

N° d'ordre : 3020

# THÈSE

Présentée à  
**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VIVANT, GÉOSCIENCES,  
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par Melle Caroline BASONI

POUR OBTENIR LE GRADE DE

## DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Sciences des aliments et nutrition

\*\*\*\*\*

*Rôles du TGFβ1 dans la Régulation de la différenciation  
myélo-monocytaire*

\*\*\*\*\*

Thèse soutenue le 22 septembre 2005

Devant la commission d'examen formée de :

Mr Jacques Bonnet, Professeur de l'Université Bordeaux 2

Mme Martine Raes, Professeur des facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur (Belgique)

Mr Jean-Pierre KOLB, Directeur de Recherche CNRS

Mr Claude Atgié, Maître de Conférence de l'Université Bordeaux 1

Mme Elisabeth Génot, Chargé de Recherche INSERM

Mr IJsbrand Kramer, Professeur de l'Université Bordeaux 1

**Président-Examineur**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examineur**

**Directrice de thèse**

**Directeur de thèse**

## *REMERCIEMENTS*

*«Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont»  
Aristote*

*A ma maman, sans qui tout ceci n'aurait pu voir le jour, merci d'avoir  
toujours été là pour moi.  
Merci d'avoir indéfectiblement et inconditionnellement cru en moi.*

*A ma famille qui m'a aidée pendant toutes ces années, merci Arlette et  
Michel.*

*A nos amis qui étaient là, simplement, merci Micheline, Catherine et  
Bernard.*

*Merci Hedwige et Jean-claude.*

*Merci Aneth.*

*Merci à Mr Dumont et au Rotary-Club de Charleroi-Ouest.*

*Merci à tous ceux qui ont cru en moi.  
Merci aussi à ceux qui n'ont pas cru, cela m'a rendue plus forte et plus  
déterminée à réussir.*

## Remerciements

*Cette page me permet d'exprimer ma profonde reconnaissance aux membres du jury qui ont pris un peu de leur temps précieux pour lire et apprécier mon travail. Et me permet de remercier tous les membres du labo.*

*Je remercie le Professeur Jacques Bonnet qui a accepté d'être Président de mon jury de thèse. Vous nous avez également accueillis chaleureusement à l'unité INSERM 441 et permis de travailler dans une ambiance scientifique très agréable et très enrichissante. Merci.*

*Je remercie le Professeur Martine Raes qui a fait le déplacement depuis notre petite Belgique pour assister à ma défense. Vous avez été témoin, depuis les Facultés de Namur, de mon parcours et m'avez guidée pendant plusieurs années dans l'univers de la biologie cellulaire. Ces années resteront parmi les plus belles où j'ai découvert un univers scientifique de prédilection. Merci de l'intérêt que vous avez montré à l'égard de mon travail et de mon manuscrit !*

*Je remercie le Docteur Jean-Pierre Kolb qui a accepté volontiers de partager ce moment de grande tension en participant au jury de ma thèse. Merci de votre sollicitude et de votre patience pour les différentes versions de ce manuscrit.*

*Je remercie le Docteur Claude Atgié, Maître de Conférences au Département Universitaire des Sciences d'Agen, d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse. Je suis heureuse de l'intérêt que vous avez montré pour mon travail lors de mon poste ATER à Agen. Votre soutien lors des travaux pratiques et nos trop rares discussions, faute de temps, sur les « pathologies liées à l'alimentation » à Agen étaient très agréables.*

*Mes remerciements vont tout particulièrement à « ma chef », le Docteur Elisabeth Génot. Mes mots ici inscrits ne suffiront pas à traduire ou à exprimer tout ce que je voudrais te dire. Tu as toujours fait preuve de ta volonté à m'enseigner tout ton savoir-faire scientifique. Tu m'as également initiée aux joies de la recherche, et à continuellement faire preuve de rigueur dans mon travail. Dans les moments joyeux comme dans les plus difficiles, tu as su être disponible. Mais particulièrement, je dois te dire merci de m'avoir accordé ta confiance pendant toutes ces années et permis de faire partie de ton équipe. Tout ce que tu m'as transmis ne sera jamais oublié. Et à l'avenir, je n'oublierai plus jamais d'écrire avec minutie chaque étape de mes manipulations ! Merci à toi.*

*Je remercie également le Professeur IJsbrand Kramer qui m'a accompagnée et transmis son savoir notamment sur les intégrines et les manipulations au FACS. Tu as toujours été présent pour nos discussions et tu as guidé toutes nos décisions. J'aurais dû parler plus souvent en Néerlandais avec toi, je n'aurais pas perdu tout mon vocabulaire si longuement appris ! J'ai aussi aimé parler avec toi des Pays-Bas, et des canaux gelés en hiver où il est possible de patiner. Je ne te dis pas un « tot siens » mais un « à bientôt » ! Dorénavant, je réfléchirai à*

*la façon dont tu aurais construit un « power point », à la manière d'un enseignant de qualité !*

*Enfin, je remercie chaleureusement l'équipe Génot, comme il nous plaît de nous appeler ! Tout d'abord, j'exprime à Edith Reuzeau, ma voisine de paillasse, toute ma profonde reconnaissance pour son aide apportée au labo. Mais principalement parce qu'elle était présente pour recevoir mes confidences et me donner de nombreux conseils. A ma collègue de thèse, Christine Varon, qui a presque soutenu en même temps que moi. Je te remercie d'avoir partagé les moments de doutes et de faiblesse, mais aussi les moments de « rush » ! A Florence Tatin, avec qui nous avons trop rarement discuté « grand théâtre », et qui a toujours été présente au labo pour nous donner un coup de pouce. Garde ta bonne humeur et ton dynamisme, et cette petite étincelle lorsque tu parles manips ! A Benjamin Chaigne-Delalande, outre ta grande aide au labo, et pas seulement pour les plasmides « Chlorure de Césium », merci pour ton soutien informatique ! A Guerric Anies, le plus jeune de nos thésards actuels. Merci d'avoir apporté le dynamisme que nous avons un peu perdu ainsi que l'esprit d'équipe, un peu trop penchés que nous étions sur nos paillasses. Et vive le comité étudiant iecbien ! A Violaine Moreau, qui a toujours été disponible pour la biologie moléculaire et particulièrement le sous-clonage. Une période terrible pour moi, sauf lorsque cela fonctionnait ! Merci de m'avoir épaulée. A Catherine Savona-Baron que j'ai rencontrée au tout début, perdue de vue et puis à nouveau rencontrée !*

*Je vous souhaite beaucoup de joie et de bonheur scientifiques et personnels dans le futur.*

*A tous,*

*Je vous dis simplement merci pour tous ces moments intenses que nous avons partagés et qui ont jalonné mes années à Bordeaux,*

*Caroline.*

## *ABBREVIATIONS*

## Abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique  
AF-6: Afadin  
Alk: Activin receptor-Like Kinase  
AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique  
ApoE: Apolipoprotéine E  
ARF: ADP Ribosylation Factor  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARNm: Acide RiboNucléique Messenger  
ATF-2: Activating Transcription Factor 2  
BCR: B Cell antigen Receptor  
BET: Bromure d’Ethidium  
bFGF: basic Fibroblast Growth Factor  
BMP: Bone Morphogenetic Protein  
BSA: Bovine Serum Albumin  
*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*  
Cacl2: Chlorure de calcium  
C2C12: myoblastes  
CD11b: Cluster of Differentiation 11b  
CHO: Chinese Hamster Ovary  
CIB: Calcium and Integrin Binding protein  
CMH: Complexe Majeur d’Histocompatibilité  
CML: Cellules Musculaires Lisses  
COS7: cellules de type fibroblaste de reins de « singes verts-green monkey » : *Cercopithecus aethiops sabaesus*  
Co-Smad : Common-partner Smad  
DAG : DiAcylGlycerol  
DMEM: Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium  
DMSO: DiMethyl SulfOnate  
DNA : DeoxyryboNucleic Acid  
DO: Densité Optique  
Domaine PSI: domaine Plexins-Semaphorins-Integrins  
DTT: DiThioThréitol  
EDTA: Acide Ethylène Diamine tétraacétique  
EGF: Epithelial Growth Factor  
EGTA : Acide Ethylène Glycol tétraacétique  
EPAC: Exchange Protein directly Activated by cAMP  
Erk: Extracellular Regulated Kinase  
FAK: Focal Adhesion Tyrosine Kinase  
FAST1: Forkhead Activin Signal Transducer 1  
FBS : Fetal Bovine Serum  
fMet-Leu-Phe ou fMLP : peptide chimiotactique d’origine bactérienne  
GAP: GTPase Activating Protein  
GDP: Guanine Di-Phosphate  
GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor  
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor  
GRD: GAP Related Domain  
GSC : Granulomatose Septique Chronique  
*GS domain* : domaine riche en résidus sérine et glycine

GST : Glutathione-S-Transferase  
GTP: Guanine Tri-Phosphate  
HEPES : Acide Sulfonique H-2-hydroxy ethylpiperazine-n'2 éthane  
HSC: Hematopoietic Stem Cell  
ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1  
IFN-γ: InterFeron Gamma  
IgG : Immunoglobuline G  
IL-8: InterLeukine 8  
ILK: Integrin Linked Kinase  
I-Smad: *Inhibitory Smad*  
JNK: c-Jun NH2-terminal Kinase  
kDa : kilo Dalton  
LAP: Latency Associated Peptide  
LB : Luria Growth  
LDL: Low Density Lipoprotein  
LFA-1: Lymphocyte Function-associated Antigen 1  
LPA: LysoPhosphatidic Acid  
LRSB: Laemmli Reducing Sample Buffer  
LRP: LDL Receptor Related Protein  
LTBP: Latent TGFβ-Binding-Protein  
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase  
MCP-1: Monocyte chemotactic Protein 1  
MFI: Mean Fluorescence Intensity  
MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de Magnésium  
MH1 : N-terminal Mad Homology 1  
MIDAS: Metal Ion-Dependent Adhesion Site  
MIP-1α : Macrophage Inflammatory Protein-1 α  
MMP-1: Matrix Metalloproteinase 1  
Motif FG: motif phenyl-alanine-glycine  
Motif GAP: motif glycine-alanine-proline  
NaCl : Chlorure de Sodium  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NBT : NitroBlue Tetrazolium  
NIH3T3: fibroblasts  
nM: nanoMolaire  
NO: Monoxyde d'Azote  
eNOS: NO Synthase  
PAF : Platelet Activating Factor  
PAI : Plasminogen Activator Inhibitor  
PAK2: p21-Activated Kinase 2  
PBS : Phosphate Buffer Saline  
(RT)-PCR: (Reverse Transcriptase)-Polymerase Chain Reaction  
PDGF: Platelet Derived Growth Factor  
PE: PhycoErythrine  
FITC: Fluorescein IsoThyoCyanate  
PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
Peptide RGD: sequence arginine-glycine-asparagine  
PI : Iodure de Propidium  
PI3K : PhosphoInositol 3 Kinase  
PKA: Protein Kinase A



PKC : Protein Kinase C  
PLC : PhosphoLipase C  
PMA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate  
pmol: pico mole  
RHAMM: Receptor for Hyaluronic-Acid-Mediated Motility  
RAPL: Regulator for cell Adhesion and Polarization enriched in Lymphoid tissues  
RBD: Ras Binding Domain  
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire  
RPM : Rotation Par Minute  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
R-Smad : Receptor-activated Smad  
RT-PCR : Retro-transcription Polymerase Chain Reaction  
SARA: Smad Anchor for Receptor Activation  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SPI: Small Peptide Inhibitors  
TAK1: TGF $\beta$  Associated Kinase 1  
TCR : T Cell antigen Receptor  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor Beta  
TGIF: TGT Interacting Factor  
TSC: Tuberos Sclerosis Complex  
LMA: Leucémie Myéloïdes Aiguës  
TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor alpha  
TRAP1: T $\beta$ RI-Associated Protein-1  
TxA2 : Thromboxane A2  
T $\beta$ R : Récepteur au TGF $\beta$   
VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor  
VLDL: Very Low Density Lipoprotein  
ZO-1: Zonula Occludens 1

# *TABLE DES MATIÈRES*

*CHAPITRE I : La différenciation myélo-monocytaire*

-1-1-Généralités.....	1
-1-2-La différenciation myélo-monocytaire.....	2
-1-3-La NADPH oxydase et la différenciation myélo-monocytaire.....	5

*CHAPITRE II : La diapédèse des monocytes et différenciation en macrophages : rôle des intégrines*

-2-1-Les intégrines.....	6
-2-1-1-Structure des intégrines.....	6
-2-1-2-Activation des intégrines.....	8
-2-1-3-Fonctions générales.....	14
-2-1-4-Les intégrines leucocytaires et la diapédèse.....	15

*CHAPITRE III : La petite GTPase Rap1 et la régulation des intégrines*

-3-1-La GTPase Rap1.....	17
-3-1-1-L'activation de Rap1.....	18
-3-1-2-Les GEF de Rap1.....	20
-3-1-3-Les GAP de Rap1.....	22
-3-1-4-Les effecteurs de Rap1.....	23
-3-1-5-Les effets biologiques Rap1.....	26

*CHAPITRE IV : Implication des monocytes/macrophages dans le contexte de l'athérosclérose*

Le processus athéroscléreux.....28

*CHAPITRE V: Le TGFβ*

-5-1-La famille du TGFβ.....37

-5-2-Le TGFβ1.....37

Les récepteurs..... 37

-5-3-La transduction du signal dépendante des Smads.....39

-5-4-La transduction du signal non dépendante des Smads.....43

-5-5- Le TGFβ dans le plasma.....44

-5-6- Les effets pléiotropes du TGFβ.....44

-5-7- Le TGFβ et l'hématopoïèse.....47

*CHAPITRE VI: CD44 et son ligand, le hyaluronan*

-6-1-Le hyaluronan.....48

-6-2-CD44.....48

-6-3-Interactions avec le TGFβ.....49

*CHAPITRE VII: Objectifs de ces études.....50*

**RESULTATS**

-1- Inhibitory control of TGFβ1 on the activation of Rap1, CD11b, and transendothelial migration of leukocytes.....52

-2- CD44 enforces TGFβ1-mediated expression of NADPH oxidase components in promyelocytic cells.....77

<i>CONCLUSION</i> .....	98
<i>BIBLIOGRAPHIE</i> .....	103
<i>ANNEXE</i> .....	117

# *INTRODUCTION*

*CHAPITRE 1 – LA DIFFERENCIATION  
CELLULAIRE*

*Le modèle d'étude des deux chapitres de résultats est une lignée promyéloïde humaine : les U937. Après différenciation par un protocole expliqué dans le chapitre « résultats », les cellules acquièrent un phénotype dit 'monocyte like'. Nous étudions le rôle du TGFβ1 dans ce processus de différenciation, avec pour objectif d'identifier les mécanismes qui sont impliqués in vivo dans ce même processus. Dans ce paragraphe, nous parlons ainsi de la différenciation des cellules immunitaires et plus particulièrement des facteurs impliqués dans la différenciation des monocytes.*

## CHAPITRE I : La différenciation myélo-monocytaire

### **-1-1-Généralités:**

Le développement d'un organisme passe par plusieurs étapes, de la cellule-œuf aux cellules spécialisées organisées en tissus et en organes. Ce processus est appelé *différenciation* et conduit les cellules à exercer des fonctions différentes dans l'organisme. En effet, chaque cellule exerce une fonction qui lui est propre en fonction de sa localisation, elle se spécialise.

