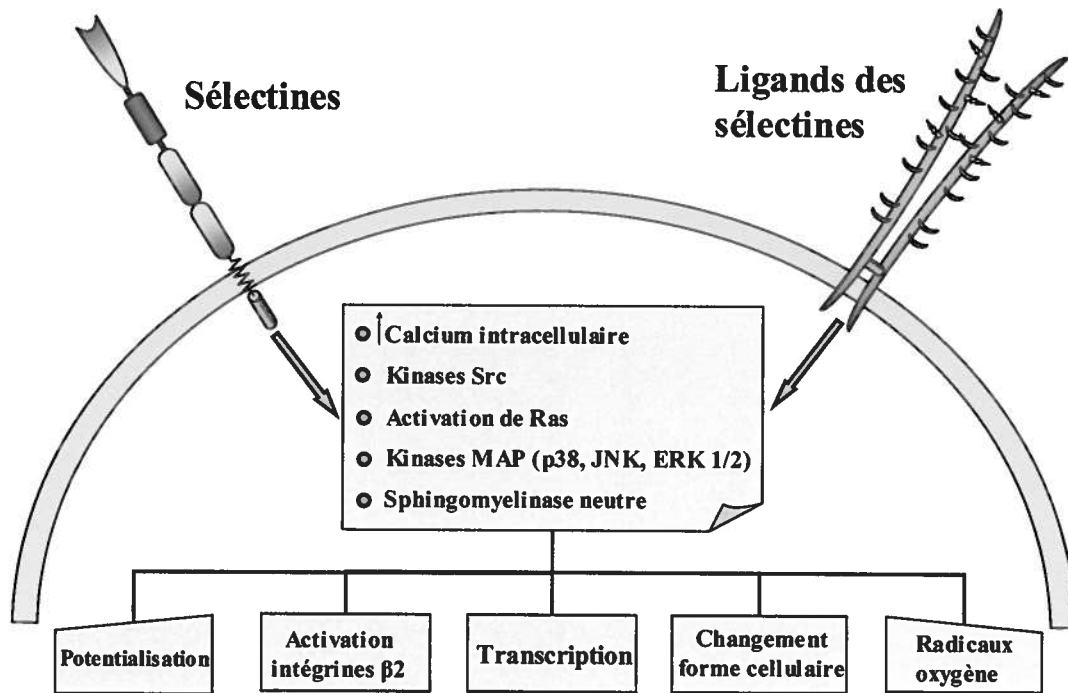


Figure 5 : Cascades de signalisation initiées par la liaison des sélectines ou de leurs ligands.

En plus d'agir à titre de molécules de signalisation, les sélectines peuvent également induire des signaux dans les cellules auxquelles elles adhèrent par l'intermédiaire de leurs ligands. L'adhésion aux plaquettes via P-sélectine induit la production de superoxyde et l'activation des intégrines β<sub>2</sub> dans les leucocytes<sup>173,174</sup>. L'utilisation de P-sélectine recombinante ou encore la réticulation de PSGL-1 conduisent les neutrophiles et les monocytes à une production de cytokines et à l'expression de différents gènes<sup>175,176</sup>. La stimulation par PSGL-1 potentialise la réponse cellulaire aux stimulus secondaires tel que le PAF ou les chimiokines<sup>177,178</sup>. Au niveau des voies de signalisation, la réticulation de PSGL-1, ligand des trois types de sélectines, stimule la

phosphorylation et l'activation de la voie Ras alors que l'adhésion aux cellules CHO exprimant P-sélectine active les kinases de la famille Src p54<sup>lyn</sup> et p56<sup>hck</sup> 176,179. L'adhésion de lymphocytes T à P-sélectine provoque dans les cellules la phosphorylation de tyrosines sur plusieurs protéines, dont la kinase d'adhésion focale pp125<sup>FAK</sup> et la paxiline 180. Les réponses leucocytaires observées suite à la liaison à E-sélectine sont similaires à celles observées avec P-sélectine. L'activation des intégrines  $\beta_2$  en réponse à la liaison à E-sélectine a été observée chez des neutrophiles adhérant aux cellules HUVEC stimulées par l'IL-1 $\beta$  181. Dans les monocytes, E-sélectine soluble induit la chimiotaxie et la phosphorylation de plusieurs protéines de signalisation incluant pp60<sup>src</sup>, p54<sup>lyn</sup> et p56<sup>hck</sup>, Erk1 et 2, et p38 182.

La capacité des sélectines à agir comme molécules de signalisation bidirectionnelles permet d'initier des cascades de signalisation à la fois dans les leucocytes en roulement et dans l'endothélium. Les capacités de signalisation des molécules de la superfamille des immunoglobulines tel ICAM-1 ont également déjà été démontrées 183-185. Ainsi, plutôt que de ne servir qu'à arrêter les leucocytes de la circulation, les sélectines et autres molécules d'adhésion exercent des changements à la fois dans les leucocytes et dans l'endothélium, changements probablement nécessaires à la migration leucocytaire. Dans les leucocytes, l'adhésion via les sélectines active les intégrines  $\beta_2$  nécessaires à l'adhésion ferme subséquente. L'adhésion potentialise également les leucocytes en vue d'une réponse au stimulus chimiotactique, facilitant leur migration dans les tissus et l'activation de leurs capacités effectrices dans le tissu enflammé et possiblement, dans le cas de cellules de lymphome, leur capacité de développement une fois atteint le site périphérique pour l'établissement de métastases. Dans les cellules endothéliales, les conséquences de l'adhésion via les sélectines sont moins bien connues. On sait tout de même qu'elles entraînent des changements au niveau jonctions intracellulaires, facilitant ainsi l'extravasation des leucocytes. Il également été démontré que l'adhésion de cellules cancéreuses du côlon à E-sélectine augmente l'activité de ERK et p38. Ces

changements amèneront une modification de l'intégrité de la barrière endothéliale, facilitant la transmigration des cellules cancéreuses <sup>186</sup>. Ces résultats soulignent l'importance des signaux générés dans l'endothélium lors de la métastase. Des travaux supplémentaires étudiant l'interaction entre les leucocytes ou encore les cellules cancéreuses et l'endothélium vasculaire seraient donc nécessaires pour élargir le champ de connaissance dans ce domaine. Le troisième chapitre de cette thèse portera ainsi sur les changements dans l'expression génique de l'endothélium suite à l'adhésion de cellules cancéreuses.

### 1.5 Modèle murin expérimental de LNH

Plusieurs modèles expérimentaux de cancer ont été établis chez les animaux afin d'en faciliter l'étude. Parmi ceux-ci, on retrouve le modèle de lymphome thymique radio-induit chez la souris établi par Henry S. Kaplan dans les années 1950 <sup>187</sup>. Ainsi, en irradiant de façon hebdomadaire pendant quatre semaines des souris à une dose de 1.75 Gy, on observe le développement d'un lymphome thymique en trois à six mois chez environ 60% des souris irradiées. Dans certaines des lignées de lymphome générées, on observera la présence d'un virus oncogénique RadLV (radiation leukemia virus), induit suite à l'irradiation. De plus, il a été démontré que l'inoculation de ce virus est suffisante pour induire le développement d'un lymphome thymique similaire à celui induit par irradiation. Selon certains travaux, il semble que l'irradiation provoque l'apparition de cellules pré-lymphomateuses dans la moelle osseuse et que ces dernières migrent ensuite vers le thymus, où elles interagissent avec les différents éléments du stroma thymique puis deviennent néoplasiques et donnent lieu au développement d'un lymphome thymique. Parmi ces évidences qui démontrent que les cellules néoplasiques ne prennent pas naissance dans le thymus, on note qu'en protégeant le thymus lors de l'irradiation on obtient quand même le développement d'un lymphome thymique. De plus, si l'on irradie une souris thymectomisée à laquelle on effectue ensuite une greffe de thymus, on peut toujours observer le développement du lymphome thymique. Par contre, la découverte récente d'un deuxième thymus

fonctionnel chez la souris au niveau de la région cervicale met en doute ces observations<sup>188,189</sup>. Malgré tout, d'autres expériences au cours desquelles on observa le développement d'un lymphome thymique chez des souris ayant simplement reçu de la moelle osseuse de souris préalablement irradiées permet de prouver l'implication des cellules souches dans ce modèle. Les cellules de lymphomes ainsi générées peuvent par la suite être mises en culture et établies sous formes de lignées expérimentales de lymphome T. Une fois réinjectées dans le thymus de souris syngéniques, ces cellules donneront naissance à des lymphomes thymiques qui, très rarement, dissémineront vers d'autres organes, dû à la rapidité avec laquelle la souris succombe au lymphome thymique mais également à la faible vascularisation du thymus. En revanche, lorsqu'injectées par voie intraveineuse, ces mêmes lignées de cellules de lymphome mèneront au développement de métastases dans plusieurs organes, plus spécifiquement dans la rate, les reins et le foie. Ainsi, ce modèle, utilisé couramment dans le laboratoire du Dr. St-Pierre, permet d'étudier le rôle de diverses molécules dans le développement du lymphome et lors des étapes successives passant par la croissance localisée au thymus jusqu'à la formation de métastases.

## 1.6 Molécules d'adhésion dans la dissémination du cancer

Au moins trois situations cliniques suggèrent que le processus de dissémination des cellules de lymphome utilise les mécanismes de migration leucocytaire<sup>190</sup>. Premièrement, les LNHS apparentés aux lymphocytes naïfs, comme le lymphome lymphocytaire et le lymphome du manteau, se propagent habituellement à plusieurs sites, alors que les LNHS apparentés aux lymphocytes activés tel le lymphome diffus à grandes cellules B restent localisés<sup>3</sup>. On peut donc présumer que les différences observées quant aux propriétés de dissémination de ces lymphomes reflètent la distribution, soit en recirculation ou localisée, de la contrepartie normale de ces LNHS. Deuxièmement, les lymphomes extra ganglionnaires des muqueuses (MALT) ou de la peau (SALT) se retrouveront disséminés de façon préférentielle respectivement au niveau des muqueuses et de la peau<sup>3,191-194</sup>. Ceci suggère que le processus de

migration spécifique retrouvé chez les lymphocytes est conservé chez le LNH. Troisièmement, la dissémination du lymphome vers des sites de blessure ou d'inflammation a déjà été observée<sup>190,194</sup>. Cette observation peut être expliquée par l'interaction des cellules de lymphome avec les molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium activé au site d'inflammation ainsi que par la sécrétion de molécules chimioattractives auxquelles pourraient être sensibles les cellules de lymphome.

#### 1.6.1: Rôle des intégrines et de la superfamille des immunoglobulines dans la dissémination

Afin d'étudier le rôle des molécules d'adhésion dans la dissémination du lymphome, l'équipe du Dr. St-Pierre combina l'utilisation de souris déficientes en ICAM-1 et les lignées de cellules de lymphomes générées par irradiation selon le modèle de Kaplan décrit préalablement. L'expression de CD3ε à la surface des lymphomes confirme que ces lignées proviennent de la transformation néoplasique de lymphocytes T, tout comme l'expression de différentes molécules d'adhésion dont ICAM-1, ICAM-2, CD31, L-sélectine et LFA-1, le ligand d'ICAM-1 et ICAM-2 sur l'endothélium. Ce répertoire de molécules d'adhésion est similaire à celui retrouvé à la surface des lymphocytes T. L'expression de LFA-1 joue un rôle important dans l'adhésion des cellules de lymphome à l'endothélium vasculaire qui expriment ICAM-1, participant ainsi au processus de dissémination des cellules tumorales aux organes cibles. Cette hypothèse repose sur certaines études démontrant une corrélation entre les niveaux d'expression de LFA-1 sur les cellules tumorales et leur capacités à former des métastases<sup>195</sup>. Puisque les cellules de lymphome expriment LFA-1, l'équipe du Dr St-Pierre vérifia si l'absence d'ICAM-1 chez la souris pouvait réduire la dissémination des cellules cancéreuses vers les organes périphériques. Deux lignées différentes de souris déficientes en ICAM-1 furent utilisées pour vérifier cette hypothèse. La première, ICAM-1<sup>tm1jcg</sup> fut générée en insérant une mutation dans le quatrième exon du gène de ICAM-1, la seconde, ICAM-1<sup>tm1Bay</sup>, en insérant une mutation similaire dans l'exon 5<sup>196,197</sup>.

Lorsque les cellules de lymphome T 164T2 sont injectées à des souris normales, on observe le développement de métastases au foie, à la rate et aux reins dans 50 à 70% des souris dans un délai de huit à dix semaines. Par contre, lorsqu'injectées aux souris déficientes en ICAM-1, aucune tumeur ne se développe, démontrant que les souris déficientes en ICAM-1 sont résistantes à la dissémination des cellules de lymphome 164T2 <sup>160</sup>. La résistance est observée également à de plus fortes doses de cellules cancéreuses et se poursuit pour une période allant jusqu'à 24 semaines après l'injection. Puisque l'on n'observa aucune métastase chez les souris déficientes en ICAM-1, on vérifia par la suite la capacité des cellules cancéreuses à coloniser les organes cibles de ces souris, à savoir le foie, la rate et les reins. Pour ce faire, les cellules 164T2 furent marquées par l'indium<sup>111</sup> et les cinétiques de migration comparées chez les souris normales et les souris déficientes en ICAM-1. Étonnement, on observa que les cellules cancéreuses migraient avec les mêmes cinétiques dans les souris normales et déficientes en ICAM-1. Ces résultats soulignent l'importance de ICAM-1 dans la dissémination du lymphome mais à des étapes ultérieures à la migration vers les organes cibles. Plus spécifiquement, ils suggèrent que la signalisation bidirectionnelle via ICAM-1 et LFA-1 pourrait être importante pour l'extravasation et la croissance tumorale suite à la migration. Par la suite, on vérifia si les souris déficientes en ICAM-1 étaient également résistantes à la dissémination de lignées de lymphomes plus agressives. Pour obtenir de tels lymphomes plus agressifs, des passages *in vivo* de la lignée 164T2 furent effectués chez des souris C57BL/6 en utilisant la rate comme organe où étaient récoltées les cellules de lymphome après chaque passage. Les lignées 164T2S11 et 164T2S19 furent ainsi obtenues. Alors que 164T2 induit le développement de métastases en six à huit semaines chez environ 70% des souris injectées, les lignées agressives 164T2S11 et 164T2S19 produisent des tumeurs dans 100% des souris en deux à trois semaines <sup>198</sup>. Le phénotype agressif de ces lignées fut également confirmé par l'expression constitutive entre autres de MMP-9, un gène associé aux LNHS agressifs. Lorsqu'injectés aux souris déficientes en ICAM-1, ces lymphomes agressifs donnent lieu au développement de métastases. Ainsi, il est



permis de croire qu'ICAM-1 permettrait l'expression de gènes nécessaires à la dissémination, gènes exprimés de façon constitutive dans les lignées agressives.

Ces résultats soulignent l'importance d'ICAM-1 dans la dissémination du lymphome corroborent ceux obtenus pour les lignées de lymphomes déficientes en LFA-1. En utilisant des lignées de lymphomes qui n'expriment pas LFA-1, Roossien *et al.* ont démontré que ces cellules présentent un potentiel invasif diminué à la fois dans des cultures d'hépatocytes et de fibroblastes <sup>199</sup>. *In vivo*, suite à l'injection intraveineuse, la lignée de lymphome parentale TAM2D2 produit des métastases dans 100% des souris en 17 à 22 jours alors que les mutants déficients en LFA-1 n'induisent des métastases que dans 10% des souris et ce en 37 à 46 jours. Cette même équipe démontra que des mutants knock-out pour l'intégrine  $\beta_1$  de la lignée de lymphome murin hautement métastatique ESb présentent un potentiel métastatique réduit <sup>200</sup>. Alors que l'injection intraveineuse de la lignée parentale ESb induit le développement de tumeurs dans toutes les souris en 9 à 11 jours, seulement 50% des souris injectées avec la lignée déficiente pour l'intégrine  $\beta_1$  développent des tumeurs, et ce, après une période de latence de 20 à 60 jours. Cette mutation empêche l'expression de l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) qui se lie normalement à VCAM-1 et à la fibronectine, et de l'intégrine  $\alpha_6\beta_1$  (VLA-6) ayant comme ligand la laminine <sup>201</sup>. Curieusement, la croissance *in vivo* de ces cellules suite à une injection intrapéritonéale n'était pas affectée, démontrant ainsi l'implication spécifique de l'intégrine  $\beta_1$  dans la dissémination via les vaisseaux sanguins. La capacité des mutants à former des métastases pouvait être restaurée en transfectant l'ADN complémentaire (ADNc) de  $\beta_1$ , prouvant l'implication de l'intégrine dans la métastase. La même équipe utilisa ces lignées déficientes pour transfecter des mutants des différents domaines de  $\beta_1$  <sup>202</sup>. Les résultats prouvent que les cinq résidus en C-terminal impliqués dans la signalisation sont nécessaires à la métastase vers le foie et la rate. Au contraire, des mutations du domaine responsable de l'adhésion n'ont aucun effet sur la métastase dépendante de l'intégrine  $\beta_1$ . L'équipe de Reiss et Engelhardt ont établi une lignée d'endothéliome déficiente en ICAM-1 par transformation

de cellules endothéliales provenant de souris ICAM-1<sup>-/-</sup> <sup>203</sup>. En utilisant ce modèle, ils ont observé que l'adhésion des cellules de lymphome TK-1 aux cellules endothéliales était grandement diminuée en l'absence d'ICAM-1. Ils démontrèrent également l'implication importante d'ICAM-1 dans la transmigration des cellules de lymphome T à travers l'endothélium. À la lumière de ces études portant sur l'implication des intégrines et des molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines, il apparaît que ces molécules sont véritablement impliquées dans la dissémination du lymphome. Par contre, cette implication ne semble pas limitée à l'adhésion des cellules de lymphome à l'endothélium, mais implique aussi les capacités de signalisation qui pourraient contrôler l'expression d'autres gènes impliqués dans le processus métastatique. Ces résultats soulèvent l'hypothèse qu'une autre famille de molécules d'adhésion telles les sélectines seraient responsable de l'arrêt des cellules de lymphomes dans les vaisseaux sanguins, sans pour autant exclure leurs capacités de signalisation et leur implication dans la dissémination

## 1.6.2 Rôle des sélectines dans la dissémination

### 1.6.2.1 L-sélectine et dissémination

Alors que le rôle physiologique de L-sélectine exprimée à la surface des leucocytes est bien connu, son rôle quant au développement et la dissémination du lymphome est toujours obscur. Roos et ses collègues ont démontré qu'un hybridome de cellules T ne produisant des métastases qu'aux ganglions lymphatiques possède une forte expression de L-sélectine <sup>195</sup>. De même, il a été observé que l'expression de la L-sélectine sur les cellules tumorales lors d'une leucémie lymphoïde se traduit par l'atteinte des ganglions lymphatiques <sup>204</sup>. Les études visant à analyser l'expression de L-sélectine dans le LNH montrent que la grande majorité des lymphomes localisés aux ganglions lymphatiques expriment L-sélectine <sup>205</sup>. Ceci est valable pour les lymphomes B agressifs de faible grade et les lymphomes T dont la localisation primaire est ganglionnaire. Par ailleurs, l'expression de L-sélectine sur les lymphomes extra ganglionnaires est variable, comme on l'observe pour les leucocytes circulants. Les

lymphomes B et T agressifs des muqueuses n'expriment généralement pas L-sélectine alors que les lymphomes T cutanés expriment de faibles niveaux de L-sélectine <sup>205-207</sup>. Par contre, deux types de lymphomes gastro-intestinaux expriment de bons niveaux de L-sélectine soit le lymphome B de faible grade de type MALT et les polypes lymphomateux malins (MLP) <sup>205,208</sup>. Alors que le MLP, un variant du lymphome du manteau, présente une dissémination vers les muqueuses et les ganglions périphériques, les lymphomes de type MALT- ne migrent habituellement que vers les muqueuses.

#### 1.6.2.2 E-sélectine et dissémination

Plusieurs études *in vitro* supportent l'idée qu'E-sélectine joue un rôle dans la métastase de cellules tumorales du côlon (Tableau 7) <sup>209-217</sup>. Règle générale, on remarque que l'expression des ligands des sélectines à la surface cellulaire est directement reliée au potentiel métastatique des cellules tumorales. Parmi ces études, certaines suggèrent que E-sélectine ne peut être responsable à elle seule de l'interaction entre les cellules tumorales et l'endothélium car d'autres interactions cellules-cellules sont nécessaires au processus métastatique <sup>210,218</sup>. D'autres études ont également suggéré que E-sélectine participe à la métastase de différents types tumoraux, incluant le lymphome (Tableau 8) <sup>219-226</sup>. Parmi celles-ci, on remarque l'implication possible de E-sélectine lors du processus métastatique de toutes les lignées de leucémie/lymphome étudiées. Il fut observé que l'adhésion de la lignée de cellules leucémiques HL-60 à l'endothélium activé est réduite de façon significative suite à l'ajout d'un anticorps contre E-sélectine <sup>220</sup>. Une autre étude démontra que deux lignées de lymphomes adhèrent à l'endothélium des sinusoides hépatiques par l'intermédiaire de E-sélectine. Dans ces travaux, l'adhésion des cellules de lymphomes est empêchée par l'utilisation de sLe<sup>x</sup> synthétique ou encore d'un anticorps monoclonal dirigé contre E-sélectine.

Tableau 7:Évidences *in vitro* de l'implication de E-sélectine dans la métastase du carcinome du côlon.

Étude	Observations	Réf.
Dejana <i>et al.</i>	Un anticorps contre E-sélectine inhibe fortement l'adhésion de cellules du côlon aux cellules endothéliales activées à l'IL-1.	209
Yamada <i>et al.</i>	L'adhésion de cellules cancéreuses du côlon humain à des HUVECs stimulées est dépendante de E-sélectine sur les cellules endothéliales et la molécule Span-1 sur les cellules tumorales.	210
Bresalier <i>et al.</i>	Le niveau d'expression de sLe <sup>x</sup> est plus élevé sur les cellules du cancer du côlon métastatique que sur les cellules de la tumeur primaire.	211
Sato <i>et al.</i>	Le niveau d'expression de sLe <sup>a</sup> par les cellules de carcinome du côlon corrèle avec leur potentiel d'adhérer aux cellules endothéliales activées.	212
Yamada <i>et al.</i>	Une augmentation de l'expression de sLe <sup>a</sup> à la surface des cellules cancéreuses est observée lorsqu'elles acquièrent un plus grand potentiel à former des métastases.	213
Cho <i>et al.</i>	Le potentiel métastatique des tumeurs est en corrélation avec l'expression de sLe <sup>x</sup> et la liaison des cellules cancéreuses à E-sélectine.	214
Nakamori <i>et al.</i>	Une sous-population de cellules cancéreuses présentant une plus forte expression de sLe <sup>x</sup> adhère plus efficacement aux cellules endothéliales activées au TNF- $\alpha$ . Des anticorps contre E-sélectine renversent la différence observée. La sous-population exprimant plus fortement sLe <sup>x</sup> produit également plus de métastases dans les souris nues.	215
Brodt <i>et al.</i>	Un anticorps contre E-sélectine inhibe complètement l'adhésion de deux lignées de cellules cancéreuses colorectales hautement métastatique à des cellules endothéliales activées au TNF- $\alpha$ . Cette inhibition n'est pas observée avec une lignée faiblement métastatique.	216
Bresalier <i>et al.</i>	Les mucines glycosylées sur les cellules cancéreuses du côlon lient E-sélectine exprimée par les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques.	217
Tremblay <i>et al.</i>	La liaison de cellules de cancer du côlon via E-sélectine modifie l'intégrité de la barrière endothéliale et facilite la transmigration.	186

Tableau 8: Études suggérant l'implication ou non de E-sélectine dans la métastase de tumeurs non colorectales.

Étude	Type de cancer	Adhésion via E-sélectine (# de lignées cellulaires)		Réf.
		Oui	Non	
Toezeren <i>et al.</i>	Carcinome mammaire	3	3	219
Lafrenie <i>et al.</i>	Leucémie	1	0	220
Yoneda <i>et al.</i>	Lymphome	2	0	221
Nakashio <i>et al.</i>	Carcinome gastrique	1	1	222
Iwai <i>et al.</i>	Carcinome pancréatique	3	3	223
Satoh <i>et al.</i>	Carcinome rénal	0	8	224
Matilla <i>et al.</i>	Sarcome	0	4	225
Miller <i>et al.</i>	Mélanome	0	12	226

Des études *in vivo* ont également souligné l'importance d'E-sélectine dans la dissémination. L'inhibition de l'expression de E-sélectine sur l'endothélium hépatique par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens empêche la formation de métastases au foie par un carcinome colorectal <sup>227</sup>. Dans cette étude, les animaux prétraités développent 86% moins de métastases suivant l'injection des cellules cancéreuses directement dans la veine porte hépatique. Dans une autre étude, un anticorps contre sLe<sup>x</sup> co-injecté avec les cellules de carcinome gastrique MKN74 inhibent de façon significative la quantité de métastases au foie dans les souris nues <sup>222</sup>. L'administration de sLe<sup>x</sup> synthétique à des souris diminue l'arrêt du mélanome B16-BL6 au niveau des poumons sans affecter les propriétés invasives des cellules tumorales <sup>228</sup>. De plus, une protéine de fusion de E-sélectine soluble, liant les cellules de carcinome du côlon HT-29, permet de bloquer la formation de métastases aux poumons de souris nues <sup>229</sup>. Biancone *et al.*

ont étudié la distribution de métastases du mélanome B16F10 chez des souris normales et dans deux lignées transgéniques exprimant E-sélectine constitutivement dans toutes les cellules de l'organisme ou encore seulement au niveau du foie <sup>230</sup>. Dans les souris normales, l'injection de cellules tumorales produit le développement de métastases aux poumons. Par contre, dans les deux lignées de souris transgéniques, on remarque la formation de métastases hépatiques, suggérant l'implication d'E-sélectine dans les sites de développement de métastases.

### 1.6.2.3 P-sélectine et dissémination

Des études suggèrent que P-sélectine, comme E-sélectine, permet l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium. En effet, Pottratz *et al.* ont démontré que l'attachement des cellules de cancer du poumon H82 aux cellules endothéliales activées requiert une hausse de l'expression de P-sélectine à la surface de l'endothélium <sup>231</sup>. D'autres études ont également démontré que les cellules du cancer du côlon KM12-L4 peuvent adhérer à P-sélectine dans des conditions imitant le flux sanguin <sup>232</sup>. Ding *et al.* ont utilisé un système de vidéo microscopie intravitale (IVVM) pour étudier le rôle de P-sélectine dans la dissémination du lymphome <sup>233</sup>. Ils observèrent tout d'abord que les cellules d'adénocarcinome C26 s'arrêtent de façon abrupte dans le foie lorsqu'elles rencontrent des vaisseaux sanguins de petite taille sans démontrer de signes préalables de roulement transitoire à la surface de l'endothélium. Elles s'immobilisent donc dans les sinusoides. Ces résultats corrént avec ceux de Chambers discutés plus tôt qui démontrent que des cellules de mélanome sont arrêtées par restriction de taille dans les vaisseaux sanguins de faible calibre. Ces études suggèrent donc que dans certains types de tumeurs, le processus métastatique implique un arrêt mécanique dû à la taille des cellules cancéreuses plutôt qu'au roulement et à l'adhésion ferme tels des leucocytes circulants. Par contre, ce phénomène ne peut-être généralisé à tous les types de cancer. Lorsque Ding *et al.* injectèrent la lignée de cellules de lymphome EL-4 qui sont plus petites que les cellules d'adénocarcinome, elles ne sont pas arrêtées par blocage mécanique. En utilisant l'IVVM, ils observèrent que les cellules EL-4 adhèrent

aux parois des vaisseaux sanguins alors que le sang continue de circuler dans la lumière du vaisseau sanguin. Lorsqu'ils injectent ces mêmes cellules à des souris déficientes en P-sélectine, ils observent encore une fois par IVVM que le nombre de cellules adhérees à la surface de l'endothélium chute de façon significative en comparaison aux souris normales. L'injection du lymphome EL-4 produit des métastases au foie dans les souris normales ou déficientes en P-sélectine mais la masse du foie néoplasique 14 jours suivant l'injection est significativement plus élevée dans les souris normales que chez celles déficientes en P-sélectine, démontrant une différence entre les deux groupes pour l'importance de la croissance métastatique. Or, tel que mentionné précédemment, plusieurs molécules d'adhésion ne sont pas exprimées de façon constitutive à la surface de l'endothélium, leur expression étant régulée par la sécrétion de molécules inflammatoires. L'équipe de Orr observa par IVVM que lorsque l'on injecte par voie intraveineuse les cellules de mélanome B16, elles sont arrêtées de façon mécanique dans les sinusoides du foie<sup>62,234</sup>. Par contre, si l'on injecte de l'IL-1 quatre heures avant l'injection des cellules tumorales, les cellules s'immobilisent par roulement à la surface de l'endothélium dans les veinules portes, en amont des sinusoides. Sept jours plus tard, les souris ayant reçu de l'IL-1 présentaient de 10 à 20 fois plus de métastases hépatiques. Ces résultats peuvent être expliqués par l'expression contrôlée de molécules d'adhésion endothéliales tel E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 suite à l'injection d'IL-1.

#### 1.6.2.4 Formation d'embolies tumorales via les sélectines.

Les mécanismes impliquant les sélectines dans la métastase décrits dans les études présentées précédemment ont une vision souvent simpliste des interactions entre les cellules cancéreuses et l'endothélium. Ils ne discutent pas du rôle joué par les sélectines dans l'interaction entre les plaquettes et les leucocytes du sang circulant pour la formation de micro-embolies susceptibles de faciliter le processus métastatique. P-et/ou L-sélectine exprimés par les cellules de l'hôte sont donc des candidats potentiels permettant l'interaction plaquettes -cellules tumorales- leucocytes- endothélium<sup>235,236</sup>.

D'autant plus que plusieurs lignées de cellules tumorales, tel le carcinome humain LS180, expriment des sialomucines pouvant servir de ligands pour L- et P-sélectines<sup>237</sup> et que les lignées de lymphomes, provenant de la transformation maligne des leucocytes, expriment toujours PSGL-1, un ligand des deux sélectines en question. Ces hypothèses ont été étudiées en utilisant des modèles murins de métastase où l'on nota que ces sialomucines pouvaient promouvoir la métastase via la liaison à L- et P-sélectines. Cette implication de L- et P-sélectines a également été démontrée de façon élégante dans un modèle de métastase d'un adénocarcinome murin établi par Borsig et ses collègues<sup>235,236</sup>. Dans ces travaux, on observa que l'injection par voie intraveineuse de cellules cancéreuses aux souris normales provoquait le développement d'une importante quantité de métastases aux poumons. On observa par contre une réduction importante de la métastase lors de l'injection à des souris déficientes en P-sélectine<sup>235</sup>. De façon intéressante, l'analyse immunohistochimique de la vascularisation pulmonaire des souris P-sélectine<sup>-/-</sup> injectées avec des cellules tumorales montra une réduction marquée de l'agrégation plaquettaire autour des cellules cancéreuses. Lorsque les mucines de la surface tumorale étaient clivées enzymatiquement préalablement à l'injection, une réduction de l'agrégation avec les plaquettes était également observée. Ces observations suggèrent donc un rôle à la fois de P-sélectine de l'hôte et des mucines de la surface des cellules cancéreuses dans l'interaction avec les plaquettes sanguines. Dans un autre modèle murin, la réduction des plaquettes par immunodéplétion réduit la métastase, laquelle est associée à une destruction des cellules cancéreuses par les cellules NK<sup>238</sup>. Cet effet en apparence protecteur des plaquettes pour la survie des cellules tumorales semble être plutôt dû à une protection physique (shielding) plutôt qu'à un rôle pro métastatique direct. Dans l'étude précédente de Borsig *et al.*, le nombre de cellules tumorales détectées était toujours inférieur dans la vascularisation pulmonaire des souris P-sélectine<sup>-/-</sup><sup>235</sup>. Ces observations suggèrent donc que la formation d'embolies engendrée par les plaquettes amène une plus grande rétention des cellules tumorales dans l'organe et l'absence de plaquettes permet un



accès plus facile aux cellules tumorales en circulation pour leur destruction par le système immunitaire.

Les leucocytes circulants peuvent également être impliqués dans la formation d'agrégats hétérotypiques avec les cellules tumorales ou encore avec les agrégats formés de plaquettes et de cellules tumorales. Tel que discuté précédemment, la plupart des sous-populations leucocytaires expriment L-sélectine de façon constitutive, ce qui en fait un candidat intéressant pour l'interaction avec les cellules tumorales. Cette hypothèse fut confirmée dans un modèle murin déficient en L-sélectine où l'on observa une atténuation du potentiel métastatique<sup>236</sup>. Cette observation implique donc directement L-sélectine, et ainsi les leucocytes, dans le processus. Puisque ces résultats sont également observés dans les souris immunodéficientes dépourvues de cellules T et B matures, l'implication de d'autres populations leucocytaires (neutrophiles, monocytes, cellules NK) entre probablement en ligne de cause. La contribution de L- et P-sélectine dans le processus métastatique fut également analysée chez des souris doublement déficientes L/P<sup>-/-</sup>. Dans ce modèle, la formation de métastases par une tumeur agressive est drastiquement réduite, suggérant un effet synergique de L- et P-sélectine dans la dissémination des cellules cancéreuses. Il est déjà établi que l'héparine non fractionnée, un anticoagulant, inhibe la liaison de P- et L-sélectine à leurs ligands naturels (sLe<sup>x</sup>)<sup>239</sup>.