Parmi les cellules originaires de la cellule-œuf, celles issues des toutes premières divisions, certaines se différencient et forment les tissus et organes, d'autres ne se différencient pas et permettent le renouvellement des cellules différenciées en fin de vie ou endommagées ou encore lorsque certaines cellules du système immunitaire sont nécessaires en grand nombre. Ce sont les *cellules-souches*. Toutes les cellules-souches n'ont pas le même potentiel. On distingue les *cellules totipotentes*, telles que la cellule-œuf et les cellules issues des toutes premières divisions, qui sont capables de produire tous les types de cellules de l'organisme auquel elles appartiennent, et les *cellules pluripotentes* dont la capacité est limitée à quelques types cellulaires, comme les cellules de la moelle osseuse qui produisent la lignée cellulaire dite hématopoïétique à laquelle appartiennent les globules rouges et les globules blancs.

Toutes les cellules somatiques d'un individu possèdent la même information génétique. La spécialisation que l'on observe au cours du développement tient au fait que ce ne sont pas toujours les mêmes gènes qui sont actifs dans chaque cellule. Le fait que tel ou tel gène soit actif ou non à un stade du développement et à un endroit donné de l'organisme repose sur des mécanismes de régulation complexes des gènes les uns vis-à-vis des autres.

Les cellules souches sont localisées dans certains organes et tissus qui sont caractérisés par un renouvellement cellulaire, un *turnover* important comme les épithélium, le sang et les lignées



germinatives. Elles sont également présentes dans le cerveau et le pancréas, bien que ces organes subissent un renouvellement cellulaire relativement faible (Odorico *et al*, 2001). Chez l'adulte, ces cellules souches existent en nombre limité, contrairement à l'embryon où elles ont de plus la capacité de donner naissance à n'importe quelle cellule spécialisée. Ce potentiel est actuellement exploité par la communauté scientifique parce qu'il laisse spécialement entrevoir un pouvoir de régénération tissulaire prodigieux.

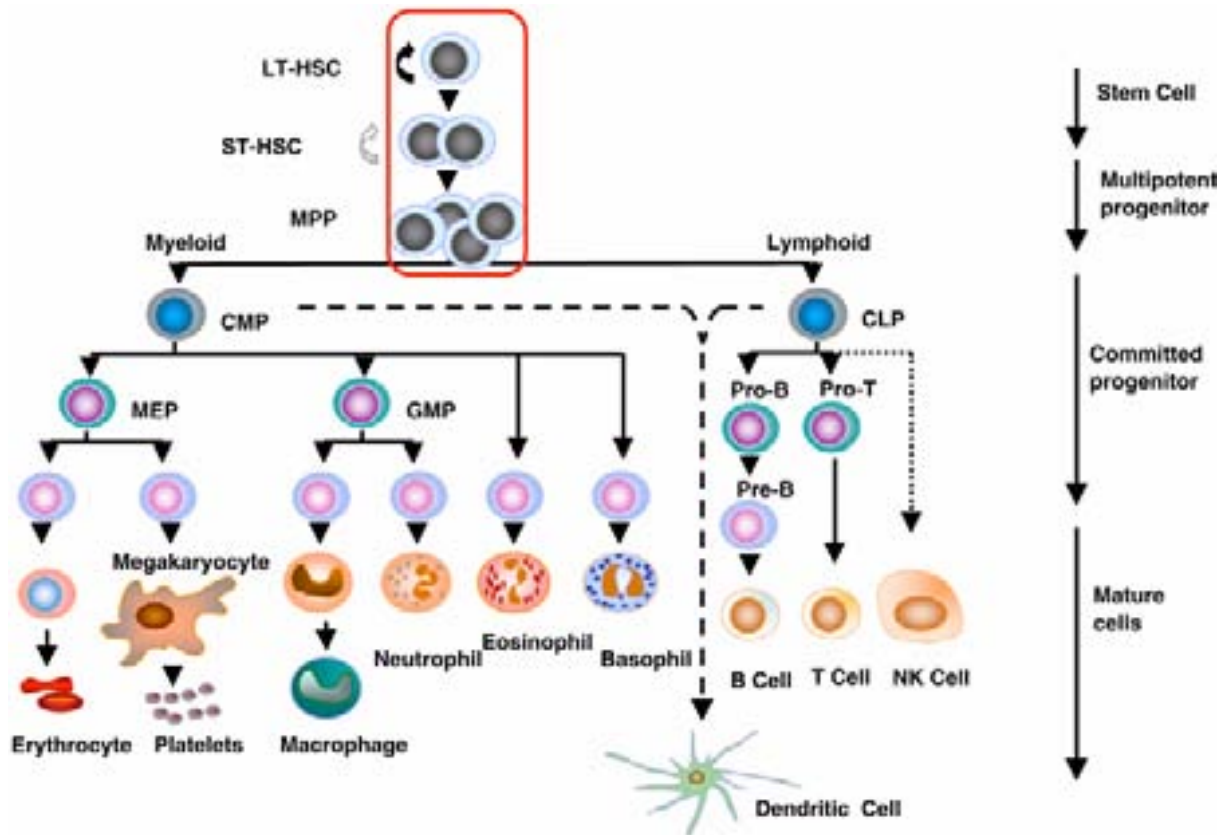
Les cellules souches de l'embryon au stade de blastocyte se différencient tout d'abord en ectoderme primitif qui donnera naissance aux trois feuillets germinatifs embryonnaires : endoderme, mésoderme et ectoderme. Lorsque ces cellules sont prélevées à partir d'un embryon, cellules souches dites embryonnaires, puis cultivées *in vitro* elles se multiplient et se remplacent indéfiniment. *In vitro*, les cellules souches embryonnaires de souris et d'humains sont capables de se différencier en cellules qui appartiennent aux trois feuillets embryonnaires : des cardiomyocytes, des cellules musculaires lisses, des adipocytes, des cellules endothéliales, des neurones, etc. (Odorico *et al*, 2001). Ces cellules ont donc la particularité de subir les processus de différenciation des embryons implantés.

### **-1-2-La différenciation myélo-monocytaire:**

Les cellules souches hématopoïétiques, HSC-*hematopoietic stem cell*, ont la capacité de se multiplier et de donner naissance aux cellules lymphoïdes et myéloïdes : les cellules sanguines, les cellules de la moelle osseuse, les cellules du thymus et de la rate (Szilvassy, 2004). Cependant, il existe certaines évidences qui montrent que ces HSC sont capables de se différencier en cellules non hématopoïétiques : cellules du foie (Vassilopoulos *et al*, 2003), du pancréas (Iannus *et al*, 2003), du cœur (Orlic *et al*, 2001), du cerveau (Eglitis and Mezey, 1997) et du rein (Masuya *et al*, 2003). Si celles-ci sont soumises à des stimuli adéquats.

Les HSC peuvent générer 8 lignées cellulaires : les lymphocytes B et T, les érythrocytes, les plaquettes/mégacaryocytes, les granulocyte/basophiles, éosinophiles, neutrophiles et les monocytes/macrophages (Szilvassy and Cory, 1994). Le système hématopoïétique est organisé de manière hiérarchique : les cellules souches engendrent les précurseurs cellulaires qui évoluent en cellules matures. Les cellules souches se renouvellent tous les 30 jours (Cheshier *et al*, 1999) et les cellules matures vont progressivement perdre le potentiel de différenciation et de prolifération des cellules dont elles proviennent (Fig. 1, page 3). Ce processus, appelé hématopoïèse, est régi par plusieurs cytokines, facteurs de croissance et protéines inhibitrices. L'hématopoïèse basale est entretenue par les cytokines et les facteurs de croissance ; et en présence d'une agression immunologique elle est régulée par les médiateurs

libérés par les macrophages et les lymphocytes T, et elle active les cellules souches myéloïdes qui vont produire un nombre important de cellules de défense.



**Fig.1. Représentation schématique du développement cellulaire des lignées hématopoïétiques. (LT-HSC : long term-HSC ; ST-HSC : short-term HSC ; MPP : multipotent progenitor ; CMP : common myeloid progenitor ; CLP : common lymphoid progenitor ; MEP : megakaryocyte/erythroid progenitor ; GMP : granulocyte-macrophage progenitor)**

**D'après Larsson and Karlsson. 2005. The role of Smad Signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24: 5676-5692**

Les monocytes circulants sont issus de la moëlle osseuse dont ils sont libérés sous une forme encore immature et circulent dans le sang pendant 1 à 3 jours (Imhof and Aurrand-Lions, 2004). Après recrutement dans les tissus, ils peuvent se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques. Il existe également des monocytes qui résident de façon permanente dans les tissus, sans y avoir été recrutés au préalable par des stimuli inflammatoires. Les monocytes sanguins peuvent également être activés dans la circulation sanguine par des cytokines inflammatoires ou par des antigènes libérés par des pathogènes.

Les monocytes/macrophages sont des cellules immunitaires qui participent à l'immunité naturelle, la réponse de type I, et assurent des fonctions de phagocytose et de présentation des

antigènes. Issus des cellules souches de la moelle osseuse chez l'adulte, ils se différencient en monocytes circulant dans le sang et en macrophages dans les tissus. Leur différenciation fait intervenir différents facteurs de croissances et cytokines produits par les cellules environnantes de la moelle osseuse, tels que : IL-3 (Interleukine-3), GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor). Ils dérivent de cellules souches myélo-monocytaires, *CFU-GM*, qui dérivent de précurseurs myéloïdes, *CFU-GEMM* (voir fig.10, ci-dessous). L'environnement cellulaire intervient également outre la sécrétion de protéines diverses, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extra cellulaire sont impliquées dans la différenciation (Szilvassy, 2004).

D'autres substances présentes dans la moelle osseuse interviennent dans le processus de différenciation. Ainsi, l'acide rétinoïque est impliqué dans la croissance, la différenciation et le développement des cellules hématopoïétiques normales et transformées (Shimizu and Takeda, 2000 ; Chatpande et al, 2002). Il induit la différenciation des cellules U937 et des cellules issues de leucémies myéloïdes chroniques. La vitamine D3 (1,25 dihydroxyvitamin D3) régule la différenciation des monocytes/macrophages de cellules issues de leucémies (Sharon *et al*, 1999) ; et joue un rôle dans l'hématopoïèse (Grande *et al*, 2002).

A l'opposé, le TGFβ a été mis en évidence dans l'inhibition de la croissance et de la différenciation des cellules immunitaires, aussi bien des précurseurs que des cellules souches. De plus, la production autocrine de TGFβ par les cellules souches a été démontrée comme intervenant dans leur quiescence, notamment en agissant sur l'expression de gènes codants pour des régulateurs du cycle cellulaire (Hatzfeld *et al*, 1991 ; Iavarone and Massague, 1997) (Voir chap.5).

Au fur et à mesure de leur différenciation en monocytes, les cellules acquièrent un certain nombre de « marqueurs » qui permettent de les différencier des autres cellules myéloïdes, elles expriment notamment des récepteurs membranaires tels que : CD16, CD32 et CD64 qui sont des récepteurs pour le fragment Fc des IgG ; les intégrines CD11b, CD11c et CD11a qui peuvent lier le fragment Fc des IgE et des protéines d'adhésion ; CD14 qui facilite la liaison aux lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-. Elles acquièrent de plus la capacité de produire des cytokines, notamment : IL-10, IL-12, IL-23 (Mantovani *et al*, 2004). En général, à ce stade les cellules vont soit rester dans la circulation sanguine pendant 24 à 72h puis être éliminées, soit elles seront recrutées dans les tissus pour y phagocyter des cellules endommagées ou en fin de vie, soit elles seront activées par des cytokines d'origine bactérienne et induiront une réponse immunitaire.

Dans la pathologie de l'athérosclérose qui est décrite au chapitre 4, les monocytes jouent un rôle important dans le développement et le maintien de l'état inflammatoire caractéristique de cette maladie.

### **-1-3-La NADPH oxydase et la différenciation myélo-monocytaire:**

La NADPH oxydase est une enzyme impliquée dans la production d'anions superoxyde  $O_2^-$  et de dérivés extrêmement réactifs tels le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le radical hydroxyle (OH) et l'oxygène singulet ( $O_2$ ). Ils permettent de tuer les micro-organismes préalablement phagocytés par les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les monocytes et macrophages et les lymphocytes B.

La NADPH oxydase est un complexe composé de protéines cytosoliques et de protéines membranaires : p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> et p67<sup>phox</sup> qui sont cytosoliques ; et p22<sup>phox</sup> et gp91<sup>phox</sup> qui sont membranaires et font partie du cytochrome b<sub>558</sub>. ((Dinauer *et al*, 1987 ; Leto *et al*, 1990 ; Parkos *et al*, 1988 ; Volpp *et al*, 1989)

Les travaux de Inoue et ses collaborateurs ont mis en évidence que lors de la différenciation de cellules U937, lignée promyéloïde humaine, la protéine p47 augmente rapidement tandis que les autres protéines augmentent progressivement dans le temps (Inoue *et al*, 2001). C'est cette caractéristique que nous avons exploitée afin de vérifier l'état de différenciation de nos cellules et l'éventuelle collaboration du TGFβ1 avec le hyaluronan dans la différenciation des U937.