En raison de l'association entre la dissémination des cellules cancéreuses et la formation d'embolies déjà décrite, l'héparine a été utilisée comme traitement initial anticoagulant<sup>240</sup>. Des effets bénéfiques de l'héparine sur la formation de métastases chez l'humain ont été observés dans plusieurs études cliniques<sup>241</sup>. D'un autre côté, l'utilisation d'un antagoniste de la vitamine K, empêchant la coagulation par un mécanisme différent de l'héparine, n'exerce aucun effet bénéfique sur la métastase. Ceci suggère donc que l'effet de l'héparine sur le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses n'est pas exclusivement redevable à son activité anticoagulante bien que la coagulation en elle-même peut favoriser la métastase<sup>240</sup>. Ainsi, le modèle murin

expérimental de métastase chez les souris déficientes en L- et P-sélectine a permis de vérifier les effets bénéfiques de l'héparine qui inhibe la capacité de liaison des sélectines<sup>235,236</sup>. L'héparine injectée par voie intraveineuse préalablement aux cellules tumorales réduit de façon significative la formation d'agrégats dans la circulation pulmonaire. Bien que les effets de l'héparine sur l'adhérence des plaquettes aux cellules tumorales ne dure que 6 à 8 heures, une importante réduction de la colonisation des poumons par les métastases s'observe quatre à six semaines suivant l'injection<sup>235,236</sup>. La quantité de métastases suite à l'injection d'héparine dans les souris normales était similaire à ce qu'elle était sans traitement dans les souris P-sel<sup>-/-</sup> et dans le groupe injecté avec les cellules tumorales privées de leur mucines. L'héparine n'a aucun effet additionnel sur les souris P-sel<sup>-/-</sup>, suggérant que l'héparine agit uniquement sur la P-sélectine plaquettaire. L'héparine injectée chez les souris L-sel<sup>-/-</sup> réduit la métastase de façon analogue à celle observée chez les souris L/P<sup>-/-</sup><sup>236</sup>. Ces données suggèrent donc que les leucocytes facilitent la métastase en stimulant la formation des premiers agrégats et embolies impliquant les plaquettes sanguines. Elles soulignent encore une fois l'importance des sélectines dans la progression de certains cancers et l'action de certains agents inhibiteurs de ces molécules d'adhésion sur la métastase.

Tel que discuté plus tôt, il a été démontré que les enzymes FX (fucosyl transférases) sont responsables de la biosynthèse des sLe<sup>x</sup> chez les leucocytes<sup>242</sup>. D'autres preuves démontrant l'implication des sélectines dans la dissémination des cellules cancéreuses sont tirées de la fonction de ces enzymes. Dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, les enzymes FX jouent un rôle clé dans la biosynthèse des ligands des sélectines dont le sLe<sup>a</sup> et dans l'interaction de ces cellules cancéreuses avec les cellules endothéliales<sup>242,243</sup>. Une relation fonctionnelle entre le niveau d'expression de l'enzyme FX et celui du ligand des sélectines sLe<sup>a</sup> est également démontrée dans les cellules cancéreuses colorectales<sup>244</sup>. Cette étude a d'ailleurs permis d'établir un axe fonctionnel reliant l'enzyme FX, l'expression de sLe<sup>a</sup>, la capacité des cellules cancéreuses à adhérer à E-sélectine et finalement à l'endothélium. Ces

conclusions s'appuient d'évidences corrélatives, d'expériences de transfection et de l'utilisation d'ARN anti-sens <sup>244</sup>. Une corrélation a également été rapportée entre l'agressivité des cellules cancéreuses, leur potentiel métastatique et l'expression de l'enzyme FX <sup>244</sup>.

On constate, à la lumière de ces différents travaux de recherche, que les sélectines et leurs ligands jouent un rôle crucial dans la dissémination de certains types de cancer et que leurs inhibiteurs, dont l'héparine, peuvent en réduire le potentiel pro-métastatique. De plus, puisque ces molécules possèdent des capacités de signalisation, un rôle original pourrait leur être attribué lors de l'interaction avec l'endothélium par la modulation de gènes pro-métastatiques. Ainsi, la poursuite de la recherche au sujet de l'implication des sélectines dans le développement et la dissémination du LNH, tout comme au niveau la modulation génique de l'endothélium suite à l'interaction avec les cellules cancéreuses, mérite un intérêt soutenu puisque de nouvelles approches thérapeutiques pourraient en émaner.

Les travaux de la présente thèse visaient donc à : 1) analyser le rôle des sélectines dans la leucémogénèse radio-induite et dans le développement de lymphomes thymiques; 2) déterminer le rôle des sélectines dans la formation de métastases par ces même cellules de lymphome; 3) analyser la modulation de l'expression génique de l'endothélium lors des contacts intercellulaires entre les cellules de lymphome et les cellules endothéliales vasculaires, une étape critique du processus métastatique.

## CHAPITRE II

Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T-lymphoma cells:  
implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma

Belanger S.D., St-Pierre Y.

Manuscrit publié dans *Blood* 2005 105(12): 4800-4806

## **Contribution des auteurs**

J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans cet article et celles présentées en annexe reliées à cet aspect de l'analyse du rôle des sélectines dans le lymphome. J'ai participé à l'élaboration des approches expérimentales, des protocoles, de l'analyse des résultats et l'interprétation des expériences. J'ai également rédigé le manuscrit en collaboration avec le Dr. St-Pierre,

## Résumé

Nous avons préalablement démontré que l'expression d'ICAM-1 par l'hôte est essentielle à la dissémination des cellules de lymphome. Puisque les sélectines font partie intégrante du même mécanisme de migration leucocytaire impliquant également ICAM-1, nous avons étudié leur implication dans la lymphomagénèse et le processus métastatique. En utilisant des souris déficientes en sélectines comme modèle, nous avons observé que l'absence de E-, P-, ou L-sélectine n'affecte pas la génération de lymphomes thymiques primaires induits par irradiation. Cependant, l'utilisation de lymphomes T générés à partir de lymphomes thymiques chez les souris L-sélectines déficientes nous a permis de déterminer que l'absence de L-sélectine sur les cellules de lymphome les empêche de se développer au niveau du thymus. Par contre, cette déficience est rétablie lorsque l'intégrité des interactions dépendantes de L-sélectine est altérée, tel que démontré par la capacité des cellules de lymphome déficientes en L-sélectine à se développer normalement dans les souris L-sélectine-déficientes et dans les expériences de transfert adoptif de moelle osseuse.

Pour ce qui concerne le rôle des sélectines dans le processus métastatique, nos résultats ont démontré que l'absence des trois membres de la famille des sélectines retarde de façon significative la dissémination des lymphomes aux organes périphériques. Cette résistance des souris déficientes en sélectines à la formation de métastases repose sur les propriétés intrinsèques des cellules cancéreuses puisque le processus métastatique de variants plus agressifs n'était pas affecté par l'absence de sélectines. Finalement, nos expériences démontrant que la migration dans les différents organes cibles se déroulant avec les mêmes cinétiques dans les souris normales et déficientes en sélectines suggèrent que ces molécules d'adhésion, tout comme ICAM-1, influencent le processus métastatique à une étape subséquente au homing. L'ensemble de ces résultats établit le rôle significatif joué par les sélectines dans les différentes étapes du développement du lymphome T.

## Introduction

T-cell lymphomagenesis is a multistep process that starts with the development of pre-leukemic cells (PLCs) in the bone marrow and the thymus, and ends with the systemic dissemination of T lymphoma cells to organs such as the liver, the spleen, the kidneys, the lymph nodes, and the ovaries. Experimentally, T-cell lymphoma can be induced by the exposure of mice to split-dose irradiation<sup>1,2</sup>. Exposure to such a leukemogenic regimen leads to the development of PLCs from early haematopoietic stem cells in the bone marrow. PLCs cannot induce lymphoma by themselves. Their neoplastic transformation to overt T-leukemic cells requires that they pass through the thymus, where close intercellular contact with thymic stromal elements and exposure to local cytokines induce their transformation to leukemic cells<sup>3-5</sup>. Systemic tumors can also result from radiation-induced leukemogenesis as leukemic cells find their way into the circulatory system. Growth of thymic lymphoma has been studied, for specific purposes, by means of intrathymic injection of lymphoma cells<sup>6,7</sup>. Lymphoma cells have also been isolated from a thymic lymphoma and used to study lymphoma metastasis after intravenous injection into normal mice<sup>8-10</sup>.

Given that lymphoma cells often express the same cell adhesion molecules (CAMs) their normal counterparts do, it has been postulated that CAMs play a crucial role at different steps of tumorigenesis, most notably by conferring metastatic properties to tumor cells<sup>11,12</sup>. Indeed, adhesion molecules are uniquely positioned at the interface between the circulating tumor cell and the milieu in which tumor growth will occur<sup>13</sup>. Support for this postulate has been provided by data showing that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-deficient mice are resistant to the development of lymphoid malignancy<sup>9</sup> and that LFA-1-defective lymphoma cells have only limited metastatic potential<sup>14</sup>. Selectins are a family of adhesion molecules closely involved in the contact between circulating leukocytes and vascular endothelial cells<sup>15</sup>. Three members of this family, E-, P-, and L-selectin, have been cloned. E- and P-selectins are expressed on vascular endothelial cells, and, like ICAM-1, their expression is rapidly upregulated on

stimulation <sup>16</sup>. P-selectin is also expressed in  $\alpha$ -granules of platelets <sup>17</sup>. In contrast, L-selectin is constitutively expressed on haematopoietic stem cells, thymocytes, circulating leukocytes, and lymphoma cells<sup>18</sup>. All selectins share a high degree of structural homology, and all bind to sialylated, glycosylated, or sulfated glycans on glycoproteins, most notably the tetrasaccharides sialyl Lewis X (sLeX) and sialyl Lewis A (sLeA), found on a wide spectrum of cell types. In physiologic conditions, selectins are responsible for the initial stickiness of circulating leukocytes to vascular endothelium <sup>19</sup>. Although a number of studies have recently addressed the implication of selectins in tumor metastasis <sup>20-22</sup> none of these has shown whether triggering of the tumorigenic process or spreading of lymphoma cells can occur in the absence of selectins. In the present work, using genetically engineered selectin-deficient mouse models, we investigated the role of selectin expression by tumor and peritumoral cells at various stages of lymphoma development.



## **Materials and methods**

### **Mice**

Breeder pairs for the selectin-deficient mouse colonies were originally obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and were backcrossed on a C57BL/6 background using polymerase chain reaction (PCR) to screen for the appropriate mutation. A colony for each of the knockout strains was maintained in our specific pathogen-free animal facility. C57BL/6 (Thy-1.2) and C57BL/Kathy (Thy-1.1) congenic for the Thy-1 allele were also bred in-house. All selectin-deficient mice were healthy, fertile, and did not show any gross abnormalities<sup>23-25</sup>. All animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

### **Cell lines and antibodies**

Mouse thymic lymphoma lines were derived from radiation-induced thymic lymphoma, as previously described.<sup>9,10</sup> Rat anti-mouse PSGL-1 monoclonal antibody was purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada). Rat anti-mouse monoclonal antibody MEL-14 was purchased from eBioscience (San Diego, CA). The hybridoma 145-2C11 (anti-CD3 $\gamma$ ) was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). The antibody was purified by protein G affinity chromatography (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) and was biotinylated using standard protocols. Streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) conjugates were obtained from Gibco/BRL (Mississauga). All cell lines were grown in RPMI 1640 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Life Technologies), 2 mM glutamine (Life Technologies), 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid) (Life Technologies) buffer, 55  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Life Technologies), and antibiotics (Life Technologies).

## **Flow cytometry**

Cells were washed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and were incubated on ice for 20 minutes with PBS containing 1% (vol/vol) bovine serum albumin (BSA), 0.01% (vol/vol) sodium azide (PBA), and 30 µg/mL human immunoglobulin G (IgG; Sigma, St Louis, MO) and then for 20 minutes with predetermined concentrations of antibodies. For indirect staining, cells were washed twice after binding of the first monoclonal antibody (mAb) and were incubated again with a saturating concentration of SA-PE conjugate for 20 minutes on ice. After mAb binding, cells were washed with ice-cold PBA and were resuspended in 1 mL PBS containing 0.01% sodium azide. Samples were kept in the dark and were analyzed using a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences). Between 10 000 and 50 000 cellular events were analyzed for each sample.

## **PCR genotype analysis**

Selectin-deficient mice were backcrossed for at least 5 generations on a C57BL/6 background, and their genotype was confirmed by PCR using primers specific for the wild-type and mutated alleles (Table 1). The genotype of L-selectin-deficient cell lines established from radiation induced thymic lymphoma was also confirmed by PCR analysis. Amplification was performed in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) using the following protocol: 120 seconds at 94°C and then 35 cycles of 3 steps consisting of 60 seconds at 94°C, 60 seconds at 58°C, and 60 seconds at 72°C. The reaction mixture was size-separated on an agarose gel, and specifically amplified products were detected by ethidium bromide staining and ultraviolet transillumination.

## **Lymphomagenesis model**

To determine the role of selectins in T-cell lymphomagenesis, 4- to 8-week-old normal and E-, L-, or P-selectin-deficient mice were exposed to 4 weekly doses of whole body irradiation ( $4 \times 1.75$  Gy), as previously described<sup>7,9,10</sup>. Mice were observed periodically for clinical signs of thymic lymphoma (runting, swelling of the thorax, and

dyspnea). When moribund, mice were killed, and thymic lymphoma was confirmed at necropsy. To study the role of selectins in lymphoid tumor growth, 4- to 8-week-old normal and selectin-deficient mice were injected in each lobe of the thymus with the indicated number of lymphoma cells. In some experiments, genomic DNA was extracted from thymic lymphoma and was resuspended in TE buffer (10 mM Tris, pH 7.2; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid) before PCR analysis. To study lymphoma in peripheral organs, mice at least 6- to 10-weeks-old were injected with  $10^5$  to  $10^6$  lymphoma cells through the tail vein. When clinical signs of lymphoma became evident (dyspnea, runting, and splenomegaly), the animals were killed and the spleen, lungs, kidneys, and liver were examined macroscopically.

### **Adoptive transfer procedure**

For bone marrow (BM) transplantation experiments, BM cells were isolated from the tibias and femurs of normal and L-selectin-deficient C57BL/Kathy (Thy-1.1) mice. Congenic C57BL/6 (Thy-1.2) and L-selectin-deficient C57BL/6 recipient mice were irradiated (7 Gy) before BM transfusion. BM cells ( $10^7$  cells) were delivered to the host in 0.2 mL PBS through tail vein injection. Flow cytometric analysis with anti-Thy-1.1, anti-Thy-1.2, and anti-L-selectin mAbs showed complete reconstitution 4 weeks after transplantation. All control recipients that did not receive BM cells died within 3 weeks of irradiation. To induce thymic lymphoma in BM chimeras, KOL1682 T-lymphoma cells ( $10^4$  cells) were microinjected into each thymic lobe of recipients, and lymphoma development was monitored as described in "Lymphomagenesis model. Four to 6 recipients were used for each experimental group.

### ***In vivo* migration assays**

The migration of 164T2 lymphoma cells was analyzed using standard indium In 111 ( $^{111}\text{In}$ ) labeling of lymphoma cells, as described previously<sup>8</sup>. Briefly,  $10^7$  cells were labeled with 370 MBq  $^{111}\text{In}$  in 0.5 mL RPMI 1640 for 15 minutes at room temperature. Cells were washed 4 times with RPMI 1640 containing serum and were resuspended in

PBS. Viability of the labeled cells was greater than 95%, as determined by trypan blue exclusion. Each mouse was injected intravenously with  $10^6$  cells. Animals were killed at various times, and the kidneys, spleen, liver, and thymuses were recovered, as were heparinized blood samples. Total radioactivity in circulating blood was estimated in 400- $\mu$ L aliquots of blood, assuming a total volume of 2 mL circulating blood per mouse.

### **Statistical analysis**

Statistical significance was measured using the log rank test, and the level of significance was established at P less than .05.

## Results

### Triggering T-cell lymphomagenesis in the absence of selectins

To establish whether selectin deficiency has an effect on the triggering of radiation-induced thymic lymphoma, we compared tumor incidence in normal and selectin-deficient C57BL/6 mice in response to a leukemogenic regimen of x-radiation. Such a regimen (4 weekly doses of 1.75 Gy) results in thymic lymphomas in most of the animals after a latency period between 3 and 6 months. Our results showed that the absence of selectins does not impair T-cell lymphomagenesis. For instance, in the case of L-selectin, which is found on early haematopoietic stem cells, thymic lymphoma was found in 80% (24 of 30; mean survival time [MST],  $142 \pm 22$  days) and 77% (20 of 26; MST,  $143 \pm 33$  days) of wild-type and L-selectin-deficient mice, respectively, with a similar latency period before the onset of thymic lymphoma (approximately 20 weeks after irradiation). Identical results were obtained in E- and P-selectin-deficient mice (data not shown).

### Growth of thymic lymphoma in the absence of L-selectin

The onset of thymic lymphoma is preceded by an extended preleukemic period during which PLCs interact with the thymic microenvironment, which provides the signals essential for tumor cell growth. Because L-selectin is expressed on several cell types in the thymus, including thymocytes and thymic dendritic cells,<sup>18,26</sup> we next tested whether the absence of L-selectin in the tumor microenvironment could interfere with the local growth of lymphoma. To this end, we compared the development of tumors induced after the intrathymic injection of lymphoma cells in normal and L-selectin-deficient mice. Our results showed that the absence of L-selectin in the thymic microenvironment did not significantly alter the frequency and growth rate of lymphoma cells because the frequency of tumor development and MST were similar in normal (12 of 17; MST,  $34 \pm 7$  days) and L-selectin-deficient (13 of 19;  $36 \pm 7$  days) C57BL/6 mice.

L-selectin-deficient mice did develop thymic lymphoma with exposure to radiation; we took advantage of this to generate L-selectin-deficient lymphoma cell lines (KOL1682 and KOL1677). We confirmed the absence of L-selectin on the KOL1682 and KOL1677 lymphoma cell lines by PCR and flow cytometry (Figure 1). To test whether the absence of L-selectin on lymphoma cells modulated thymic lymphoma growth, L-selectin-deficient cells and control cells expressing L-selectin (the 1681 cells, generated from a heterozygous control) were then injected intrathymically in normal mice. Our results showed that the absence of L-selectin on lymphoma cells significantly impaired their ability to grow in the thymuses of normal mice. Indeed, although the injection of control cells expressing L-selectin induced thymic lymphoma in all injected mice (11 of 11), we found that only 3 of 14 (21.4%) normal mice developed thymic lymphoma after injections of L-selectin-deficient cells (Table 2). Moreover, in mice that did develop thymic lymphoma, the latency period was significantly ( $P < .001$ ) longer than it was when tumors were induced with L-selectin-expressing cells (52 days vs 21 days). Genotype analysis was used to confirm the donor origin of the tumor cells (Figure 2). However, the absence of L-selectin in the thymus restored the capacity of L-selectin-deficient cells to induce lymphoma with a latency period equivalent to that of wild-type lymphoma cells (Table 2).

To further investigate the mechanism responsible for the inability of L-selectin-deficient lymphoma cells to induce thymic lymphoma in normal mice, an adoptive transfer strategy was used. For this purpose, normal C57BL/6 mice were lethally irradiated and reconstituted with bone marrow (BM) cells isolated from C57BL/6 L-selectin-deficient mice (and vice versa). In preliminary experiments carried out 4 weeks after reconstitution, flow cytometric analysis using Thy-1.1, Thy-1.2, and L-selectin-specific antibodies were used to confirm the donor origin of thymocytes in BM chimeras. Six weeks after reconstitution, recipient mice were thus inoculated intrathymically with L-selectin-deficient lymphoma cells, and the growth of thymic lymphoma was monitored. Four weeks after reconstitution, the expression of P-selectin ligands (PSGL-1) was confirmed on the surfaces of thymocytes in all bone marrow chimeras (Figure 3A-D),

but, as expected, only chimeras reconstituted with bone marrow cells reconstituted from C57BL/6 mice expressed L-selectin (Figure 4). Lymphoma cells, including the KOL1682 L-selectin-deficient lymphoma cell lines, also express the L-selectin ligand PSGL-1 (Figure 3E). As expected from our previous results, mice from the control groups, consisting of normal mice reconstituted with BM cells from L-selectin-positive mice, were resistant to the growth of thymic lymphoma induced by the injection of L-selectin-deficient lymphoma cells (Table 3). Thus, tumor growth occurred in L-selectin-deficient mice reconstituted with L-selectin-deficient BM cells. The inability of L-selectin-deficient lymphoma cells to induce thymic lymphoma in C57BL/6 mice was overcome after reconstitution with L-selectin-deficient BM cells. However, BM cells from normal mice could not inhibit the growth of L-selectin-deficient lymphoma cells when they were transferred into the thymuses of L-selectin-deficient mice. These results suggest that the expression of L-selectin on lymphoma cells and hematopoietic progenitors is important for maintaining the functional integrity of the thymic architecture and the growth of thymic lymphoma.

### **Resistance of selectin-deficient mice to dissemination of lymphoma cells**

We previously showed that the dissemination of T-lymphoma cells (eg, 164T2 and 267) to peripheral organs was completely inhibited by the genetic ablation of the ICAM1 gene<sup>9</sup>. Because ICAM-1 and selectins have distinct but overlapping functions, we wanted to know whether lymphoma dissemination was also inhibited in the absence of selectins. For this purpose, 164T2 T-lymphoma cells were injected intravenously into normal and E-, P-, or L-selectin-deficient mice, and the development of lymphoma in the different groups of mice was compared. We found that whereas all normal mice succumbed to tumor approximately 40 days (MST,  $38 \pm 3$  days) after the injection of 10<sup>6</sup> lymphoma cells, tumor-related death was significantly delayed in mice deficient in E-selectin (MST,  $55 \pm 10$  days;  $P < .001$ ), P-selectin (MST,  $53 \pm 10$  days;  $P < .008$ ), and L-selectin (MST,  $50 \pm 2$  days;  $P < .008$ ) (Figure 5). Similar results were obtained in mice injected with lower doses of lymphoma cells.

### **Resistance of selectin-deficient mice to lymphoma metastasis is manifested after homing**

To investigate whether the resistance of selectin-deficient mice to lymphoma metastasis might be caused by the inability of lymphoma cells to migrate into the target organs, lymphoma cells were labeled with  $^{111}\text{In}$ , and the homing of T-lymphoma cells was compared in normal and selectin-deficient mice. We found that lymphoma cells migrated to the same target organs and at the same rate in normal and selectin-deficient mice (Figure 6). This indicates that selectin expression in the host inhibits lymphoma metastasis sometime after homing to target organs.

### **Ability of aggressive lymphoma cells to overcome the resistance of selectin-deficient mice**

Aggressive lymphoma cells display a constitutive expression of tumor-promoting genes, allowing them to bypass the traditionally required exchange of signals during the establishment of a secondary tumor in target organs<sup>10,11</sup>. To test whether highly aggressive lymphoma cells can overcome the absence of selectins, we injected  $5 \times 10^5$  S11 lymphoma cells into normal and selectin-deficient mice. S11 is an aggressive lymphoma cell line derived from *in vivo* passages of the low metastatic 164T2 cells<sup>10</sup>. Compared with 164T2 cells, which induce lymphoid tumors after a period of 50 to 70 days in approximately 75% of injected mice, S11 induces tumors in 100% of normal C57BL/6 mice within 15 days of injection. Our results showed that S11 did induce tumors in all injected mice within 14 days of injection, irrespective of the presence or absence of selectins (Table 4).



## Discussion

The availability of selectin-deficient mice and of our murine lymphoma model has provided us with a unique opportunity to address the contribution of selectins to lymphomagenesis and to the growth and dissemination of T-cell lymphomas. In the present work, although we found that selectins are not essential for triggering radiation-induced lymphomagenesis, we provided evidence that L-selectin contributes to the growth of thymic lymphoma. Furthermore, we found that the absence of selectins significantly delayed the dissemination of lymphomas to peripheral tissues. This resistance of selectin-deficient mice to lymphoma metastasis was dependent on the intrinsic properties of lymphoma cells because highly tumorigenic variants could overcome the resistance created by the absence of selectins. The observations that lymphoma cells spread with the same efficiency and kinetics in normal and selectin-deficient mice indicates that selectins, like ICAM-1, exert their influence only after the homing stage of lymphoma dissemination.

Our results provide additional evidence that cell-cell interactions control the dissemination of transformed lymphocytes to peripheral tissues. ICAM-1 controls the emigration of normal lymphocytes,<sup>27</sup> and we had previously shown that its absence almost completely inhibited the dissemination of lymphoma cells<sup>9</sup>. These results were consistent with the observations that LFA-1-defective mutants had reduced capacity to metastasize<sup>28</sup>. In the case of selectins, we found that the resistance of selectin-deficient mice was not as strong as that observed in the absence of ICAM-1, which completely abrogated the dissemination of lymphoma<sup>9</sup>. It is likely that compensatory adhesion mechanisms, still present in selectin deficient mice, contribute to this partial resistance because selectins have functions that overlap with those of ICAM-1.

One similarity between ICAM-1- and selectin-deficient mice is that their resistance to lymphoma dissemination does not reflect an impaired ability of lymphoma

cells to migrate to the target organs. Indeed, we found that lymphoma cells migrated with the same efficiency in the presence or absence of selectins. Similar results have been obtained with our L-selectin-deficient cell lines (data not shown). These observations are consistent with the idea that interactions through cell adhesion molecules provide critical signals that control post-homing events. Thus adhesion molecules on vascular endothelial cells control the expression of genes on tumor cells, which in turn reflect their invasiveness<sup>29,30</sup>. Our observation that aggressive lymphoma cells, with a repertoire of metastatic genes previously associated with a poor prognosis in human lymphomas, overcome the resistance of these adhesion-deficient mice supports this hypothesis<sup>10</sup>. Because the specificity of lymphocyte homing is determined by combinatorial “decision processes” involving a multistep sequential engagement of adhesion receptors, it is likely that—as through LFA-1/ICAM-1—the binding of lymphoma cells to endothelial cells through selectins could trigger cellular activation underlying the expression of these genes. Such a possibility has previously been raised to explain the resistance of L-selectin-deficient mice to the dissemination of carcinoma cells<sup>21</sup>. The capacity of selectins to mediate intracellular signals is well established in normal leukocytes, most notably in neutrophils and lymphocytes<sup>31,32</sup>, suggesting that L-selectin-mediated signalling could be involved in tumor cell survival or extravasation by favouring cytokine production by leukocytes. The membrane proximal and membrane-distal domains of its cytoplasmic tail have been reported to independently regulate L-selectin function through the association with several intracellular proteins<sup>33-35</sup>. Alternatively, leukocytes interacting with activated endothelium could play the role of a bridge through binding to platelets attached to lymphoma cells<sup>32</sup>. The use of L-selectin-deficient lymphoma cell lines and *in vivo* imaging techniques will provide an interesting avenue to study the role of the different domains of L-selectin in lymphoma metastasis.

Hematopoietic cells from the bone marrow express L-selectin and its ligands<sup>36-38</sup>. However, we found that this molecule was not implicated in radiation-induced lymphomagenesis. L-selectin and its ligands are also expressed in the thymus

microenvironment, either on thymocytes or on stromal cells. We have found that L-selectin-mediated interactions can play a role in the growth of lymphoma because L-selectin-negative lymphoma cells had reduced capacity to grow in the thymic microenvironment of normal mice. Of interest, we found that this defect was overcome when these cells were injected in the thymuses of L-selectin-deficient mice or when normal mice were reconstituted with BM cells with L-selectin-deficient mice, suggesting that L-selectin is important for maintaining the functional integrity of the thymic architecture. This is the first indication that L-selectin-mediated interactions have a measurable biologic effect in the thymus, at least in the context of tumor growth. This, of course, raises the possibility that, although the thymus of L-selectin-deficient mice appears normal in terms of thymocytes subpopulations, L-selectin could play an as yet unidentified role in T-cell maturation. Previous studies showing that L-selectin-mediated signals enhance CXCR4 expression, a chemokine receptor involved in the early stage of T-cell differentiation, support this hypothesis<sup>39-41</sup>. Although others have reported that L-selectin is expressed on the surfaces of macrophages in the thymus<sup>42</sup>, we have been unable to detect its expression on these cells in our chimeras. Because thymocytes and T-lymphoma cells express L-selectin and its ligand(s), it is more likely that intercellular homotypic adhesion plays a central role in providing critical signals that control the growth of thymic lymphomas.

In conclusion, our results have provided for the first time evidence that selectins play a significant role in the growth of T-lymphoma cells into the thymus and their subsequent dissemination to peripheral organs. We have further established that the resistance of selectin-deficient mice is manifested after homing to the target organs. Given the ability of selectins to induce intracellular activation, our results suggest that selectins, like ICAM-1, may induce the expression of genes that control the late stages of metastasis.

## **Acknowledgments**

We thank Ms Doris Legault for her excellent technical assistance, Ms Marie Desy for statistical analysis, and Dr Edouard F. Potworowski for revision of the manuscript.

## References

1. Santos J, Montagutelli X, Acevedo A, et al. A new locus for resistance to gamma-radiation-induced thymic lymphoma identified using inter-specific consomic and inter-specific recombinant congenic strains of mice. *Oncogene*. 2002;21:6680-6683.
2. Williams CJ, Grandal I, Vesprini DJ, Wojtyra U, Danska JS, Guidos CJ. Irradiation promotes V(D)J joining and RAG-dependent neoplastic transformation in SCID T-cell precursors. *Mol Cell Biol*. 2001;21:400-413.
3. Carnes WH, Kaplan HS, Brown MB, Hirsch BB. Indirect induction of lymphomas in irradiated mice, III: role of the thymic graft. *Cancer Res*. 1956;16:429-433.
4. Defresne MP, Rongy AM, Greimers R, Boniver J. Cellular aspects of radiation leukemogenesis in C57 BL/Ka mice: alterations to thymic microenvironment and lymphopoiesis. *Leuk Res*. 1986;10:783-789.
5. Verlaet M, Deregowski V, Denis G, et al. Genetic imbalances in preleukemic thymuses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;283:12-18.
6. Aoudjit F, Masure S, Opdenakker G, Potworowski EF, St-Pierre Y. Gelatinase B (MMP-9), but not its inhibitor (TIMP-1), dictates the growth rate of experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer*. 1999; 82:743-747.
7. Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315:884-891.

8. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. The metastatic characteristics of murine lymphoma cell lines *in vivo* are manifested after target organ invasion. *Blood*. 1998;91:623-632.
9. Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol*. 1998;161:2333-2338.
10. Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood*. 2000;95: 314-319.
11. Drillenburger P, Pals ST. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination. *Blood*. 2000;95:1900-1910.
12. Pals ST, Horst E, Ossekoppele GJ, Figdor CG, Scheper RJ, Meijer CJ. Expression of lymphocyte homing receptor as a mechanism of dissemination in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1989;73: 885-888.
13. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66.
14. Soede RD, Wijnands YM, Van Kouteren-Cobzaru I, Roos E. ZAP-70 tyrosine kinase is required for LFA-1-dependent T cell migration. *J Cell Biol*. 1998;142:1371-1379.
15. Fukuda M, Hiraoka N, Yeh JC. C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides: versatile roles in cell-cell interaction. *J Cell Biol*. 1999;147:467-470.

16. Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins: expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* 1992;267:15176-15183.
17. Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell.* 1989;56:1033-1044.
18. Witherden DA, Abernethy NJ, Kimpton WG, Cahill RN. Changes in thymic export of L-selectin+ gamma delta and alpha beta T cells during fetal and postnatal development. *Eur J Immunol.* 1994;24:1234-1239.
19. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995;9:866-873.
20. Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 1996;56:5309-5318.
21. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 2193-2198.
22. Takada A, Ohmori K, Yoneda T, et al. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res.* 1993;53:354-361.
23. Bullard DC, Qin L, Lorenzo I, et al. P-selectin/ ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest.* 1995;95:1782-1788.

24. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14423-14428.
25. Steeber DA, Tang mL, Zhang XQ, Muller W, Wagner N, Tedder TF. Efficient lymphocyte migration across high endothelial venules of mouse Peyer's patches requires overlapping expression of Lselectin and beta7 integrin. *J Immunol*. 1998;161:6638-6647.
26. Vremec D, Shortman K. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol*. 1997;159:565-573.
27. Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1994;180:95-109.
28. Roosien FF, de Kuiper PE, de Rijk D, Roos E. Invasive and metastatic capacity of revertants of LFA-1-deficient mutant T-cell hybridomas. *Cancer Res*. 1990;50:3509-3513.
29. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol*. 1998;160:2967-2973.
30. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, et al. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol*. 1999;154:229-238.



31. Swarte VV, Mebius RE, Joziase DH, Van den Eijnden DH, Kraal G. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1998;28:2864-2871.
32. Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol.* 1997;159:952-963.
33. Pavalko FM, Walker DM, Graham L, Goheen M, Doerschuk CM, Kansas GS. The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via -actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with -actinin. *J Cell Biol.* 1995;129:1155-1164.
34. Matala E, Alexander SR, Kishimoto TK, Walcheck B. The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. *J Immunol.* 2001;167:1617-1623.
35. Ivetic A, Deka J, Ridley A, Ager A. The cytoplasmic tail of L-selectin interacts with members of the Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) family of proteins: cell activation-dependent binding of Moesin but not Ezrin. *J Biol Chem.* 2002;277:2321-2329.
36. Boniver J, Decleve A, Lieberman M, Honsik C, Travis M, Kaplan HS. Marrow-thymus interactions during radiation leukemogenesis in C57BL/Ka mice. *Cancer Res.* 1981;41:390-392.
37. Oxley SM, Sackstein R. Detection of an L-selectin ligand on a hematopoietic progenitor cell line. *Blood.* 1994;84:3299-3306.

38. Dercksen MW, Gerritsen WR, Rodenhuis S, et al. Expression of adhesion molecules on CD34+ cells: CD34+ L-selectin+ cells predict a rapid platelet recovery after peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 1995;85:3313-3319.
39. Ding Z, Issekutz TB, Downey GP, Waddell TK. L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood*. 2003;101:4245-4252.
40. Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, et al. A cellautonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5663-5667.
41. Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood*. 2002;99:546-554.
42. Munro JM, Brisco DM, Tedder TF. Differential regulation of leucocyte L-selectin (CD62L) expression in normal lymphoid and inflamed extralymphoid tissues. *J Clin Pathol*. 1996;49:721-727.