## *CHAPITRE 2-L'ES INTEGRINES*

Dans notre première étude, nous avons étudié le rôle des intégrines  $\alpha M\beta_2$  dans la différenciation des monocytes traités au TGF $\beta$ 1. C'est pourquoi nous développons quelques caractéristiques des intégrines ci-après.

## CHAPITRE II : La diapédèse des monocytes et différenciation en macrophages : rôle des intégrines

### **-2-1-Les intégrines:**

Les intégrines contribuent à l'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice extra cellulaire. Récepteurs transmembranaires, elles sont en relation avec le cytosquelette et participent à différentes voies de signalisation intracellulaires. Les intégrines appartiennent à la famille des glycoprotéines transmembranaires et transmettent les signaux de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur, et *vice versa*. Ce qui est appelé communément la signalisation *inside-out* et *outside-in*.

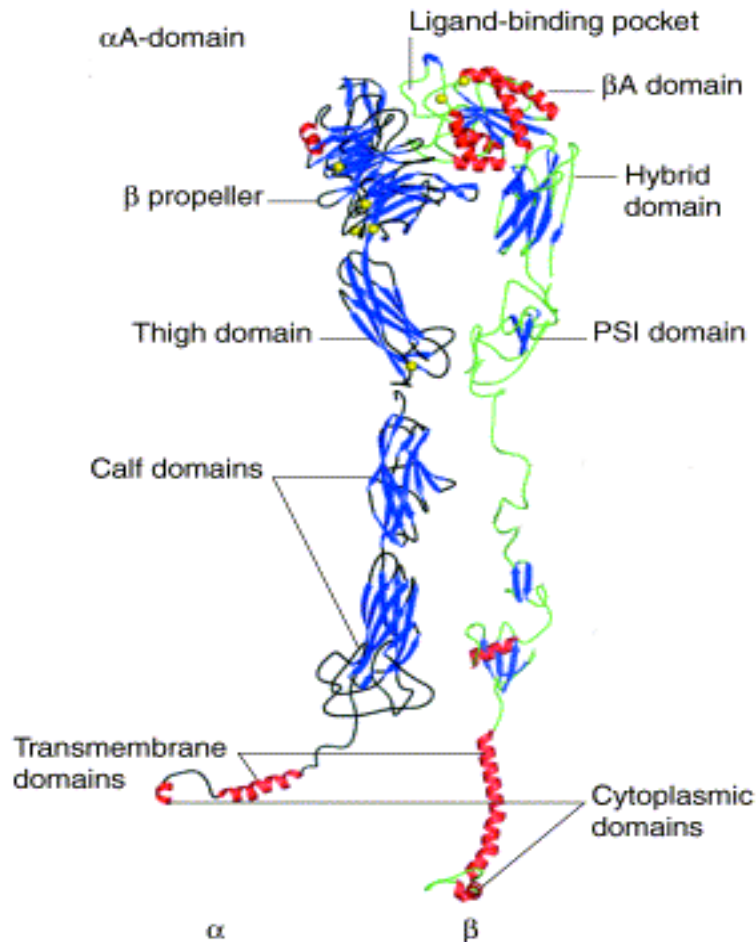
### **-2-1-1-Structure des intégrines:**

Les intégrines sont des hétérodimères composés de 2 sous-unités associées de façon non covalente : sous-unité  $\alpha$  et sous-unité  $\beta$ . A ce jour, 8 sous-unités  $\beta$  et 18 sous-unités  $\alpha$  ont été identifiées chez les Mammifères, elles s'assemblent pour former 24 intégrines distinctes. Chaque intégrine a un rôle spécifique, où la combinaison des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  détermine sa spécificité de ligands (Hynes, 2002) (Fig.2, page suivante).



cytoplasmique (Tan *et al*, 2001) (Fig.3, ci-dessous).

Ces deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  interagissent entre elles uniquement au niveau du *I-Like domain* et du domaine I.



**Fig.3. Représentation d'une intégrine ( $\alpha_v\beta_3$ )**

**D'après Humphries, M. J. et al. 2003. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble.**

***Trends in Biochemical Sciences*, 28: 313-320**

### **-2-1-2-Activation des intégrines:**

En tant que récepteurs transmembranaires, les intégrines sont capables de réagir face à des modifications externes soit directement en propageant les signaux vers l'intérieur de la cellule, soit indirectement via d'autres récepteurs qui conduisent à l'activation de protéines interagissant avec les intégrines, celles-ci en retour peuvent modifier leur liaison au ligands. Les intégrines possèdent ainsi un mécanisme de contrôle qui leur permet d'être dans une conformation active ou inactive. Ce mécanisme dépend d'une part de la configuration du site



de liaison au ligand, et d'autre part des informations provenant du cytoplasme. De plus, en réponse aux signaux reçus, la liaison au ligand intervient de deux façons différentes : par modification soit de l'avidité, soit de l'affinité des intégrines pour leur ligand.

### *Les molécules d'activation*

Les domaines cytoplasmiques sont le lieu d'interaction avec les composants du cytosquelette et différentes protéines impliquées dans la signalisation qui permettent d'activer les intégrines, de l'intérieur vers l'extérieur : *inside-out*.

Des études impliquant des mutations ou l'isolation du domaine cytoplasmique des sous-unités  $\beta$  ont mis en évidence leur rôle majeur dans le maintien des fonctions des intégrines, leur localisation correcte en membrane ou l'activation de certaines voies de signalisation. Ainsi, Zent et ses collaborateurs ont montré que CD98, une glycoprotéine transmembranaire exprimée chez les cellules hématopoïétiques, interagissait uniquement avec le domaine cytoplasmique du variant  $\beta_{1A}$ , et que cette association permettait de réguler l'intégrine et sa localisation membranaire (Zent *et al*, 2000). De même, le groupe de Retta a mis en évidence dans des myoblastes C2C12 ou des fibroblastes NIH3T3 que le domaine cytoplasmique du variant  $\beta_{1D}$  était suffisant pour inhiber la croissance cellulaire (Belkin and Retta, 1998). Les domaines cytoplasmiques des sous-unités  $\beta_1$ ,  $\beta_3$ , et  $\beta_5$  phosphorylent FAK, *focal adhesion tyrosine kinase*, en position tyrosine en réponse à l'adhérence à la matrice extracellulaire. Les acides aminés impliqués dans ce mécanisme ont été mis en évidence grâce à la construction de mutants pour la région cytoplasmique de  $\beta_3$ . Ainsi, Tahiliani et ses collaborateurs ont montré que les acides aminés situés dans le segment C-terminal et le segment proche de la membrane sont indispensables pour la phosphorylation de FAK (Tahiliani *et al*, 1997).

Plusieurs protéines qui interagissent avec le domaine cytoplasmique des sous-unités  $\beta$  ont été identifiées. Elles ont été classées en 3 catégories : les protéines qui se lient à l'actine, les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire et enfin les protéines qui n'appartiennent pas à ces deux catégories.

Parmi les protéines qui se lient à l'actine et au domaine cytoplasmique des sous-unités  $\beta$ , la taline est le premier composant qui ait été identifié, et co-localise avec les intégrines  $\beta$  au niveau des points focaux d'adhérence (Horwitz *et al*, 1986 ; Pfaff *et al*, 1998). Elle est considérée comme la protéine qui matérialise le lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine, soit par liaison directe avec l'actine, soit par liaison à la vinculine qui interagit avec l'actine. Le groupe de Schwartz a étudié la localisation de l'intégrine  $\beta_1$  mutée au niveau du

domaine cytoplasmique. Ils ont mis en évidence que lorsque ce domaine est complètement absent,  $\beta$ 1 ne peut co-localiser avec la taline, l' $\alpha$ -actinine, la vinculine, la F-actine et FAK (Lewis and Schwartz, 1995). Les autres protéines identifiées sont la filamine et l' $\alpha$ -actinine. L' $\alpha$ -actinine est une protéine qui co-localise avec les intégrines  $\beta$ 1 au niveau des points focaux d'adhérence. Pavalko et ses collaborateurs ont montré que lorsque des forces de cisaillement sont appliquées à des ostéoblastes, *in vitro*, il apparaît un remaniement des filaments d'actine en fibres de stress, mécanisme dû au recrutement des intégrines  $\beta$ 1 et de l' $\alpha$ -actinine au niveau des points focaux d'adhérence (Pavalko *et al*, 1998). La filamine est recrutée au niveau des sous-unités  $\beta$ 1 suite à des stress mécaniques et conduit au recrutement de la F-actine et à la formation des points focaux d'adhérence. Ce qui met en place un processus protégeant la cellule contre des forces de tensions externes (Glogauer *et al*, 1998). La filamine peut aussi jouer le rôle de protéine adaptatrice notamment pour la GTPase RalA qui intervient dans la régulation des mouvements du cytosquelette (Ohta *et al*, 1999).

Dans la catégorie des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, deux kinases capables de se lier aux sous-unités  $\beta$  ont été identifiées : FAK et ILK (Integrin Linked Kinase) ; ainsi que les cytohésines, des GEF de la famille des GTPases ARF (ADP Ribosylation Factor). Le site de liaison de FAK aux sous-unités  $\beta$  est localisé au niveau de son domaine N-terminal, bien que ce domaine ne soit pas nécessaire pour l'ancrage au niveau des points focaux d'adhérence. De plus, le groupe de Chen a montré que FAK n'interagissait pas toujours directement avec les sous-unités  $\beta$ . En effet, dans des cellules de Schwann en différenciation et en contact avec une lame basale, FAK ne co-immunoprécipite pas seul avec  $\beta$ 1, la paxilline est également présente et celle-ci est capable d'interagir avec l'actine (Chen *et al*, 2000). ILK (Integrin Linked Kinase) est une kinase qui peut interagir avec le domaine cytoplasmique des sous-unités  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 (Hannigan *et al*, 1996). Cette kinase se lie ensuite à des composants présents au niveau des points focaux d'adhérence et qui peuvent interagir avec l'actine: la protéine adaptatrice paxiline, les protéines PINCH 1 et 2, ainsi que l' $\alpha$ -parvine et la  $\beta$ -parvine (Persad and Dedhar, 2003). Le site de liaison d'ILK à l'intégrine se situe au niveau du domaine C-terminal. Les cytohésines sont des protéines qui d'une part se lient aux sous-unités  $\beta$ 2 et d'autre part jouent le rôle de GEF pour les GTPases de la famille ARF (Kolanus *et al*, 1996). Elles sont spécifiques des cellules leucocytaires et n'interagissent donc pas avec les autres sous-unités  $\beta$ . Les interactions entre Rap1 et les intégrines sont décrites dans le chapitre suivant. Rap1 module l'activation des intégrines et intervient aussi bien dans la régulation des lymphocytes T, dans l'activation des macrophages que dans

l'adhérence cellulaire.

Les autres protéines qui se lient aux sous-unités  $\beta$  sont nombreuses. Parmi celles-ci, nous retrouvons : l'endonexine- $\beta$ 3, la paxilline, Grb2, la Cavéoline-1, CD98 (Liu *et al*, 2000).

Bien que les séquences génétiques des sous-unités  $\alpha$  soient bien conservées à travers les espèces, elles ne possèdent entre elles que peu d'homologies de séquences (Hynes, 1992). Peu de protéines interagissant directement avec les sous-unités  $\alpha$  ont été identifiées. La F-actine est capable d'interagir avec le domaine cytoplasmique des intégrines  $\alpha$ 2, au niveau du domaine C-terminal (Kieffer *et al*, 1995); la calréticuline, protéine du réticulum endoplasmique, peut se lier directement aux sous-unités  $\alpha$  (Coppolino *et al*, 1997); la protéine CIB (calcium- and integrin-binding protein) qui est spécifique de l'intégrine  $\alpha$ 1b (Naik *et al*, 1997); la cavéoline-1, un adaptateur transmembranaire, interagit d'une part avec la sous-unité  $\alpha$  et d'autre part recrute Shc, ce qui conduit à la régulation de la voie de signalisation Ras-ERK et de la progression dans le cycle cellulaire (Wary *et al*, 1998); la paxilline, un adaptateur intracellulaire, qui se lie uniquement aux sous-unités  $\alpha$ 4 (Liu *et al*, 1999).

La sous-unité  $\beta$  est le principal site de liaison des éléments du cytosquelette et des molécules impliquées dans la signalisation cellulaire, tandis que la sous-unité  $\alpha$  sert principalement de régulateur.