**Table 1**

Primers	Sequence	Amplicon length (bp)
E-Sel-WT-F	GGACTGTGTAGAGATTTACATCC	
E-Sel-WT-R	GCAGGTGTAAC TATTGATGGT	664
E-Sel-Neo-F	CACGAGACTAGTGAGACGTG	
E-Sel-Neo-R	GCAGGTGTAAC TATTGATGGT	320
L-Sel-WT-F	GGGAGCCCAACAACAAGAAG	
L-Sel-WT-R	CTGCATCACAGATGCACGTG	728
L-Sel-Puro-F	GGGAGCCCAACAACAAGAAG	
L-Sel.-Puro-R	ACACTGGACCACATACTGACACTG	320
P-Sel-WT-F	TTGTAAATCAGAAGGAAGTGG	
P-Sel-WT-R	AGAGTTACTCTTGATGTAGATCTCC	322
P-Sel-Neo-F	CTGAATGAACTGCAGGACGA	
P-Sel-Neo-R	ATACTTTCTCGGCAGGAGCA	172

**Table 2**

Mice	1681 cells		KOL 1682 cells		KOL1677 cells	
	Frequency	Mean survival time (days)	Frequency	Mean survival time (days)	Frequency	Mean survival time (days)
C57BL/6	11/11 100%	21 ± 2	1/10 (10%)	57	2/4 (40%)	49 ± 3
C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	4/4 (100%)	21 ± 1	5/5 (100%)	20 ± 1	5/5 (100%)	23 ± 1

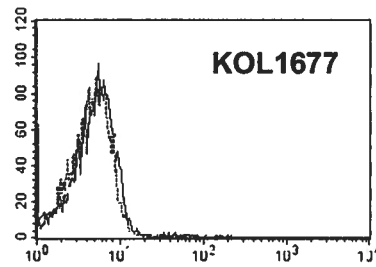
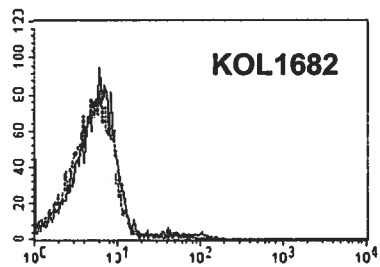
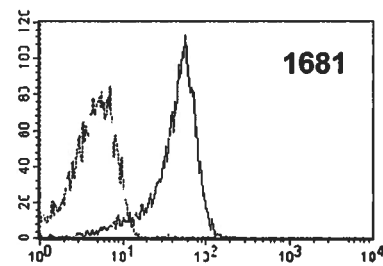
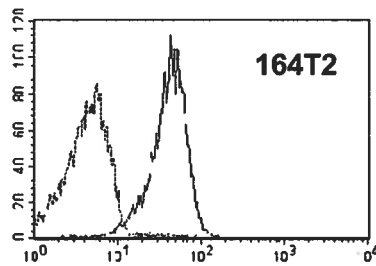
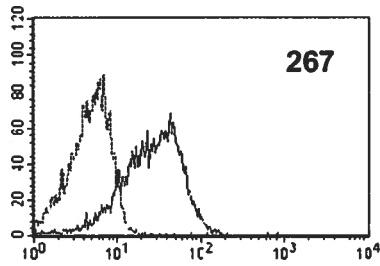
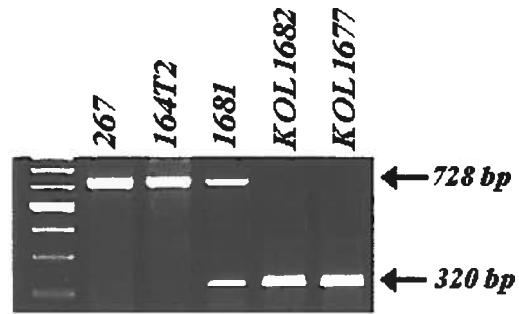
**Table 3**

Donor	Recipient	Frequency of thymic lymphoma (mean survival time in days)
C57BL/Kathy	C57BL/6	0/6
C57BL/Kathy	C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	5/5 (22 ± 1.1)
C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6	4/4 (22 ± 1.3)
C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	5/5 (22 ± 1.2)

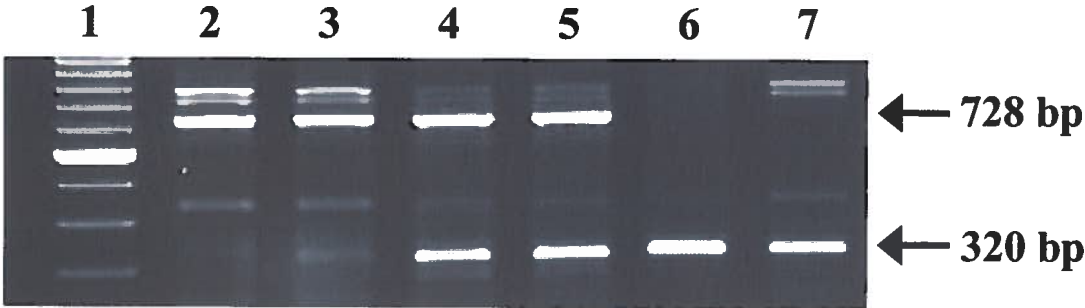
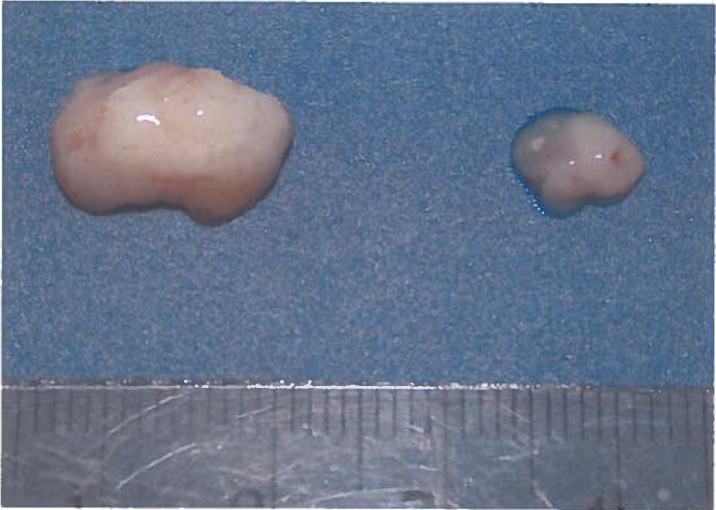
**Table 4**

Mice	Frequency	Mean survival time (days)
C57BL/6	8/8 (100%)	14 ± 1.1
C57BL/6- <i>E-sel</i> <sup>-/-</sup>	4/4 (100%)	14 ± 0.6
C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	4/4 (100%)	14 ± 0.5
C57BL/6- <i>P-sel</i> <sup>-/-</sup>	7/7 (100%)	14 ± 0.5

**Figure 1**

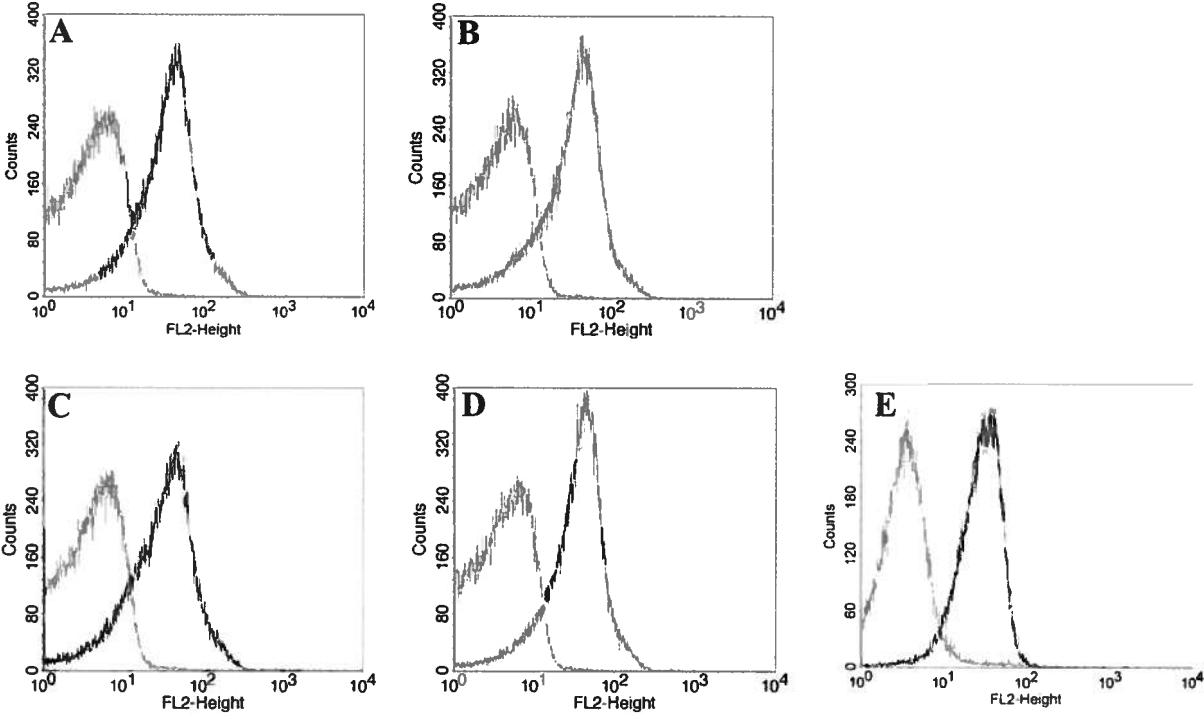


**Figure 2**

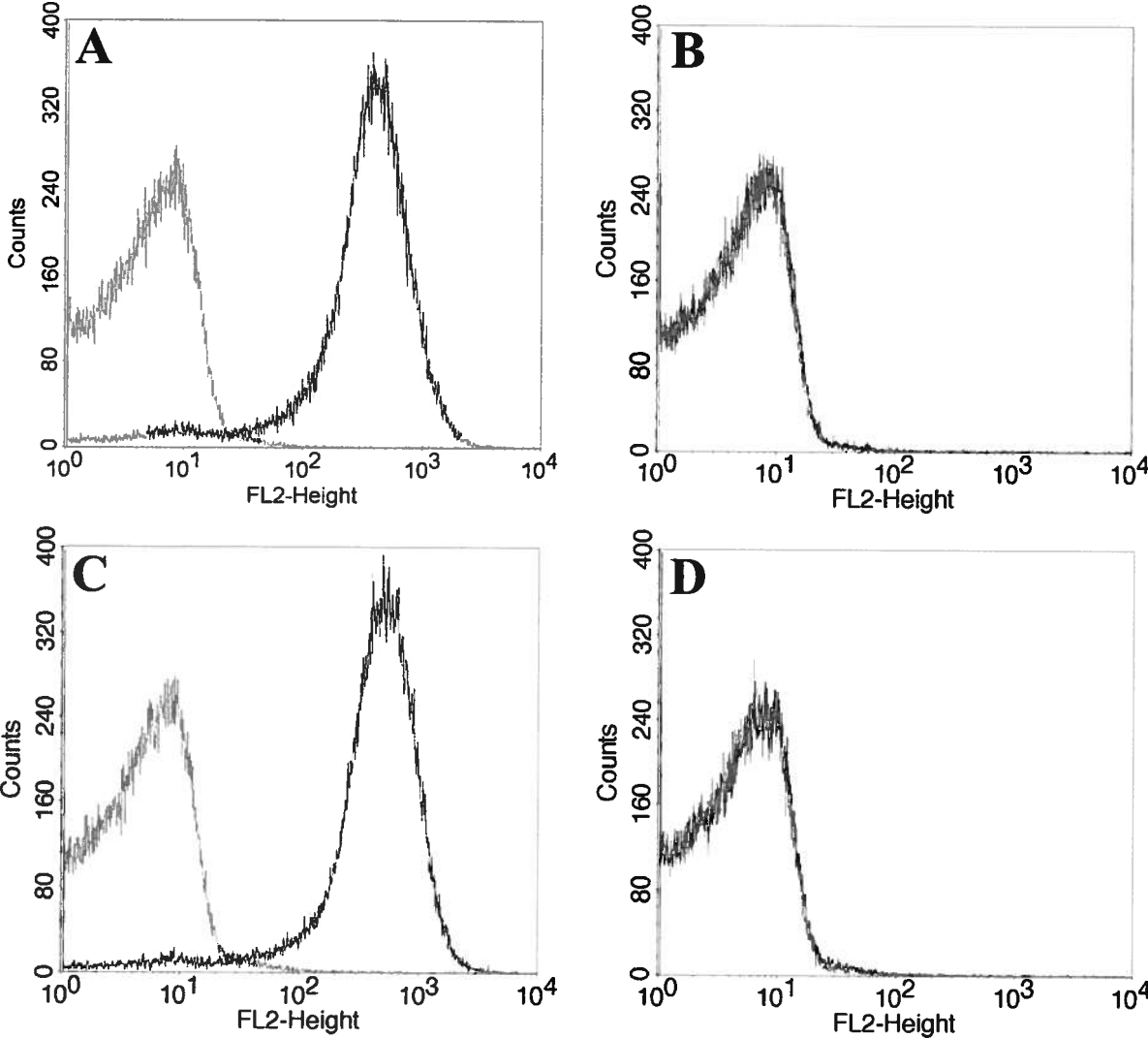




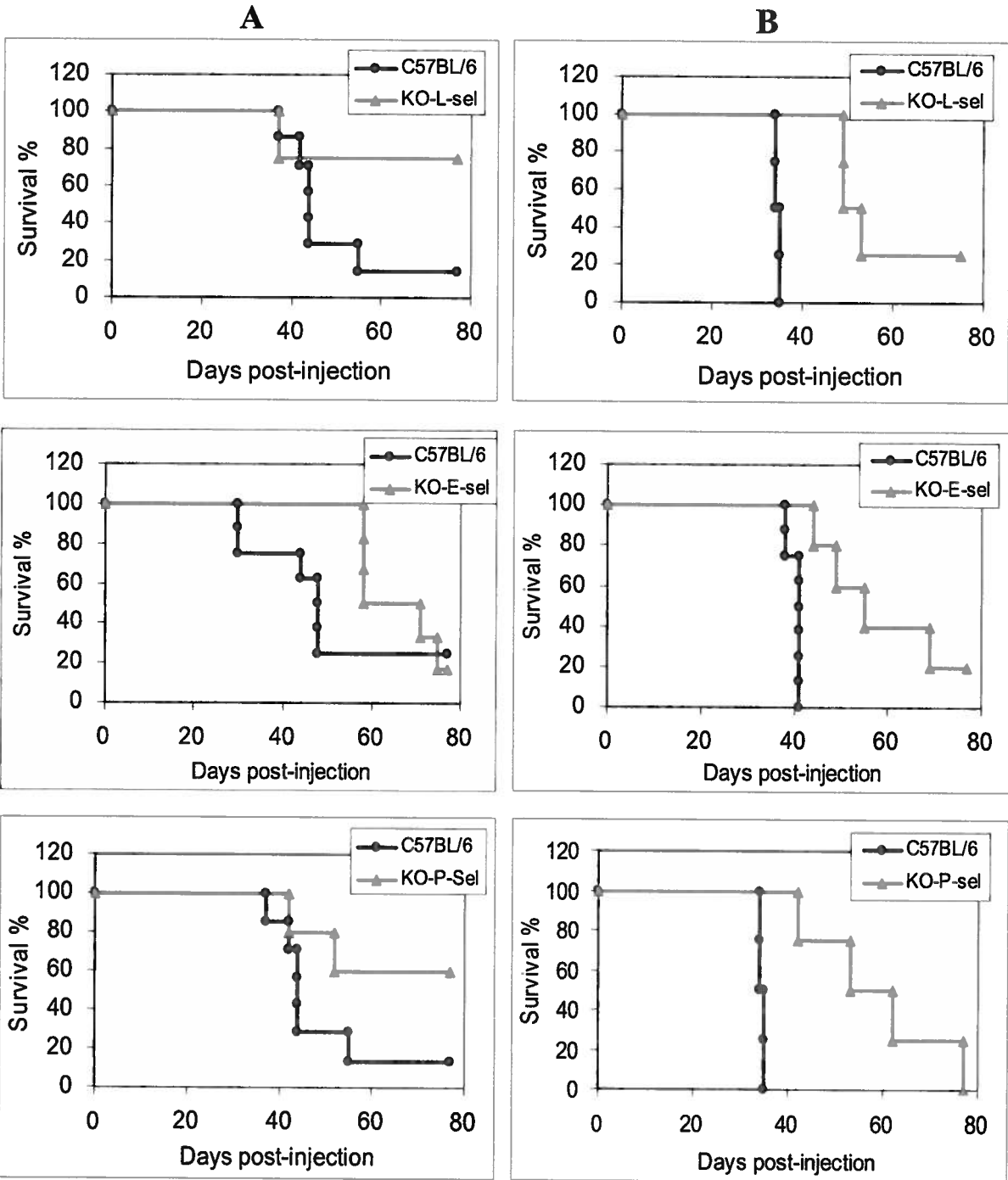
**Figure 3**



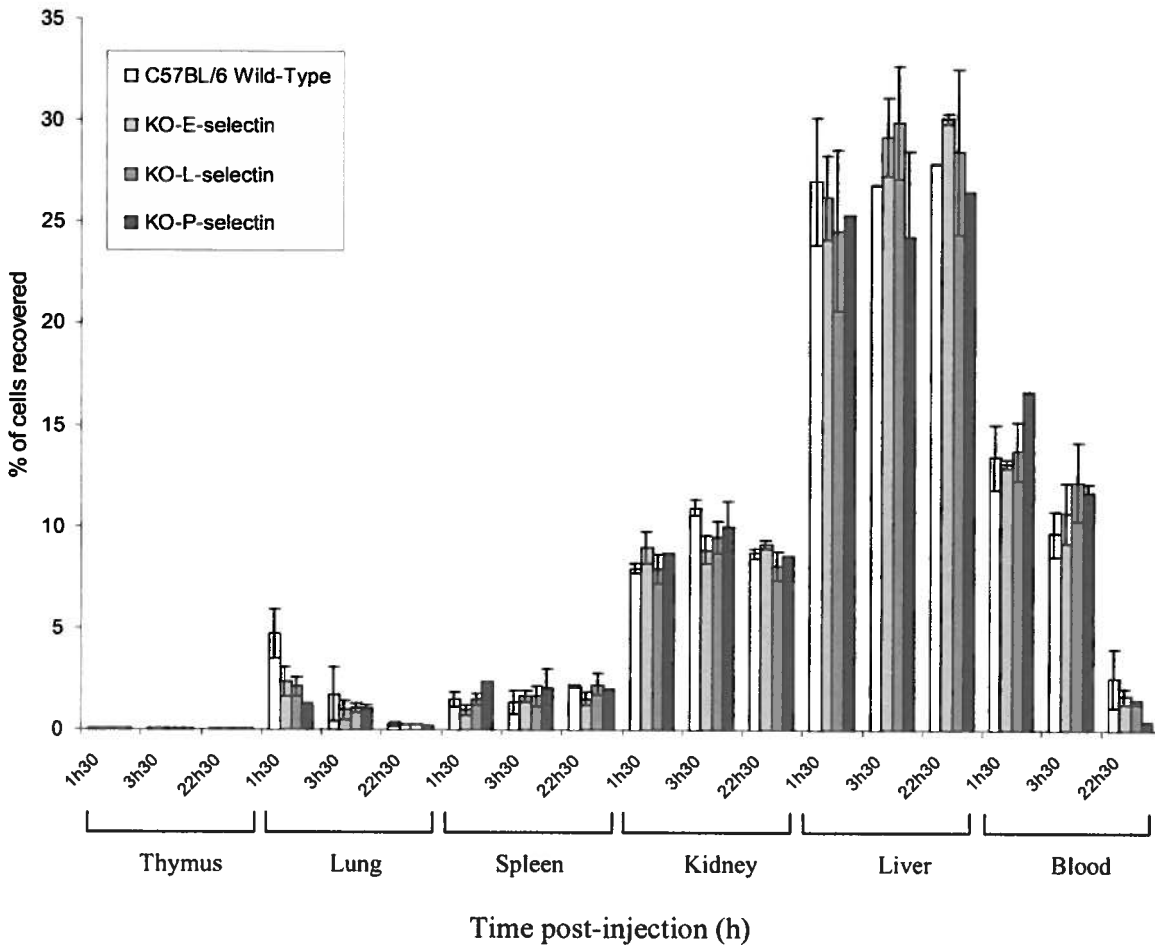
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



## Legends to tables and figures

### Table 1. Sequences of primers used for genotyping of mice and lymphoma cell lines

**Figure 1. Generation of L-selectin-deficient lymphoma cells.** (A) Genotype of T-lymphoma cell lines generated from normal (164T2 and 267), heterozygous (1681), and L-selectin-deficient mice (KOL lines) showing the presence of the wild-type allele (728 base pair [bp]) and the puromycin-containing mutant alleles (320 bp). (B) Surface expression of L-selectin on lymphoma cell lines. Cells were stained for L-selectin using the MEL-14 mAb by flow cytometry. Controls included cells incubated with SA-PE alone. The T-cell origin of all lymphoma cell lines was established by their ability to express CD3 $\epsilon$  (data not shown). The x axis measures fluorescence intensity; the y axis, cell counts.

### Table 2. Absence of L-selectin in the thymus overcomes the reduced tumorigenicity of L-selectin-deficient T-lymphoma cells

**Figure 2. Absence of L-selectin on lymphoma cells prevents their growth in the thymuses of normal, but not L-selectin-deficient, C57BL/6 mice.** (A, left) Representative thymic lymphoma harvested at necropsy after the injection of normal lymphoma or of L-selectin-deficient lymphoma to L-selectin-deficient mice. (Right) Thymus representative of a C57BL/6 mouse injected with L-selectin-deficient lymphoma after the same period of latency. (B) Genotype of thymic lymphoma cells induced on the intrathymic injection of lymphoma cells. Thymic lymphomas were harvested, and their genomic DNA was analyzed using the same primers as those used in Figure 1. Lane 1, 100-bp ladder; lane 2, thymic lymphoma harvested from normal C57BL/6 mice injected with 267 cells; lane 3, L-selectin-deficient C57BL/6 mice injected with 267 cells; lane 4, C57BL/6 mice injected with 1681 cells; lane 5, L-selectin-deficient C57BL/6 mice

injected with 1681 cells; lane 6, L-selectin-deficient C57BL/6 mice injected with KOL1682 cells; lane 7, L-selectin-deficient C57BL/6 mice injected with KOL1677 cells.

**Table 2. Absence of L-selectin in the thymus overcomes the reduced tumorigenicity of L-selectin-deficient T-lymphoma cells**

**Figure 3. Expression of PSGL-1 in the thymuses of BM chimeras.** After irradiation, normal (A-B) and L-selectin-deficient (C-D) C57BL/6 mice were reconstituted with syngenic BM cells collected from normal (A,C) or L-selectin-deficient (B,D) mice, as described in "Materials and methods." After 4 weeks, the thymocytes were analyzed for PSGL-1 expression by flow cytometry using the PSGL-1-specific mAb antibody (dark line). (E) Flow cytometric analysis of PSGL-1 (dark line) on KOL1682 lymphoma cell line. Control included incubation with the phycoerythrin (PE) conjugate alone. FL-2 indicates fluorescence intensity.

**Figure 4. L-selectin expression on thymocytes of BM chimeras.** After irradiation, normal (A-B) and L-selectin-deficient (C-D) C57BL/6 mice were reconstituted with syngenic bone marrow cells collected from normal (A,C) or L-selectin-deficient (B,D) mice, as described in "Materials and methods." After 6 weeks, the thymocytes were analyzed for L-selectin expression by flow cytometry using the MEL-14 mAb antibody (dark line). Control included incubation with the PE conjugate alone.

**Table 3. Growth of L-selectin-negative KOL1682 T-cell lymphoma injected intrathymically into syngenic mice reconstituted with bone marrow cells from normal and L-selectin-deficient mice**

**Figure 5. Dissemination of T-cell lymphoma in normal and selectin-deficient mice.** Kaplan-Meier survival curves showing the percentage of survival of normal and E-, L-,

and P-selectin-deficient C57BL/6 mice after intravenous injection of (A)  $5 \times 10^5$  and (B)  $5 \times 10^6$  164T2 T-lymphoma cells.

**Figure 6. *In vivo* migration assays of 164T2 T-lymphoma cells in normal and E-, L-, and P-selectin-deficient mice.** Cells were labeled *in vitro* with  $^{111}\text{In}$ , and  $10^6$  labeled cells were subsequently injected intravenously into mice. Radioactivity was counted in the organs at different times and was expressed as the percentage of total radioactivity injected, as described previously <sup>32</sup>. Data represent the mean values of duplicates.

### CHAPITRE III

Up-regulation of *egr-1* gene expression in endothelial cells following interaction with lymphoma cells.

Belanger S.D., Couillard J, and St-Pierre Y.

Soumis pour publication dans *Journal of Immunology*,  
Juillet 2007 (# de soumission 07-11984-FL)



## **Contribution des auteurs**

J'ai réalisé 90% des expériences décrites dans cet article, de même que participé à l'élaboration des approches expérimentales, des protocoles, de l'analyse des résultats et l'interprétation des expériences. J'ai également rédigé le manuscrit en collaboration avec le Dr. St-Pierre, manuscrit qui a été révisé par Julie Couillard.

## Résumé

La progression de plusieurs types de cancer d'origine hématopoïétique, incluant le lymphome non hodgkinien, est dépendante de l'interaction bi-directionnelle entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales (CE). L'angiogenèse ne joue pas seulement un rôle dans l'apport nutritif de la tumeur puisque les CE sécrètent également des facteurs de croissance pour la tumeur ainsi qu'une variété de protéinases dégradant la matrice et facilitant l'invasion tumorale. Un réseau vasculaire mieux développé favorise le processus de métastase des cellules tumorales circulantes via des interactions spécifiques impliquant les molécules d'adhésion situées à des sites déterminés de l'endothélium vasculaire. Malgré que nous ayons préalablement démontré que les CE peuvent activer les cellules de lymphome, l'inverse, soit l'habileté des cellules de lymphome à activer les CE est très peu connue. Dans cette étude utilisant une approche génomique, nous avons démontré que les CE répondent aux stimuli des cellules de lymphome. Plus spécifiquement, nous avons observé que les cellules de lymphome peuvent induire dans les CE l'expression de EGR-1, un facteur de transcription connu pour son implication dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes dans l'endothélium dont plusieurs sont reliés à la progression tumorale.

## Introduction

During inflammation, cell adhesion molecules (CAMs) such as E- and P-selectin, VCAM-1 or ICAM-1 are induced on the endothelial cell surface and are involved in the recruitment of T lymphocyte subsets into different inflamed tissues<sup>1,2</sup>. Recent evidence has consolidated the notion that binding of transformed lymphocytes to endothelial cells (EC) via adhesion molecules is critical for the dissemination of lymphoma cells in peripheral tissues. We and others have also shown, using siRNA strategies or ICAM-1 or selectins adhesion-deficient mice, that inhibition of CAMs expression significantly impair lymphoma progression<sup>3-6</sup>. The role of CAMs, however, is not limited to their role in recruitment of circulating cells since we found that lymphoma cells migrated with the same efficiency in both normal and adhesion-deficient mice<sup>7,8</sup>. This raised the possibility that close contact between lymphoma cells and EC may lead to the bi-directional activation of specific prometastatic genes in the tumour cells and the vascular endothelium. This idea has received strong support from studies demonstrating that contact between lymphoma cells and EC leads to the induction of several members of the family of matrix metalloproteinases (MMP), such as MMP-3, MMP-9, and MMP-10<sup>9-11</sup>. These genes play a primary role in the progression and invasiveness of many cancers, including leukemias<sup>12,13</sup>. The ability of lymphoma cells to activate EC remains, however, poorly characterized. In addition to express CAMs, EC are also well known to express a wide variety of chemokine and growth factor receptors, rendering them responsive to the local production of soluble mediators, most notably during close contact with lymphoma cells. In the present study we asked whether contact between T lymphoma cell and EC induces a significant change in gene expression in EC. Among those genes whose expression was significantly altered, we further investigated the upregulation of EGR-1, a transcription factor induced by a large number of growth factors and cytokines.

## **Materials and methods**

### **Mice**

Male and female C57BL/6 mice were bred in our animal facility and maintained under specific pathogen-free conditions and in accordance with institutional guidelines. Breeder pairs for the C57BL/6 mouse colony were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

### **Cell lines and reagents**

The origin of the 267 and 164T2 T lymphoma cell lines has been described. As a model to study lymphoma-EC interaction, we used the endothelioma cell line bEnd.3. In addition to expressing the von Willebrand factor, these cells express the same repertoire of cell adhesion molecules than that found on normal EC, including ICAM-1, VCAM-1, E- and P-selectins, CD31, and ICAM-2. The bEnd.3 cells upregulate the expression of cell adhesion molecules after stimulation with inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF $\alpha$ , with kinetics similar to those reported for primary ECs. Human Burkitt lymphoma Raji and COS-7 fibroblast cell lines were obtained from the ATCC (Manassas, VA). HUVEC cell lines were obtained from GlycoTech Corporation (Rockville, MD) and were maintained in EC complete medium containing EBM (endothelial cell basal medium) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), 0.001 mg/ml hydrocortisone, 0.012 mg/ml bovine brain extract, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer and 0,001% gentamycin/amphotericin (Cambrex, Walkersville, MD). The MDA-MB-231 and 293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS serum. Except for the human B lymphoma cell lines, which were maintained in B-cell medium (RPMI-1640 supplemented with 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.1 unit/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 0,075 % (w/v) sodium bicarbonate), all other cell lines were maintained in RPMI-1640 complete medium supplemented with 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES buffer, 0.1 unit/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin and 55  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol.

### ***In vitro* lymphoma-EC interactions**

Endothelial cell lines (bEnd.3) were seeded at the indicated density in 6- or 12-well plates (Corning, Acton, MA) and incubated overnight at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere until they reached approximately 80% confluence. Aliquots of 10<sup>7</sup> lymphoma cells re-suspended in complete RPMI medium were then added to the layer of endothelial cells and the co-cultures incubated for 12 hours at 37°C. Controls included EC incubated without lymphoma cells. Lymphoma cells were removed from adherent cells using a warm solution of 0.004% trypsin-EDTA. Remaining adherent EC cells were then harvested using 0.05% trypsin-EDTA and sorted on the Epics Elite system (Beckman Coulter, Miami, FL) based on size and granularity to discard the remaining lymphoma cells. Resulting bEnd.3 cell suspensions were immediately centrifuged and processed for RNA extraction and analysis by cDNA array.

### **Gene expression array**

Total cellular RNA was extracted from bEnd.3 cells using Qiagen RNeasy minikit (Qiagen, Chatsworth, CA). The Atlas cDNA Expression Array (Atlas Mouse 1.2, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, using 50 µg of DNase-digested total RNA, Poly(A)+ RNA was purified using streptavidin magnetic beads and biotinylated Oligo(dT). Poly(A)+ RNA was reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in the presence of [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]dATP and purified by column chromatography (NucleoSpin Extraction Spin Column; Clontech Laboratories). Prehybridization was carried out in ExpressHyb solution (Clontech Laboratories) containing 0.5 mg/ml sheared salmon testes DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in hybridization bottles. The membranes were then hybridized with [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]-labelled first strand cDNA probes (10 x 10<sup>6</sup> cpm of each probe sample) overnight at 68°C in a hybridization oven. The membranes were then washed extensively (three 20-min washes in 2x SSC at 68°C, 1% SDS, followed by two 20-min washes in 0.1x SSC/0.5% SDS at 68°C and room temperature) and exposed to a

PhosphorImager screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). The resulting hybridization signals were measured using a PhosphorImager SI (Molecular Dynamics). Arrays were analyzed using ImageQuant 5.0 software (Molecular Dynamics). The gene expression in bEnd.3 cells following contact with thymocytes or lymphoma cells was then compared with the corresponding bEnd.3 control population after normalization with housekeeping genes.

### **Semiquantitative RT-PCR**

RNA was prepared as described above. First strand mouse cDNA was synthesized from 2 µg of total cellular RNA using Omniscript RT (Qiagen, Chatsworth, CA). Primers used for PCR amplification were: 5'-TAA TAG CAG CAG CAG CAC CAG C-3' and 5'-GTC GTT TGG CTG GGA TAA CTC G-3' for EGR-1; 5'-TGA GGT CCA GCT CTC CTT C-3' and 5'-GCA GTG TGC TCA CCA CCT C-3' for PDGF-β; 5'-CAT GGA TGA CGA TAT CGC TGC GC-3' and 5'-GCT GTC GCC ACG CTC GGT CAG GAT-3' for β-actin; 5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' and 5'-CAG AAG TGG TGG TAC CTC TTC CGA-3' for GAPDH. PCR reactions were performed in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Cambridge, MA) using 35 cycles of the following parameters: 1 min at 94°C, 1 min at 58°C and 1 min at 72°C. PCR products were size separated by agarose gel electrophoresis and amplicons detected by ethidium bromide staining and UV transillumination. For analysis of PDGF-β and EGF expression, tumor cell lines were grown in culture, their RNA extracted and submitted to RT-PCR analysis using specific primers as described above.

### **HUVECS and bEnd.3 stimulation by EGF and PDGF-β**

bEnd.3 cells were grown to confluency in RPMI 1640 complete medium prior to stimulation. Recombinant growth human (EGF) or platelet growth factors (PDGF-β) (Prospec TechnoGene, Rehovot, Israel) were added at various concentrations for the indicated times. In some experiments, cells were stimulated with PMA (Sigma) at 50 ng/ml for one hour as positive control for the stimulation of *egr-1*. Following stimulation,

RNA was extracted and RT-PCR was performed to analyse *egr-1* expression as described above.

### **Reporter constructs.**

A 1222-bp DNA fragment of the mouse *egr-1* promoter was isolated by PCR from the genomic DNA purified from bEnd.3 using the forward primer (5'-ACG GAG GGA ATA GCC TTT CG-3') and the reverse primer (5'-CAT CCC GGA CCA GCG AGC TGG-3'). The amplicon was ligated into pCR®4-TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and then subcloned into the promoterless luciferase reporter vector pGL3-Basic to create *egr-1*/Luc (Promega, Madison, WI). For transfection analyses, the promoter-less pGL3-Basic vector was used as a negative control.

### **Transfection and luciferase assays**

Transfections in COS-7 or 293 cells were performed using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Briefly,  $3 \times 10^5$  cells were seeded in 6 well plates 24 h before transfection. At 60-70% confluency, cells were incubated with the lipofectamine:DNA complexes containing 10  $\mu$ l of lipofectamine 2000 reagent and 2  $\mu$ g of *egr-1*/Luc plasmid in RPMI 1640 medium. Five hours later, the transfection mixture was replaced by regular growth medium. The co-culture assays were performed 24 h post-transfection. For co-culture assay, the cells were seeded in 12-well plates 24 h post-transfection and lymphoma cells were added ( $2 \times 10^6$  lymphoma cells) at a ratio COS-7:Lymphoma cells of 1:10 or at a ration of COS-7: breast cancer cells of 1:3. The cells were then incubated for 18 h and cells harvested for measurement of luciferase activity using the Luciferase Assay System according to the manufacturer's protocol (Promega).

### ***In vivo* EGR-1 expression analysis**

Eight- to 10-wk-old C57BL/6 mice (5–10 mice per group) were injected intravenously with  $5 \times 10^6$  164T2S11 and 267 syngeneic T lymphoma cells. Mice were

then regularly observed for clinical signs of lymphoma (runting, splenomegaly, etc.), which only appear at the end stage of the disease and reveal imminent death owing to dissemination of lymphoma in peripheral tissues, most notably in the liver<sup>3,12</sup>. The presence of lymphoid tumors was confirmed at necropsy. The liver was collected and RNA extracted using Trizol Reagent (Invitrogen) and submitted to RT-PCR analysis as described above. All of the animal research was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier in accordance with institutional and Canadian guidelines for animal experiments.



## Results

### Identification of differentially expressed genes in bEnd.3 following contact with T-cell lymphoma

To screen for genes induced in endothelial cells (EC) following contact with T lymphoma cells, we used an *in vitro* model in which the T lymphoma cells were co-cultured with the bEnd.3 endothelial cell line. This endothelioma cell line has been used by many investigators as an *in vitro* model to study the ability of leukocytes to interact with vascular endothelium<sup>11,14-16</sup>. Our previous published data and preliminary experiments using this model system established that a 12h period of time was optimal to obtain a maximal induction of gene expression in EC following contact with lymphoma cells<sup>9,11</sup>. After contact, the lymphoma cells were removed, the EC purified and an expression array system was used to identify genes whose expression was modulated upon contact with lymphoma cells. Our results showed that while the percentage of genes that showed a relatively high change in their expression was rather limited (**Figure 1 and Table I**), we found that contact between T lymphoma cells and EC induced a strong upregulation of *egr-1*, a gene encoding a transcription factor whose expression is known to be highly inducible in EC following exposure to several cytokines and pharmacological agents, such as PMA, and implicated in the transcription of multiple genes within the endothelium<sup>17</sup>. The induction of *egr-1* in EC upon contact with T lymphoma cells was confirmed in independent experiments by RT-PCR analysis (**Figure 2a**). Expression of EC was also induced upon co-culture with normal T cells (thymocytes) and aggressive T lymphoma cells, S11 (**Figure 2a**). Control EC were grown at the same confluence for an equal period of time and then submitted to the same treatment consisting of an incubation with a warm solution of 0,004% trypsin-EDTA and then harvested using 0,05% trypsin-EDTA and submitted to the cell sorter system in the same conditions. The upregulation of *egr-1* was not due to the presence of contaminating T lymphoma cells following EC isolation after contact since RT-PCR analysis failed to detect expression of *I-selectin* (**Figure 2b**), a gene specifically expressed in T cells but not in EC.

### **Analysis of EGR-1 promoter activity by luciferase assays.**

To further confirm the ability of lymphoma cells to upregulate *egr-1* upon close contact, we used the COS-7 fibroblast-like cells as a model system. These cells were transfected with a reporter construct containing the *egr-1* promoter and subsequently co-cultured with different types of murine and human T and B lymphoma cells. Our results showed that the murine 164T2 T lymphoma cells induced a significant ( $p < 0.05$ ) increase in luciferase activity in COS-7 cells (**Figure 3a**). Similar results were obtained using the human Raji B lymphoma cells ( $p < 0.005$ ) (**Figure 3a and 3b**). These results suggest that both human and murine B and T lymphoma cells have the ability to induce *egr-1* in COS-7 cells via activation of the its promoter.

### **Induction of *egr-1* by breast cancer cells.**

Since EC is in close proximity to other cells in other types of cancer, we have investigated the ability of other cells to induce *egr-1* gene expression. We found that other tumour cell lines, such as the human MDA-MB-231 ( $p < 0.001$ ) (**Figure 3b**) and mouse 4T1 ( $p < 0.05$ ) breast cancer cell lines could also induce *egr-1* expression in COS-7 cells. The ability of MDA-MB-231 was particularly strong, inducing up to 12-fold the level of EGR-1 activity as compared to unstimulated controls in some independent experiments (*data not shown*). To determine whether the contact between the tumor and the stromal cells was essential, we used a Transwell system that physically separated the stromal cells (bottom) from the tumor cells with a 0,4  $\mu\text{m}$  pore membrane. Using this approach, we found that while this physical barrier reduced the EGR-1 induction, we could still observe an activation of the *egr-1* promoter on COS-7 cells using a Transwell system (**Figure 3c**), indicating that while induction of *egr-1* gene expression was stronger upon close contact between tumour cells and EC, direct contact was not essential and that activation of *egr-1* was most likely involving secretion of a soluble factor.

### **EGF and PDGF can induce *egr-1* gene expression in EC.**

Platelet-derived growth factor (PDGF) is a potent inducer of *egr-1* expression in many cell types<sup>18,19</sup>. Interestingly, we found that PDGF was expressed at high levels in our T lymphoma cells (**Figure 4a**). Moreover, we found that exposure of EC to recombinant PDGF induced, in a time-dependent manner, the expression of *egr-1* in EC (**Figure 4b**), indicating that PDGF was sufficient to increase *egr-1* in EC. Our expression analysis of PDGF in breast cancer cell lines, however, showed that PDGF was not expressed in these cells and could thus not be considered as a potential candidate for the induction of *egr-1* in EC by these tumor cells. We have thus examined these cells for other putative cytokines/growth factors that could induce *egr-1* in EC. Our investigations led us to EGF (epidermal growth factor), a gene we found was expressed constitutively at high levels in the MDA-MB-231 human breast cancer cells (**Figure 5a**). Interestingly, EGF was also expressed at high levels in the human Raji B lymphoma cells (**Figure 5a**) and in the mouse T lymphoma cells lines (i.e. 164T2; *data not shown*), all capable of inducing *egr-1* gene expression in EC. We also found that human recombinant EGF could induce the transcriptional activity of the *egr-1* promoter in COS-7 and in human 293 fibroblasts cells in response to different doses of recombinant EGF (**Figure 5b**). We also confirmed that EGF induced the activation of endogenous *egr-1* in primary human endothelial cells (**Figure 5c**).

### ***In vivo* expression of EGR-1 in different tumor types.**

Since our results have shown that lymphoma cells induces *egr-1* gene expression *in vitro*, we have compared the level of *egr-1* gene expression in peripheral organs of mice injected intravenously with the 164T2S11 or 267 murine T lymphoma cells. In this model, as shown in **Figure 6**, we found a significant increase in the overall expression of *egr-1* in the liver of mice injected with lymphoma cells as compared with the normal mice.

## Discussion

Although intercellular adhesion of leukocytes and tumor cells to EC is a key event in inflammation and metastasis, EC have been mostly considered as bystander cells, serving as an adhesion platform. In the present work, using an approach based on genomic analysis of EC in contact with T lymphoma, we provide evidence that EC are responsive to lymphoma cells. More specifically, we showed that: 1) lymphoma cells can induce the expression of *egr-1*, a gene known to be implicated in the transcriptional regulation of multiple genes within the endothelium; 2) exposure of PDGF or EGF, which are constitutively expressed by lymphoma cells, are sufficient to induce the expression of *egr-1*; 3) the 1,200-bp 5' flanking region of the *egr-1* promoter confers responsiveness to these growth factors; 4) although growth factors can lead to the up-regulation of *egr-1* gene expression, direct contact with EC cells is more efficient in inducing *egr-1*, and 5) lymphoid tumors induced by injection of T lymphoma cells have abnormally high levels of *egr-1* expression in their microenvironment.

In our previous investigations, we have used our co-culture experimental system to investigate the molecular changes that occur as a result of the bi-directional "cross-talk" between tumour cells and endothelial cells<sup>9,10,11</sup>. We had found that several genes, including those encoding the members of the family of matrix metalloproteinases (MMP) were significantly upregulated during the interactions between tumour and endothelial cells. Here, we have specifically focused on transcriptional reprogramming of EC, which can be followed by expression profiling, to detect tumour-induced phenotypic changes induced in endothelial cells upon contact with tumour cells. Our microarray data showed that contact between T lymphoma cells and EC induced the upregulation of several member of the immediate-early gene family that include *c-fos*, *c-jun*, and *egr-1*. We found that the most prominent change, however, was the upregulation of *egr-1*. EGR-1 (also known as krox-24, ZIF268, and TIS8) is a zinc-finger transcription factor that belongs to a multigene family that includes Egr-2, Egr-3, Egr-4, and WT-1<sup>20</sup>. Its

expression is rapidly and transiently induced by a large number of growth factors and cytokines<sup>21</sup>. In EC, it has been shown to be increased in response to fluid shear stress<sup>22</sup>, wound healing<sup>23</sup>, following exposure to thrombin<sup>24</sup> or to basic and acidic fibroblast growth factor (aFGF and bFGF)<sup>25-27</sup>. A previous study has also reported that EGR-1 can be induced by EGF in HUVEC<sup>28</sup>. But to our knowledge, this is the first report showing that PDGF-BB and adhesion to normal and transformed lymphocytes can induce EGR-1 in EC.

The interface between the cell surface receptors and the downstream signaling pathways, including the activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway via Ras, the activation of signal transducers and activators of transcription (STAT), or the activation of phospholipase C $\gamma$ , that triggers the upregulation of EGR-1 via the EGF or PDGF receptors are currently not known but is likely to involve the activation of Ras/ERK signaling pathway since previous studies in keratinocytes and EC have shown, for instance, that EGF induces EGR-1 via the phosphorylation and activation of ERK and is inhibited by specific MAP kinase inhibitor<sup>28,29</sup>. However, it is likely that the downstream signal transduction networks may be modified at different rates depending on the stimulus and in different types of endothelial cells. Regardless of the underlying signaling pathway involved in the triggering of EGR-1, our findings have wide implications for the interpretation of intercellular contact between lymphoma cells (and possibly normal lymphocytes and other tumour cell types) and EC. EGR-1 does indeed control the expression of a wide variety of pathogenesis relevant genes, including growth factors, cytokines, adhesion molecules, and extracellular proteases, many of which play an important role in tumorigenesis and angiogenesis<sup>17</sup>. Nevertheless, in the case of cancer, the role of EGR-1 is complicated. Some reports have shown that EGR-1 induces cell arrest against tumor transformation<sup>30,31</sup>. Others have shown that EGR-1 inhibits apoptosis and increases during tumor growth<sup>32-34</sup>. Moreover, prostate and breast cancer progression are significantly impaired in EGR-1-deficient mice and by EGR-1 DNazymes respectively<sup>35-36</sup>. More recently, Lucerna *et*

*al.*,<sup>37</sup> have shown that sustained expression of EGR-1 in EC blocks angiogenesis and repress tumor growth, most likely since excessive activation of some of the genes induced by EGR-1, which may be proangiogenic when transiently expressed, are antiangiogenic after sustained expression. An important goal for future studies will thus be to characterize the nature and the consequences of functional interaction occurring between lymphoma cells and EC via *egr-1*, most notably with regards to the genes that are subsequently induced and the physiological consequences of these activated pathways.

Our *in vitro* model system was useful to demonstrate that EGR-1 was increased in endothelial cells upon contact with lymphoma cells. We also find an increased *egr-1* gene expression in liver lymphoid tumor tissues collected from mice injected with T-lymphoma cells, as compared with normal liver tissues. These data are consistent with previous studies showing that systemic administration of EGF to mice results in the upregulation of EGR-1 in EC in many tissues, although to a lower extent in the liver where EGF induces EGR-1 in hepatocytes<sup>38</sup>. Therefore, we cannot rule out the possibility that other cell types, including the hepatocytes, may also contribute to the upregulation of EGR-1 observed in the liver lymphoid tumors. Indeed, previous studies have shown that EGR-1 can be expressed by many cell types<sup>39-40</sup>. Moreover, we have shown here that intercellular contact and EGF can induce EGR-1 in other cell types such as COS-7 and 293 cells. It is also possible that while administration of EGF has not been shown to induce EGR-1 in EC in the liver, the presence of lymphoma cells and PDGF-BB can do so. Finally, recent data published by Kim *et al.*,<sup>41</sup> showing that latent membrane protein 1 (LMP1) encoded from the Epstein-Barr virus (EBV) can increase the expression of EGR-1 in tumour cells, most notably in human T lymphoma cells, also raise the possibility that increased EGR-1 may reflect at least a partial contribution by lymphoma cells. Future experiments using transgenic approach will be a valuable alternative to distinguish between the host and the tumour cells as being the main the source of this upregulation of EGR-1 in lymphoid tumors.

## **Acknowledgments**

We thank Doris Legault and Diane Tremblay for their excellent technical support.

## References

1. Ley, K., Kansas, G. S. 2004. Selectins in T cell recruitment to non-lymphoid tissues and of sites of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 325-336.
2. Wang, J., Springer, T. A. 1998. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol. Rev.* 163: 197-215.
3. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., Springer, T. A., St-Pierre, Y. 1998. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J. Immunol.* 161:2333-2338.
4. Fukami, A., Iijima, K., Hayashi, M., Komiyama, K., Omura, S. 2002. Macrophage B suppressed metastasis through inhibition of adhesion of sLe(x)/E-selectin molecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 1065-1070.
5. Bélanger, S., St-Pierre, Y. 2005. Role of selectins in triggering, growth, and dissemination of lymphoma: Implication of L-selectin in growth of Thymic lymphoma. *Blood* 105: 4800-4806.
6. Zuo, Y., Wei, W., Liu, C., Zhao, L., Wang, L., Zhang, J. 2007. Silencing L-selectin expression by siRNA attenuated metastasis of murine lymphoid neoplasm cell P388D1 to peripheral lymph nodes. *Leukemia* 21: 180-183.
7. Jonas, P., Holzmann, B., Jablonski-Westrich, D., Hamann, A. 1998. Dissemination capacity of murine lymphoma cells is not dependent on efficient homing. *Int. J. Cancer* 77: 402-407.



8. Lalancette, M., Aoudjit, F., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. 2000. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood* 95:314-319.
9. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. 1998. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol.* 160: 2967-2973.
10. Van Themsche, C., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. 2004. Stromelysin-1 (MMP-3) is inducible in T lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 884-891.
11. Van Themsche, C., Alain, T., Kossakowska, A. E., Urbanski, S., Potworowski, E. F., St-Pierre, Y. 2004. Stromelysin-2 (matrix metalloproteinase 10) is inducible in lymphoma cells and accelerates the growth of lymphoid tumors *in vivo*. *J. Immunol.* 173: 3605-3611.
12. Demers, M., Magnaldo, T., St-Pierre, Y. 2005. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res.* 65: 5205-5210.
13. Stefanidakis, M., Koivunen, E. 2006. Cell-surface association between matrix metalloproteinases and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* 108:1441-1450.
14. Williams, R. L., Risau, W., Zerwes, H. G., Drexler, H., Aguzzi, A., Wagner, E. F. 1989. Endothelioma cells expressing the polyoma middle T oncogene induce hemangiomas by host cell recruitment. *Cell* 57: 1053-1063.

15. Weller, A., Isenmann, S., Vestweber, D. 1992. Cloning of the mouse endothelial selectins. *J. Biol. Chem.* 267: 15176-1983.
16. Kinashi, T., St-Pierre, Y., Springer, T. A. 1995. Expression of glycoposphatidylinositolanchored and -non-anchered isoforms of vascular cell adhesion molecule 1 in murine stromal and endothelial cells. *J. Leukoc. Biol.* 57: 168-173.
17. Fu, M., Zhu, X., Zhang, J., Liang, J., Lin, Y., Zhao, L., Chen, Y. E. 2003. Ehrenguber MU, Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 315: 33-41.
18. Rupprecht, H. D., Sukhatme, V. P., Lacy, J., Sterzel, R. B., Coleman, D. L. 1993. PDGF-induced Egr-1 expression in rat mesangial cells is mediated through upstream serum response elements. *Am. J. Physiol.* 265: F351-360.
19. Mundschau, L. J., Forman, L. W., Weng, H., Faller, D. V. 1994. Platelet-derived growth factor (PDGF) induction of egr-1 is independent of PDGF receptor autophosphorylation on tyrosine. *J. Biol. Chem.* 269: 16137-142.
20. Gashler, A., Sukhatme, V. P. 1995. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50: 191-224.
21. Sukhatme, V. P., Cao, X. M., Chang, L. C., Tsai-Morris, C. H., Stamenkovich, D. , Ferreira, P. C., Cohen, D. R., Edwards, S. A., Shows, T. B., Curran, T., Le Beau, M. M., Adamson, E. D. 1988. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53: 37-43.

22. Schwatgen, J. L., Houston, P., Campbell, C., Sukhatme, V., Braddock, M. 1998. fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Clin. Invest.* 101: 2540-2549.
23. Khachigian, L. M., Collins, T. 1998. Early growth response factor 1: a pleiotropic mediator of inducible gene expression. *J. Mol. Med.* 76: 613–616.
24. Wu, S. Q., Minami, S. Q., Donovan, D. J., Aird, W. C. 2002. The proximal serum response element in the Egr-1 promoter mediates response to thrombin in primary human endothelial cells. *Blood* 100: 454-461.
25. Ko, Y., Totzke, G., Seewald, S., Schmitz, U., Schiemeyer, B., Meyer, Z. U., Brickwedde, M.K., Vetter, H., Sachinidis, A. 1995. Native low-density lipoprotein (LDL) induces the expression of the early growth response gene-1 in human umbilical arterial endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 68: 306-312.
26. Delbridge, G. J., Khachigian, L. M. 1997. FGF-1-induced platelet-derived growth factor-A chain gene expression in endothelial cells involves transcriptional activation by early growth response factor-1. *Circ. Res.* 81: 282-288.
27. Santiago, F. S., Lowe, H. C., Day, F. L., Chesterman, C. N., Khachigian, L. M. 1999. Early growth response factor-1 induction by injury is triggered by release and paracrine activation by fibroblast growth factor-2. *Am. J. Pathol.* 154: 937-944.
28. Tsai, J. C., Liu, L., Guan, L., Aird, W. C. 2000. The Egr-1 gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 279:C1414-1424.

29. Kaufman, K., Thiel, G. 2002. Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J. Cell Biochem.* 85: 381-391.
30. Liu, C., Adamson, E., Mercola, D. 1996. Transcription factor Egr-1 suppresses the growth and transformation of human HT-1080 fibrosarcoma cells by induction of TGF1. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 93: 11831-11836.
31. de Belle, I., Huang, R. P., Fan, Y., Liu, C., Mercola, D. Adamson, E. D. 1999. p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells, but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis. *Oncogene* 18: 3633-3642.
32. Sells, S. F., Muthukumar, S., Sukhatme, V. P., Crist, S. A., Rangnekar, V. M. 1995. The zinc finger transcription factor EGR-1 impedes interleukin-1-inducible tumor growth arrest. *Mol. Cell Biol.* 15: 682-692, 1995.
33. Calogero, A., Cuomo, L., D'Onofrio, M., de Grazia, U., Spinsanti, P., Mercola, D., Faggioni, A., Frati, L., Adamson, E. D., Ragona, G. 1996. 1996. Expression of Egr-1 correlates with the transformed phenotype and the type of viral latency in EBV genome positive lymphoid cell lines. *Oncogene* 13: 2105-2112.
34. Scharnhorst, V., Menke, A. L., Attema, J., Haneveld, J. K., Riteco, N., van Steenbrugge, G. J., van der Eb, A. J., Jochemsen, A. G. 2000. EGR-1 enhances tumor growth and modulates the effect of the *Wilms' tumor 1* gene products on tumorigenicity. *Oncogene* 19: 791-800.
36. Fahmy, R. G., Dass, C. R., Sun, L. Q., Chesterman, C. N., Khachigian, L. M. 2003. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nature Med.* 9: 1026-1032.

37. Lucerna, M., Pomyje, J., Mechtcheriakova, D., Kadl, A., Gruber, F., Bilban, M., Sobanov, Y., Schabbauer, G., Breuss, J., Wagner, O., Bischoff, M., Clauss, M., Binder, M., Hofer, E. 2006. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 66: 6708-6713.
38. Liu, L., Tsai, J. C., Aird, W. C. 2000. Egr-1 gene is induced by the systemic administration of the vascular endothelial growth factor and the epidermal growth factor. *Blood* 96:1772-1781.
39. Shao, H., Kono, D. H., Chen, L. Y., Rubin, E. M., Kaye, J. 1997. Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J. Exp. Med.* 185:731-744.
40. Ke, J., Gururajan, M., Kumar, A., Simmons, A., Turcios, L., Chelvarajan, R. L., Cohen, D. M., Wiest, D. L., Monroe, J. G., Bondada, S. 2006. The role of MAPKs in B cell receptor induced down-regulation of Egr-1 in immature B lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 281: 39806-39818.
41. Kim, J. H., Kim, W. S., Kang, J. H., Lim, H. Y., Ko, Y. H., Park, C. 2007. Egr-1, a new downstream molecule of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *FEBS Lett.* 581: 623-628.

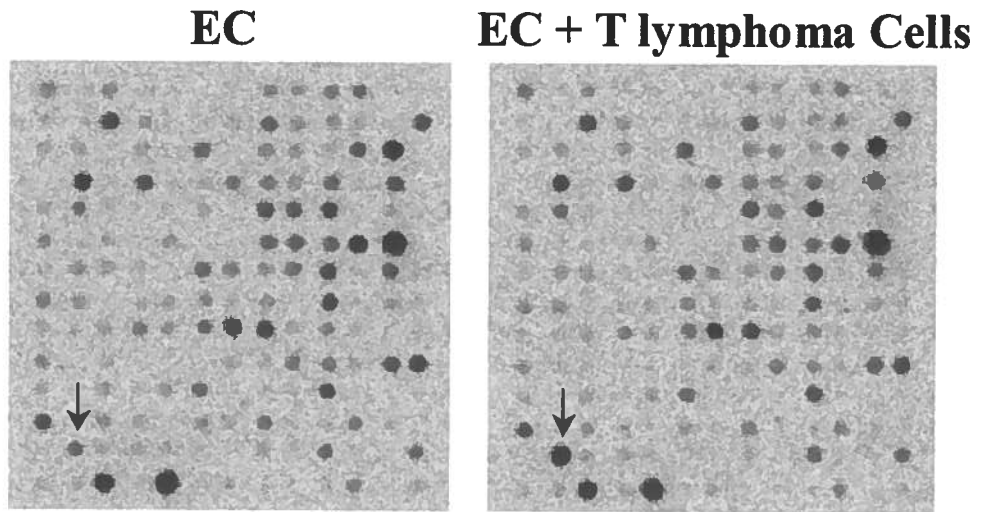
## Tableau et figures

**Table 1**

<i>Genes</i>	Accession number	Gene expression in bEnd.3			
		Control	+Thymocytes	+ 164T2	+164T2S19
<i>Up-regulated genes</i>					
Basic fibroblast growth factor receptor 1 (BFGFR1)	M28998	1	9 030	11 519	14 307
Ezrin	X60671	24 152	32 914	35 856	51 538
Dystroglycan (DAG1)	U43512	12 499	17 499	23 768	28 253
Tyrosine kinase c-abl	L10656	7 678	13 220	22 052	25 333
<b>Early growth response protein 1 (EGR-1)</b>	<b>M20157</b>	<b>20 839</b>	<b>223 565</b>	<b>212 240</b>	<b>85 021</b>
c-jun	J04115	13 749	59 087	42 905	26 318
c-fos	V00727	1	26 197	19 031	8 334
fos-related antigen-2	X83971	11 672	19 457	10 339	33 390
Src homology 2 domain-containing transforming protein C1 (Shc1)	U15784	15 514	14 466	16 510	31 240
E47 interaction protein 1 (EIP1)	Y07836	11 071	13 766	27 965	35 795
<i>Down-regulated genes</i>					
Calcyclin binding protein	U97327	29 845	16 105	21 630	9 408
WSB1 protein	AF033186	10 111	1	3 476	5 731
WSB2 protein	AF033188	12 751	5 825	3 605	4 785
Proteasome alpha7/C8 subunit	AF055983	20 360	6 095	7 108	5 256
Eph-related receptor tyrosine kinase	M68513	8 100	4 915	2 280	1 689