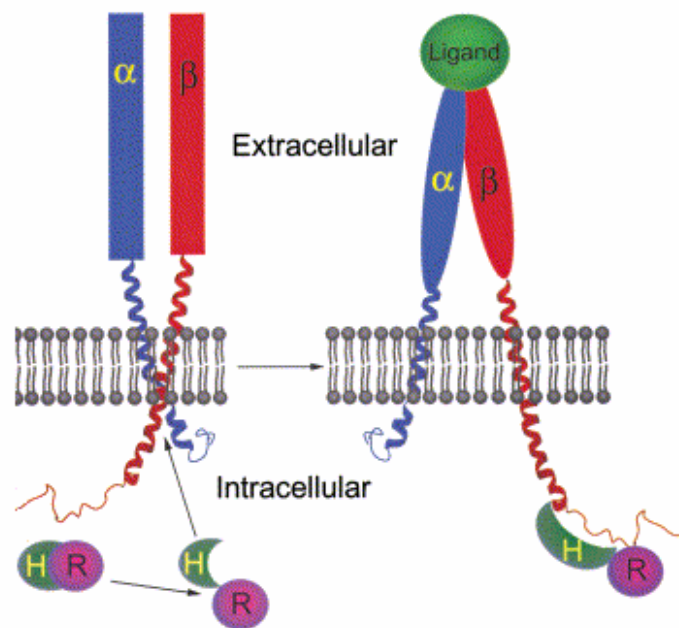
Les domaines extracellulaires sont le lieu d'interactions entre cellules et/ou entre cellules et matrice extracellulaire, les intégrines reconnaissant la séquence peptidique suivante : arg-gly-asn ou séquence RGD. Ainsi, ces domaines peuvent se lier à plusieurs types de ligands et molécules d'adhérence. Dont les principaux identifiés sont : pour les intégrines  $\beta$ 1, la laminine, la fibronectine, le collagène et VCAM-1 ; pour  $\beta$ 2, ICAM-1, 2 et 3, le fibrinogène et C3bi ; pour  $\beta$ 3, le fibrinogène, la fibronectine, la vitronectine, le facteur de von Willebrand, la thrombospondine et PECAM-1 ; pour  $\beta$ 4, la laminine ; pour  $\beta$ 5, la vitronectine et la fibronectine, pour  $\beta$ 6, la fibronectine ; et pour  $\beta$ 7, la fibronectine et VCAM-1. Les intégrines interagissent également avec des récepteurs membranaires qu'elles régulent et/ou qui les régulent. Ainsi, plusieurs travaux ont montré l'implication des intégrines dans la signalisation cellulaire par les récepteurs aux facteurs de croissance : dans les cellules endothéliales,  $\alpha$ v $\beta$ 3 participe à l'activation du récepteur au VEGF (VEGFR-2) qui est impliqué dans les processus d'inflammation, d'angiogenèse tumorale et de régénération tissulaire (Soldi *et al*, 1999) ; dans les oligodendrocytes,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 interagit avec le récepteur au PDGF (PDGF $\alpha$ R) au niveau de

compartiments particuliers -les *lipid raft*- ce qui a pour conséquence d'amplifier le signal PI3K/Akt et de promouvoir la survie et la prolifération cellulaire (Baron *et al*, 2003) ; dans les cellules endothéliales, des cytokines (TGF $\beta$  et bFGF), *via* leurs récepteurs, induisent l'expression de la sous-unité  $\alpha_5$  en membrane. Celle-ci peut se lier à la sous-unité  $\beta_1$  et ainsi agir sur l'adhérence et la migration des cellules endothéliales notamment lors du processus d'angiogenèse (Collo and Pepper, 1999).

### *L'activation*

L'activation proprement dite des intégrines est composée de deux étapes : le priming où l'intégrine acquiert la faculté de se lier au ligand c'est-à-dire le moment où le domaine de liaison (l'épitope d'activation) est exposé, et l'activation proprement dite où l'intégrine est liée à son ligand.

La transmission du signal du cytoplasme vers l'extérieur, c'est-à-dire vers le domaine extracellulaire, fait intervenir les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les premiers travaux effectués afin de mettre en évidence un quelconque mécanisme ont été réalisés sur des intégrines incomplètes, soit sur les domaines intracellulaires seuls, soit sur les domaines extracellulaires seuls. Ainsi Lu et ses collaborateurs ont montré que pour maintenir l'intégrine dans un état inactif, les domaines cytoplasmiques des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  devaient interagir. La délétion de l'un ou de l'autre provoquait l'activation de l'intégrine (Lu *et al*, 2001 ; Takagi *et al*, 2001). Weisel et ses collaborateurs ont montré chez l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  que lorsque celle-ci se lie au fibrinogène, les deux sous-unités sont séparées et orientées chacune vers une extrémité du fibrinogène (Weisel *et al*, 1992). Récemment ces résultats ont été approfondis par le groupe de Qin, chez l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , grâce à la RMN. Ainsi, à l'état inactif, les sous-unités interagissent entre elles au niveau des hélices proches de la membrane cytoplasmique en faisant intervenir des forces électrostatiques et des interactions hydrophobes. Dès rupture de cette liaison suite à l'interaction avec un élément du cytosquelette ou une protéine cytoplasmique, le changement conformationnel de l'intégrine se propage vers le domaine extracellulaire et vers le domaine de liaison au ligand (Vinogradova *et al*, 2002) (Fig.4, page suivante).



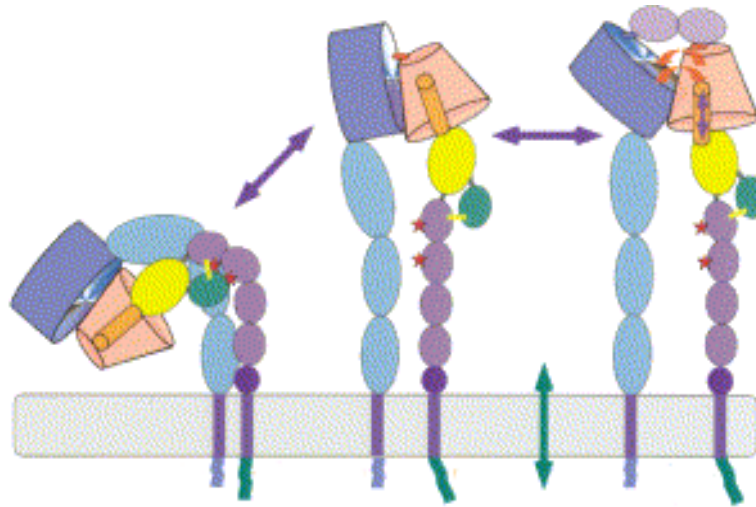
**Fig.4. Modèle des changements conformationnels subis par les intégrines lors de leur liaison à un ligand intracellulaire.**

**D'après Vinogradova, O. 2002. A Structural Mechanism of Integrin  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  "Inside-Out" Activation as Regulated by Its Cytoplasmic Face. *Cell*, 110 :587-597**

Bien que des analyses effectuées au niveau des domaines de liaison révèlent des réarrangements des structures secondaires qui laissent apparaître une « poche », la séquence conduisant à ces changements n'a pas encore été élucidée. Le modèle structural cependant proposé est le suivant (Hynes, 2002) (Fig.5, page 14): dans son état inactif, l'intégrine est repliée sur elle-même et forme un coude, le site de liaison au ligand est inaccessible ; ensuite via ces domaines cytoplasmiques, l'intégrine se lie à une protéine qui entraîne la dissociation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que l'exposition du domaine de liaison au ligand ; puis, l'intégrine interagit avec son ligand, elle se trouve en conformation active. Ce modèle est également applicable pour la signalisation outside-in où la liaison du ligand à l'intégrine provoquerait la séparation des domaines cytoplasmiques, leur permettant d'interagir avec des éléments du cytosquelette ou des protéines de la signalisation cellulaire.

La liaison des intégrines à leurs ligands est caractérisée par deux termes qui reflètent d'une part la qualité de la liaison ou l'affinité, et d'autre part la quantité du nombre de liaisons ou l'avidité. Le terme « valence » est également utilisé à la place du terme « avidité ». L'affinité résulte des changements conformationnels de l'intégrine tandis que l'avidité implique que les intégrines se déplacent à travers la membrane plasmique et se regroupent en « clusters » (Hato

*et al*, 1998). Ces régulations concernant les interactions intégrine-ligand sont le reflet du rôle joué par les intégrines.



**Fig.5. Modèle des changements conformationnels subis par les intégrines lors de leur liaison à un ligand extracellulaire.**  
 D'après Hynes, R. 2002. *Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. Cell, 110 :673-687*

### **-2-1-3-Fonctions générales:**

Les intégrines sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires tels la polarité de la cellule, l'adhérence, la migration, l'organisation du cytosquelette, la prolifération, la différenciation mais également l'angiogenèse, la réparation tissulaire, la survie, le développement, l'hémostase, etc. Elles réagissent en fonction des modifications de leur environnement où en réponse à certains signaux comme expliqué précédemment.

Ainsi, le groupe de Hall a étudié le rôle des intégrines dans la polarité cellulaire d'astrocytes en migration. Les astrocytes de rats sont soumis à un test mimant une blessure : le « scratch test » où on interrompt une monocouche de cellules. Du côté où la blessure a été effectuée, les intégrines sont capables de percevoir ces modifications et d'entraîner la polarisation et la migration cellulaire, de façon à recouvrir à nouveau l'espace artificiellement créé. Afin d'identifier le mécanisme sous-jacent, les intégrines ont été inhibées, ce qui entraîne le blocage de l'activation de Cdc42 et de PKCζ et entraîne en retour la réorientation du Golgi, la polarisation du centrosome et la formation de protrusions à l'origine de la polarisation cellulaire et de la migration des astrocytes (Etienne-Manneville and Hall, 2001).

L'implication des intégrines dans la survie cellulaire a été montrée entre autre dans des fibroblastes cultivés dans des gels 3D composés de collagène. Le groupe de Henke a en effet mis en évidence le rôle des intégrines  $\beta_1$  dans la régulation de la viabilité cellulaire. L'interaction de  $\beta_1$  avec un anticorps anti- $\beta_1$  protège la cellule contre l'apoptose induite lorsque les fibroblastes sont soumis aux tensions qui résident dans le gel 3D. En parallèle, ils ont montré que  $\beta_1$  induisait l'apoptose via la voie de signalisation PI3Kinase/Akt, et donc qu'en présence de l'anticorps anti- $\beta_1$ , la phosphorylation d'Akt était élevée et protégeait la cellule de l'apoptose (Tian *et al*, 2002). Plath et ses collaborateurs ont étudié la relation entre le suppresseur de tumeur p16<sup>INK4a</sup> et l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  dans le phénomène d'anoikis (Plath *et al*, 2000). Ce processus apoptotique se déclenche suite à la perte de contact de la cellule avec la matrice extracellulaire. Et protège contre la prolifération cellulaire et la migration anarchiques responsables de la métastase cancéreuse. La surexpression de p16<sup>INK4a</sup> dans des cellules cancéreuses de pancréas permet de rétablir le processus d'anoikis qui a été perdu lors de la transformation en cellules malignes. En effet, p16<sup>INK4a</sup> régule l'expression de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$ , celle-ci joue un rôle important dans la régulation de la croissance tumorale.  $\alpha_5\beta_1$  en absence de matrice extracellulaire (cellules non adhérentes) peut alors transmettre à nouveau un signal inhibiteur de la croissance cellulaire qui conduit à l'apoptose.

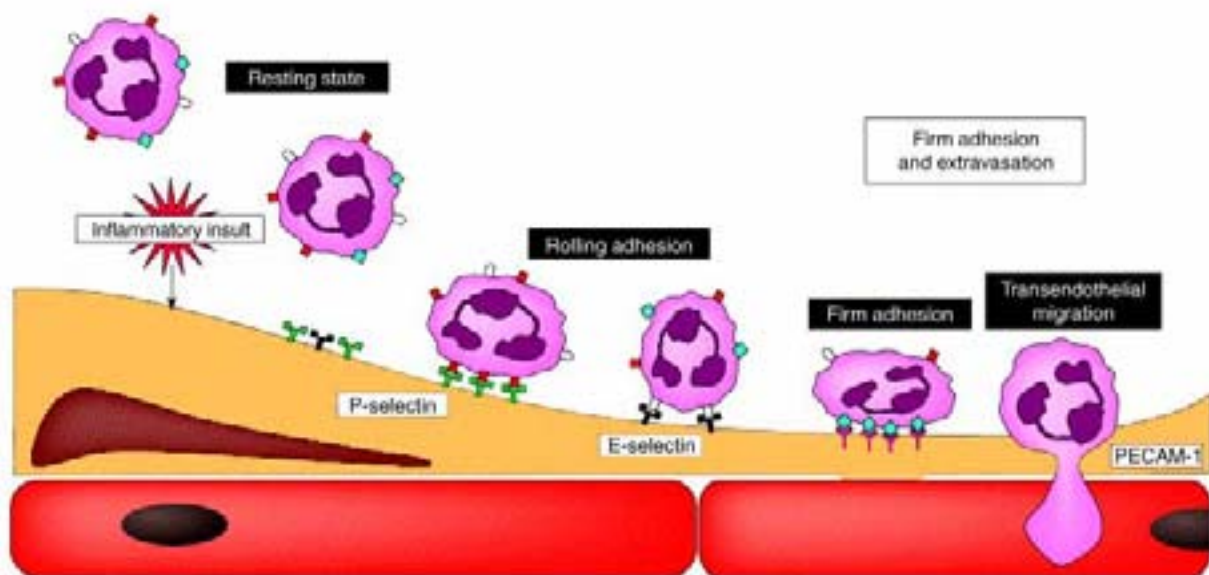
Dans les expériences d'inactivation de gènes codant pour les intégrines, DiPersio et ses collaborateurs ont étudié le rôle de l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  dans le développement de la peau chez la souris. Chez ces souris, la lame basale est désorganisée au fur et à mesure de la gestation. Et à la naissance, elle présente des boursoufflures au niveau des jonctions derme-épiderme, bien que la stratification caractéristique de la peau soit maintenue. De plus, les kératinocytes issus de ces souris mutantes sont encore capables de se lier à la laminine-5, *via* l'intégrine  $\alpha_6\beta_3$ , mais ne s'étalent pas correctement *in vitro*. Ce qui suggère que l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  joue un rôle dans l'étalement des cellules et dans le maintien de l'intégrité de la peau (DiPersio *et al*, 1997).

#### **-2-1-4-Les intégrines leucocytaires et la diapédèse:**

Tous les leucocytes expriment les intégrines  $\beta_2$ :  $\alpha_M\beta_2$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_X\beta_2$  et  $\alpha_D\beta_2$ . Et parmi ces cellules, les éosinophiles, les monocytes et les lymphocytes expriment également les intégrines  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_4\beta_7$ .

Les intégrines exprimées par ces globules blancs participent de manière parallèle ou séquentielle au processus inflammatoire. Ce processus comporte 7 étapes : recrutement des

cellules (*tethering*), « roulement ou rolling », activation, adhérence, migration transendothéliale, passage à travers la membrane basale et enfin migration vers l'espace interstitiel (Springer, 1994 ; Ley and Tedder, 1995) (Fig.6, ci-dessous). Ainsi, le recrutement des cellules fait intervenir la L-sélectine, une molécule d'adhérence; le *rolling* est dépendant de la P-sélectine et des intégrines  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_4\beta_7$ ; les intégrines  $\alpha_M\beta_2$  et  $\alpha_L\beta_2$  sont activés par des chémokines provenant des cellules endothéliales activées, ce qui induit un changement conformationnel provoquant l'exposition d'épitopes d'activation un niveau du domaine extracellulaire; l'adhérence proprement dite est dépendante des intégrines  $\beta_2$  et dans une moindre mesure des intégrines  $\alpha_4$ ; la migration transendothéliale dépend de la molécule d'adhérence PECAM-1 (CD31) ainsi que des intégrines  $\beta_2$ ; les intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_2$  sont impliquées dans la migration vers l'espace interstitiel (Ley, 1996).



**Fig.6. Schéma migration transendothélial des monocytes.**  
**D'après Kakkar and Lefer. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr. Op. Pharmacol.* 4:154-158**



## *CHAPITRE 3-LA GTPase Rap1*

Parmi les nombreux acteurs impliqués dans la propagation du signal au sein des cellules, nous sommes intéressés par la famille des protéines liant le GTP. Et notamment leur implication dans la régulation des intégrines leucocytaires. Dans ce chapitre, nous présentons la GTPase Rap1 qui fait l'objet entre autre de notre première étude.

### CHAPITRE III : La petite GTPase Rap1 et la régulation des intégrines

#### **-3-1-La GTPase Rap1:**

La majeure partie des membres de la famille des protéines liant le GTP, qui comporte les protéines G et les GTPases, sont capables d'hydrolyser le GTP. Elles sont présentes sous deux formes, une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. On peut ainsi leur attribuer le terme de « commutateurs moléculaires » (Bos *et al*, 2001). Le passage d'un état à l'autre s'effectue respectivement via l'action de GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) et de GAP (GTPase Activating Protein).

La GTPase Rap1 fait partie de la famille Ras qui comporte une grande variété de protéines caractérisées d'une part par des similitudes au niveau de leur domaine effecteur, et d'autre part par leur faculté d'assembler ou d'activer des protéines au niveau de la membrane plasmique (Bos *et al*, 2001). Dans cette famille, la GTPase Ras est le membre qui a été le plus étudié bien que Rap1 soit maintenant de mieux en mieux connu.

Les protéines Ras sont surtout connues sous leur forme oncogéniques. En effet, ces protéines sont fréquemment mutées dans les tumeurs humaines (30%) où elles sont constitutivement sous forme activée, c'est à dire liées au GTP (Bos, 1989). A l'état sauvage, ces protéines s'expriment de manière ubiquitaire et sont attachées à la membrane plasmique interne par leur extrémité c-terminale. Elles jouent un rôle notamment dans la croissance et la différenciation cellulaire.

Rap1 a, dans un premier temps, été identifié comme un antagoniste des effets de Ras (Kitayama *et al*, 1989). Ensuite, des analyses ont montré que Rap1 et Ras possèdent un domaine effecteur similaire, suggérant la possibilité pour ces deux GTPases d'interagir avec des effecteurs communs. Et notamment la sérine/thréonine kinase B-Raf (Bos, 1997). A noter que cette dernière n'est pas exprimée dans tous les types cellulaires.

Rap1 est présent sous 2 isoformes, Rap1A et Rap1B, qui se distinguent l'une de l'autre par 9 acides aminés localisés la plupart au niveau du domaine c-terminal (Noda, 1993). Comme toutes les GTPases, Rap1 existe sous une forme active liée au GTP et sous une forme inactive liée au GDP. Le passage d'une forme à l'autre est assuré respectivement par les GEF et les GAP.

Les travaux de J. L. Bos et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence l'activation de Rap1 via différents récepteurs transmembranaires, tels que les récepteurs tyrosine kinases, les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques, les récepteurs aux cytokines et les molécules d'adhérence cellulaire (Bos *et al*, 2001). Les seconds messagers permettant la transmission des stimuli externes vers Rap1 sont l'AMPc, le DAG (DiAcylGlycerol) et le Ca<sup>2+</sup>. Plusieurs effecteurs de Rap1 qui permettent de propager le signal en aval ont été identifiés, ils participent notamment à la voie de signalisation Erk. Dans les divers processus cellulaires, Rap1 est impliqué entre autre dans la prolifération cellulaire et dans l'adhérence médiée par les intégrines. Rap1 a été également mis en évidence au niveau des granules sécrétoires, il pourrait ainsi jouer un rôle dans l'exocytose. Nous allons approfondir ces différents points dans les paragraphes suivants.

### **-3-1-1-L'activation de Rap1:**

Dans différents types cellulaires, des études ont permis de mettre à jour divers stimuli permettant d'activer Rap1.

Ainsi, en 1994, le groupe de White II, a montré qu'après stimulation par la thrombine (ou par le thromboxane A2), une partie (20%) de Rap1 est rapidement (30s) localisée au niveau du cytosquelette d'actine, le reste étant transloqué moins rapidement (Fischer *et al*, 1994). Les travaux de Franke et ses collaborateurs en 1997 ont permis de montrer que la thrombine et le thromboxane A2 (TxA2), cette fois en présence de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, pouvaient activer Rap1 dans les plaquettes (Franke *et al*, 1997). L'adhérence et l'agrégation plaquettaire, processus permettant d'arrêter les saignements, sont accompagnées de modifications morphologiques dues à un profond remaniement du cytosquelette d'actine. Ces travaux mettent en évidence que Rap1 pourrait réguler des événements précoces, comme le remaniement initial du cytosquelette plaquettaire, et des événements plus lents à se mettre en place comme des changements conduisant à l'agrégation plaquettaire.

Chez les lymphocytes T, la liaison du TCR (*T Cell Antigen Receptor*) au CMH (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*) de classe II, sans co-stimulation, conduit à un état de quiescence plus ou moins long où la cellule est incapable d'engendrer une réponse. Puis, lorsqu'un signal

co-stimulateur est présent, la cellule devient complètement activée et est capable d'une part de se différencier en cellule effectrice ou en cellule mémoire ; d'autre part, la cellule activée peut également initier la transcription de gènes précoces comme ceux codant pour l'IL-2. En 1997, le groupe de Nadler a, dans un premier temps, mis en évidence la présence de Rap1 activé dans des lymphocytes T humains quiescents. Dans un second temps, il a montré que l'activation de Rap1, suite à la stimulation du TCR sans la présence d'un facteur stimulant, était responsable de l'inhibition de la transcription du gène codant pour l'IL-2, ce qui conduit à la quiescence cellulaire (Boussiotis *et al*, 1997).

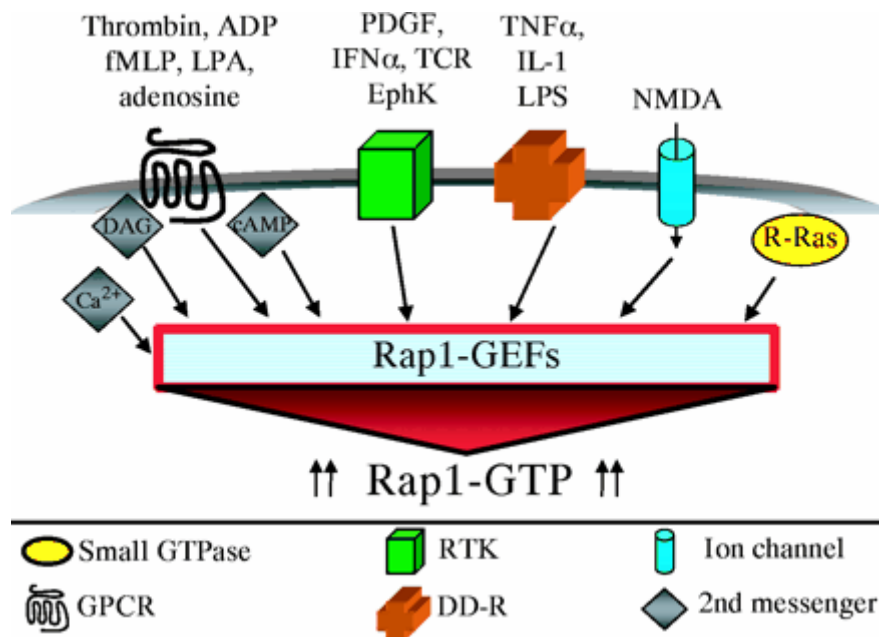
Les travaux de McLeod et ses collaborateurs sur les lymphocytes B ont également montré que Rap1 pouvait être activé via le BCR (*B Cell Antigen Receptor*). Lorsque des antigènes sont présents, ils se lient au BCR, les lymphocytes B quiescents sont alors activés et, en présence de facteurs stimulants, prolifèrent et se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps. Le BCR peut, au sein du lymphocyte B, activer Rap1 et cela dépendamment de la PLC (*Phospholipase C*) et donc du DAG (*Diacylglycerol*). L'activation de Rap1 via la liaison au BCR peut conduire soit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la quiescence, soit à l'apoptose (McLeod *et al*, 1998). La balance entre ces deux états, activation-quiescence, dépendrait respectivement de la présence ou non de signaux stimulateurs provenant des lymphocytes T.

Dans les neutrophiles, l'équipe de Bos et ses collaborateurs (M'Rabet *et al*, 1998) ont identifiés 3 composants capables d'activer Rap1 : fMet-Leu-Phe (*fMLP*, peptide chimiotactique d'origine bactérienne) et PAF (*Platelet-Activating Factor*) qui se lient à des récepteurs couplés aux protéines G; et GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) qui se lie à des récepteurs à tyrosine kinase. La voie fMLP induit l'activation de la PLC qui conduit à la libération de DAG et de Ca<sup>2+</sup>, ces derniers pouvant activer Rap1 dans les neutrophiles.

L'équipe d'Altschuler et ses collaborateurs ont montré que Rap1 était activé dans des cellules NIH3T3 traitées avec des agents capable d'augmenter l'AMPc (Altschuler *et al*, 1995) : la forskoline et le CPT-cAMP. De plus, dans les fibroblastes, les travaux de Zwartkuis et ses collaborateurs ont permis de montrer que l'activation de Rap1 était régulée par plusieurs récepteurs couplé aux protéines G ainsi que par plusieurs récepteurs à tyrosine kinase (Zwartkuis *et al*, 1998). En effet, ils ont utilisé des facteurs de croissance ainsi que d'autres substances actives pour activer Rap1. Rap1 peut donc être activé par : le PDGF (*Platelet-Derived growth factor*) et l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) qui se lient à des récepteurs à tyrosine kinase; ainsi que le LPA (*Lysophosphatidic acid*) et l'endotheline (un peptide vasoactif) qui se lient à des récepteurs couplé aux protéines G. De plus, ils ont mis en

évidence que l'activation de Rap1 par le PDGF est dépendante de la PLC et donc du DAG et du  $Ca^{2+}$ ; de même l'activation de Rap1 par l'endotheline est dépendante de la PLC.

Grâce à ces travaux, un nombre important d'acteurs impliqués dans l'activation de Rap1 a été identifié. Et actuellement, trois messagers secondaires sont connus : le DAG, l'AMPc et le  $Ca^{2+}$ . Toutefois, les mécanismes mis en œuvre restent dépendants de la stimulation ainsi que du type cellulaire (Fig.7, ci-dessous).



**Fig.7. Schéma des récepteurs et seconds messagers impliqués dans l'activation de Rap1.**

**D'après Caron *et al.* 2003. Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges. *J. Cell Sci.* 116:435-440**

### **-3-1-2-Les GEF de Rap1:**

Les GEF facilitent le passage de la forme inactive d'une GTPase, GTPase liée au GDP, à sa forme active, GTPase liée au GTP.

Plusieurs GEF spécifiques de Rap1, ou communes à d'autres GTPases comme Rap2 et Ras, ont ainsi été identifiées.

La première GEF spécifique de Rap1 qui a été clonée est C3G. Les travaux de Gotoh et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle d'activateur de C3G pour Rap1 (Gotoh *et al.*, 1995). Ainsi, ils ont mesuré *in vitro*, en présence de C3G, la rapidité d'échange du GDP par le GTP parmi certains membres de la famille Ras : Ha-Ras, N-Ras, RalA et Rap1. L'échange est le plus rapide pour Rap1. De même, dans des cellules COS7 co-transfectées par un plasmide

codant pour C3G et un plasmide codant pour Rap1, il y a une augmentation de 33% de Rap1 activé par rapport aux cellules contrôles.

C3G contient un domaine riche en résidus proline qui peut se lier au domaine SH3 de CrkI-CrkII-CrkL-Cbl, des protéines adaptatrices de la famille Crk (Tanaka *et al*, 1994). Il semble que le complexe C3G/Crk soit constitutif dans la plupart des types cellulaires, mais cette association peut être régulée et peut de ce fait modifier la propagation du signal intracellulaire. En effet, le groupe de O'Toole a mis en évidence la régulation de C3G/CrkII par les intégrines, dans des cellules CHO (Buensuceso and O'Toole, 2000). En présence de fibronectine comme source de matrice extracellulaire, Erk activé augmente dans les cellules CHO tandis que Rap1 activé et le complexe C3G/CrkII n'augmentent pas de façon significative. Au contraire dans les cellules contrôles, le complexe C3G/CrkII est abondant et Rap1 activé élevé alors que Erk est basal. De plus, en détruisant le complexe C3G/CrkII, Erk activé augmente dans les cellules CHO. Crk se lie aux protéines contenant des phosphotyrosines, comme par exemple des récepteurs à tyrosine kinase, via son domaine SH2, le complexe C3G/Crk est ainsi recruté en membrane plasmique (Kiyokawa *et al*, 1997). C3G est ensuite activé par Crk via la phosphorylation d'une tyrosine en position 504, ce qui bloque l'inhibition exercée par le domaine inhibiteur de C3G (Ichiba *et al*, 1999).

Ensuite, 2 autres facteurs d'échange pour Rap1 ont été identifiés, ils appartiennent à la famille CalDAG-GEF. Ce sont des facteurs d'échange directement activés par le Ca<sup>2+</sup> et/ou le DAG. En effet, ils possèdent un domaine de liaison au Ca<sup>2+</sup> et un domaine de liaison au DAG, l'activation de Rap1 est ainsi dépendante de la PLC. Il s'agit de CalDAG-GEFI et CalDAG-GEFIII.

CalDAG-GEFI est exprimé principalement dans les cellules du cerveau et les plaquettes (Kawasaki *et al*, 1998 ; Crittenden *et al*, 2004) et c'est une GEF spécifique de Rap1. Tandis que CalDAG-GEFIII, qui est surtout exprimé dans les cellules gliales du cerveau et les cellules mésangiales des glomérules rénaux, est un facteur d'échange pour Rap1 et Ras (Yamashita *et al*, 2000).