Figure 1

**A**



**B**

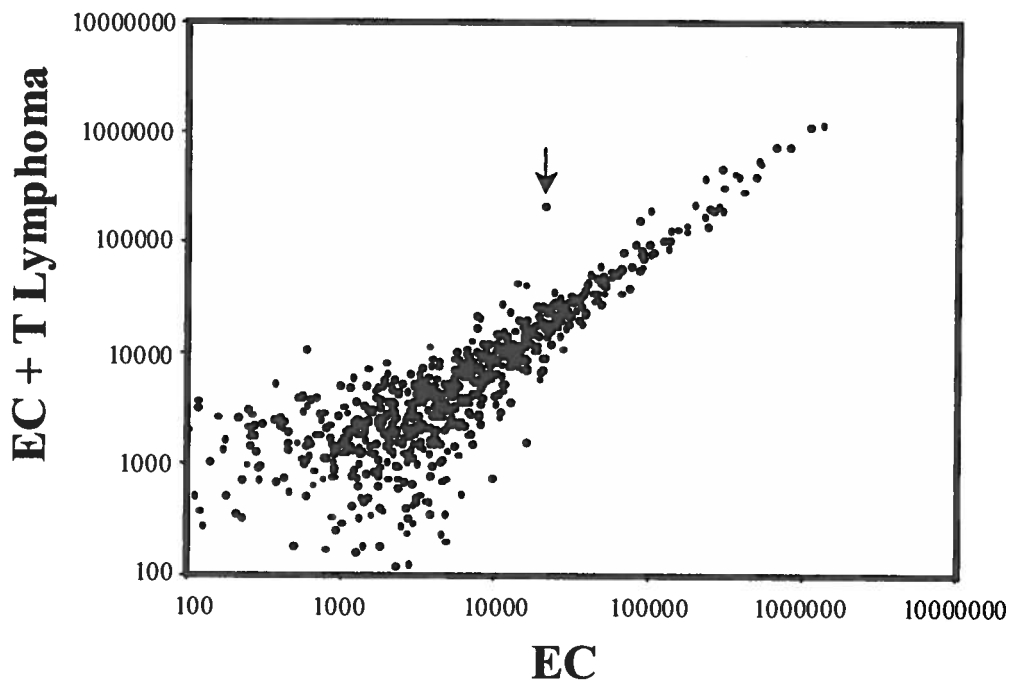


Figure 2

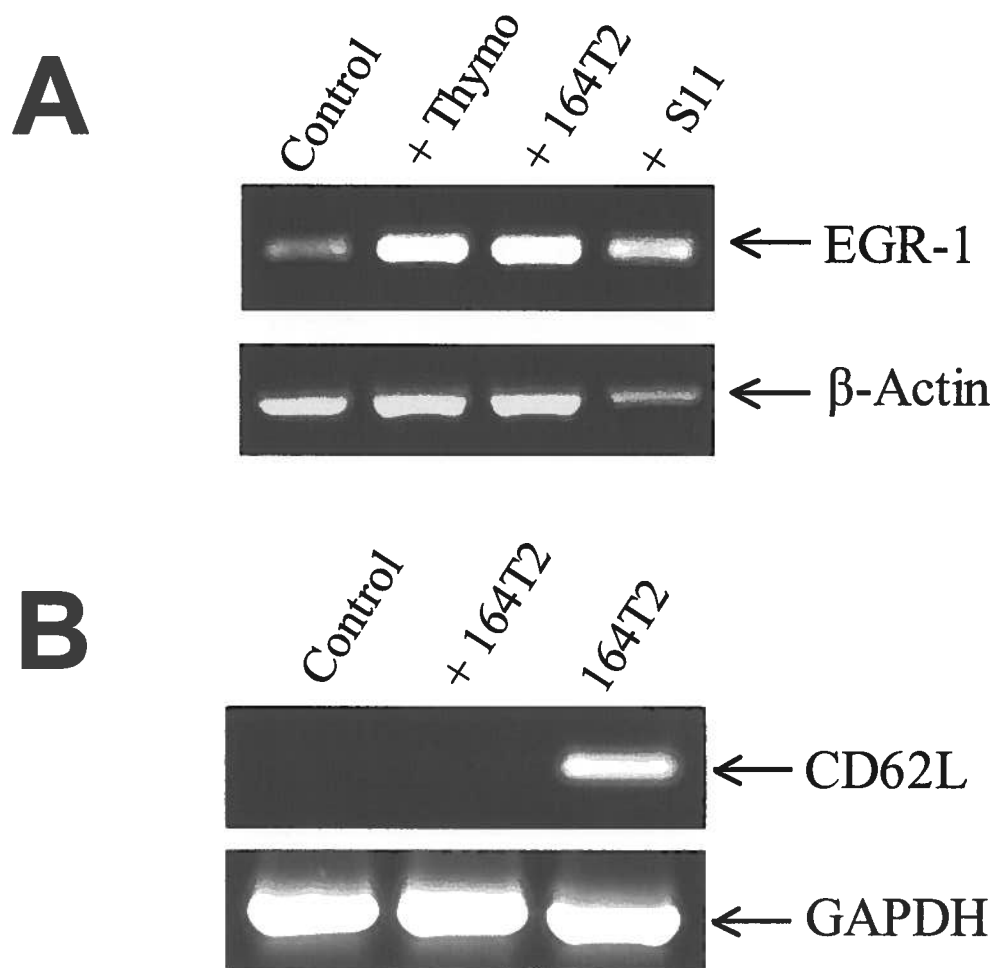




Figure 3

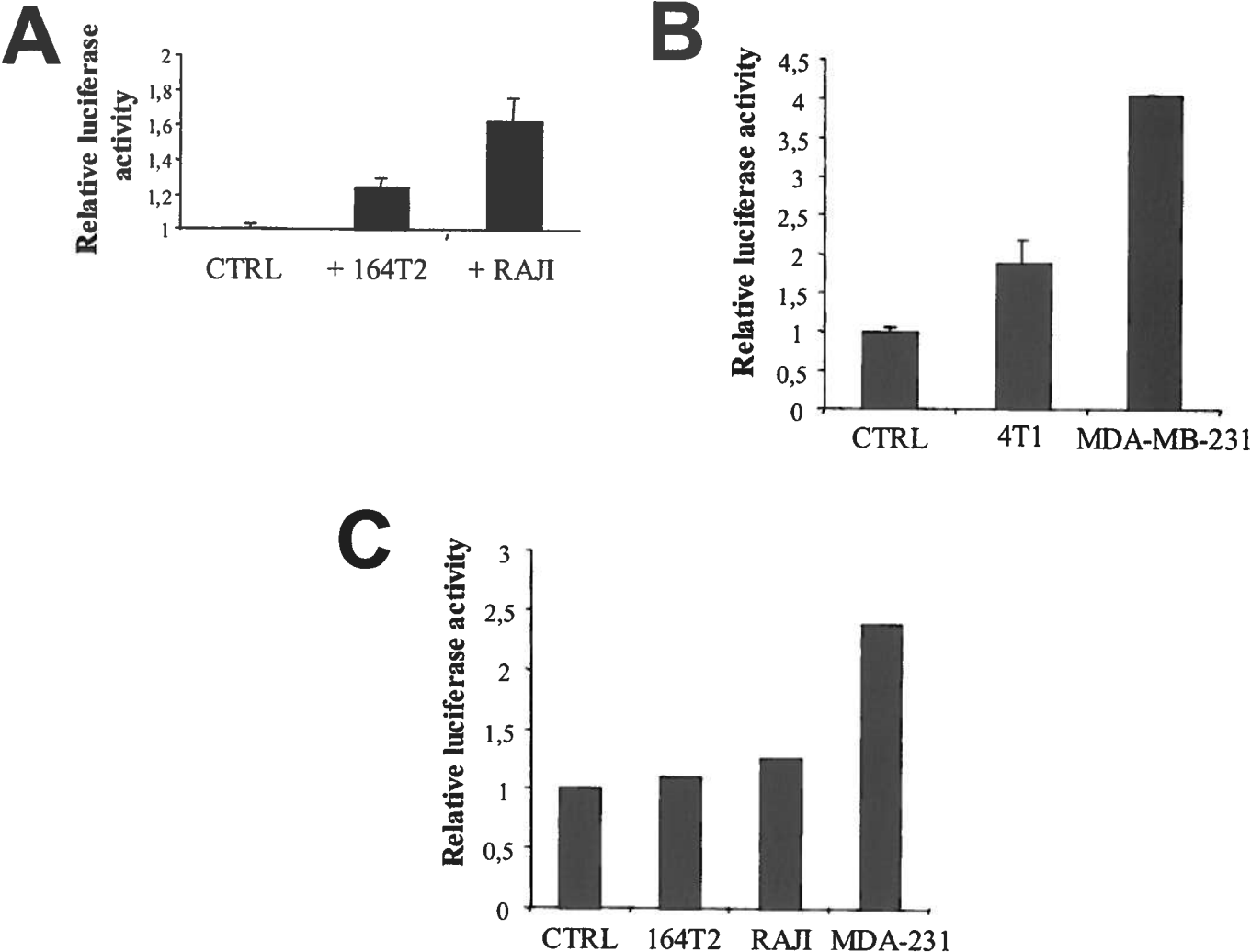


Figure 4

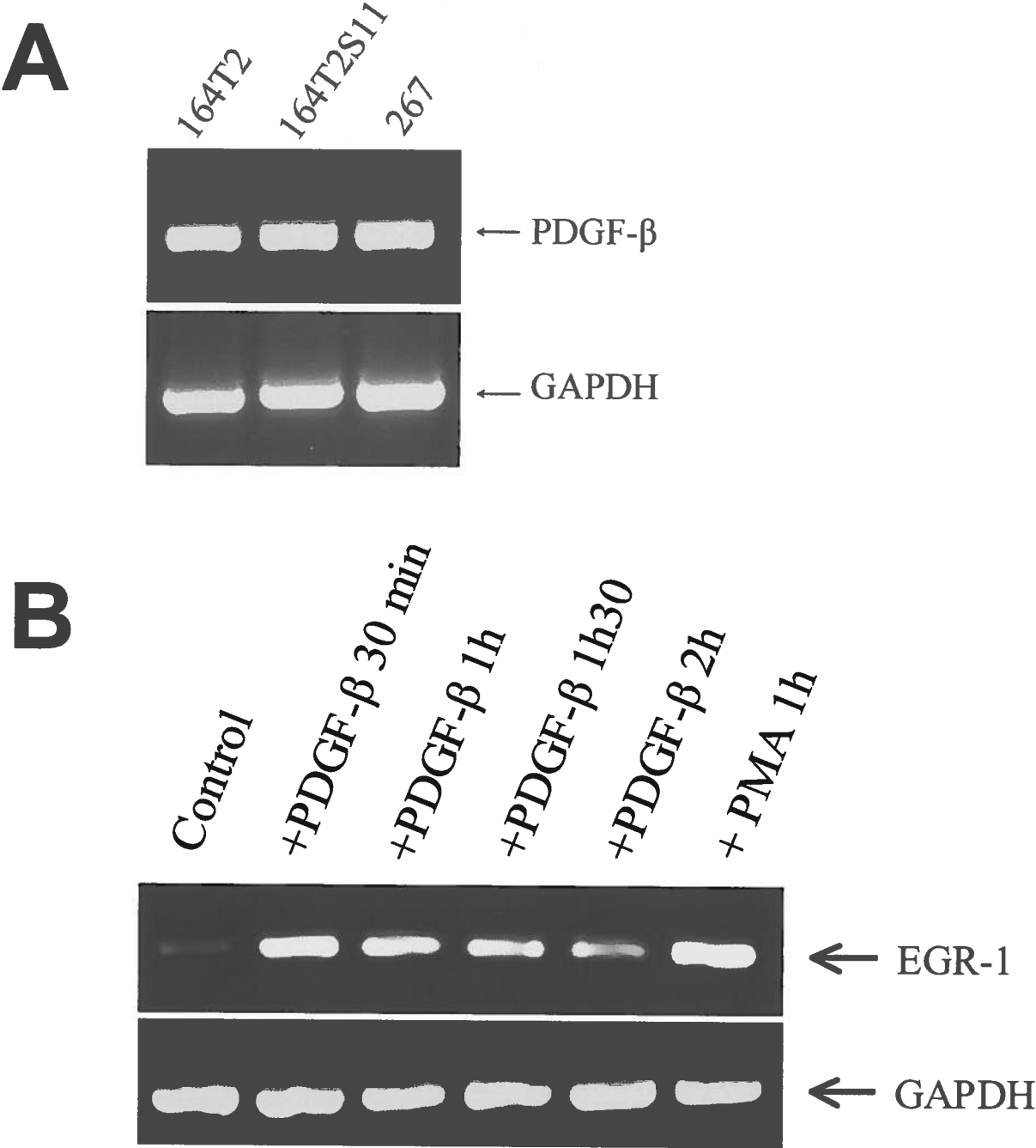
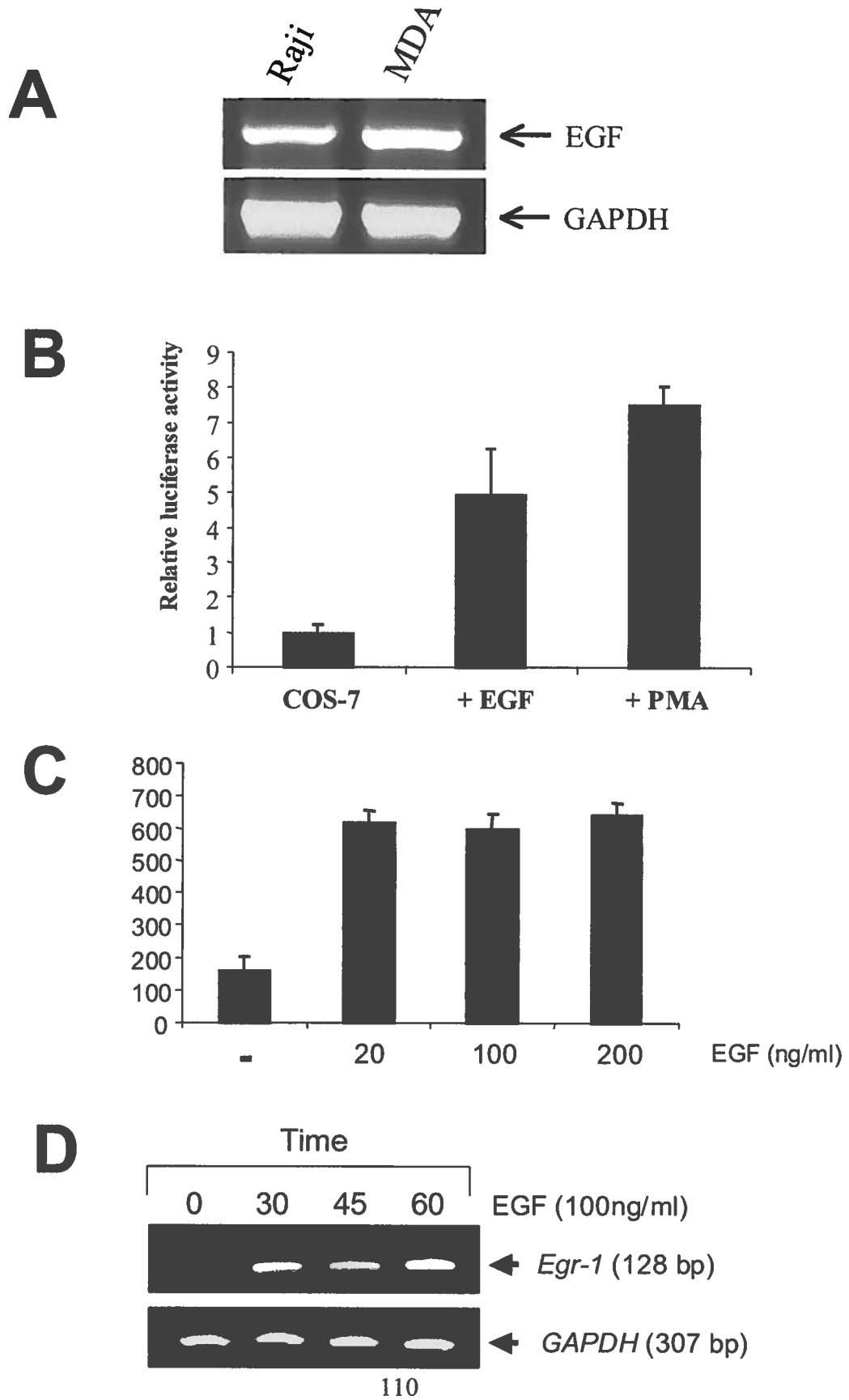
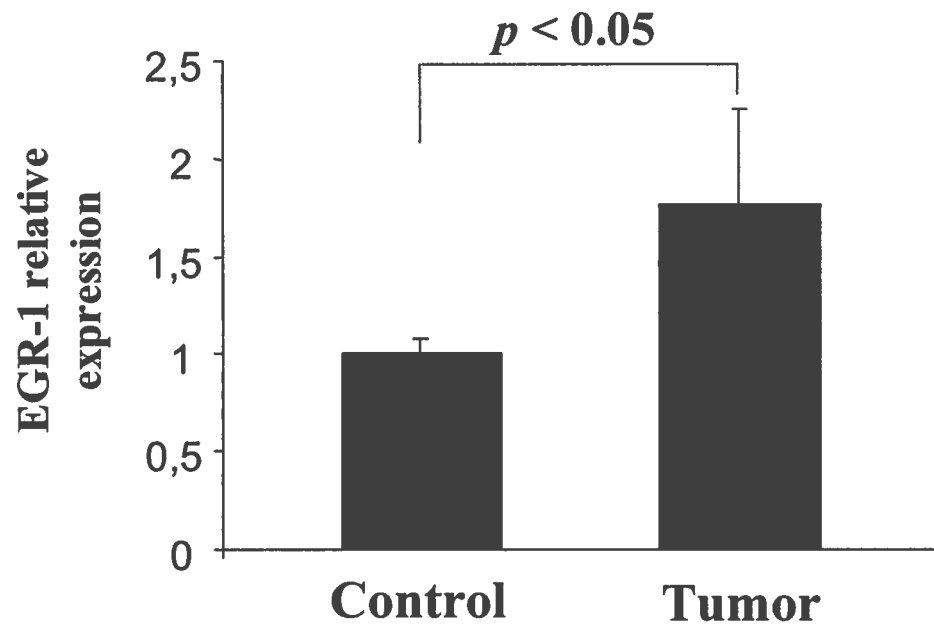


Figure 5



**Figure 6**



## Legends to tables and figures

**Table 1: Genes differentially expressed in endothelial cells following contact with thymocytes or T lymphoma cells.**

**Figure 1: Identification of differentially expressed genes in bEnd.3 endothelial cell line following contact with 164T2 T lymphoma cells.** (A) Gene expression profiling was performed using RNA isolated from bEnd.3 cells cultured alone (control, *left panel*) and bEnd.3 cells after contact with 164T2 T-lymphoma cell line (*right panel*). [<sup>33</sup>P]-labelled cDNAs were synthesized by RT of total RNAs isolated from bEnd.3 and hybridized with Clontech Atlas Mouse 1.2 cDNA expression arrays. (B) Scatter plot analysis of densitometric quantification of expression data. Each point represents one of the 1176 genes on the array and the location of each point on the scatter plot is determined by the gene expression level in bEnd.3 cells, represented on the x-axis, and the gene expression level in bEnd.3 cells after contact with lymphoma cells, represented in the y-axis. The location of EGR-1 is indicated by the arrow.

**Figure 2: EGR-1-induced expression in endothelial cell lines following contact with T lymphoma cells.** (A) Following *in vitro* contact with freshly isolated murine thymocytes, 164T2 or 164T2S11 T-lymphoma cell lines, bEnd.3 endothelial cells were harvested, purified and processed to isolate RNA and analyse *egr-1* and  $\beta$ -*actin* gene expression by RT-PCR. (C) Expression of *L-selectin* in bEnd.3 cells following contact with 164T2 T lymphoma cells as a control of bEnd.3 purity following sorting. No expression of L-selectin is detectable in EC or after third purification following co-culture with T lymphoma cells. The 164T2 cells were used as a positive control for *L-selectin* gene expression.  $\beta$ -*actin* amplification was used as loading control of RNA. In both above experiments, the control includes EC cells incubated without lymphoid cells in the same culture conditions.

**Figure 3: Intercellular contact between tumor cells and EC induces the transcriptional activation of EGR-1 promoter.** Luciferase reporter vectors were constructed using pGL3-Basic Vector (Promega) and the 5'-flanking promoter region of the *egr-1* gene. COS-7 cells were transiently transfected with the vector and reporter activity was detected by measuring the luciferase activity following co-culture with (A) the murine 164T2 and the human Burkitt RAJI B lymphoma cells or (B) the human (MDA-MB-231) breast carcinoma cells. In (C), co-cultures between COS-7 (bottom) cells transfected with the *egr-1* reporter vector and the lymphoma or breast cancer cell lines (upper chambers) was carried out in presence of a physical membrane using a Transwell system with 164T2S11 T-cell lymphoma, Raji B-cell lymphoma and MDA-MB-231 breast cancer cell lines.

**Figure 4: PDGF- $\beta$  induces the expression of EGR-1 in endothelial cells.** (A) PDGF- $\beta$  expression by lymphoma cell lines. RNA from 164T2, 164T2S11 and 267 murine T lymphoma cell lines was extracted and submitted to RT-PCR analysis using specific PDGF- $\beta$  primers. (B) EGR-1 expression following treatment with recombinant PDGF- $\beta$ . 15 ng/ml recombinant PDGF- $\beta$  was added to confluent bEnd.3 cells for 30 min, 1h, 1h30 and 2h. Positive control consisted of bEnd.3 cells incubated with 50ng/ml of PMA for one hour. Following incubation, RNA was extracted and submitted to RT-PCR analysis of EGR-1 expression. GAPDH amplification was used as loading control of RNA

**Figure 5: Activation of EGR-1 by EGF.** (A) Constitutive expression of EGF in human lymphoma and breast cancer cell lines, as shown by RT-PCR analysis. (B) Ability of human recombinant EGF to activate EGR-1 promoter in COS-7 cells transfected with the EGR-1 reporter vector. (C) Similar results were obtained using the human 293 cells using different doses of human recombinant EGF. (D) Ability of recombinant EGF to induce EGR-1 in primary human endothelial cells (HUVECs) following exposure to 100 ng/ml EGF. Results are representative of at least two independent experiments.

**Figure 6: EGR-1 gene expression in lymphoid tumors *in vivo*.**  $10^6$  267 and S11 T-lymphoma cells were injected intravenously to C57BL/6 mice. Following lymphoma development, RNA was extracted from liver and RT-PCR carried out for *egr-1* expression analysis, using liver from healthy mice as control. PCR amplicons were size separated by agarose gel electrophoresis and band intensity analyzed by densitometry.

## **Discussion générale et conclusion**

### **4.1 Rappel des objectifs de recherche**

Bien connues pour leur rôle dans la migration leucocytaire, les sélectines font maintenant l'objet d'un intérêt accru quant à leur implication dans la dissémination des cellules cancéreuses et ce, particulièrement pour les cancers colorectaux. De nombreuses molécules sont ligands reconnus, certaines d'entre-elles étant exprimées à la surface des cellules cancéreuses. Cependant, il y a peu de données disponibles quant au rôle spécifique de chacune des sélectines dans la dissémination du lymphome et encore moins quant à leur implication dans la croissance localisée au niveau d'organes cibles, tel que le thymus. De plus, des travaux récents ont démontré que lors du processus métastatique, les contacts intercellulaires entre les cellules tumorales et l'endothélium vasculaire supportés par la présence de ces différentes molécules d'adhésion pourraient à leur tour moduler l'expression génique des différentes cellules stromales, notamment les cellules de l'endothélium vasculaire. Les travaux de la présente thèse visaient donc à étudier le rôle de cette famille de molécules d'adhésion intercellulaire dans le développement et la dissémination du lymphome et d'analyser la modulation de l'expression génique de l'endothélium lors des contacts intercellulaires entre les cellules de lymphome et les cellules endothéliales vasculaires, une étape critique du processus métastatique. Nos travaux ont démontré que : 1) Les sélectines ne sont pas essentielles au développement d'un lymphome thymique induit par irradiation; 2) la L-sélectine joue un rôle majeur dans la croissance du lymphome au niveau du thymus; 3) les trois membres de la famille des sélectines participent activement à la dissémination du lymphome vers les organes périphériques, et 4) les cellules de lymphome possèdent la capacité de moduler l'expression génique de l'endothélium, notamment celle du facteur de transcription EGR-1, ce qui pourrait faciliter le processus métastatique.



## 4.2 Implication des sélectines dans le développement du lymphome thymique

Dans la première partie de nos travaux, nous avons observé que l'absence des sélectines chez l'hôte n'affecte en rien le développement du lymphome T induit par irradiation selon le modèle de Kaplan présenté dans la revue de littérature <sup>245</sup>. Les souris déficientes en L-, E-, ou P-sélectine développent un lymphome thymique au même rythme et à une fréquence similaire aux souris normales (Résultats présentés à l'annexe 1). L'absence de L-sélectine sur les cellules pré-lymphomateuses de la moelle osseuse ou de E- et P-sélectine sur l'endothélium vasculaire ne semble donc pas empêcher les cellules préleucémiques (PLCs) de migrer vers le thymus où elles acquièrent leurs propriétés agressives et engendrent la formation d'un lymphome thymique suite à des interactions intercellulaires avec les différents éléments du stroma thymiques<sup>4,36</sup>. L'expression de L-sélectine et de ligands de E- et P-sélectine à la surface des PLCs <sup>246-248</sup> et leur rôle dans la migration des leukocytes, notamment dans celui des lymphocytes T laissent envisager la possibilité que les sélectines puissent jouer un rôle dans le développement de lymphome T, notamment lors du processus de migration des PLCs de la moelle osseuse vers le thymus. Des travaux ont d'ailleurs permis de mettre en évidence l'expression de P-sélectine à la surface de l'endothélium thymique et un rôle de la P-sélectine et de son ligand PSGL-1 dans le recrutement de précurseurs de la moelle osseuse vers le thymus <sup>249</sup>. Il est bien entendu possible que des mécanismes d'adhésion alternatifs puissent expliquer l'absence d'effet de l'ablation génétique des sélectines de façon individuelle et que seule l'ablation génétique des trois membres de cette famille de molécules impliquées dans les étapes précoces de l'adhésion puissent inhiber de façon significative le processus. Néanmoins, nos résultats antérieurs démontrant que l'absence d'ICAM-1, une molécule d'adhésion impliquée dans l'adhésion ferme (étape tardive), n'affecte en rien le développement du lymphome laisse plutôt supposer que les mécanismes de migration des cellules normales et des cellules tumorales sont différents. Dans ce contexte, il serait intéressant d'analyser l'implication des sélectines dans le développement d'un lymphome B. D'une part étant donné que les précurseur de lymphocytes B et

conséquemment des lymphomes B, expriment également L-sélectine et sLe<sup>x</sup> <sup>246,247,250</sup>, et d'autre part étant donné que certains travaux ont démontré que les sélectines et leurs ligands aidaient à créer l'architecture spécialisée du microenvironnement de la moelle osseuse <sup>251,252</sup>, d'où leur implication possible dans le développement du lymphome B.

#### 4.3 Implication de L-sélectine dans la croissance localisée du lymphome thymique

Par ailleurs, le développement de lymphome T dans les souris déficientes en L-sélectine nous a donné l'opportunité d'établir en culture des lignées de cellules de lymphome T déficientes en L-sélectine. Ces lignées s'avèrent des outils intéressants pour étudier, par exemple, le rôle de cette molécule d'adhésion dans la croissance au niveau du thymus et la dissémination des cellules de lymphome. Comme nous l'avons démontré, l'absence de L-sélectine sur les cellules de lymphome T empêche la formation d'un lymphome thymique induit par voie intrathymique chez des souris normales <sup>245</sup>. Alors que les cellules stromales thymiques expriment les ligands de L-sélectine, dont PSGL-1, on peut donc conclure que la présence de L-sélectine à la surface du lymphome est nécessaire à la croissance des cellules lymphomateuses, du moins dans le contexte d'un microenvironnement thymique normal. En effet, lorsqu'injectées individuellement, seules les lignées de lymphomes exprimant L-sélectine pouvaient se développer dans les souris normales. Par contre, des résultats plus récents non publiés nous ont permis de démontrer que si on injecte par voie intrathymique simultanément une lignée de lymphome exprimant la L-sélectine et une lignée de lymphome L-sélectine-déficiente, on observe lors du prélèvement du lymphome thymique que la tumeur est constituée des deux lignées de lymphomes (Annexe 2), ce qui indique que les deux lignées, incluant celle n'exprimant pas la L-sélectine, se sont développées de façon similaire dans un environnement normal. Ces résultats suggèrent que la présence de L-sélectine à la surface des lymphomes induit possiblement la production de facteurs essentiels à leur croissance, facteurs qui ont permis dans ce cas-ci de permettre la croissance des deux lignées de lymphomes et de combler l'absence de L-sélectine à la surface d'une des deux lignées. Le fait que les

lymphomes L-sélectine<sup>-/-</sup> ne se développent que dans les souris L-sélectine déficientes, et ce notamment dans les modèles chimériques, laisse supposer que l'absence de L-sélectine crée une architecture thymique anormale plus favorable au développement de lymphomes T. On pourrait donc envisager que la présence de L-sélectine est importante non seulement pour maintenir l'intégrité fonctionnelle du thymus, mais également afin d'établir un mécanisme de protection contre le développement de lymphomes. Quel est ce mécanisme? Ces résultats suscitent plusieurs hypothèses et soulignent pour la première fois l'importance de l'axe L-sélectine dans la croissance au niveau du thymus, du moins en ce qui concerne la formation de tumeurs lymphoïdes alors qu'aucune donnée n'était disponible jusqu'à maintenant quant au rôle potentiel de L-sélectine dans le maintien de l'architecture thymique. Par l'utilisation de matrices d'ADN complémentaire, il serait également intéressant d'analyser le transcriptome d'un lymphome thymique induit par l'injection d'un lymphome déficient en L-sélectine pour vérifier si des gènes, outre L-sélectine, sont différentiellement modulés par rapport à un lymphome normal, gènes qui constitueraient des candidats intéressants et qui pourraient permettre de mieux comprendre les différences observées dans notre modèle.

#### 4.4 Implication des sélectines dans la dissémination du lymphome T

##### 4.4.1 Rôle de L-sélectine exprimée sur le lymphome

Des résultats préliminaires suggèrent que l'absence de L-sélectine à la surface des cellules de lymphome n'empêche pas la dissémination suite à l'injection par voie intraveineuse. Lorsqu'injectée à des souris normales, la lignée de cellules déficientes en L-sélectine provoque le développement de métastases avec un temps de survie similaire aux lignées de cellules de lymphome exprimant L-sélectine. Ces résultats ne sont pas réellement surprenants puisque bien que pouvant être impliquée dans la migration des leucocytes dans le système vasculaire lors de l'inflammation <sup>134</sup>, le rôle primordial de L-sélectine exprimée sur les lymphocytes réside plutôt dans la migration au sein du système lymphatique et l'arrêt aux ganglions <sup>134,253-255</sup>. Il serait donc intéressant d'utiliser le modèle de lignées de cellules de lymphome L-sélectine<sup>-/-</sup> pour

vérifier son implication dans la migration des cellules cancéreuses vers ces ganglions lymphatiques. La majorité des études visant à élucider les mécanismes régulant le processus métastatique se sont surtout portées sur la dissémination via le système circulatoire sanguin, mais ont négligé le système lymphatique. En réalité, les systèmes lymphatique et sanguin possèdent de nombreuses anastomoses qui permettent aux cellules cancéreuses de circuler rapidement d'un système à l'autre <sup>256</sup>. Il est connu depuis longtemps que la sécrétion de molécules pro-angiogéniques, tel le VEGF, favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui irrigueront la tumeur et faciliteront la migration subséquente des cellules cancéreuses vers les organes cibles périphériques <sup>257,258</sup>. Plus récemment, il a été démontré que la sécrétion de VEGF-C par les cellules tumorales engendre également la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques <sup>259,260</sup>. Cette lymphangiogenèse facilite la dissémination des cellules cancéreuses et la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques. Comme ces études ont été effectuées dans un modèle de mélanome, elles pourraient d'autant plus s'appliquer à notre modèle de lymphome murin, qui exprime lui aussi les molécules d'adhésion utilisées par les leucocytes lors de la migration lymphatique, telle la L-sélectine. Ainsi, on pourrait envisager l'utilisation de lymphomes déficients en L-sélectine générés dans le cadre du projet pour déterminer l'importance de cette molécule dans la dissémination via les vaisseaux lymphatiques. Par contre, lors de telles études, il faudrait prendre en considération la migration des différents leucocytes dans le système lymphatique dépendante de L-sélectine. L'absence de L-sélectine pourrait diminuer la migration vers les ganglions lymphatiques dans une souris L-sélectine-déficiente, mais également affecter la migration des cellules effectrices contrôlant le développement tumoral. Des travaux récents utilisant des modèles de souris déficientes en L-sélectine présentent des résultats en ce sens, alors que la migration de cellules NK vers les ganglions lymphatiques dépend de L-sélectine et que les cellules NK permettent de supprimer la formation de métastases au niveau des ganglions <sup>261</sup>. Il serait nécessaire d'utiliser un outil tel qu'un lymphome déficient en L-sélectine ou encore un modèle où l'expression de L-sélectine a été inhibée pour cibler

précisément le rôle de L-sélectine exprimée par le lymphome. À cet égard, l'équipe de Zhang a d'ailleurs observé que l'inhibition de l'expression de L-sélectine par siRNA pouvait atténuer la métastase d'un lymphome murin vers les ganglions préphériques

262

#### 4.4.2 Rôle des sélectines exprimées par l'hôte

Nous avons observé que l'absence d'une seule des sélectines, soit la L-, E- ou P-sélectine, est suffisante pour ralentir la dissémination qui suit l'injection par voie intraveineuse de cellules de lymphome murin. Par contre, dans aucun cas, ce défaut d'expression d'une sélectine n'est suffisant pour inhiber complètement la formation des métastases, l'effet observé concernant uniquement le temps de latence pour la formation de tumeurs macroscopiques dans les organes cibles comme le foie, les reins et la rate. Ces observations s'expliquent en partie du fait que les fonctions de P- et E-sélectine peuvent se chevaucher puisqu'ils partagent des récepteurs communs, tel PSGL-1, à la surface des cellules de lymphome. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation de souris comportant des ablations génétiques multiples au niveau des gènes des sélectines, soit des doubles et triples déficiences<sup>151,153</sup>. Dans nos études, il est permis de croire que l'absence d'une seule sélectine diminue le nombre de cellules de lymphome pouvant migrer vers les organes cibles mais est insuffisante pour empêcher la dissémination de toutes les cellules de lymphome et prévenir la formation de métastases. Puisque moins de cellules sont aptes à franchir la barrière endothéliale, le temps de développement d'une masse tumorale détectable s'allonge. Tel que discuté dans la revue de littérature, L-sélectine peut permettre l'arrêt des cellules cancéreuses par un mécanisme différent du traditionnel culbutage précédant l'adhésion ferme qui est décrite en détail pour la migration leucocytaire<sup>66</sup>. En favorisant la formation d'agrégats entre les cellules cancéreuses et les leucocytes circulants, L-sélectine pourrait permettre un ralentissement de ces agrégats par contrainte de taille dans les petits vaisseaux sanguins. Des études ultérieures employant un système de microscopie intravitale tel qu'utilisé par Chambers *et al.* et Ding *et al.* pourraient permettre de confirmer cette

hypothèse<sup>59,233</sup>. Par contre, ce mécanisme n'est qu'un exemple parmi tant d'autres, pour supporter l'arrêt de la circulation des cellules de lymphome, d'où la différence observée au niveau du temps nécessaire à son développement, mais sans altération du résultat final, à savoir le développement de métastases amenant au sacrifice des souris injectées.

#### 4.4.3 Implication des leucocytes dans le processus métastatique

Un lien étroit entre l'inflammation et le cancer fut établi par Virchow en 1893 et plusieurs preuves récentes supportent ces observations<sup>65</sup>. Bien que la majorité des études portant sur le rôle des molécules d'adhésion dans le processus tumoral visent à étudier la dissémination des cellules cancéreuses, leur implication dans la migration des leucocytes au site tumoral pour faciliter la métastase a également été envisagée. À première vue, le système immunitaire est réputé combattre la progression tumorale, mais tel que souligné plus tôt, plusieurs travaux, dont ceux de l'équipe de Werb, suggèrent que les leucocytes au site tumoral favorisent la progression tumorale<sup>64,65</sup>. La sécrétion d'enzymes protéolytiques et de cytokines par les leucocytes faciliterait l'invasion et la croissance des cellules cancéreuses. Le pouvoir anti-métastatique d'agents bloquant l'adhérence via les sélectines, telle que l'héparine, pourrait jouer un rôle pour la migration des cellules cancéreuses et des leucocytes. Dans cette optique, l'effet anticoagulant de l'héparine, qui diminue l'arrêt des cellules cancéreuses dans circulation, n'est peut-être pas le seul mécanisme d'action de ce traitement. Les travaux de Borsig *et al.* ont démontré que la P-sélectine est nécessaire à la formation d'agrégats entre les cellules cancéreuses et les plaquettes ce qui facilite le blocage de la circulation<sup>236</sup>. Par contre, le rôle de la L-sélectine ne consiste pas exclusivement en la formation d'agrégats entre les cellules cancéreuses et les leucocytes circulants; il favorise aussi la migration des leucocytes au site d'embolie<sup>236</sup>. Suite à la formation d'embolie via P-sélectine, l'afflux des leucocytes à ce site pourrait faciliter la dissémination des cellules tumorales dans l'organe cible. L'effet de L-sélectine a été observé même chez des souris déficientes en cellules B et T, suggérant que les

neutrophiles, les granulocytes et/ou les monocytes en seraient responsables. Dans une étude plus récente, l'équipe de Borsig démontra que cet effet de L-sélectine est en partie causé par l'action protectrice des leucocytes présents au site d'embolie; en effet, chez les souris L-sélectine<sup>-/-</sup>, le défaut d'association des leucocytes aux cellules tumorales retarde l'apparition des métastases <sup>263</sup>. Ils ont observé que l'inhibition temporaire de la L-sélectine par l'utilisation d'anticorps pouvait réduire la métastase. Ils notèrent également une augmentation de l'expression des ligands de L-sélectine près des embolies tumorales en présence des leucocytes. La métastase était réduite chez les souris déficientes en fucosyltransférase-7 qui n'expriment pas ces ligands. L'implication de L-sélectine de l'hôte dans le processus métastatique implique donc les interactions leucocytes-endothélium au site d'arrêt intravasculaire des cellules tumorales, le tout supporté par l'induction de ligands de L-sélectine via la fucosyltransférase-7. De plus, des travaux récents utilisant des variants d'héparine sans effet sur la coagulation mais agissant spécifiquement sur les liaisons via les sélectines permettent d'observer une diminution du potentiel métastatique des cellules de carcinome, sans effet additionnel chez les souris déficientes en L- et P-sélectine, confirmant l'implication de ces molécules dans le phénomène <sup>264</sup>.

#### 4.4.4 Thérapies anti-sélectines

Tel que présenté, l'héparine, entre autres par son inhibition de l'adhérence impliquant les sélectines, possède un effet thérapeutique sur le processus métastatique. Plusieurs autres stratégies ont été proposées pour bloquer l'adhérence des cellules cancéreuses à l'endothélium via les sélectines, incluant des anticorps contre sLe<sup>a/x</sup>, des composés mimant les déterminants sLe<sup>a/x</sup>, et des oligonucléotides antisens contre les enzymes impliquées dans la synthèse de ces ligands. Par exemple, des anticorps monoclonaux contre sLe<sup>a/x</sup> réduisent la formation des métastases dans des modèles de cancer pancréatique et gastrique chez des souris nues <sup>222,265</sup>. L'utilisation d'un peptide mimant sLe<sup>a</sup> généré par criblage aléatoire a permis d'inhiber la colonisation par des cellules tumorales exprimant sLe<sup>a</sup> <sup>266</sup>. L'utilisation d'antisens, et plus récemment d'ARN

inhibiteurs (ARNi) représentent des avenues prometteuses <sup>267</sup>. Des antisens contre le gène *FUT7*, codant pour une fucosyltransférase impliquée dans la synthèse des ligands des sélectines, démontrent une inhibition significative de l'expression de sLe<sup>x</sup> et de l'adhésion de cellules leucémiques <sup>268</sup>. La même stratégie appliquée contre les fucosyltransférases III/VI prévient la dissémination des cellules de cancer colorectal <sup>269</sup>. D'autres agents pharmaceutiques conventionnels ont démontré une certaine efficacité dans l'inhibition de l'adhérence des cellules cancéreuses via les sélectines. La cyclooxygénase-2 (COX-2), par exemple, participe à la progression de cancers colorectaux. L'inhibiteur de COX-2 Celecoxib réduit l'expression de sLe<sup>a</sup> et supprime la métastase au foie par les cellules de cancer du côlon <sup>270</sup>. La cimetidine, un bloqueur du récepteur de type 2 de l'histamine, prescrit habituellement pour le traitement d'ulcères gastroduodénaux, améliore la survie post-opératoire de patients atteints de cancers gastriques et colorectaux <sup>271</sup>. Une amélioration notable de 48,8% à 84,6% dans la survie à 10 ans suite à l'opération fut reportée. Lorsque les cellules cancéreuses expriment fortement sLe<sup>a</sup>, l'effet bénéfique de la cimetidine est encore plus marqué puisque que le taux de survie passe de 20,1% à 90,9%, alors qu'aucun effet n'est observé lorsque les cellules cancéreuses expriment peu ou pas de sLe<sup>a</sup> <sup>271</sup>. Cet effet prophylactique de la cimetidine a par la suite été associé à une inhibition de l'expression de E-sélectine à la surface des cellules vasculaires endothéliales <sup>272</sup>. L'utilisation de cocktails thérapeutiques ciblant à la fois les trois sélectines pourrait ainsi s'avérer prometteuse pour inhiber le processus métastatique.