PDZ-GEF 1 et 2 (RA-GEF) sont des facteurs d'échange spécifiques de Rap1 et de Rap2. Ces GEF possèdent un domaine PDZ impliqué dans les interactions protéine-protéine, plus particulièrement avec les extrémités C-terminales des protéines membranaires, ainsi qu'un domaine de liaison à l'AMPc non fonctionnel. Le domaine PDZ sert à fixer la GEF en membrane, afin d'être proche de Rap1 et catalyser l'échange du GDP en GTP. PDZ-GEF1 et 2 sont exprimés dans tous les types cellulaires et activent Rap1 et Rap2 *in vitro* et *in vivo* (de Rooij *et al*, 1999 ; Kuiperij *et al*, 2003).

EPAC (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*), un autre facteur d'échange de Rap1, est activé par l'AMPc. Tout comme PDZ-GEF1, cette GEF possède un domaine de liaison à l'AMPc identique à celui de la PKA (Protein Kinase A). Ce domaine est un domaine inhibiteur qui est inactivé lorsque l'AMPc se lie à EPAC. Cependant, EPAC est une cible directe de l'AMPc. C'est ainsi une voie récente de signalisation cellulaire par l'AMPc sans l'intervention de PKA. Il existe 2 isoformes pour EPAC : Epac1 et Epac2 (de Rooij *et al*, 1998 ; de Rooij *et al*, 2000) (Fig. 7, page 25).

### **-3-1-2-Les GAP de Rap1:**

Rap1 possède une activité GTPase plus faible que Ras, elle ne peut pas passer de la forme liée au GTP à celle liée au GDP de manière rapide. Les GAP de Rap1 ont donc pour fonction d'augmenter l'activité GTPase intrinsèque de Rap1 et jouent un rôle de régulateur puissant.

Il existe deux familles principales qui exercent le rôle de GAP de Rap1 : la famille RapGAP (Rap1GAP1 et Rap1GAP2) et la famille SPA-1 (SPA-1, E6TP1, SPAL et SPAR) dont SPA-1 est le représentant principal (Polakis *et al*, 1991 ; Kurachi *et al*, 1997). La Tubérine qui est une GAP spécifique de Rap1 n'est pas associée à l'une ou l'autre de ces deux familles. Toutes les Rap1 GAP possèdent un domaine catalytique appelé GRD (*GAP-Related Domain*). Leur distribution dans les tissus est différente : RapGAP est exprimé principalement dans le cerveau, le pancréas et les reins, tandis que SPA-1 est exprimé dans les tissus hématopoïétiques. La Tubérine est exprimée par contre dans tous les tissus.

RapGAP1 est la première GAP qui a été identifiée. Elle a été purifiée à partir de deux fractions cellulaires: fraction cytosolique et fraction membranaire (Nice *et al*, 1992). RapGAP2 a ensuite été clonée à partir de cellules hématopoïétiques et cérébrales. RapGAP1 et 2 sont capables d'interagir avec respectivement  $G\alpha_z$  et  $G\alpha_i$  et d'induire l'activation de la voie Erk/MAPK en inactivant Rap1, c'est-à-dire en augmentant l'hydrolyse du GTP.  $G\alpha_z$  et  $G\alpha_i$  inactifs séquestrent RapGAP tandis que  $G\alpha_z$  et  $G\alpha_i$  activés recrutent RapGAP en membrane (Mochizuki *et al*, 1999 ; Meng *et al*, 1999). Brinkmann et ses collaborateurs ont montré un mécanisme d'action spécifique pour RapGAP où le motif impliqué est un « doigt d'asparagine » qui se loge dans le site actif de Rap (Brinkmann *et al*, 2002 ; Daumke *et al*, 2004). Le mécanisme classique découvert pour une GAP de Ras est le suivant : un motif dit en « doigt d'arginine » porté par la GAP vient s'insérer au niveau du site actif de Ras. Cela engendre un changement conformationnel de la protéine Ras et permet à la glutamine-61 du site actif de Ras de participer à l'hydrolyse du GTP (Scheffzek *et al*, 1997).

SPA-1 (*Signal-induced proliferation-associated gene-1*) est la principale GAP de Rap

présente dans les cellules progénitrices hématopoïétiques. Récemment, l'équipe d'Ishida a mis en évidence pour SPA-1 un rôle de suppresseur des tumeurs d'origine myéloïde. En effet, chez des souris invalidées pour le gène SPA-1, un nombre important de désordres qui ressemblent à ceux de la leucémie chronique myéloïde (CML) se développent. De plus, chez ces mêmes souris, le syndrome myélodisplasique (MDS) peut également apparaître (Ishida *et al*, 2003). Su et ses collaborateurs ont mis en évidence des interactions de SPA-1 avec AF-6, une protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette et l'adhérence cellulaire. AF-6 contient de nombreux domaines de liaison avec l'actine et peut également interagir avec ZO-1 (Zonula Occludens), un composant des jonctions serrées. Ils ont ainsi mis en évidence que la liaison entre SPA-1 et AF-6 nécessite une interaction entre le domaine GRD de SPA-1 et le domaine PDZ d'AF-6. De plus, AF-6 peut se lier à RapGTP et peut donc contrôler l'activation de Rap1 en recrutant SPA-1 à proximité de son substrat, facilitant de ce fait la réaction d'hydrolyse du GTP (Su *et al*, 2003). AF-6 peut également être considéré comme un effecteur de Rap1 (voir ci-après).

La Tubérine a été identifiée lors d'études sur les gènes impliqués dans la « sclérose tubéreuse », TSC ou *Tuberous Sclerosis Complex*, une pathologie humaine d'origine génétique caractérisée notamment par le développement varié de tumeurs bénignes, parfois malignes, localisées dans tous les tissus. Dans cette maladie, deux gènes mutés ont été identifiés : *TSC1* et *TSC2*. C'est le gène *TSC2* qui encode la Tubérine. Le groupe de DeClue a mis en évidence, chez des patients atteints de TSC, que Rap1 est constitutivement activé alors que la Tubérine est inactive. La Tubérine est de ce fait considérée comme un suppresseur de tumeurs (Wienecke *et al*, 1995). Récemment, Jones et ses collaborateurs ont réussi à co-fractionner la Tubérine avec la caveoline-1 au niveau des *lipids rafts*. De plus, ils ont mis en évidence l'implication de la Tubérine dans la régulation des transports post-golgiens (Jones *et al*, 2004).

### **-3-1-4-Les effecteurs de Rap1:**

Les protéines effectrices de Rap1 permettent de propager un signal en aval. Les différents effecteurs impliqués peuvent ainsi orienter la réponse cellulaire et aboutir à des cibles distinctes. Ces effecteurs dépendent du type cellulaire et du stimulus. Actuellement, peu d'effecteurs ont été identifiés.

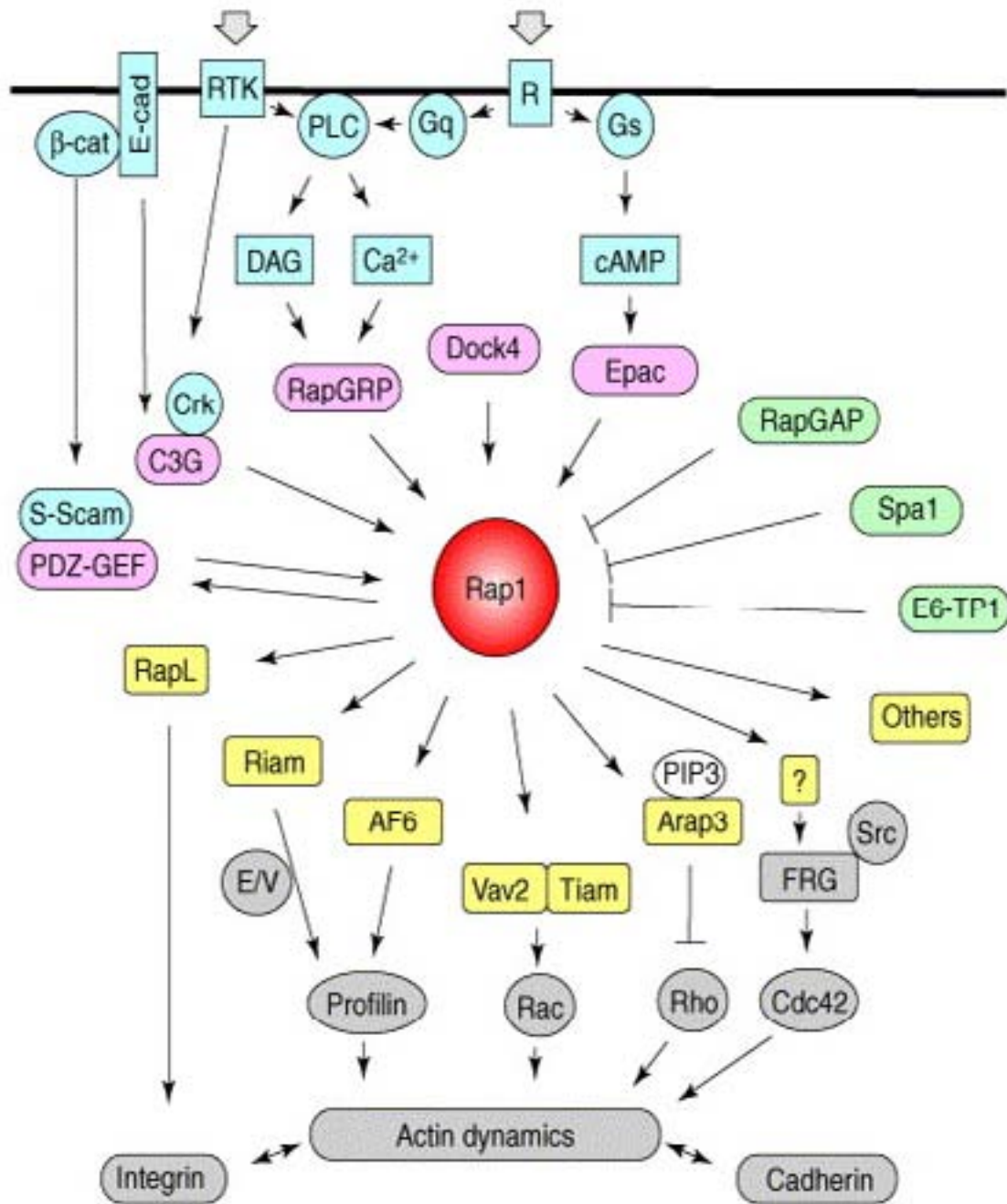
B-Raf, un membre de la famille Raf, est un effecteur de Rap1 et de Ras. Vossler et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'association de Rap1-GTP avec B-Raf est un



processus qui peut se dérouler à la membrane. L'activation de B-Raf mène à la voie de signalisation MEK/Erk/Elk-1, activation dépendante de l'AMPc mais indépendante de PKA (Ohtsuka *et al*, 1996 ; Vossler *et al*, 1997). C'est entre autre parce que Rap1 et Ras partagent ce même effecteur qu'ils sont considérés comme des antagonistes, Rap1 inhibant les effets de Ras.

RAPL, *Regulator for cell Adhesion and Polarization enriched in Lymphoid tissues*, a été isolé à partir de lymphocytes par le groupe de Kinashi. RAPL permet à Rap1 d'activer les intégrines. En effet, dans leur modèle, Rap1 activé peut, par l'intermédiaire de RAPL, activer les intégrines LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen 1) qui vont se réarranger en membrane et conduire à la polarisation de la cellule. C'est un processus qui intervient dans les synapses immunologiques, l'adhérence et la migration transmembranaire (Katagiri *et al*, 2003 ; Katagiri *et al*, 2004). Récemment, l'équipe de Mochizuki a localisé RAPL au niveau des microtubules de cellules endothéliales. De plus, ils ont mis en évidence l'implication de Rap1 dans le contrôle de la migration des cellules endothéliales lors d'essais mimant la réparation tissulaire : Rap1 activé s'associe à RAPL, ce qui induit la dissociation de RAPL avec les microtubules, et permet d'orienter la migration des cellules endothéliales (Fujita *et al*, 2005).

AF-6 (ou Afadin et Canoe chez la Drosophile) comporte, en position N-terminale, deux motifs de liaison de type RBD, *Ras Binding Domain* et un domaine PDZ. AF-6 est localisé au niveau des jonctions adhérentes et des jonctions serrées, et se lie aux cadhérines et à ZO-1, eux-mêmes en contact avec l'actine (Mandai *et al*, 1997). En étudiant le développement des souris, Zhadanov et ses collaborateurs ont montré qu'AF-6 régulait les jonctions cellules-cellules et donc l'établissement de la polarité cellulaire (Zhadanov *et al*, 1999). Boettner et ses collaborateurs ont d'une part mis en évidence pour AF-6 le rôle d'effecteur de Rap1 : AF-6 interagit avec Rap1 activé et ces derniers colocalisent à la membrane. D'autre part, ils ont identifié un régulateur du cytosquelette d'actine qui se lie également à AF-6, la profiline (Boettner *et al*, 2000). Ainsi, Rap1 peut moduler le cytosquelette d'actine grâce à son effecteur AF-6. De plus, en régulant le recrutement de RapGTP et de SPA-1, AF-6 peut contrôler l'activation de Rap1 et l'adhérence dépendante des intégrines (Su *et al*, 2003) (Voir Fig. 8, page suivante).



**Fig 8. Représentation schématique de la voie de signalisation de la GTPase Rap1.**

En bleu : les protéines et second messagers impliqués ; en rose, les GEFs de Rap1 ; en vert, les GAPs de Rap1 ; en jaune, les effecteurs de Rap1 ; en gris, les cibles potentielles de Rap1. Bos, 2005. Linking Rap to cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 17:123-128.

### **-3-1-5-Les effets biologiques Rap1:**

Les effets de Rap1 conduisent notamment à la régulation des fonctions cellulaires dépendantes ou indépendantes des intégrines.