On constate donc que le processus inflammatoire permet le recrutement de leucocytes au site tumoral. De même, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pourrait faciliter le processus métastatique. Tel que démontré dans cette thèse, les sélectines endothéliales, E- et P-sélectine, sont impliquées dans la dissémination des cellules de lymphome aux organes périphériques suite à leur injection par voie intraveineuse. Il est déjà bien connu que l'expression de ces molécules est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ . Des travaux antérieurs



ont démontré que les cellules cancéreuses possèdent la capacité de stimuler l'expression de E-sélectine à la surface de l'endothélium, entre autres via l'expression de ces cytokines <sup>273-275</sup>. D'autres études ont permis de vérifier la capacité des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules cancéreuses à stimuler l'expression de cytokines par les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques. Par exemple, le récepteur du mannose exprimé sur le mélanome B16 stimule la production d'IL-1 $\beta$  et l'adhérence via VCAM-1 des cellules cancéreuses à l'endothélium et facilite la formation de métastases au foie <sup>276</sup>. De façon similaire, on observa qu'une lignée de cellules de cancer colorectal pouvait stimuler l'expression d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les cellules Kupffer des sinusoides hépatiques <sup>277</sup>. Les cytokines produites par ces cellules Kupffer étaient induisaient l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales. Dans une autre étude, la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-1, qui peut être détectée *in vivo* dans les 30 à 60 minutes suivant l'injection de cellules cancéreuses dans le système veineux porte, provoque l'expression de E-sélectine hépatique pour une période de 2 à 24 heures <sup>278</sup>. Ces différents travaux démontrent donc la capacité des cellules cancéreuses en circulation à induire l'expression de différentes molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium, et ainsi faciliter la colonisation des organes cibles par ces cellules. Pour ajouter à l'effet des cellules cancéreuses, il nous est permis de croire que le processus inflammatoire, par l'expression importante de cytokines pro-inflammatoires, pourrait favoriser la métastase en haussant l'expression des sélectines à la surface de l'endothélium. Les travaux de l'équipe de Orr ont souligné le rôle important joué par la production exogène de cytokines dans le processus métastatique. Les cellules de mélanome B16 injectées s'arrêtent dans les sinusoides hépatiques par restriction de taille, tel que démontré par l'équipe de Chambers <sup>59,61,234</sup>. Par contre, lorsqu'ils injectent préalablement 1,5 $\mu$ g d'IL-1, les cellules ne parviennent pas aux sinusoides mais arrêtent en amont par un mécanisme similaire au roulement des leucocytes <sup>234</sup>. De plus, la rétention des cellules B16 dans le foie des souris traitées à l'IL-1 était deux fois plus importante immédiatement après l'injection et 7 fois plus grande 24 heures post-injection. Ils observèrent également 3 fois plus de cellules adhérentes à la

microcirculation hépatique des souris traitées. Cette adhérence pouvait être bloquée par l'utilisation d'anticorps contre E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1 et la sous-unité d'intégrine  $\alpha_v$ , corroborant l'hypothèse qu'une multiplicité de molécules d'adhésion peut être impliquée dans le processus métastatique <sup>220</sup>.

Il devient donc important de remettre en question l'utilisation de cytokines dans le traitement du cancer, puisque par leur capacité à augmenter l'expression des différentes molécules d'adhésion elles pourraient aussi favoriser la dissémination des cellules cancéreuses. Il a déjà été démontré qu'une thérapie systémique avec le TNF- $\alpha$  était associée à l'induction de E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, alors qu'étaient détectées ces molécules d'adhésion solubles dans le sang <sup>279</sup>. Par contre, de nouvelles molécules ont récemment été générées pour contrer l'effet du TNF- $\alpha$  sur la modulation de E-sélectine <sup>280</sup>. Ces chitooligosaccharides N-acétylés présentent donc non seulement un potentiel anti-inflammatoire mais également un effet inhibiteur du processus métastatique.

#### 4.4.5 Rôle de la signalisation via les sélectines

En plus de leur rôle d'adhésion dans l'arrêt des cellules cancéreuses de la circulation, plusieurs travaux indiquent que la signalisation via les sélectines permettrait de moduler l'activité d'autres molécules d'adhésion telles les intégrines et ainsi favoriser indirectement le processus métastatique. Il est déjà connu que L-sélectine permet l'activation de l'intégrine- $\beta_2$  <sup>164</sup>. Elle pourrait donc en plus de favoriser la formation d'agrégats entre les cellules de lymphome et les leucocytes et plaquettes circulants, permettre indirectement l'arrêt de la circulation vers les organes cibles en activant différentes molécules d'adhésion nécessaires à l'adhésion ferme des cellules cancéreuses à l'endothélium vasculaire. Il a également déjà été observé que la stimulation via PSGL-1, un ligand des sélectines active l'intégrine- $\beta_2$  et l'adhésion à ICAM-1 <sup>281</sup>. Des travaux récents ont démontré que l'activation des intégrines leucocytaires par PSGL-1 impliquait la formation d'un complexe avec la queue cytoplasmique de PSGL-1 et Nef-associated factor 1 et la phosphorylation par les

kinases Src <sup>282</sup>. Dans le même ordre d'idées, le culbutage des neutrophiles sur E-sélectine active l'intégrine  $\beta 2$  et la liaison à ICAM-1, via un mécanisme de signalisation dépendant des MAPK <sup>283</sup>. Cette adhésion ferme modulée par l'interaction entre les intégrines  $\beta 2$  et ICAM-1 est déjà reconnue comme étant essentielle à la formation de métastases par les cellules de lymphome, tel que démontré antérieurement dans le laboratoire du Dr. St-Pierre <sup>160,198</sup>. Comme dans le cas des sélectines, dont les propriétés de signalisation ont été présentées dans la revue de littérature, cette interaction pourrait jouer non seulement un rôle mécanique pour l'adhésion des cellules cancéreuses aux cellules endothéliales, mais aussi stimuler la cascade de signalisation favorisant le processus métastatique. Cette hypothèse est soutenue par les études de migration *in vivo* réalisées à la fois dans les modèles de souris déficientes en sélectines, présenté dans le chapitre II, et dans les souris déficientes en ICAM-1 <sup>160,245</sup>. Ces expériences ont permis de constater que malgré une différence significative dans la formation de métastases, la migration vers les organes cibles était similaire en dépit de l'absence de ces différentes molécules d'adhésion. À ce propos, des études utilisant des technologies plus modernes telles que des systèmes d'imagerie intravitale permettraient de visualiser concrètement l'implication des sélectines lors de la migration. De tels travaux de recherche ont permis à Ding *et al.* <sup>233</sup> d'observer directement que chez des souris déficientes en P-sélectine, un nombre réduit de cellules de lymphome s'immobilisent à la surface de l'endothélium. Tout comme dans nos travaux, cette absence de P-sélectine résultait essentiellement à un allongement du temps de latence avant l'apparition de métastases. Nos études de migration *in vivo* nous permettent tout de même de suggérer que les différentes molécules d'adhésion exprimées sur l'endothélium telles que E-sélectine, P-sélectine et ICAM-1 joueraient dans le processus métastatique un rôle subséquent à la migration vers les organes cibles, soulignant encore une fois l'importance des capacités de signalisation de ces molécules. Il a d'ailleurs déjà été observé que la migration transendothéliale de cellules de cancer du côlon nécessitait la liaison à E-sélectine exprimée sur l'endothélium et l'activation de SAPK2 (stress-activated protein kinase-2) dans les cellules tumorales <sup>284</sup>. Cette même

équipe démontra plus récemment que cette liaison de cellules cancéreuses à l'endothélium via E-sélectine augmentait l'activité de ERK et p38, causant une modification de l'intégrité des jonctions endothéliales et facilitant ainsi la transmigration des cellules cancéreuses <sup>186</sup>. Tel que présenté plus tôt, l'interaction entre les cellules cancéreuses et endothéliales permet l'arrêt de la circulation, mais également la production de différents facteurs pro-métastatiques. Cette interaction peut être dépendante des molécules d'adhésion exprimées à la fois sur les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales. Les propriétés de signalisation des molécules d'adhésion en font de bons candidats pour la propagation d'une cascade de signalisation menant à la production de facteurs pro-métastatique. En plus de la signalisation directe induite par les sélectines, elles peuvent revêtir des fonctions de co-stimulation des cellules endothéliales, en collaboration avec d'autres molécules d'adhésion, ou encore avec des facteurs solubles comme les chimiokines <sup>178,281,285</sup>.

#### 4.5 Modulation génique de l'endothélium suite au contact avec le lymphome T.

Le deuxième objectif principal du projet visait à mieux caractériser à l'échelon moléculaire les interactions entre le lymphome et l'endothélium vasculaire suite aux contacts intercellulaire déployés lors du processus métastatiques. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle *in vitro* d'analyse cellules-cellules pour vérifier la capacité des cellules de lymphome à moduler l'expression génique de l'endothélium. À cette fin, suite à l'adhérence de cellules de lymphome T, le transcriptome des cellules endothéliales fût soumis à une matrice d'ADN complémentaire qui a permis l'analyse de l'expression de 1153 gènes différents. Parmi ceux-ci, celui pour lequel la modulation était la plus importante est le facteur de transcription EGR-1(*early growth response protein 1*) dont l'expression était augmentée suite à l'interaction avec les cellules de lymphome. Nous avons également observé que même si le contact direct provoque une plus forte expression d'EGR-1, la sécrétion de molécules solubles suffisait à stimuler l'expression de ce facteur. Parmi ces molécules, PDGF et EGF, produits de façon constitutive

respectivement par le lymphome et par les cellules de cancer du sein, pouvaient augmenter l'expression d'EGR-1.

EGR-1 <sup>286</sup>, également connu sous le nom de ZIF-268, NGFI-A (*nerve growth factor induced-A*), Krox24 et TIS8, est une protéine de 80- à 82-kd constituée de 533 acides aminés. C'est un facteur de transcription en doigt de zinc typique, appartenant à la même famille que EGR-2 <sup>287</sup>, EGR-3 <sup>288</sup>, EGR-4 <sup>289</sup>, TIEG/EGR- $\alpha$  <sup>290</sup> et WT-1 (Wilms tumor suppressor protein 1) <sup>291</sup>. Son domaine de liaison à l'ADN conservé consiste en trois domaines en forme de doigts de zinc situés entre les acides aminés 332 et 416 qui lie des séquences d'ADN riches en GC présentant la séquence consensus 5'-GCG(T/G)GGGCG-3'. Une fois lié à l'ADN, EGR-1 modifie l'expression génique par des mécanismes reposant à la fois sur des co-activateurs et des co-répresseurs. L'expression de différents gènes via EGR-1 implique différentes MAPKs (mitogen-activated protein kinases), incluant les voies ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase) et p38 <sup>292-295</sup>. EGR-1 est exprimé de façon inductible dans une multitude de types cellulaires, comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les leucocytes. Son induction très rapide est observée suite à la stimulation par une panoplie de facteurs de croissance et de cytokines tout comme lors de stress mécaniques et de dommages vasculaires.

EGR-1 est reconnu pour son rôle dans la différenciation et la prolifération cellulaire. EGR-1 établit un lien entre les signaux extra-cellulaires et les réponses à long terme en modifiant l'expression de gènes cibles, responsables de plusieurs actions physiologiques. Suite à l'activation des cellules endothéliales, EGR-1 est exprimé dans le noyau des cellules où il contrôle l'expression de plusieurs gènes impliqués dans divers processus physiologiques dont l'angiogenèse <sup>296-298</sup>. Parmi les molécules placées sous le contrôle d'EGR-1, on retrouve PDGF-A (platelet derived growth factor) <sup>299,300</sup>, PDGF-B <sup>297</sup>, FGF-2 (fibroblast growth factor) <sup>301</sup>, apolipoprotéine A1 <sup>302</sup>, M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) <sup>303</sup>, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) <sup>304</sup>, tissue

factor <sup>305</sup>, u-PA (urokinase-type plasminogen activator) <sup>306</sup>, IL-2 (interleukine-2) <sup>307</sup>, ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) <sup>308</sup>, CD44 <sup>309</sup> et MT1-MMP <sup>310</sup>. Plusieurs de ces molécules produites peuvent également stimuler l'expression d'EGR-1, amenant la possibilité de boucles d'activation autocrines et paracrines. PDGF et FGF peuvent eux-mêmes augmenter l'expression d'EGR-1, tel que nous l'avons observé avec PDGF, qui à son tour active la transcription de PDGF et FGF, complétant la boucle d'amplification <sup>300,311,312</sup>. Lors de nos travaux, nous avons observé que la modulation de l'expression d'EGR-1 pouvait également être observée dans les études de co-culture en *transwell*, suggérant l'implication de molécules solubles. Parmi celles-ci, nous avons démontré la capacité de PDGF- $\beta$  et EGF à moduler l'expression d'EGR-1 dans les cellules endothéliales murines et humaines, respectivement. Par contre, l'expression d'EGR-1 observée lors des études de co-culture en *transwell*, qui ne permettent pas le contact direct, était moins importante que suite à l'interaction directe entre les cellules cancéreuses et stromales, suggérant une co-stimulation via les molécules d'adhésion, ou encore la formation d'une synapse immunologique au site de contact, favorisant un effet plus important des cytokines produites. Ces résultats sont conformes à ceux que nous avons obtenus lors des interactions bi-directionnelles entre les lymphomes T et l'endothélium vasculaire menant à l'expression de MMP-9 dans les deux types cellulaires et que nous avons démontré comme étant favorisées par le contact d'ICAM-1 <sup>185</sup>. Il serait donc intéressant dans des travaux ultérieurs de déterminer si l'induction d'EGR-1 lors du contact est elle-même favorisée par des molécules d'adhésion spécifiques telles qu'ICAM-1 ou encore par les sélectines. De plus, il serait intéressant, dans une perspective à long terme, de déterminer les voies de signalisation empruntées pour la modulation de l'expression de EGR-1 suite à la stimulation par PDGF et EGF. Des travaux sont présentement en cours dans notre laboratoire à cette fin. Des études antérieures laissent présager l'activation de la voie Ras/Erk puisque que la stimulation de EGR-1 par EGF dans les cellules endothéliales et les kératinocytes induisent la phosphorylation de ERK et est inhibée par des inhibiteurs des MAP kinases <sup>313,314</sup>.

L'implication de nos résultats pourrait avoir une portée significative pour ce qui concerne l'angiogénèse. Pour étudier le rôle d'EGR-1 dans l'angiogénèse, Fahmy *et al.*<sup>315</sup> ont utilisé des DNAzymes pour en inhiber l'expression. Les DNAzymes sont des enzymes dépendantes de cations composées entièrement d'ADN et construites pour cliver l'ARN messager de gènes spécifiques. Ces DNAzymes ont permis d'inhiber l'expression protéique d'EGR-1, la réplication et la migration de cellules endothéliales vasculaires et la formation de microtubules dans des matrices formées de membrane basale. L'inhibition d'EGR-1 a également bloqué l'angiogénèse dans des bouchons de matrigel implantés par voie sous-cutanée chez la souris, résultats confirmés chez des souris déficientes en EGR-1. De plus, l'utilisation de ces DNAzymes a permis de supprimer la croissance *in vivo* de carcinome mammaire humain MCF-7 chez des souris nues. Ces agents ont également permis d'observer une diminution de l'expression de FGF-2, un facteur proangiogénique en aval d'EGR-1. Fahmy *et al.* ont également démontré dans cette étude la capacité des DNAzymes spécifiques à EGR-1 de diminuer la néovascularisation de la cornée chez des rats. Dans une autre étude, Borden et ses collègues<sup>316</sup> ont démontré l'implication de HGF (hepatocyte growth factor) à réguler l'expression des facteurs angiogéniques PDGF et VEGF (vascular endothelial growth factor) en induisant l'expression d'EGR-1. EGR-1 est également connu pour augmenter l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la tumorigénicité, incluant IGF-II (insulin-like growth factor-II) et VEGF<sup>317-319</sup>. Ainsi, l'augmentation de son expression par les cellules endothéliales et autres cellules stromales comme les fibroblastes suite au contact avec les cellules de lymphome, tel que nous l'avons mis en évidence, pourrait jouer un rôle considérable dans le processus métastatique. Il pourrait être impliqué dans la néovascularisation des métastases par cette modulation de l'expression de VEGF. Il est bien connu que la croissance des tumeurs primaires, mais également des métastases, est dépendante de l'angiogénèse<sup>320</sup>. L'absence de facteurs angiogéniques est associée à la dormance tumorale, qui à son tour favorise l'apoptose des cellules cancéreuses<sup>321</sup>. Les premiers stades du développement vasculaire incluent la différenciation et l'expansion de cellules endothéliales précurseurs provenant du réseau

vasculaire existant. Par la suite, lors du processus angiogénique, la ramification de nouveaux vaisseaux sanguins s'observe de concert avec le recrutement de cellules musculaires lisses et de péricytes capables de supporter ces vaisseaux sanguins nouvellement formés<sup>322,323</sup>. Plusieurs facteurs produits par les cellules tumorales ont déjà été identifiés comme régulateur de cette néo-vascularisation. En lien avec ces travaux, nos résultats suggèrent que les cellules endothéliales elles-mêmes peuvent être responsables de la production de VEGF et d'autres facteurs pro-angiogénique élaborés au contact des cellules cancéreuses. L'augmentation d'EGR-1 dans les cellules endothéliales, un modulateur de VEGF, tout comme de VEGF lui-même, suite au contact avec les cellules de lymphome, tel que présenté dans le chapitre III, supportent cette hypothèse. Des travaux démontrent également que l'adhérence via les sélectines et sLe<sup>a/x</sup> est impliquée de façon significative dans l'angiogenèse tumorale, démontrant encore une fois l'importance des interactions cellulaires dans ce processus<sup>324</sup> tant via les différentes molécules d'adhésion que par la sécrétion de facteurs solubles amenant une activation des cellules stromales.

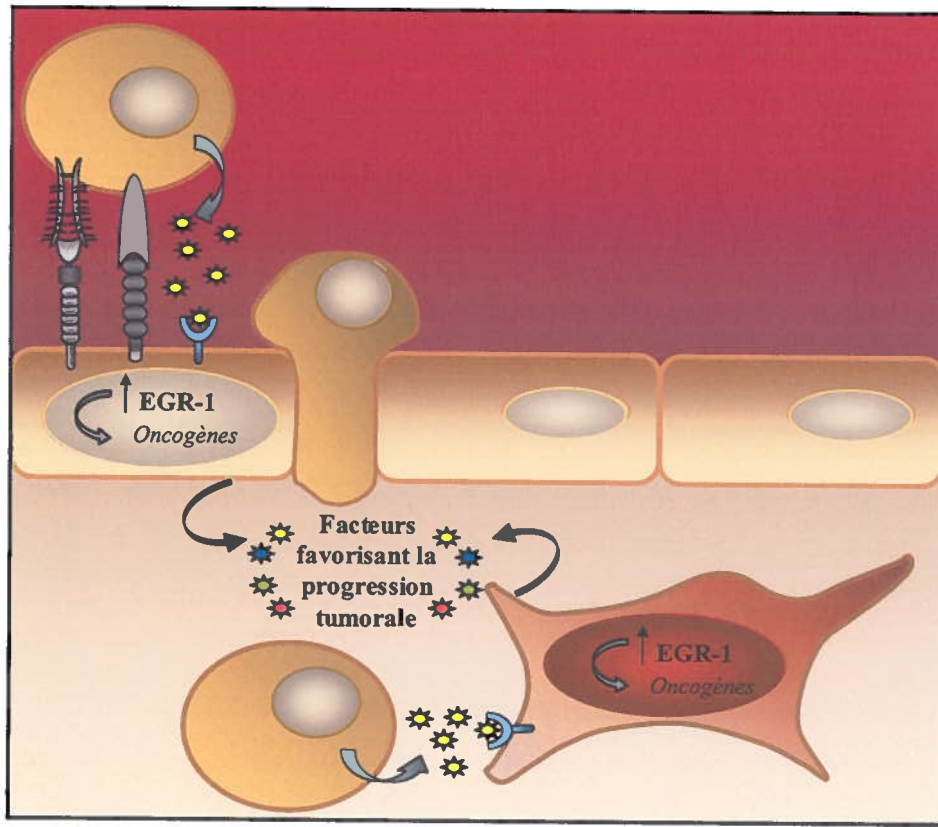
Finalement, nous avons également observé l'augmentation d'EGR-1 *in vivo* dans des tumeurs lymphoïdes du foie s'étant développées en réponse à l'injection d'un lymphome T par voie intra-veineuse. Les résultats *in vitro* portent à croire que l'augmentation du niveau d'expression d'EGR-1 dans ces tumeurs peut résulter de la stimulation des cellules stromales par les cellules de lymphome. Mais, nous ne pouvons exclure la contribution intrinsèque, à tout le moins en partie, des cellules de lymphome pour l'augmentation d'EGR-1. Des travaux récents démontrant que LMP1 (latent membrane protein 1) d'EBV, souvent associé aux lymphomes T, peut induire l'expression de EGR-1 et que cette expression augmente la survie de cellules cancéreuse supportent cette idée<sup>325</sup>. Il serait donc intéressant d'inhiber l'expression d'EGR-1 dans les cellules de lymphome avant leur injection et vérifier le développement tumoral et l'expression d'EGR-1 au sein de la tumeur pour déterminer la source de cette augmentation.



#### **4.4 Conclusion**

Nous avons démontré pour la première fois un rôle clé de L-sélectine dans le développement du lymphome thymique. De plus, nos travaux indiquent que les sélectines jouent un rôle significatif dans le processus métastatique du lymphome non-hodgkinien, alors que ce processus est retardé chez les souris présentant une déficience en L-, E-, ou P-sélectine. Finalement, nos travaux démontrent que l'interaction entre les cellules de lymphome et l'endothélium est beaucoup plus complexe que celle d'abord envisagée puisque les cellules cancéreuses peuvent moduler l'expression génique de l'endothélium. Parmi les gènes dont l'expression est influencée par les cellules de lymphome, on retrouve EGR-1, un facteur de transcription contrôlant différents facteurs ayant un rôle dans le développement tumoral.

Il est possible que les molécules d'adhésion et les mécanismes d'adhérence et de signalisation employés par les cellules cancéreuses lors du processus métastatique pourraient constituer des cibles potentielles pour le développement de nouvelles thérapies. Les patients susceptibles de bénéficier d'un tel traitement sont particulièrement ceux n'ayant pas encore développé de métastases. Ce type de thérapie pourrait également être utilisé lors de la chirurgie pour prévenir la colonisation des organes périphériques qui pourrait survenir lors de l'intervention.



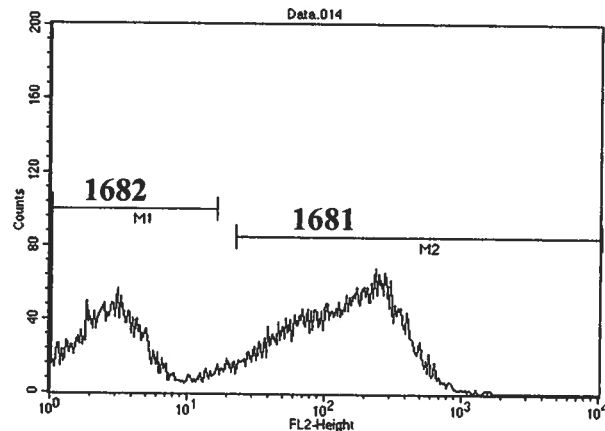
**Figure 1.** Modèle d'interaction lympho-stromale lors de la métastase. Lors de la migration dans les vaisseaux sanguins, les sélectines permettent l'interaction entre les cellules lymphomateuses circulantes et l'endothélium. Cette interaction n'est pas seulement mécanique car elle permet également d'activer la signalisation dans l'endothélium. De plus, cette interaction permet de créer une synapse immunologique qui amplifie le signal déclenché au niveau de l'endothélium par les molécules solubles sécrétées par les cellules de lymphome. Ces différents stimuli modulent l'expression de différents gènes des cellules endothéliales dont le facteur de transcription EGR-1 qui peut secondairement contrôler l'expression de différents facteurs favorisant la progression tumorale. Finalement, une fois dans l'organe cible, les cellules de lymphome peuvent également interagir avec différentes cellules stromales tel que les fibroblastes, pour stimuler à nouveau l'expression d'EGR-1, favorisant ainsi le développement de la tumeur dans les organes périphériques et l'instauration du processus angiogénique.

## Annexe 1

Souris	Fréquence	Temps moyen de survie
C57BL/6	24/30 (80%)	142 ± 23
C57BL/6- <i>L-sel</i> <sup>-/-</sup>	20/26 (77%)	143 ± 33
C57BL/6- <i>E-sel</i> <sup>-/-</sup>	4/4 (100%)	120 ± 12
C57BL/6- <i>P-sel</i> <sup>-/-</sup>	4/4 (100%)	129 ± 27

**Fréquence de développement de lymphome T au niveau du thymus suite à l'irradiation de souris déficientes en L-, E-, ou P-sélectine.** Des souris C57BL/6 normales ou déficientes en L-, E- ou P-sélectine âgées de 4 à 8 semaines ont été exposées à 4 doses hebdomadaires d'irradiation (4 x 1.75Gy). Les souris étaient observées périodiquement et sacrifiées lors de manifestations des signes cliniques du développement de lymphome thymique (dyspnée, poil hérissé, amaigrissement, etc). La présence de lymphome thymique était confirmée lors de la nécropsie.

## Annexe 2



**Développement d'un lymphome T déficient en L-sélectine lorsque injecté simultanément avec un lymphome normal.** Des souris C57BL/6 et C57BL/Kathy (Thy1.2 négatives) furent injectées par voie intrathymique simultanément avec  $10^4$  cellules de lymphome déficientes en L-sélectine (1682) et exprimant L-sélectine (1681). Suite au développement, le lymphome thymique fut prélevé, les cellules en ont été extraites puis marquées avec un anticorps anti-L-sélectine et analysées par cytométrie en flux pour déterminer la population de cellules de lymphome s'étant développées. Les cellules de lymphome étaient tout d'abord discriminées des cellules thymiques de l'hôte par leur taille et leur granularité. De plus, un marquage anti-Thy1.2, spécifique aux cellules de lymphomes injectées aux souris C57BL/Kathy (Thy1.2 négatives) a permis de confirmer l'origine des cellules analysées. On remarque que les cellules L-sélectine déficientes se sont développées et ont généré un lymphome thymique alors que lorsque injectées seules, aucun lymphome ne se développe. La figure est représentative de résultats obtenus avec 4 souris.

## Annexe 3



Res. Adv. in Blood 2, 2003

# Towards a better understanding of the role cell adhesion molecules play in the dissemination of T lymphoma using genetically-engineered mouse models

Simon D. Bélanger and Yves St-Pierre\*

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada

## Abstract

Since lymphoma cells often express the same cell adhesion molecules (CAM) as their normal counterparts, it has been postulated that CAMs could function in a similar way in both cases. Thus, in the dissemination of lymphoma cells to target organs, they could play a crucial role in the late stages of the metastatic process by mediating cell-cell contact to arrest them in the circulation, as they do in the case of normal leukocytes. Powerful experimental models using genetically-engineered animals or tumor cells deficient for specific adhesion molecules has led to fundamental advances in understanding the complex processes associated with dissemination of lymphoma cells. This review highlights the progress generated by these experimental models and their significance in the context of the development of anti-adhesion therapy in the control of lymphoma dissemination.

## Introduction

During inflammation, the recruitment of leukocytes to an extravascular destination requires intercellular communication between stromal cells and leukocytes. Leukocytes must be able to resist blood flow by adhering to vascular endothelium before entering target organs. This adhesion involves the orchestrated

expression of leukocyte and vascular adhesion molecules. (1, 2). Briefly, in an initial step well known as leukocyte rolling, selectins are implicated in slowing the leukocytes by a transient adhesion to the endothelium (3). Following this, leukocytes adhere firmly to the endothelium through the interaction between integrins and members of the immunoglobulin superfamily (4, 5). The final steps consist of extravasation into the extravascular space and migration of the inflammatory cells through the stroma, towards the inflammatory site (1, 6). As lymphoma cells express the same pattern of adhesion molecules as their normal

---

\*Corresponding author address: INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada,  
E-mail: .yves.st-pierre@inrs-raf.quebec.ca

counterparts, it had been postulated that lymphoma metastasis could use a similar mechanism as lymphocyte recruitment (7, 8). Experimental models, using blocking antibodies have failed, however, to clearly establish whether adhesion molecules indeed play a role in the homing of tumor cells to target organs, or whether they are required at all for tumor growth (9, 10). The effects observed were often attributed to the specificity of the antibody used, the injection route or regimen (11, 12). The generation of genetically-engineered adhesion-deficient mice, which had proven very useful to establish *in vivo* the multistep model of leukocyte recruitment that had been predicted from *in vitro* data (13-17), was finally been put to contribution to test if indeed adhesion molecules were similarly involved in the dissemination of lymphoma cells. This brief review will focus on data obtained from studies made using mice deficient in adhesion molecules as well as from some studies using gene-targeted adhesion molecules mutant cell lines.

### **Integrins and immunoglobulin superfamily.**

Firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium is nearly exclusively mediated by integrin receptors. Recent studies suggest that specialized integrins support reversible cell-cell interaction ("tethering") that slow down selectin-initiated rolling of leukocytes prior to their arrest. In this case, integrins act as the "ultimate brakes" for circulating leukocytes, definitively arresting rolling cells on the surface of endothelial cell; and contribute to the selectivity of leukocyte/endothelial cell interactions and hence leukocyte recruitment.

Integrins are heterodimers composed of an alpha and a beta subunit bound noncovalently to each other. The alpha chain contains a large N-terminal extracellular domain with 7 conserved repeats of putative metal binding domains, a transmembrane domain, and a short C-terminal cytoplasmic

tail. Some alpha integrins also contain an insertion (I) domain of approximately 200-amino acids, some of which undergo proteolytic cleavage near the transmembrane domain. The beta chain contains an N-terminal signal peptide, a large extracellular domain that includes 4 cysteine-rich repeats, a transmembrane domain, and a short C-terminal tail. Although integrins are widely expressed and highly versatile transmembrane receptors, leukocyte arrest is almost exclusively mediated by the leukocyte  $\beta 2$  integrins LFA-1 ( $\alpha_L\beta_2$ , CD11a/CD18) and Mac-1 ( $\alpha_M\beta_2$ , CD11b/CD18), as well as VLA-4 ( $\alpha_4\beta_1$ , CD49d/CD29) and its related integrin  $\alpha_4\beta 7$  (LPAM-1). These integrins mediate the intercellular adhesion through specific binding to members of the immunoglobulin superfamily (IgSF). Members of the IgSF share structural and genetic features with immunoglobulin molecules and contain at least one immunoglobulin domain (18). Among the members of this family expressed on vascular endothelial cells, and which are implicated in leukocyte recruitment via the integrin receptors, we found intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54), ICAM-2 (CD102), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106), and the mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1). The latter is specifically expressed on mucosal endothelium of the Peyer's patches, and is thus implicated in lymphocyte homing to the intestinal mucosa.

Just like leukocyte recruitment, cancer metastasis is a multistep process in which adhesion molecules play an important role. While evading the immune system, cancer cells must first detach from the primary tumor, enter the vascular circulation, home to the target organs, extravasate through the endothelium and the basement membrane, and proliferate to form secondary tumors. The arrest from the blood circulation by interaction with the endothelium is thus a rate-limiting step in the metastasis process (19). In order to study the role of adhesion molecules in the multistep process of dissemination of lymphoma cells, we

have combined the use of genetically-engineered ICAM-1-deficient mice and tumorigenic lymphoma cell lines of T-cell origin that we derived from radiation-induced thymic lymphomas; a model based on the studies described by the group of Henry S. Kaplan. The expression of CD3 $\epsilon$  confirmed the T-cell origin of these lymphoma cells as well as the expression of adhesion molecules ICAM-1, ICAM-2, CD31, CD62L and, most importantly, LFA-1, the ICAM-1 counter receptor. This repertoire of adhesion molecules is similar to that normally found on the surface of T cells. When injected intrathymically to syngeneic mice, these lymphoma cells can induce the formation of a thymic lymphoma that rarely disseminates to other organs, allowing to selectively study the role of specific interactions between T lymphoma cells and their peritumoral environment on tumor growth (20). In contrast, intravenous injection of lymphoma cells can be used as model of experimental metastasis, as lymphoma cells can spread in different lymphoid and non-lymphoid organs and form lymphoid tumors in various organs, most notably in the spleen, lymph nodes, kidneys and liver.

Among adhesion molecules that could be implicated in lymphoma dissemination, ICAM-1 represents a good candidate. The expression of LFA-1 on lymphoma cells is believed to mediate binding of lymphoid tumor cells to the ICAM-1-expressing vascular endothelium, thereby initiating the dissemination process of tumor cells to secondary target organs. This hypothesis was based on studies showing a correlation between the levels of LFA-1 expression on tumour cells and their metastatic capacity (21). As our lymphoma cells express LFA-1 and disseminate to peripheral organs following intravenous injection, we tested if the absence of ICAM-1 in these mice could reduce the dissemination of lymphoma in target organs. Two independently derived ICAM-1-deficient mice strains were used to test this hypothesis. The first strain (ICAM-1<sup>tm1jcer</sup>) was generated by inserting a

mutation in the fourth exon of the ICAM-1 gene while the second strain (ICAM-1<sup>tm1Bay</sup>) was obtained by inserting a similar mutation in the fifth exon (22, 23). When we injected intravenously 164T2 T lymphoma cells to

normal mice, we observed the development of solid tumors in kidneys and spleen in 50 to 70 % of mice within 8 to 10 weeks. However, when the same treatment was applied to ICAM-1-deficient mice, we found that no tumor developed, indicating that these mice were completely resistant to lymphoma development (20). The absence of organ infiltration by lymphoma cells was confirmed using histological studies. The resistance was neither dose nor time dependent as the injection of higher concentrations of lymphoma cells failed to produce tumors in ICAM-1-deficient mice for up to 24 weeks post-injection. These results were similar in both ICAM-1-deficient mice strains, confirming the implication of ICAM-1 in the dissemination of T-cell lymphoma to target organs. Since ICAM-1 is implicated in leukocyte recruitment, the ability of 164T2 lymphoma cells to home to the target organs (spleen, liver, kidneys, etc) was tested. For this purpose, lymphoma cells were radiolabelled with indium and the homing kinetics compared in both normal and ICAM-1-deficient mice at different times post-injection (20). Surprisingly, we found that lymphoma cells migrated with the same kinetic in both normal and ICAM-1-deficient mice. While these results firmly established for the first time the role of ICAM-1 in the dissemination of T-cell lymphoma, they further suggested that this molecule was most likely involved in the post-homing events rather than in the recruitment of lymphoma cells to the target site. More specifically, it suggested that ICAM-1 and LFA-1 were possibly involved in bi-directional signaling processes that lead to the expression of key molecules necessary not for homing but for extravasation and tumor growth. While the concept of outside-in signaling has been well established for integrins, most notably for LFA-1 during leukocyte recruitment, the ability of

ICAM-1 to generate intracellular signals is less well known. Some studies however, had shown that ICAM-1 could indeed generate such signals, most notably when expressed at the surface of vascular endothelial cells (24, 25).