Dans des fibroblastes de souris, Rap1 activé par C3G est impliqué dans l'adhérence et l'étalement ainsi que dans le développement embryonnaire (stades précoces) de la souris (Ohba *et al*, 2001). Dans des macrophages, en réponse au LPS, Rap1, en association avec MyD88, Irak et p38MAPK, régule l'étalement dépendant des intégrines β<sub>2</sub> (Schmidt *et al*, 2001). Des études chez la *Drosophila* ont mis en évidence le rôle de Rap1 dans la régulation des jonctions adhérentes des cellules des ailes. En effet, chez des cellules épithéliales mutantes pour Rap1, les jonctions adhérentes sont localisées à un seul côté de la cellule. Cela modifie les propriétés des cellules épithéliales et entraîne leur dispersion à travers tout le tissu (Knox and Brown, 2002). Dans des cellules épithéliales de rein, Rap1 régule l'adhérence cellulaire dépendante des cadhérines d'une part en guidant correctement les cadhérines en membrane, et d'autre part en contribuant à la stabilisation des contacts cellule-cellule; Rap1 maintient aussi les jonctions adhérentes en place (Price *et al*, 2004 ; Hogan *et al*, 2004). Rap1 est également responsable de l'étalement cellulaire, il se lie à Tiam1 et Vav2, deux GEF de Ras, et permet leur redistribution au niveau des extensions cellulaires appelées lamellipodia (Arthur *et al*, 2004).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de Rap1 dans la signalisation dite inside-out impliquant les intégrines. Dans les macrophages, Rap1 régule l'activation des intégrines α<sub>M</sub>β<sub>2</sub> (ou Mac-1) et contrôle ainsi la phagocytose de cellules cibles C3bi-opsonisées (Caron *et al*, 2000). Dans les lymphocytes, Rap1 activé par différentes chemokines (Secondary Lymphoid Tissue Chemokine et Phorbol-Myristate Acetate) induit d'une part l'adhérence des intégrines α<sub>L</sub>β<sub>2</sub> (ou LFA-1 - Leukocyte Function Associated molecule-1) à ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1), et d'autre part l'adhérence des intégrines α<sub>4</sub>β<sub>1</sub> (ou VLA-4 - Very Late Antigen-1) à VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1), ceci en augmentant l'avidité des intégrines pour leurs ligands par leur regroupement en « clusters ». Rap1 est également impliqué dans la migration transendothéliale des lymphocytes soumis à des forces de cisaillement (Sebzda *et al*, 2002 ; Shimonaka *et al*, 2003). Dans les plaquettes, Rap1 est capable de moduler l'agrégation plaquettaire et l'étalement en contrôlant les interactions des intégrines α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> (ou CD41) avec le cytosquelette d'actine, ce qui modifie l'affinité des intégrines pour leurs ligands naturels, le fibrinogène et le facteur de von Willebrand (Bertoni *et al*, 2002). Les mécanismes par lesquels Rap1 régule les intégrines ou les jonctions

adhérentes restent inconnus. Tous les effecteurs impliqués n'ont pas encore été identifiés, seul AF-6 qui se lie à ZO-1, un composant des jonctions adhérentes et des jonctions serrées qui interagit également avec les cadhérines, a été mis en évidence. ZO-1 se lie aussi à l'actine et peut donc servir d'intermédiaire entre Rap1 et les intégrines.

## *CHAPITRE 4-L'ATHEROSCLEROSE*

*Dans ce chapitre, nous présentons les caractéristiques de l'athérosclérose, une pathologie qui est initiée au niveau de l'intima des artères de moyens et gros calibres. Notre travail pourrait s'inscrire parmi les mécanismes mis en œuvre dans ce processus, notamment lors des premières étapes conduisant à l'inflammation.*

### CHAPITRE IV : Implication des monocytes/macrophages dans le contexte de l'athérosclérose

La pathologie athéroscléreuse serait de loin la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Cette maladie aux répercussions multiples est à l'origine de nombreuses complications cardio-vasculaires. En effet, en conséquence de la formation d'une plaque d'athérome, touchant l'intima et la media des artères de moyens et gros calibres, il peut s'ensuivre une série d'affections aiguës, qui dépendent de la localisation de ces plaques, telles que :

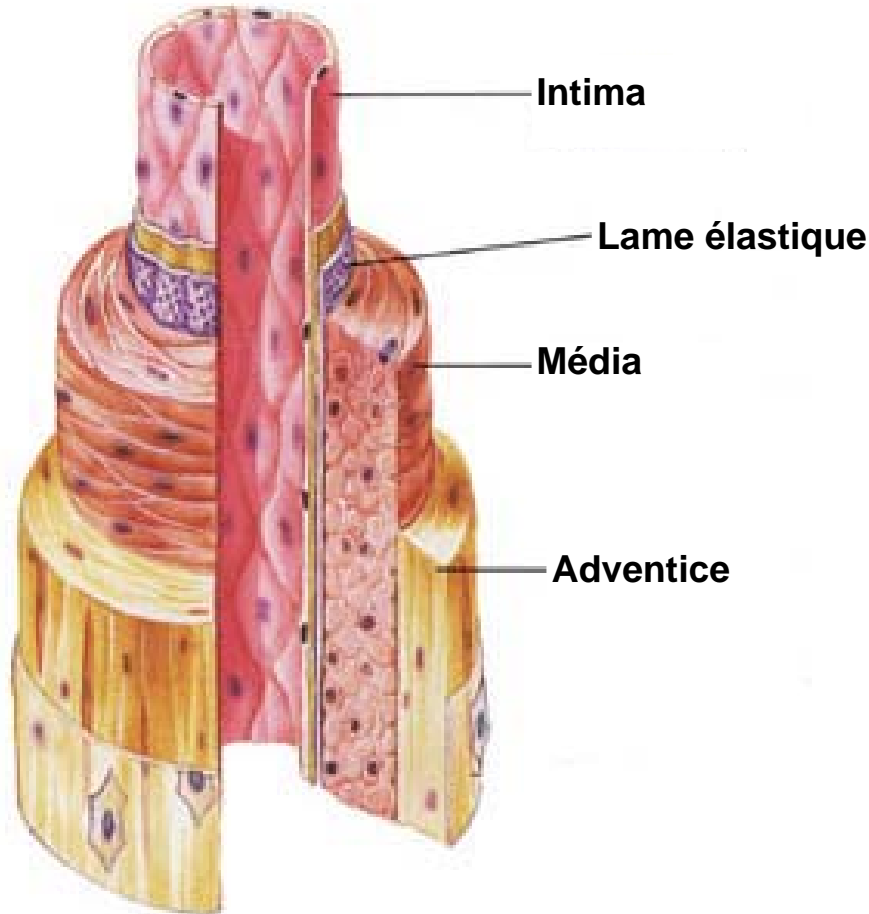
- des ischémies myocardiques ;
- des accidents vasculaires cérébraux ;
- des ischémies aiguës des membres.

L'athérosclérose consiste en une lésion histologique qui touche les grosses et moyennes artères au niveau de la tunique interne des vaisseaux, l'intima. Cette tunique subit des remaniements consistants en une accumulation locale de lipides, de polysaccharides, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, associés à des modifications de la tunique intermédiaire, la média, conduisant progressivement à la réduction de la lumière des vaisseaux. Cette pathologie est communément reconnue comme une inflammation chronique de l'intima de vaisseaux puisqu'il y a, en plus des éléments mentionnés plus haut, accumulation de cellules mononuclées, des macrophages et des lymphocytes, ainsi que des cellules musculaires lisses (Jonasson *et al*, 1986).

#### **Le processus athéroscléreux:**

La paroi artérielle est constituée de 3 tuniques concentriques : la tunique interne ou intima, composée d'une couche unique de cellules endothéliales (l'endothélium), la tunique intermédiaire ou média, constituée de cellules musculaires lisses bien organisées et la tunique externe ou adventice, qui est l'enveloppe conjonctive entourant l'ensemble (Fig.9, page suivante).

L'intima, la tunique la plus interne des vaisseaux sanguins, est constituée d'une couche unique de cellules endothéliales, d'une limitante élastique interne constituée d'élastine ainsi que d'une couche de tissu conjonctif sous-endothélial. C'est cette couche interne qui est le lieu d'initiation, de déclenchement des lésions athéroscléreuses.



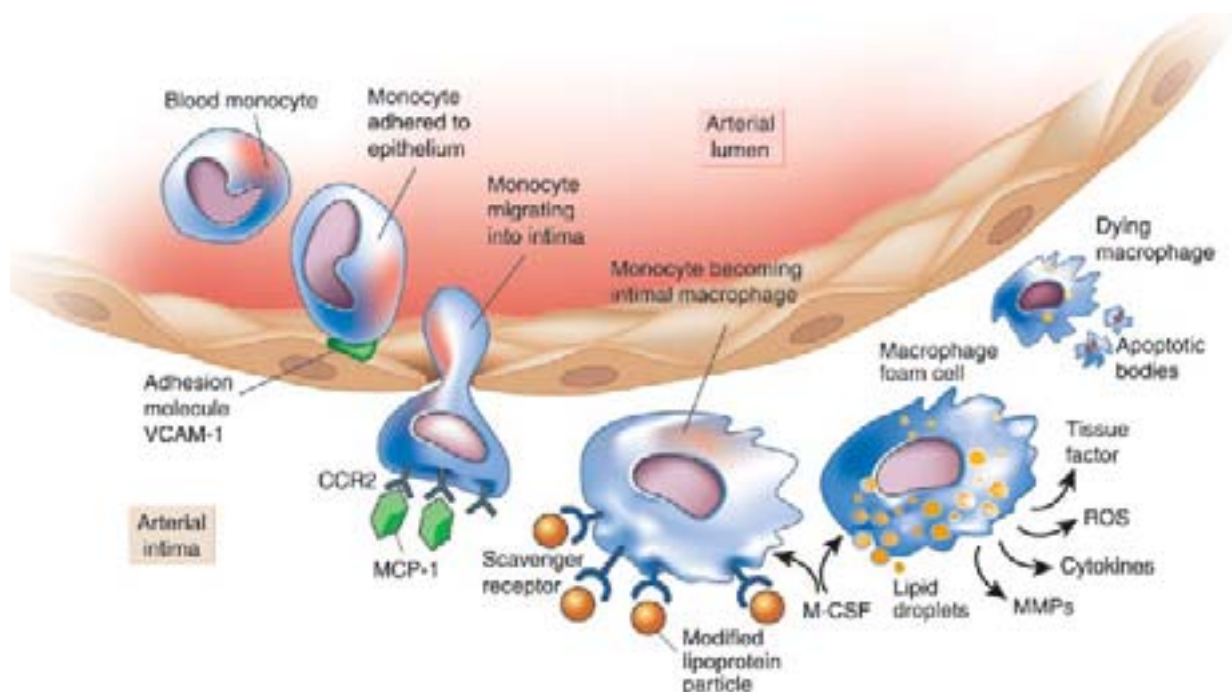
**Fig. 9. Artère en coupe.**  
D'après [www.kensbiorefs.com/humphy.html](http://www.kensbiorefs.com/humphy.html).

L'étape initiale se caractérise par un dysfonctionnement (ou activation) endothélial dont les causes sont partiellement comprises. Les bifurcations et les courbes des troncs artériels sont des régions prédisposées à développer des plaques d'athérome. Ce sont des régions où les flux sanguins sont perturbés et où l'endothélium est soumis d'une part à des fluctuations spatiales et d'autre part à des *shear stress* d'amplitudes variables. Des « senseurs » de *shear stress* ont été identifiés, il s'agit d'intégrines, de *caveolae* et de protéines G qui perçoivent les

modifications du flux sanguin et transmettent ces perturbations aux cellules qui réagissent en conséquence. En effet, les réarrangements rapides du cytosquelette des cellules endothéliales soumises à des *shear stress*, et le rôle de ce cytosquelette dans la transduction du signal, impliqueraient une voie de transduction qui débiterait par les intégrines et se propagerait via le cytosquelette (Ingber, 1998 ; Davies, 1997). De plus, les *caveolae*, portions rigides de la membrane plasmique riches en cholestérol, possèdent plusieurs molécules impliquées dans la signalisation cellulaire : des sérine et tyrosine kinases ainsi que la NO synthase, eNOS. Il a été démontré par Rizzo et ses collaborateurs que ces structures répondaient aux variations de flux en mesurant les mouvements rapides de la eNOS des *caveolae* vers le cytoplasme (Rizzo *et al*, 1998). Les protéines G sont également impliquées, elles joueraient le rôle de méchanotransducteurs. Les travaux de Gudi et ses collaborateurs ont mis en évidence que des protéines G reconstituées sous forme de liposomes, en absence de récepteurs, montraient une activité croissante en réponse à un *shear stress*. Cette augmentation d'activité pouvait être atténuée si l'on ajoutait aux liposomes reconstitués des molécules de cholestérol, rendant la construction plus rigide. Ce dernier fait est intéressant puisqu'il permettrait de mettre en relation les protéines G et les *caveolae* en tant que co-méchanosenseurs (Gudi *et al*, 1998). La présence en excès de lipoprotéines de faible densité, LDL (*low density lipoprotein*) et LDL-cholestérol, dans le sang, participe également à l'installation du dysfonctionnement endothélial. Ces particules s'accumulent sous l'endothélium ainsi que dans les cellules endothéliales et subissent alors des modifications oxydatives plus au moins importantes. Il existe plusieurs récepteurs aux LDL qui permettent aux particules lipidiques, plus ou moins modifiées ou oxydées, de pénétrer à l'intérieur des cellules. La famille des récepteurs aux lipoprotéines est actuellement constituée de 9 récepteurs : les récepteurs aux LDL, les récepteurs aux VLDL (*very low density lipoprotein*), les récepteurs aux ApoE (apolipoprotéine E), le récepteur Megalin, les récepteurs LRP et LRP1B (*LDL-receptor-related protein*), le récepteur « megalin », les récepteurs *scavenger* ainsi que les récepteurs sorLA/LRP11, LRP1b, MEGF7, LRP5/6 (Willnow *et al*, 1999 ; Chung and Wasan, 2004). Les récepteurs aux LDL ont pour rôle d'éliminer les LDL de la circulation sanguine, favorisant ainsi l'homéostasie sanguine de ces lipoprotéines de basse densité. En effet, la perte de récepteurs aux LDL a pour conséquences une augmentation du taux de LDL dans le sang et une réduction de sa dégradation (Hobbs *et al*, 1986). Cependant, des études réalisées chez des humains ou chez des lapins ont montré que ces récepteurs ne semblent pas être exprimés au niveau de l'intima des artères normale ou présentant des lésions athéroscléreuses (Ylä-Herttuala *et al*, 1991 ; Luoma *et al*, 1994). Dès lors, les récepteurs aux LDL ne participeraient