Using an experimental *in vitro* system, we thus tested the hypothesis that the interaction between LFA-1 and ICAM-1 was essential for the regulation of specific metastatic genes in both endothelial and lymphoma cells. Among the candidate genes, we examined those encoding the matrix metalloproteinases (MMPs), which have been associated with the aggressiveness of several types of cancer, notably malignant lymphomas (26, 27). In fact, integrins had been shown in previous studies to modulate the expression of MMPs in various cell types, including T cells (28). Using an experimental *in vitro* system, we indeed found MMP-9 expression in both lymphoma cells and endothelial cells following cell-cell contact (29). Most importantly, we found that activation of MMP-9 gene expression in lymphoma cells was dependent on the adhesion to ICAM-1, as antibodies specific for LFA-1 and ICAM-1, but not for ICAM-2, completely blocked MMP-9 induction. However, the inducing signal in endothelial cells was distinct as anti-LFA-1 and anti-ICAM-1 failed to block the induction of MMP-9. These results bring support to the hypothesis that intercellular contact via adhesion molecules controls the expression of genes involved in post-homing events.

Since the interaction mediated by LFA-1/ICAM-1 increased the aggressiveness of lymphoma cells by controlling the expression of metastatic genes, one could therefore use this model to isolate new metastatic genes that are associated with lymphoma dissemination. For this purpose, we next tested whether more aggressive lymphoma cell lines, each expressing a distinct repertoire of genes, could overcome the resistance of ICAM-1-deficient mice. To obtain such aggressive lymphomas, we carried out *in vivo* passages of the 164T2 lymphoma cell line in young C57BL/6 mice

using the spleen as the organ from which lymphoma cells were recovered after each passage. Aggressive lymphoma clones, 164T2S11 and 164T2S19, were established after 11 and 19 passages respectively. Whereas 164T2 lymphoma cells induced lymphoid tumors in 50 % of injected mice after a period of approximately 60 days, the aggressive 164T2S11 (S11) and 164T2S19 (S19) clones induced tumors in 100% of injected mice after less than 20 days (30). The aggressive phenotype of the lymphoma cells was further confirmed by its ability to constitutively express MMP-9, a gene associated with aggressive non-Hodgkin's lymphomas. We then tested if these aggressive clones could overcome resistance of ICAM-1-deficient mice to lymphoma dissemination. We found that both S11 and S19 were able to overcome the resistance of ICAM-1-deficient mice. Again, we found that the homing kinetics were identical for both aggressive and non-aggressive lymphoma cells, a finding consistent with the hypothesis that the critical step of lymphoma dissemination is manifested after homing. Interestingly, we found no difference in the repertoire of adhesion molecules at the surface of parental cells and the aggressive variants. However, genomic analysis of the transcriptome of these lymphoma cells allowed us to identify a number of other genes that are specifically associated with lymphoma development (31). Thus, the use of genetically engineered adhesion-deficient mice is a valuable tool to dissect the role of specific adhesion molecules in metastasis and identify new genes associated with the dissemination of lymphoid cells.

Our results with ICAM-1-deficient mice are consistent with those obtained with genetically engineered LFA-1-deficient lymphoma cell lines. Using chemically induced lymphoma mutants, deficient in LFA-1 cell surface expression, Roossien *et al.* (32) showed that LFA-1-deficient lymphoma cells express a diminished invasive potential in both hepatocyte and fibroblast cultures compared



with the parental cells. Moreover, when testing the *in vivo* metastatic capacity by intravenous injection, the parental lymphoma TAM2D2 produced metastases in 100% of mice in 17 to 22 days while the LFA-1 mutants only induces metastases in around 10 % of mice in 37-46 days. They further showed that  $\beta_1$  integrin double knockout (DKO) mutants of the highly metastatic ESb murine T lymphoma cell line have a reduced metastatic potential (33). Indeed, while intravenous injection of the parental lymphoma cells ESb and of single-knockout cells induces lymphoid tumors in all animals within 9-11 days, only 50 % of mice injected with double knockout cells developed such tumors, and this after a period of 20-60 days post-injection. This mutation was shown to abrogate the expression of the integrin  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4), which normally binds VCAM-1 and fibronectin, and of the integrin  $\alpha_6\beta_1$  (VLA-6), which binds laminin (5). Interestingly, the *in vivo* growth of these cells following intraperitoneal injection was not altered. Metastatic capacity of DKO cells could be restored following transfection with  $\beta_1$  cDNA, proving the implication of  $\beta_1$  integrin in lymphoma metastasis. Using these DKO cells, they transfected  $\beta_1$  mutants in different domains (34). These lymphoma cell lines allowed them to conclude that the five C-terminal residues implicated in cell signaling by the  $\beta_1$  integrin were essential for lymphoma metastasis to liver and spleen. In contrast, mutations in the cytoplasmic domain that are required for stable adhesion had no effect on  $\beta_1$ -dependant metastasis formation. In view of these studies on the implication of integrins and IgSF of adhesion molecules, it appears that these molecules are clearly implicated in lymphoma dissemination. However, this implication does not seem to be restricted to adhesion between lymphoma cells and the endothelium but also applies to cell signaling for the regulation of other genes that could participate in metastasis. It is conceivable that another group of adhesion molecules, the selectins, is responsible for lymphoma arrest in the blood vessels and

adhesion to vascular endothelium, which does not exclude their possible role in cell signaling.

The availability of ICAM-1-deficient mice and the ability to generate cell lines from different tissues has allowed to further test specific aspects of their role on lymphoma development as well. Reiss and Engelhardt have established the ICAM-1-deficient endothelioma cell line bEnd11.1 by transformation of endothelial cells purified from ICAM-1-deficient mice (35). Using this model, they showed that the adhesion of T

lymphoma cell line TK-1 to endothelial cells was significantly reduced in the absence of ICAM-1. Moreover, using a transmigration assay, they showed the major implication of ICAM-1 in the transmigration of T lymphoma cells across endothelium. This reduced extravasation in ICAM-1-deficient endothelium is in accordance with the resistance of ICAM-1-deficient mice to T lymphoma that we observed, despite their similar homing. Using mAb against ICAM-2 these authors showed that this molecule interferes with the adhesion and, to a larger extent, with the transmigration of the T lymphoma cells TK-1, but exclusively on the ICAM-1-deficient bEnd11.1 cell line, showing a possible redundancy in their functions. This implication of ICAM-2 was however not observed when they analyzed adhesion of thymocytes or of memory T-cells to bEnd11.1. As these three cell lines express similar levels of LFA-1, the activation of LFA-1 in lymphoma should be at a different stage that allows interaction with ICAM-2. Moreover, the fact that ICAM-2-mediated adhesion should only be observed in the absence of ICAM-1 shows the minor role played by ICAM-2 in the adhesion and transmigration of T lymphoma cells. This implication of ICAM-2 in adhesion and more importantly in extravasation could also be one of the reasons why aggressive lymphoma overcomes the metastasis resistance of ICAM-1-deficient mice in our model. However, other adhesion molecules participating in the adhesion cascade should explain this

observation, such as selectins, which will be discussed below.

Since ICAM-1 is also expressed on circulating lymphocytes (and T lymphoma cells), and since the level of expression of ICAM-1 at the cell surface of tumor cells has been shown to be an important factor in tumor development, most notably by playing a role in tumor recognition by the immune cells, we used ICAM-1-deficient mice to generate T lymphoma cells deficient for ICAM-1-expression and test whether the level of ICAM-1 on the surface of lymphoma cells influenced lymphoma development. We first established that ICAM-1 deficiency had no effect on the triggering of radiation-induced thymic lymphoma, as tumor incidence in normal and in ICAM-1-deficient mice after exposure to a leukemogenic regimen of X-ray was identical (St-Pierre *et al.*, *manuscript in preparation*). Such a regimen (4 weekly doses of 175 rads) results in thymic lymphomas in most of the animals after a latency period varying between 3 and 6 months. By comparing tumor growth in animals injected intrathymically with suboptimal doses of 164T2 and 267 lymphoma cells ( $10^3$  to  $10^6$  cells/lobe) in normal and ICAM-1-deficient mice, we further established that ICAM-1 expression by thymic stromal cells (such as thymic epithelial cells, fibroblasts, thymic nurse cells, etc) did not influence the final stage of the disease, i.e. growth of thymic lymphoma. Normal C57BL/6 mice injected intrathymically with these lymphoma cells develop thymic lymphoma within 2-6 weeks, depending of the number of cells injected.

Since ICAM-1-deficient mice developed radiation-induced thymic lymphoma, we took advantage of this opportunity to generate ICAM-1-deficient lymphoma cell lines, as previously described (36). As a control, we transfected in these cells the cDNA encoding the wild-type form of ICAM-1 and tested whether the levels of ICAM-1 influenced a) lymphoma dissemination, and b) lymphoma growth. Our results showed that absence of

ICAM-1 on lymphoma cells does not alter the ability of lymphoma cells to grow, nor does it confer to these cells an increased tumorigenicity (St-Pierre *et al.*, *manuscript in preparation*).

### Selectins

Although metastasis manifests itself after homing to the target organ, it appears that dissemination of tumor cells first requires contact with endothelial cells via CAMs. The latter point was demonstrated by the results obtained with ICAM-1-deficient mice and LFA-1-deficient cell lines, as well as data showing that contact of lymphoma cells with EC induces bi-directional activation of both cell types. The implication of selectins in metastasis has therefore received much attention recently as genetically-engineered selectin-deficient mice uncovered their role in the recruitment of normal leukocytes to inflammatory sites (37-42). Selectins is another family of adhesion molecules implicated in intercellular interaction with three members: E-, P-, and L-selectin. The genes for all three selectins are found in a gene cluster on chromosome 1 (43). Selectins are transmembrane glycoproteins that bind to sialylated carbohydrates on target proteins namely Sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>) and Sialyl Lewis A (sLe<sup>a</sup>) (44). Selectins are structurally very similar to their lectin domain in the N-terminus, which is responsible for ligand binding (45). The lectin domain is followed by a domain related to a repeat found in the epidermal growth factor called the EGF-like domain, and a varying number of consensus repeat (CR) domains. E-selectin (CD62E) is expressed on endothelial cells following stimulation by cytokines such as TNF- $\alpha$  or IL-1 (46). P-selectin (CD62P) is expressed in both blood platelets and endothelial cells (47, 48). P-selectin is constitutively expressed in Weibel-Palade bodies of endothelial cells and  $\alpha$ -granules of platelets. These granules allow expression of P-selectin at the cell surface within minutes following stimulation (49). L-

selectin is constitutively expressed on most leukocytes, including neutrophils, monocytes, basophils, eosinophils and most T- and B-cells (50, 51).

One of the most studied selectin ligands is the P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1), which is expressed on most leukocytes (52). Originally described as specific for P-selectin, PSGL-1 has later been shown to bind to E- and L-selectin (53, 54). P-selectin can also mediate intercellular interaction upon binding to CD24 (45), while E-selectin can bind to E-selectin glycoprotein ligand 1 (ESGL-1), cutaneous lymphocyte antigen (CLA), and L-selectin (54-57). In the case of L-selectin, its ligands include CD34, GlyCAM-1 and MadCAM-1, identified from high endothelial venules of the lymph nodes, all of which contains sLe<sup>x</sup> or sLe<sup>a</sup> (58-60). The redundancy among selectin ligands has been well characterized by examining the phenotype of selectin-deficient mice, most notably in the case of E- and P-selectins which share the same receptors on the surface of leukocytes. As reviewed by Kubes (61), platelets could also play the role of a bridge between leukocytes and endothelium since platelets express more P-selectin than the endothelium, to which they can bind via selectin dependent and independent mechanisms.

Our laboratory has recently initiated a series of experiments to elucidate the role of selectins in lymphoma metastasis. We studied experimental metastasis of lymphoma by injecting intravenously 164T2 T lymphoma cells to E- and P-selectin-deficient mice. Our preliminary data show that the lack of one of these selectins could not block metastasis to peripheral organs but increase the latency time (Bélanger *et al.*, *manuscript in preparation*). As E- and P-selectins share common ligands, this could explain why lymphoma cells could continue to disseminate to target organs in spite of the absence of one of these molecules. However, the increased survival time of mice deficient in E- or P-selectin could be explained by the fact that the lack of one of these

adhesion molecules could reduce the number of lymphoma cells that are arrested in the blood circulation and that will extravasate and form tumors in target organs. This would extend the time required for a tumor to grow to a detectable size. These preliminary results are in agreement with those of Ding *et al.* who used intravital videomicroscopy (IVVM) to study the role of P-selectin in lymphoma dissemination (62). Using IVVM, they showed that colon adenocarcinoma cells C26 arrested abruptly in the liver when they encountered blood vessels smaller in diameter than their own size and there was no sign of rolling before their arrest. These cells were then arrested immediately by entrapment when entering the sinusoids. These results are in agreement with those of Chambers *et al.* who showed that melanoma cells are arrested by size restriction in blood vessels (63-65). These studies clearly demonstrated that in some type of tumors, metastasis implicates mechanical arrest due to size restriction instead of rolling and firm adhesion like leukocytes. But this phenomenon may not account for all cancers. When Ding *et al.* injected lymphoma cells EL-4, which are smaller than colon adenocarcinoma cells, they were not arrested by entrapment. Using IVVM, they showed that EL-4 cells adhere to the walls of the blood vessels while the blood in the lumen kept circulating. When they injected the same lymphoma cell line into P-selectin-deficient mice, they observed by IVVM that the number of cells arrested in the blood vessels of the liver was significantly reduced compared to the number in normal mice. However, the injection of lymphoma cells resulted in liver metastases in either normal or P-selectin-deficient mice although the liver weight at 14 days post-injection was significantly greater in normal mice showing a difference in the total metastatic burden between the two groups. These observations could be explained by the fact that P-selectin function can be in part accomplished by E-selectin as they share common receptors on lymphoma cells. Thus, the P-selectin deficiency diminished the

number of lymphoma cells arrested in the blood vessels but is not sufficient to avoid arrest and formation of metastases of all lymphoma cells as we observed in our studies.

When studying the impact of these adhesion molecules in lymphoma dissemination, we must not forget that most of them are not constitutively expressed on the endothelium. Orr *et al.* thus showed by IVVM that when injecting B16 melanoma, cells stopped by mechanical arrest in the sinusoids of the liver (19, 66). They then injected IL-1 4 hrs prior to B16 injection and observed that cancer cells arrested by adhesive interaction (analogous to "rolling") in portal vein branches, up-stream of sinusoids. Seven days later, mice who had been injected with IL-1 developed 10- to 20-fold more hepatic metastases than control. These results could be explained by the up-regulated expression of endothelial adhesion molecules E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 following IL-1 stimulation. These results could probably be transposed in the lymphoma dissemination model, as, like their normal counterpart, they require these adhesion molecules for appropriate arrest on the endothelium. New concepts of leukocyte recruitment by aggregation with platelets and other leukocytes also need a special attention and could be part of the lymphoma dissemination model (61). Indeed, Borsig *et al.* showed that carcinoma cells mediate aggregation with platelets via P-selectin and with leukocytes via L-selectin, thereby facilitating metastatic spreading (42, 67).

### Conclusion

The use of genetically-engineered adhesion-deficient mice and lymphoma cell lines has allowed to firmly establish the role of adhesion molecules in lymphoma dissemination. We propose that selectins could play an important role in arresting lymphoma cells from the blood flow while the interaction between integrins and IgSF molecules seems to play an important role in cell signaling in both lymphoma and

stromal cells. We cannot, however, rule out the possibility that selectin-mediated signaling are also involved in, or even essential for, the development of lymphoma, most notably in the post-homing stages. Their ability to mediate interaction with circulating cells and the vascular endothelium must be taken into consideration when comparisons between their role in leukocyte recruitment and dissemination of tumor cells are made.

### Acknowledgments:

This work was supported by a grant from The Cancer Research Society of Canada. The authors thank Dr. E.F.Potworowski for discussion and revision of the manuscript. Y.S.P is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). S.D.B. is a research student of The Terry Fox Foundation through an award from the National Cancer Institute of Canada.

### References

1. Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76: 301-314, 1994.
2. Butcher, E. C. and Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272: 60-66, 1996.
3. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88: 3259-3287, 1996.
4. Williams, A. F. and Barclay, A. N. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, 6: 381-405, 1988.
5. Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25, 1992.
6. Shimizu, Y. and Shaw, S. Lymphocyte interactions with extracellular matrix. *Faseb J*, 5: 2292-2299, 1991.
7. Albelda, S. M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest*, 68: 4-17, 1993.
8. Huang, Y. W., Baluna, R., and Vitetta, E. S. Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histol Histopathol*, 12: 467-477, 1997.
9. Naor, D., Sionov, R. V., Zahalka, M., Rochman,

- M., Holzmann, B., and Ish-Shalom, D. Organ-specific requirements for cell adhesion molecules during lymphoma cell dissemination. *Curr Top Microbiol Immunol*, *231*: 143-166, 1998.
10. Harning, R., Myers, C., and Merluzzi, V. J. Monoclonal antibodies to lymphocyte function-associated antigen-1 inhibit invasion of human lymphoma and metastasis of murine lymphoma. *Clin Exp Metastasis*, *11*: 337-342, 1993.
  11. Zahalka, M. A. and Naor, D. Beta 2-integrin dependent aggregate formation between LB T cell lymphoma and spleen cells: assessment of correlation with spleen invasiveness. *Int Immunol*, *6*: 917-924, 1994.
  12. Zahalka, M. A., Okon, E., and Naor, D. Blocking lymphoma invasiveness with a monoclonal antibody directed against the beta-chain of the leukocyte adhesion molecule (CD18). *J Immunol*, *150*: 4466-4477, 1993.
  13. Cotran, R. S. and Mayadas-Norton, T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathol Biol (Paris)*, *46*: 164-170, 1998.
  14. Hartwell, D. W. and Wagner, D. D. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins. *Thromb Haemost*, *82*: 850-857, 1999.
  15. Patel, K. D., Cuvelier, S. L., and Wiehler, S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*, *14*: 73-81, 2002.
  16. Sheppard, D. In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biol*, *19*: 203-209, 2000.
  17. Hynes, R. O. and Bader, B. L. Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. *Thromb Haemost*, *78*: 83-87, 1997.
  18. Wang, J. and Springer, T. A. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev*, *163*: 197-215, 1998.
  19. Orr, F. W., Wang, H. H., Lafrenie, R. M., Scherbarth, S., and Nance, D. M. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol*, *190*: 310-329, 2000.
  20. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., Springer, T. A., and St-Pierre, Y. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol*, *161*: 2333-2338, 1998.
  21. Roos, E. Adhesion molecules in lymphoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, *10*: 33-48, 1991.
  22. Xu, H., Gonzalo, J. A., St Pierre, Y., Williams, I. R., Kupper, T. S., Cotran, R. S., Springer, T. A., and Gutierrez-Ramos, J. C. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*, *180*: 95-109, 1994.
  23. Sligh, J. E., Jr., Ballantyne, C. M., Rich, S. S., Hawkins, H. K., Smith, C. W., Bradley, A., and Beaudet, A. L. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*: 8529-8533, 1993.
  24. Hubbard, A. K. and Rothlein, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med*, *28*: 1379-1386, 2000.
  25. Greenwood, J., Etienne-Manneville, S., Adamson, P., and Couraud, P. O. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol*, *38*: 315-322, 2002.
  26. Kossakowska, A. E., Urbanski, S. J., Huchcroft, S. A., and Edwards, D. R. Relationship between the clinical aggressiveness of large cell immunoblastic lymphomas and expression of 92 kDa gelatinase (type IV collagenase) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNAs. *Oncol Res*, *4*: 233-240, 1992.
  27. Stetler-Stevenson, M., Mansoor, A., Lim, M., Fukushima, P., Kehrl, J., Marti, G., Ptaszynski, K., Wang, J., and Stetler-Stevenson, W. G. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood*, *89*: 1708-1715, 1997.
  28. Vachula, M. and Van Epps, D. E. In vitro models of lymphocyte transendothelial migration. *Invasion Metastasis*, *12*: 66-81, 1992.
  29. Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol*, *160*: 2967-2973, 1998.
  30. Lalancette, M., Aoudjit, F., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood*, *95*: 314-319, 2000.
  31. Moisan, S., Demers, M., Mercier, J., Magnaldo, T., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia*, *17*: 751-759, 2003.
  32. Roossien, F. F., de Rijk, D., Bikker, A., and Roos, E. Involvement of LFA-1 in lymphoma invasion and metastasis demonstrated with

- LFA-1-deficient mutants. *J Cell Biol*, *108*: 1979-1985, 1989.
33. Stroeken, P. J., van Rijthoven, E. A., van der Valk, M. A., and Roos, E. Targeted disruption of the beta1 integrin gene in a lymphoma cell line greatly reduces metastatic capacity. *Cancer Res*, *58*: 1569-1577, 1998.
  34. Stroeken, P. J., van Rijthoven, E. A., Boer, E., Geerts, D., and Roos, E. Cytoplasmic domain mutants of beta1 integrin, expressed in beta 1-knockout lymphoma cells, have distinct effects on adhesion, invasion and metastasis. *Oncogene*, *19*: 1232-1238, 2000.
  35. Reiss, Y. and Engelhardt, B. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: trans-endothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol*, *11*: 1527-1539, 1999.
  36. Aoudjit, F., Esteve, P. O., Desrosiers, M., Potworowski, E. F., and St-Pierre, Y. Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int J Cancer*, *71*: 71-78, 1997.
  37. Frenette, P. S., Subbarao, S., Mazo, I. B., von Andrian, U. H., and Wagner, D. D. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 14423-14428, 1998.
  38. Homeister, J. W., Zhang, M., Frenette, P. S., Hynes, R. O., Wagner, D. D., Lowe, J. B., and Marks, R. M. Overlapping functions of E- and P-selectin in neutrophil recruitment during acute inflammation. *Blood*, *92*: 2345-2352, 1998.
  39. Kunkel, E. J., Ramos, C. L., Steeber, D. A., Muller, W., Wagner, N., Tedder, T. F., and Ley, K. The roles of L-selectin, beta 7 integrins, and P-selectin in leukocyte rolling and adhesion in high endothelial venules of Peyer's patches. *J Immunol*, *161*: 2449-2456, 1998.
  40. Steeber, D. A., Campbell, M. A., Basit, A., Ley, K., and Tedder, T. F. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*: 7562-7567, 1998.
  41. Robinson, S. D., Frenette, P. S., Rayburn, H., Cumiskey, M., Ullman-Cullere, M., Wagner, D. D., and Hynes, R. O. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*: 11452-11457, 1999.
  42. Borsig, L., Wong, R., Feramisco, J., Nadeau, D. R., Varki, N. M., and Varki, A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*: 3352-3357, 2001.
  43. Watson, M. L., Kingsmore, S. F., Johnston, G. I., Siegelman, M. H., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Bora, N. S., Howard, T. A., Weissman, I. L., McEver, R. P., and et al. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med*, *172*: 263-272, 1990.
  44. Varki, A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest*, *100*: S31-35, 1997.
  45. Vestweber, D. and Blanks, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, *79*: 181-213, 1999.
  46. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., and Gimbrone, M. A., Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*: 9238-9242, 1987.
  47. McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D. F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*, *84*: 92-99, 1989.
  48. Hsu-Lin, S., Berman, C. L., Furie, B. C., August, D., and Furie, B. 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, 1984.
  49. Furie, B., Furie, B. C., and Flaumenhaft, R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*, *86*: 214-221, 2001.
  50. Stamenkovic, I. The L-selectin adhesion system. *Curr Opin Hematol*, *2*: 68-75, 1995.
  51. Gallatin, W. M., Weissman, I. L., and Butcher, E. C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, *304*: 30-34, 1983.
  52. Laszik, Z., Jansen, P. J., Cummings, R. D., Tedder, T. F., McEver, R. P., and Moore, K. L. 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, 1996.
  53. Sperandio, M., Smith, M. L., Forlow, S. B., Olson, T. S., Xia, L., McEver, R. P., and Ley, K. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Mediates L-Selectin-dependent Leukocyte Rolling in Venules. *J Exp Med*, *197*: 1355-1363, 2003.
  54. Asa, D., Raycroft, L., Ma, L., Aeed, P. A.,

- Kaytes, P. S., Elhammer, A. P., and Geng, J. G. The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J Biol Chem*, 270: 11662-11670, 1995.
55. Levinovitz, A., Muhlhoff, J., Isenmann, S., and Vestweber, D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol*, 121: 449-459, 1993.
56. Rossiter, H., van Reijssen, F., Mudde, G. C., Kalthoff, F., Buijnzeel-Koomen, C. A., Picker, L. J., and Kupper, T. S. Skin disease-related T cells bind to endothelial selectins: expression of cutaneous lymphocyte antigen (CLA) predicts E-selectin but not P-selectin binding. *Eur J Immunol*, 24: 205-210, 1994.
57. Picker, L. J., Warnock, R. A., Burns, A. R., Doerschuk, C. M., Berg, E. L., and Butcher, E. C. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*, 66: 921-933, 1991.
58. Baumharter, S., Singer, M. S., Henzel, W., Hemmerich, S., Renz, M., Rosen, S. D., and Lasky, L. A. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, 262: 436-438, 1993.
59. Berg, E. L., McEvoy, L. M., Berlin, C., Bargatze, R. F., and Butcher, E. C. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*, 366: 695-698, 1993.
60. Tangemann, K., Bistrup, A., Hemmerich, S., and Rosen, S. D. Sulfation of a high endothelial venule-expressed ligand for L-selectin. Effects on tethering and rolling of lymphocytes. *J Exp Med*, 190: 935-942, 1999.
61. Kubes, P. The complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol*, 14: 65-72, 2002.
62. Ding, L., Sunamura, M., Kodama, T., Yamauchi, J., Duda, D. G., Shimamura, H., Shibuya, K., Takeda, K., and Matsuno, S. In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. *Br J Cancer*, 85: 431-438, 2001.
63. Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, 2: 563-572, 2002.
64. Koop, S., MacDonald, I. C., Luzzi, K., Schmidt, E. E., Morris, V. L., Grattan, M., Khokha, R., Chambers, A. F., and Groom, A. C. Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res*, 55: 2520-2523, 1995.
65. Chambers, A. F., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Koop, S., Morris, V. L., Khokha, R., and Groom, A. C. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev*, 14: 279-301, 1995.
66. Scherbarth, S. and Orr, F. W. Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: effects of interleukin-1alpha on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest. *Cancer Res*, 57: 4105-4110, 1997.
67. Borsig, L., Wong, R., Hynes, R. O., Varki, N. M., and Varki, A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 2193-2198, 2002.

## Références

1. Société Canadienne du Cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2006. [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca).
2. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood*. 2000;95:1443-1450.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1994;84:1361-1392.
4. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J. Lymphoma classification--from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO Classification of lymphoid neoplasms. *Ann Oncol*. 2000;11 Suppl 1:3-10.
5. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood*. 1992;80:8-20.
6. Borisch B, Hennig I, Laeng RH, Waelti ER, Kraft R, Laissue J. Association of the subtype 2 of the Epstein-Barr virus with T-cell non-Hodgkin's lymphoma of the midline granuloma type. *Blood*. 1993;82:858-864.
7. Robert-Guroff M, Nakao Y, Notake K, Ito Y, Sliski A, Gallo RC. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T cell leukemia. *Science*. 1982;215:975-978.
8. Fagioli F, Rigolin GM, Cuneo A, et al. Primary gastric lymphoma: distribution and clinical relevance of different epidemiological factors. *Haematologica*. 1994;79:213-217.
9. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med*. 1995;332:1186-1191.
10. Goodlad JR, Davidson MM, Hollowood K, Batstone P, Ho-Yen DO. *Borrelia burgdorferi*-associated cutaneous marginal zone lymphoma: a clinicopathological study of two cases illustrating the temporal progression of *B. burgdorferi*-associated B-cell proliferation in the skin. *Histopathology*. 2000;37:501-508.
11. Saltzstein SL, Ackerman LV. Lymphadenopathy induced by anticonvulsant drugs and mimicking clinically pathologically malignant lymphomas. *Cancer*. 1959;12:164-182.
12. Morrison HI, Semenciw RM, Wilkins K, Mao Y, Wigle DT. Non-Hodgkin's lymphoma and agricultural practices in the prairie provinces of Canada. *Scand J Work Environ Health*. 1994;20:42-47.



13. Boffetta P, Andersen A, Lynge E, Barlow L, Pukkala E. Employment as hairdresser and risk of ovarian cancer and non-Hodgkin's lymphomas among women. *J Occup Med.* 1994;36:61-65.
14. Hardell L, Eriksson M. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer.* 1999;85:1353-1360.
15. Hardell L, Eriksson M, Degerman A. Exposure to phenoxyacetic acids, chlorophenols, or organic solvents in relation to histopathology, stage, and anatomical localization of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res.* 1994;54:2386-2389.
16. Colton T. Herbicide exposure and cancer. *Jama.* 1986;256:1176-1178.
17. Pearce NE, Sheppard RA, Smith AH, Teague CA. Non-Hodgkin's lymphoma and farming: an expanded case-control study. *Int J Cancer.* 1987;39:155-161.
18. Woods JS, Polissar L, Severson RK, Heuser LS, Kulander BG. Soft tissue sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in relation to phenoxyherbicide and chlorinated phenol exposure in western Washington. *J Natl Cancer Inst.* 1987;78:899-910.
19. Persson B, Fredriksson M, Olsen K, Boeryd B, Axelson O. Some occupational exposures as risk factors for malignant lymphomas. *Cancer.* 1993;72:1773-1778.
20. Beebe GW, Kato H, Land CE. Studies of the mortality of A-bomb survivors: 6. mortality and radiation dose, 1950--1974. *Radiat Res.* 1978;75:138-201.
21. List AF, Greer JP, Cousar JB, et al. Non-Hodgkin's lymphoma after treatment of Hodgkin's disease: association with Epstein-Barr virus. *Ann Intern Med.* 1986;105:668-673.
22. Brennan NJ, Fennelly JJ, Towers RP, FitzGerald MX. Sarcoidosis and lymphoma in the same patient. *Postgrad Med J.* 1983;59:581-585.
23. Kassan SS, Thomas TL, Moutsopoulos HM, et al. Increased risk of lymphoma in sicca syndrome. *Ann Intern Med.* 1978;89:888-892.
24. Purtilo DT. Pathogenesis and phenotypes of an X-linked recessive lymphoproliferative syndrome. *Lancet.* 1976;2:882-885.
25. Starzl TE, Nalesnik MA, Porter KA, et al. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet.* 1984;1:583-587.
26. Harris NL, Stein H, Coupland SE, et al. New approaches to lymphoma diagnosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2001:194-220.
27. Takagi S, Tsunoda S, Tanaka O. Bone marrow involvement in lymphoma: the importance of marrow magnetic resonance imaging. *Leuk Lymphoma.* 1998;29:515-522.

28. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA. Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science*. 1987;237:175-178.
29. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239:487-491.
30. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood*. 1993;81:3449-3457.
31. Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1991;325:1525-1533.
32. Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood*. 1988;71:1157-1160.
33. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:244-251.
34. Kramer MH, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol*. 1996;14:2131-2138.
35. Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, et al. Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J Clin Oncol*. 1998;16:1931-1939.
36. Koduru PR, Raju K, Vadmal V, et al. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:4078-4091.
37. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1997;337:529-534.
38. Hill ME, MacLennan KA, Cunningham DC, et al. Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood*. 1996;88:1046-1051.
39. Kaneko Y, Rowley JD, Variakojis D, et al. Prognostic implications of karyotype and morphology in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 1983;32:683-692.

40. Offit K, Wong G, Filippa DA, Tao Y, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood*. 1991;77:1508-1515.
41. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998;92:3152-3162.
42. Horst E, Meijer CJ, Radaszkiewicz T, Ossekoppele GJ, Van Krieken JH, Pals ST. Adhesion molecules in the prognosis of diffuse large-cell lymphoma: expression of a lymphocyte homing receptor (CD44), LFA-1 (CD11a/18), and ICAM-1 (CD54). *Leukemia*. 1990;4:595-599.
43. Rizvi MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson BP, Rosen ST. T-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107:1255-1264.
44. Philip T, Guglielmi C., Hagenbeek A., Renier Somers, Hans Van Der Lelie, Dominique Bron, Pieter Sonneveld, Christian Gisselbrecht, Jean-Yves Cahn, Jean-Luc Harousseau, Bertrand Coiffier, Pierre Biron, Franco Mandelli and Franck Chauvin. Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 1995;333:1540-1545.
45. Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev*. 2004;202:275-293.
46. Waters JS, Webb A, Cunningham D, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:1812-1823.
47. Buttgereit P, Schakowski F, Marten A, et al. Effects of adenoviral wild-type p53 gene transfer in p53-mutated lymphoma cells. *Cancer Gene Ther*. 2001;8:430-439.
48. Multani PS, Grossbard ML. Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 1998;16:3691-3710.
49. Moura IC, Lepelletier Y, Arnulf B, et al. A neutralizing monoclonal antibody (mAb A24) directed against the transferrin receptor induces apoptosis of tumor T lymphocytes from ATL patients. *Blood*. 2004;103:1838-1845.
50. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1999;17:268-276.
51. Diab A, Cohen AD, Alpdogan O, Perales MA. IL-15: targeting CD8+ T cells for immunotherapy. *Cytotherapy*. 2005;7:23-35.

52. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, Levy R. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med.* 1992;327:1209-1215.
53. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996;2:52-58.
54. Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat Med.* 1999;5:1171-1177.
55. Timmerman JM, Czerwinski DK, Davis TA, et al. Idiotype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood.* 2002;99:1517-1526.
56. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet.* 1889;1:571-573.
57. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:453-458.
58. Demers M, Couillard J, Belanger S, St-Pierre Y. New roles for matrix metalloproteinases in metastasis. *Crit Rev Immunol.* 2005;25:493-523.
59. Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14:279-301.
60. Koop S, MacDonald IC, Luzzi K, et al. Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res.* 1995;55:2520-2523.
61. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:563-572.
62. Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol.* 2000;190:310-329.
63. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med.* 2000;6:100-102.
64. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell.* 2000;103:481-490.
65. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860-867.
66. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-314.

67. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999;79:181-213.
68. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88:3259-3287.
69. Patel KD, Cuvelier SL, Wiehler S. Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Semin Immunol.* 2002;14:73-81.
70. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:325-335.
71. Watson ML, Kingsmore SF, Johnston GI, et al. Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med.* 1990;172:263-272.
72. Collins T, Williams A, Johnston GI, et al. Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *J Biol Chem.* 1991;266:2466-2473.
73. Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science.* 1992;258:964-969.
74. Becker-Andre M, Hooft van Huijsduijnen R, Losberger C, Whelan J, Delamarter JF. Murine endothelial leukocyte-adhesion molecule 1 is a close structural and functional homologue of the human protein. *Eur J Biochem.* 1992;206:401-411.
75. Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem.* 1992;267:15176-15183.
76. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood.* 1992;80:795-800.
77. Strubel NA, Nguyen M, Kansas GS, Tedder TF, Bischoff J. Isolation and characterization of a bovine cDNA encoding a functional homolog of human P-selectin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192:338-344.
78. Siegelman MH, van de Rijn M, Weissman IL. Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science.* 1989;243:1165-1172.
79. Lasky LA, Singer MS, Yednock TA, et al. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell.* 1989;56:1045-1055.
80. Watanabe T, Song Y, Hirayama Y, Tamatani T, Kuida K, Miyasaka M. Sequence and expression of a rat cDNA for LECAM-1. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1131:321-324.

81. Walcheck B, White M, Kurk S, Kishimoto TK, Jutila MA. Characterization of the bovine peripheral lymph node homing receptor: a lectin cell adhesion molecule (LECAM). *Eur J Immunol.* 1992;22:469-476.
82. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9121-9126.
83. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92-99.
84. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9799-9804.
85. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell.* 1993;74:541-554.
86. Ley K, Bullard DC, Arbones ML, et al. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med.* 1995;181:669-675.
87. Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, et al. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest.* 1997;100:158-168.
88. Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med.* 1996;184:81-92.
89. Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood.* 2000;95:3146-3152.
90. Pan J, McEver RP. Regulation of the human P-selectin promoter by Bcl-3 and specific homodimeric members of the NF-kappa B/Rel family. *J Biol Chem.* 1995;270:23077-23083.
91. Pan J, Xia L, McEver RP. Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1998;273:10058-10067.
92. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem.* 1989;264:7768-7771.

93. Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:8389-8394.
94. Eppihimer MJ, Russell J, Anderson DC, Wolitzky BA, Granger DN. Endothelial cell adhesion molecule expression in gene-targeted mice. *Am J Physiol*. 1997;273:H1903-1908.
95. Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med*. 2003;197:1585-1598.
96. Tchernychev B, Furie B, Furie BC. Peritoneal macrophages express both P-selectin and PSGL-1. *J Cell Biol*. 2003;163:1145-1155.
97. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*. 2003;9:263-268.
98. Keelan ET, Licence ST, Peters AM, Binns RM, Haskard DO. Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *Am J Physiol*. 1994;266:H278-290.
99. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999;401:708-712.
100. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:9238-9242.
101. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*. 1989;243:1160-1165.
102. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD. Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 1993;4:791-801.
103. Pigott R, Needham LA, Edwards RM, Walker C, Power C. Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leucocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1991;147:130-135.
104. Erbe DV, Wolitzky BA, Presta LG, et al. Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J Cell Biol*. 1992;119:215-227.
105. Jutila MA, Watts G, Walcheck B, Kansas GS. Characterization of a functionally important and evolutionarily well-conserved epitope mapped to the short consensus repeats of E-selectin and L-selectin. *J Exp Med*. 1992;175:1565-1573.

106. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*. 1983;304:30-34.
107. Lewinsohn DM, Bargatze RF, Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: evidence of a common molecular mechanism shared by neutrophils, lymphocytes, and other leukocytes. *J Immunol*. 1987;138:4313-4321.
108. von Andrian UH, Chambers JD, Berg EL, et al. L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways. *Blood*. 1993;82:182-191.
109. Tedder TF, Isaacs CM, Ernst TJ, Demetri GD, Adler DA, Disteché CM. Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. *J Exp Med*. 1989;170:123-133.
110. Camerini D, James SP, Stamenkovic I, Seed B. Leu-8/TQ1 is the human equivalent of the Mel-14 lymph node homing receptor. *Nature*. 1989;342:78-82.
111. Siegelman MH, Weissman IL. Human homologue of mouse lymph node homing receptor: evolutionary conservation at tandem cell interaction domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:5562-5566.
112. Bowen BR, Nguyen T, Lasky LA. Characterization of a human homologue of the murine peripheral lymph node homing receptor. *J Cell Biol*. 1989;109:421-427.
113. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101.
114. Jutila MA, Rott L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol*. 1989;143:3318-3324.
115. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*. 1989;245:1238-1241.
116. Jung TM, Dailey MO. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *J Immunol*. 1990;144:3130-3136.
117. Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder TF. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol*. 1992;119:229-238.
118. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med*. 2005;9:255-266.



119. Varki A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J Clin Invest.* 1997;100:S31-35.
120. Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood.* 1996;88:3010-3021.
121. Sako D, Chang XJ, Barone KM, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993;75:1179-1186.
122. Liu W, Ramachandran V, Kang J, Kishimoto TK, Cummings RD, McEver RP. Identification of N-terminal residues on P-selectin glycoprotein ligand-1 required for binding to P-selectin. *J Biol Chem.* 1998;273:7078-7087.
123. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 1995;128:661-671.
124. Yang J, Hirata T, Croce K, et al. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med.* 1999;190:1769-1782.
125. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *Faseb J.* 1998;12:1241-1251.
126. Levinovitz A, Muhlhoff J, Isenmann S, Vestweber D. Identification of a glycoprotein ligand for E-selectin on mouse myeloid cells. *J Cell Biol.* 1993;121:449-459.
127. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, et al. The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature.* 1995;373:615-620.
128. Dimitroff CJ, Descheny L, Trujillo N, et al. Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer Res.* 2005;65:5750-5760.
129. Asa D, Raycroft L, Ma L, et al. The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins. *J Biol Chem.* 1995;270:11662-11670.
130. Zollner O, Lenter MC, Blanks JE, et al. L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J Cell Biol.* 1997;136:707-716.
131. Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell.* 1991;66:921-933.
132. Patel KD, McEver RP. Comparison of tethering and rolling of eosinophils and neutrophils through selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Immunol.* 1997;159:4555-4565.

133. Hirata T, Merrill-Skoloff G, Aab M, Yang J, Furie BC, Furie B. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med*. 2000;192:1669-1676.
134. Rosen SD. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:129-156.
135. Hwang ST, Singer MS, Giblin PA, et al. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes. *J Exp Med*. 1996;184:1343-1348.
136. Giblin PA, Hwang ST, Katsumoto TR, Rosen SD. Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates beta1 integrins and promotes adhesion to fibronectin. *J Immunol*. 1997;159:3498-3507.
137. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature*. 1993;366:695-698.
138. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*. 1995;80:413-422.
139. Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol*. 1988;107:1853-1862.
140. Spertini O, Cordey AS, Monai N, Giuffre L, Schapira M. P-selectin glycoprotein ligand 1 is a ligand for L-selectin on neutrophils, monocytes, and CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Cell Biol*. 1996;135:523-531.
141. Walcheck B, Moore KL, McEver RP, Kishimoto TK. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest*. 1996;98:1081-1087.
142. Fukuda M. Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res*. 1996;56:2237-2244.
143. Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, et al. Increased expression of sialyl Lewis x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res*. 1993;53:3632-3637.
144. Labow MA, Norton CR, Rumberger JM, et al. Characterization of E-selectin-deficient mice: demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity*. 1994;1:709-720.
145. Arbones ML, Ord DC, Ley K, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*. 1994;1:247-260.

146. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med.* 1995;181:2259-2264.
147. Naka Y, Toda K, Kayano K, Oz MC, Pinsky DJ. Failure to express the P-selectin gene or P-selectin blockade confers early pulmonary protection after lung ischemia or transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:757-761.
148. Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest.* 1997;99:1037-1043.
149. Connolly ES, Jr., Winfree CJ, Prestigiacomo CJ, et al. Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. *Circ Res.* 1997;81:304-310.
150. Munoz FM, Hawkins EP, Bullard DC, Beaudet AL, Kaplan SL. Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J Clin Invest.* 1997;100:2099-2106.
151. Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell.* 1996;84:563-574.
152. Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, et al. Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med.* 1996;183:2329-2336.
153. Robinson SD, Frenette PS, Rayburn H, et al. Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11452-11457.
154. Staite ND, Justen JM, Sly LM, Beaudet AL, Bullard DC. Inhibition of delayed-type contact hypersensitivity in mice deficient in both E-selectin and P-selectin. *Blood.* 1996;88:2973-2979.
155. Subramaniam M, Saffaripour S, Van De Water L, et al. Role of endothelial selectins in wound repair. *Am J Pathol.* 1997;150:1701-1709.
156. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102:145-152.
157. Jung U, Ley K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol.* 1999;162:6755-6762.
158. Collins RG, Jung U, Ramirez M, et al. Dermal and pulmonary inflammatory disease in E-selectin and P-selectin double-null mice is reduced in triple-selectin-null mice. *Blood.* 2001;98:727-735.

159. Forlow SB, Ley K. Selectin-independent leukocyte rolling and adhesion in mice deficient in E-, P-, and L-selectin and ICAM-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H634-641.
160. Aoudjit F, Potworowski EF, Springer TA, St-Pierre Y. Protection from lymphoma cell metastasis in ICAM-1 mutant mice: a posthoming event. *J Immunol*. 1998;161:2333-2338.
161. Laudanna C, Constantin G, Baron P, et al. Sulfatides trigger increase of cytosolic free calcium and enhanced expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8 mRNA in human neutrophils. Evidence for a role of L-selectin as a signaling molecule. *J Biol Chem*. 1994;269:4021-4026.
162. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol*. 1995;154:2291-2302.
163. Smolen JE, Petersen TK, Koch C, et al. L-selectin signaling of neutrophil adhesion and degranulation involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000;275:15876-15884.
164. Po JL, Mazer B, Jensen GS. The L-selectin antibody FMC46 mediates rapid, transient increase in intracellular calcium in human peripheral blood mononuclear cells and Daudi lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;217:1145-1150.
165. Waddell TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP. Signaling functions of L-selectin. Enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J Biol Chem*. 1995;270:15403-15411.
166. Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, et al. L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:15376-15381.
167. Brenner B, Weinmann S, Grassme H, Lang F, Linderkamp O, Gulbins E. L-selectin activates JNK via src-like tyrosine kinases and the small G-protein Rac. *Immunology*. 1997;92:214-219.
168. Brenner B, Grassme HU, Muller C, Lang F, Speer CP, Gulbins E. L-selectin stimulates the neutral sphingomyelinase and induces release of ceramide. *Exp Cell Res*. 1998;243:123-128.
169. Ding Z, Issekutz TB, Downey GP, Waddell TK. L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood*. 2003;101:4245-4252.
170. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, et al. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol*. 1998;142:1381-1391.

171. Modderman PW, von dem Borne AE, Sonnenberg A. Tyrosine phosphorylation of P-selectin in intact platelets and in a disulphide-linked complex with immunoprecipitated pp60c-src. *Biochem J.* 1994;299 ( Pt 3):613-621.
172. Hu Y, Szente B, Kiely JM, Gimbrone MA, Jr. Molecular events in transmembrane signaling via E-selectin. SHP2 association, adaptor protein complex formation and ERK1/2 activation. *J Biol Chem.* 2001;276:48549-48553.
173. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, et al. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol.* 1993;151:3267-3273.
174. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996;88:4183-4194.
175. Koike J, Nagata K, Kudo S, Tsuji T, Irimura T. Density-dependent induction of TNF-alpha release from human monocytes by immobilized P-selectin. *FEBS Lett.* 2000;477:84-88.
176. Hidari KI, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1997;272:28750-28756.
177. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol.* 1991;115:223-234.
178. Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, et al. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest.* 1996;97:1525-1534.
179. Piccardoni P, Sideri R, Manarini S, et al. Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in Mac-1 adhesive function triggered by P-selectin. *Blood.* 2001;98:108-116.
180. Haller H, Kunzendorf U, Sacherer K, et al. T cell adhesion to P-selectin induces tyrosine phosphorylation of pp125 focal adhesion kinase and other substrates. *J Immunol.* 1997;158:1061-1067.
181. Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, Leeuwenberg JF, Roos D. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-mediated CD18 activation. *J Immunol.* 1991;147:1369-1376.
182. Kumar P, Hosaka S, Koch AE. Soluble E-selectin induces monocyte chemotaxis through Src family tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 2001;276:21039-21045.

183. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1379-1386.
184. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol.* 2002;38:315-322.
185. Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Bi-directional induction of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 during T lymphoma/endothelial cell contact: implication of ICAM-1. *J Immunol.* 1998;160:2967-2973.
186. Tremblay PL, Auger FA, Huot J. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene.* 2006;25:6563-6573.
187. Kaplan HS, Brown MB. A quantitative dose-response study of lymphoid-tumor development in irradiated C 57 black mice. *J Natl Cancer Inst.* 1952;13:185-208.
188. Terszowski G, Muller SM, Bleul CC, et al. Evidence for a functional second thymus in mice. *Science.* 2006;312:284-287.
189. Dooley J, Erickson M, Gillard GO, Farr AG. Cervical thymus in the mouse. *J Immunol.* 2006;176:6484-6490.
190. Pals ST, Horst E, Scheper RJ, Meijer CJ. Mechanisms of human lymphocyte migration and their role in the pathogenesis of disease. *Immunol Rev.* 1989;108:111-133.
191. Banfi A, Bonadonna G, Ricci SB, et al. Malignant lymphomas of Waldeyer's ring: natural history and survival after radiotherapy. *Br Med J.* 1972;3:140-143.
192. Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB, Brown TC, Chua T, Bush RS. Patterns of disease in localized extranodal lymphomas. *J Clin Oncol.* 1987;5:875-880.
193. Radaszkiewicz T, Dragosics B, Bauer P. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology.* 1992;102:1628-1638.
194. Koizumi H, Kumakiri M, Ishizuka M, Ohkawara A, Okabe S. Leukemia cutis in acute myelomonocytic leukemia: infiltration to minor traumas and scars. *J Dermatol.* 1991;18:281-285.
195. Roos E. Adhesion molecules in lymphoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1991;10:33-48.
196. Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, et al. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180:95-109.

197. Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, et al. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:8529-8533.
198. Lalancette M, Aoudjit F, Potworowski EF, St-Pierre Y. Resistance of ICAM-1-deficient mice to metastasis overcome by increased aggressiveness of lymphoma cells. *Blood*. 2000;95:314-319.
199. Roossien FF, de Rijk D, Bikker A, Roos E. Involvement of LFA-1 in lymphoma invasion and metastasis demonstrated with LFA-1-deficient mutants. *J Cell Biol*. 1989;108:1979-1985.
200. Stroeken PJ, van Rijthoven EA, van der Valk MA, Roos E. Targeted disruption of the beta1 integrin gene in a lymphoma cell line greatly reduces metastatic capacity. *Cancer Res*. 1998;58:1569-1577.
201. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69:11-25.
202. Stroeken PJ, van Rijthoven EA, Boer E, Geerts D, Roos E. Cytoplasmic domain mutants of beta1 integrin, expressed in beta 1-knockout lymphoma cells, have distinct effects on adhesion, invasion and metastasis. *Oncogene*. 2000;19:1232-1238.
203. Reiss Y, Engelhardt B. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol*. 1999;11:1527-1539.
204. Stoolman LM, Kaldjian E. Adhesion molecules involved in the trafficking of normal and malignant leukocytes. *Invasion Metastasis*. 1992;12:101-111.
205. Pals ST, Meijer CJ, Radaszkiewicz T. Expression of the human peripheral lymph node homing receptor (LECAM-1) in nodal and gastrointestinal non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*. 1991;5:628-631.
206. Moller P, Eichelmann A, Mechttersheimer G, Koretz K. Expression of beta 1-integrins, H-CAM (CD44) and LECAM-1 in primary gastro-intestinal B-cell lymphomas as compared to the adhesion receptor profile of the gut-associated lymphoid system, tonsil and peripheral lymph node. *Int J Cancer*. 1991;49:846-855.
207. Abel EA, Wood GS, Hoppe RT, Warnke RA. Expression of Leu-8 antigen, a majority T-cell marker, is uncommon in mycosis fungoides. *J Invest Dermatol*. 1985;85:199-202.
208. Pals ST, Drillenburger P, Dragosics B, Lazarovits AI, Radaszkiewicz T. Expression of the mucosal homing receptor alpha 4 beta 7 in malignant lymphomatous polyposis of the intestine. *Gastroenterology*. 1994;107:1519-1523.

209. Dejana E, Martin-Padura I, Lauri D, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. *Lab Invest.* 1992;66:324-330.
210. Yamada N, Chung YS, Sawada T, Okuno M, Sowa M. Role of SPan-1 antigen in adhesion of human colon cancer cells to vascular endothelium. *Dig Dis Sci.* 1995;40:1005-1012.
211. Bresalier RS, Ho SB, Schoepfner HL, et al. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology.* 1996;110:1354-1367.
212. Sato M, Narita T, Kimura N, et al. The association of sialyl Lewis(a) antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 1997;17:3505-3511.
213. Yamada N, Chung YS, Takatsuka S, et al. Increased sialyl Lewis A expression and fucosyltransferase activity with acquisition of a high metastatic capacity in a colon cancer cell line. *Br J Cancer.* 1997;76:582-587.
214. Cho M, Dahiya R, Choi SR, et al. Mucins secreted by cell lines derived from colorectal mucinous carcinoma and adenocarcinoma. *Eur J Cancer.* 1997;33:931-941.
215. Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, et al. Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *Dis Colon Rectum.* 1997;40:420-431.
216. Brodt P, Fallavollita L, Bresalier RS, Meterissian S, Norton CR, Wolitzky BA. Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer.* 1997;71:612-619.
217. Bresalier RS, Byrd JC, Brodt P, Ogata S, Itzkowitz SH, Yunker CK. Liver metastasis and adhesion to the sinusoidal endothelium by human colon cancer cells is related to mucin carbohydrate chain length. *Int J Cancer.* 1998;76:556-562.
218. Giavazzi R, Foppolo M, Dossi R, Remuzzi A. Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest.* 1993;92:3038-3044.
219. Tozeren A, Kleinman HK, Grant DS, Morales D, Mercurio AM, Byers SW. E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer.* 1995;60:426-431.
220. Lafrenie RM, Gallo S, Podor TJ, Buchanan MR, Orr FW. The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and alpha 4 beta 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. *Eur J Cancer.* 1994;30A:2151-2158.



221. Yoneda J, Saiki I, Kobayashi H, et al. Inhibitory effect of recombinant fibronectin polypeptides on the adhesion of liver-metastatic lymphoma cells to hepatic sinusoidal endothelial cells and tumor invasion. *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:723-734.
222. Nakashio T, Narita T, Sato M, et al. The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res.* 1997;17:293-299.
223. Iwai K, Ishikura H, Kaji M, et al. Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis(a) in the adhesion of pancreatic carcinoma cells to activated endothelium. *Int J Cancer.* 1993;54:972-977.
224. Satoh M, Handa K, Saito S, et al. Disialosyl galactosylgloboside as an adhesion molecule expressed on renal cell carcinoma and its relationship to metastatic potential. *Cancer Res.* 1996;56:1932-1938.
225. Mattila P, Majuri ML, Renkonen R. VLA-4 integrin on sarcoma cell lines recognizes endothelial VCAM-1. Differential regulation of the VLA-4 avidity on various sarcoma cell lines. *Int J Cancer.* 1992;52:918-923.
226. Miller N, Vile RG, Hart IR. Selectin ligands on human melanoma cells. *Glycoconj J.* 1996;13:33-43.
227. Khatib AM, Fallavollita L, Wancewicz EV, Monia BP, Brodt P. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res.* 2002;62:5393-5398.
228. Saiki I, Koike C, Obata A, et al. Functional role of sialyl Lewis X and fibronectin-derived RGDS peptide analogue on tumor-cell arrest in lungs followed by extravasation. *Int J Cancer.* 1996;65:833-839.
229. Mannori G, Santoro D, Carter L, Corless C, Nelson RM, Bevilacqua MP. Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol.* 1997;151:233-243.
230. Biancone L, Araki M, Araki K, Vassalli P, Stamenkovic I. Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J Exp Med.* 1996;183:581-587.
231. Pottratz ST, Hall TD, Scribner WM, Jayaram HN, Natarajan V. P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am J Physiol.* 1996;271:L918-923.
232. Goetz DJ, Ding H, Atkinson WJ, et al. A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am J Pathol.* 1996;149:1661-1673.

233. Ding L, Sunamura M, Kodama T, et al. In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. *Br J Cancer*. 2001;85:431-438.
234. Scherbarth S, Orr FW. Intravital videomicroscopic evidence for regulation of metastasis by the hepatic microvasculature: effects of interleukin-1alpha on metastasis and the location of B16F1 melanoma cell arrest. *Cancer Res*. 1997;57:4105-4110.
235. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3352-3357.
236. Borsig L, Wong R, Hynes RO, Varki NM, Varki A. Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:2193-2198.
237. Mannori G, Crottet P, Cecconi O, et al. Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res*. 1995;55:4425-4431.
238. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res*. 1999;59:1295-1300.
239. Koenig A, Norgard-Sumnicht K, Linhardt R, Varki A. Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1998;101:877-889.
240. Smorenburg SM, Van Noorden CJ. The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies. *Pharmacol Rev*. 2001;53:93-105.
241. Cosgrove RH, Zacharski LR, Racine E, Andersen JC. Improved cancer mortality with low-molecular-weight heparin treatment: a review of the evidence. *Semin Thromb Hemost*. 2002;28:79-87.
242. Eshel R, Besser M, Zanin A, Sagi-Assif O, Witz IP. The FX enzyme is a functional component of lymphocyte activation. *Cell Immunol*. 2001;213:141-148.
243. Eshel R, Zanin A, Kapon D, et al. Human Ly-6 antigen E48 (Ly-6D) regulates important interaction parameters between endothelial cells and head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2002;98:803-810.
244. Zipin A, Israeli-Amit M, Meshel T, et al. Tumor-microenvironment interactions: the fucose-generating FX enzyme controls adhesive properties of colorectal cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64:6571-6578.

245. Belanger SD, St-Pierre Y. Role of selectins in the triggering, growth, and dissemination of T-lymphoma cells: implication of L-selectin in the growth of thymic lymphoma. *Blood*. 2005;105:4800-4806.
246. Sackstein R. Expression of an L-selectin ligand on hematopoietic progenitor cells. *Acta Haematol*. 1997;97:22-28.
247. Sackstein R, Dimitroff CJ. A hematopoietic cell L-selectin ligand that is distinct from PSGL-1 and displays N-glycan-dependent binding activity. *Blood*. 2000;96:2765-2774.
248. Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1998;188:465-474.
249. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol*. 2005;6:626-634.
250. Kikuchi J, Shinohara H, Nonomura C, et al. Not core 2 beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-2 or -3 but -1 regulates sialyl-Lewis x expression in human precursor B cells. *Glycobiology*. 2005;15:271-280.
251. Simmons PJ, Zannettino A, Gronthos S, Leavesley D. Potential adhesion mechanisms for localisation of haemopoietic progenitors to bone marrow stroma. *Leuk Lymphoma*. 1994;12:353-363.
252. Verfaillie CM. Adhesion receptors as regulators of the hematopoietic process. *Blood*. 1998;92:2609-2612.
253. Imai Y, True DD, Singer MS, Rosen SD. Direct demonstration of the lectin activity of gp90MEL, a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol*. 1990;111:1225-1232.
254. Girard JP, Springer TA. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*. 1995;16:449-457.
255. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996;272:60-66.
256. Carr I. Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1983;2:307-317.
257. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:795-803.
258. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10.

259. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006;312:549-560.
260. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science.* 2002;296:1883-1886.
261. Chen S, Kawashima H, Lowe JB, Lanier LL, Fukuda M. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med.* 2005;202:1679-1689.
262. Zuo Y, Wei W, Liu C, Zhao L, Wang L, Zhang J. Silencing L-selectin expression by siRNA attenuated metastasis of murine lymphoid neoplasm cell P388D1 to peripheral lymph nodes. *Leukemia.* 2007;21:180-183.
263. Laubli H, Stevenson JL, Varki A, Varki NM, Borsig L. L-selectin facilitation of metastasis involves temporal induction of Fut7-dependent ligands at sites of tumor cell arrest. *Cancer Res.* 2006;66:1536-1542.
264. Hostettler N, Naggi A, Torri G, et al. P-selectin- and heparanase-dependent antimetastatic activity of non-anticoagulant heparins. *Faseb J.* 2007.
265. Hosono J, Narita T, Kimura N, et al. Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol.* 1998;67:77-84.
266. O I, Otvos L, Kieber-Emmons T, Blaszczyk-Thurin M. Role of SA-Le(a) and E-selectin in metastasis assessed with peptide antagonist. *Peptides.* 2002;23:999-1010.
267. Nishiwaki Y, Yokota T, Hiraoka M, et al. Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310:1062-1066.
268. Hiraiwa N, Dohi T, Kawakami-Kimura N, et al. Suppression of sialyl Lewis X expression and E-selectin-mediated cell adhesion in cultured human lymphoid cells by transfection of antisense cDNA of an alpha1-->3 fucosyltransferase (Fuc-T VII). *J Biol Chem.* 1996;271:31556-31561.
269. Weston BW, Hiller KM, Mayben JP, et al. Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 1999;59:2127-2135.
270. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M, et al. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res.* 2002;62:1567-1572.
271. Matsumoto S, Imaeda Y, Umemoto S, Kobayashi K, Suzuki H, Okamoto T. Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumour cells. *Br J Cancer.* 2002;86:161-167.

272. Kobayashi K, Matsumoto S, Morishima T, Kawabe T, Okamoto T. Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Res.* 2000;60:3978-3984.
273. Kishimoto T, Saito K, Ishikura H. [Mechanism of blood-borne metastasis in relation to the interaction between pancreatic carcinoma and endothelial cells]. *Nippon Rinsho.* 1995;53:1765-1769.
274. Narita T, Kawakami-Kimura N, Kasai Y, et al. Induction of E-selectin expression on vascular endothelium by digestive system cancer cells. *J Gastroenterol.* 1996;31:299-301.
275. Narita T, Kawakami-Kimura N, Matsuura N, Hosono J, Kannagi R. Corticosteroids and medroxyprogesterone acetate inhibit the induction of E-selectin on the vascular endothelium by MDA-MB-231 breast cancer cells. *Anticancer Res.* 1995;15:2523-2527.
276. Mendoza L, Olaso E, Anasagasti MJ, Fuentes AM, Vidal-Vanaclocha F. Mannose receptor-mediated endothelial cell activation contributes to B16 melanoma cell adhesion and metastasis in liver. *J Cell Physiol.* 1998;174:322-330.
277. Gangopadhyay A, Lazure DA, Thomas P. Adhesion of colorectal carcinoma cells to the endothelium is mediated by cytokines from CEA stimulated Kupffer cells. *Clin Exp Metastasis.* 1998;16:703-712.
278. Khatib AM, Kontogiannea M, Fallavollita L, Jamison B, Meterissian S, Brodt P. Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res.* 1999;59:1356-1361.
279. Boehme MW, Waldherr R, Kist A, et al. Kinetics of soluble TNF-receptors and soluble adhesion molecules ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 under systemic rhTNF alpha therapy. *Eur J Clin Invest.* 1996;26:404-410.
280. Lin CW, Chen LJ, Lee PL, Lee CI, Lin JC, Chiu JJ. The inhibition of TNF-alpha-induced E-selectin expression in endothelial cells via the JNK/NF-kappaB pathways by highly N-acetylated chitooligosaccharides. *Biomaterials.* 2006.
281. Blanks JE, Moll T, Eytner R, Vestweber D. Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates beta 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1. *Eur J Immunol.* 1998;28:433-443.
282. Wang HB, Wang JT, Zhang L, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat Immunol.* 2007;8:882-892.
283. Simon SI, Hu Y, Vestweber D, Smith CW. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to ICAM-1 through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol.* 2000;164:4348-4358.

284. Laferriere J, Houle F, Taher MM, Valerie K, Huot J. Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J Biol Chem.* 2001;276:33762-33772.
285. Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, et al. P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:8767-8771.
286. Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, et al. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell.* 1988;53:37-43.
287. Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA, Jr., et al. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:7164-7168.
288. Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, et al. EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene.* 1991;6:917-928.
289. Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol.* 1991;11:3835-3841.
290. Blok LJ, Grossmann ME, Perry JE, Tindall DJ. Characterization of an early growth response gene, which encodes a zinc finger transcription factor, potentially involved in cell cycle regulation. *Mol Endocrinol.* 1995;9:1610-1620.
291. Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell.* 1990;60:509-520.
292. Lim CP, Jain N, Cao X. Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene.* 1998;16:2915-2926.
293. Midgley VC, Khachigian LM. Fibroblast growth factor-2 induction of platelet-derived growth factor-C chain transcription in vascular smooth muscle cells is ERK-dependent but not JNK-dependent and mediated by Egr-1. *J Biol Chem.* 2004;279:40289-40295.
294. Osawa M, Itoh S, Ohta S, et al. ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation. *J Biol Chem.* 2004;279:29691-29699.

295. Rolli-Derkinderen M, Machavoine F, Baraban JM, Grolleau A, Beretta L, Dy M. ERK and p38 inhibit the expression of 4E-BP1 repressor of translation through induction of Egr-1. *J Biol Chem*. 2003;278:18859-18867.
296. Khachigian LM, Collins T. Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium. *Circ Res*. 1997;81:457-461.
297. Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury. *Science*. 1996;271:1427-1431.
298. Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1995;50:191-224.
299. Khachigian LM, Williams AJ, Collins T. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal platelet-derived growth factor A-chain promoter in cultured vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1995;270:27679-27686.
300. Silverman ES, Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T. Inducible PDGF A-chain transcription in smooth muscle cells is mediated by Egr-1 displacement of Sp1 and Sp3. *Am J Physiol*. 1997;273:H1415-1426.
301. Biesiada E, Razandi M, Levin ER. Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem*. 1996;271:18576-18581.
302. Kilbourne EJ, Widom R, Harnish DC, Malik S, Karathanasis SK. Involvement of early growth response factor Egr-1 in apolipoprotein AI gene transcription. *J Biol Chem*. 1995;270:7004-7010.
303. Harrington MA, Edenberg HJ, Saxman S, Pedigo LM, Daub R, Broxmeyer HE. Cloning and characterization of the murine promoter for the colony-stimulating factor-1-encoding gene. *Gene*. 1991;102:165-170.
304. Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST. Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem*. 1997;272:17795-17801.
305. Cui MZ, Parry GC, Oeth P, et al. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem*. 1996;271:2731-2739.
306. Verde P, Boast S, Franze A, Robbiati F, Blasi F. An upstream enhancer and a negative element in the 5' flanking region of the human urokinase plasminogen activator gene. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:10699-10716.

307. Skerka C, Decker EL, Zipfel PF. Coordinate expression and distinct DNA-binding characteristics of the four EGR-zinc finger proteins in Jurkat T lymphocytes. *Immunobiology*. 1997;198:179-191.
308. Maltzman JS, Carmen JA, Monroe JG. Transcriptional regulation of the Icam-1 gene in antigen receptor- and phorbol ester-stimulated B lymphocytes: role for transcription factor EGR1. *J Exp Med*. 1996;183:1747-1759.
309. Maltzman JS, Carman JA, Monroe JG. Role of EGR1 in regulation of stimulus-dependent CD44 transcription in B lymphocytes. *Mol Cell Biol*. 1996;16:2283-2294.
310. Xiang F, Bai M, Jin Y, Ma W, Xin J. Egr-1 mediates SiO<sub>2</sub>-driven transcription of membrane type I matrix metalloproteinase in macrophages. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 2007;27:13-16.
311. Wang D, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. Basic fibroblast growth factor transcriptional autoregulation requires EGR-1. *Oncogene*. 1997;14:2291-2299.
312. Delbridge GJ, Khachigian LM. FGF-1-induced platelet-derived growth factor-A chain gene expression in endothelial cells involves transcriptional activation by early growth response factor-1. *Circ Res*. 1997;81:282-288.
313. Kaufmann K, Thiel G. Epidermal growth factor and thrombin induced proliferation of immortalized human keratinocytes is coupled to the synthesis of Egr-1, a zinc finger transcriptional regulator. *J Cell Biochem*. 2002;85:381-391.
314. Tsai JC, Liu L, Guan J, Aird WC. The Egr-1 gene is induced by epidermal growth factor in ECV304 cells and primary endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C1414-1424.
315. Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, Chesterman CN, Khachigian LM. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med*. 2003;9:1026-1032.
316. Worden B, Yang XP, Lee TL, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor differentially regulates expression of proangiogenic factors through Egr-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65:7071-7080.
317. Bae SK, Bae MH, Ahn MY, et al. Egr-1 mediates transcriptional activation of IGF-II gene in response to hypoxia. *Cancer Res*. 1999;59:5989-5994.
318. Fu M, Zhu X, Zhang J, et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene*. 2003;315:33-41.
319. Yan SF, Fujita T, Lu J, et al. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med*. 2000;6:1355-1361.



320. Pluda JM. Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol.* 1997;24:203-218.
321. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1995;1:149-153.
322. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell.* 1998;93:661-664.
323. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376:62-66.
324. Tei K, Kawakami-Kimura N, Taguchi O, et al. Roles of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis induced by cotransplantation of cancer and endothelial cells to nude rats. *Cancer Res.* 2002;62:6289-6296.
325. Kim JH, Kim WS, Kang JH, Lim HY, Ko YH, Park C. Egr-1, a new downstream molecule of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *FEBS Lett.* 2007;581:623-628.