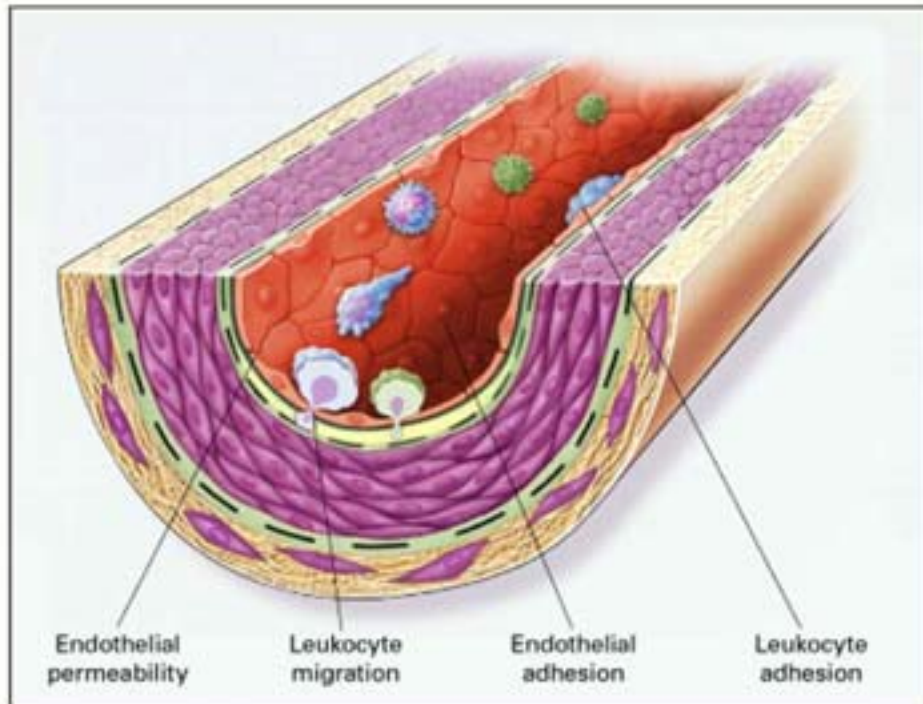
pas à la formation des cellules spumeuses. Les récepteurs aux VLDL se lient et participent à la dégradation des VLDL qui contiennent l'ApoE et aux β-VLDL. Les récepteurs aux VLDL sont exprimés au niveau de l'endothélium et des cellules musculaires lisses de la média d'artères saines. Dans les artères qui présentent des lésions athérosclérotiques, ceux-ci sont exprimés par les macrophages et les cellules musculaires lisses (Mulhaupt *et al*, 1996; Hiltunen *et al*, 1998). Les récepteurs aux VLDL peuvent contribuer à la formation des cellules spumeuses. Les récepteurs LRP se lient entre autres aux VLDL enrichies en ApoE (Krieger, 1994). Ils sont exprimés par les cellules musculaires lisses et les macrophages des artères athérosclérotiques, chez les humains, les souris et les lapins. Ces récepteurs jouent également un rôle dans la formation des cellules spumeuses (Hiltunen and Ylä-Herttuala, 1998). Les récepteurs *scavenger* qui sont exprimés par les macrophages «sains » ou par les macrophages des lésions athérosclérotiques se lient aux LDL oxydées, Ox-LDL ; l'expression de ces récepteurs est induite pendant la différenciation des monocytes en macrophages, et régulée par les cytokines présentes dans les lésions athérosclérotiques : le TGFβ, l'IFN-γ et le TNF-γ inhibent leur expression ; tandis que le M-CSF augmente leur expression (Hiltunen and Ylä-Herttuala, 1998). (Fig.10, ci-dessous)



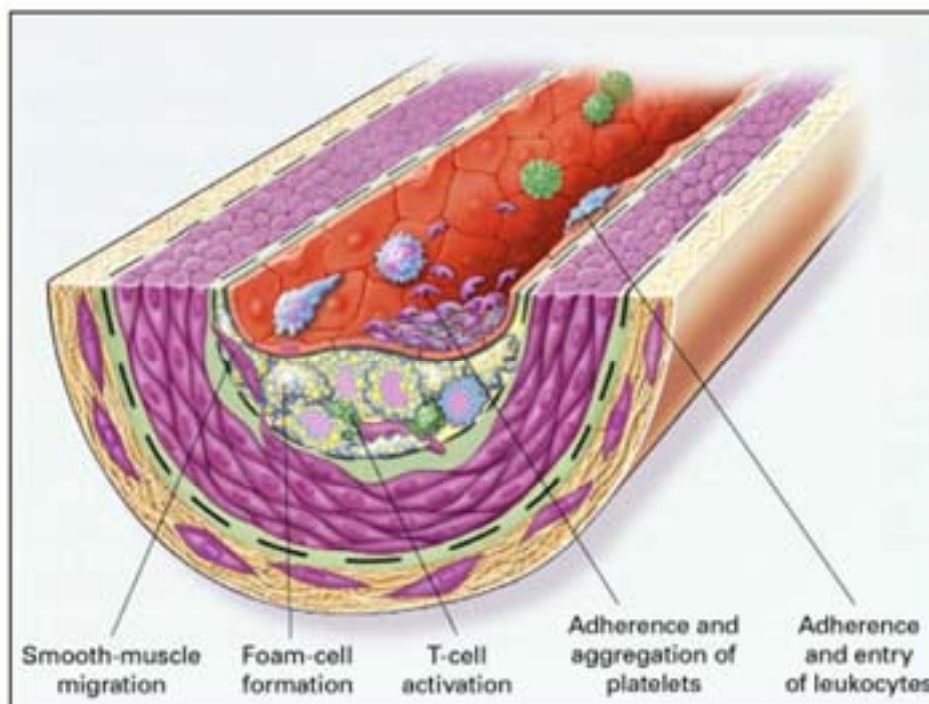
**Fig. 10. Recrutement des monocytes, migration transendothéliale et formation des cellules spumeuses.**

**D'après Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420 :868-874**

Ce dysfonctionnement transmis par les différents « senseurs » conduit à la modulation de l'expression de gènes endothéliaux. Notamment de gènes codant pour des facteurs de croissance, des cytokines, des chémokines, des constituants de la matrice extracellulaire, des molécules d'adhérence, des facteurs de transcription, etc. Ces molécules d'adhérence, VCAM-1 et /ou ICAM-1, exprimées par les cellules endothéliales activées sont capables d'interagir avec leurs ligands présents sur la membrane des leucocytes circulants (Nakashima *et al*, 1998). Parmi les chémokines secrétées, MCP-1 est un chimioattractant pour les cellules inflammatoires ; GM-CSF, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, est également secrété et permet aux macrophages recrutés de se multiplier (Rajavashisth *et al*, 1990). Ces processus concourent d'une part au recrutement et à l'adhérence de monocytes et de lymphocytes au niveau de l'endothélium (Fig.11, page suivante), et d'autre part à leur multiplication. Les monocytes ayant pénétré dans la couche intinale, sous l'influence de ces substances, vont se multiplier et se transformer en macrophages qui vont se gorger de LDL oxydées présentes dans l'espace sous-endothélial, ils vont devenir des cellules spumeuses. On est à présent au stade de « stries lipidiques » (Ross, 1999) (Fig.12, page suivante).

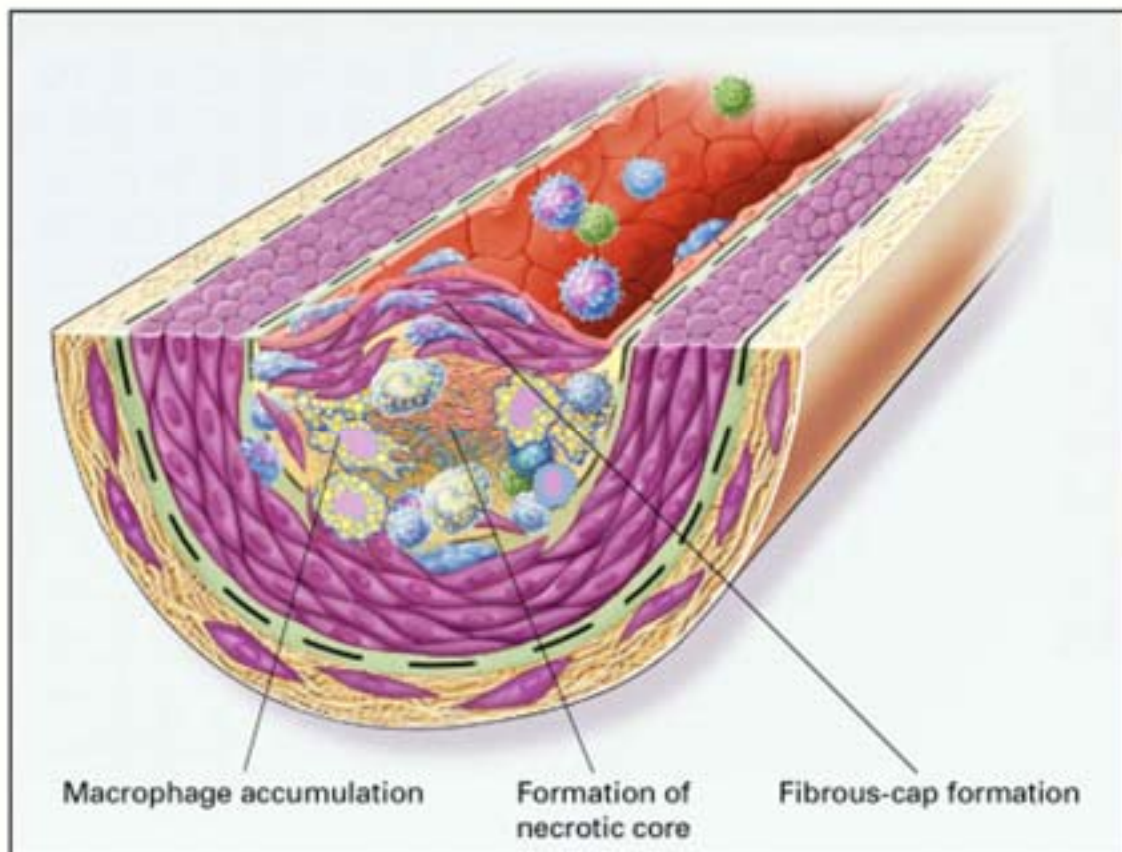


**Fig. 11. Représentation du dysfonctionnement endothélial.**  
D'après Ross, R. N. Atherosclerosis, an inflammatory process. 1999. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126



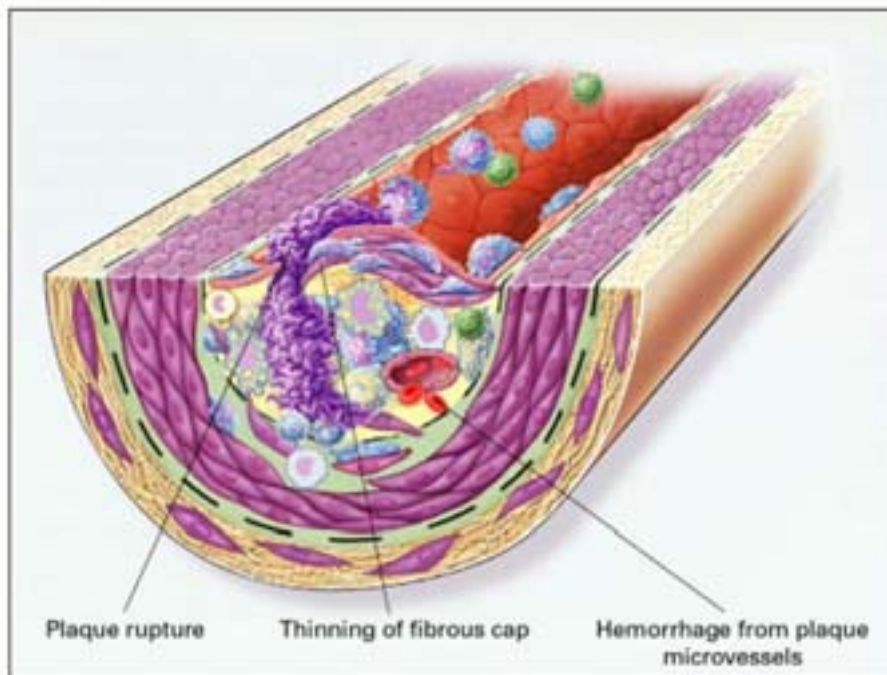
**Fig.12. Représentation du stade « stries lipidiques ».**  
D'après Ross, R. N. Atherosclerosis, an inflammatory process. 1999. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126

Le phénomène va s'amplifier car les macrophages et les lymphocytes vont entretenir le phénomène inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IFN-γ, TNF-α) ou en stimulant la production de cytokines ou de MCP-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML) de la media. Les CML vont progressivement subir un phénomène de dédifférenciation afin de migrer vers l'endothélium et construire une « chape fibreuse » entourant les cellules inflammatoires (Fig.13, ci-dessous). Cette migration s'accompagne de la production de métalloprotéinases (MMP, matrix metalloproteinases), qui dégradent la matrice extracellulaire. De plus, les cytokines secrétées par les cellules inflammatoires vont conduire à inhiber la production de collagènes de type I et III par les CML. Ensuite, celles-ci se multiplient et continuent à produire MMP-9 et MMP-3, qui ont pour rôle de dégrader notamment les protéoglycanes et l'élastine (Galis *et al*, 1994). La présence des CML permet d'une part de stabiliser la plaque d'athérome mais d'autre part, lorsque celles-ci produisent de façon massive MMP-9 et MMP-3, elles la dégradent et la fragilisent.



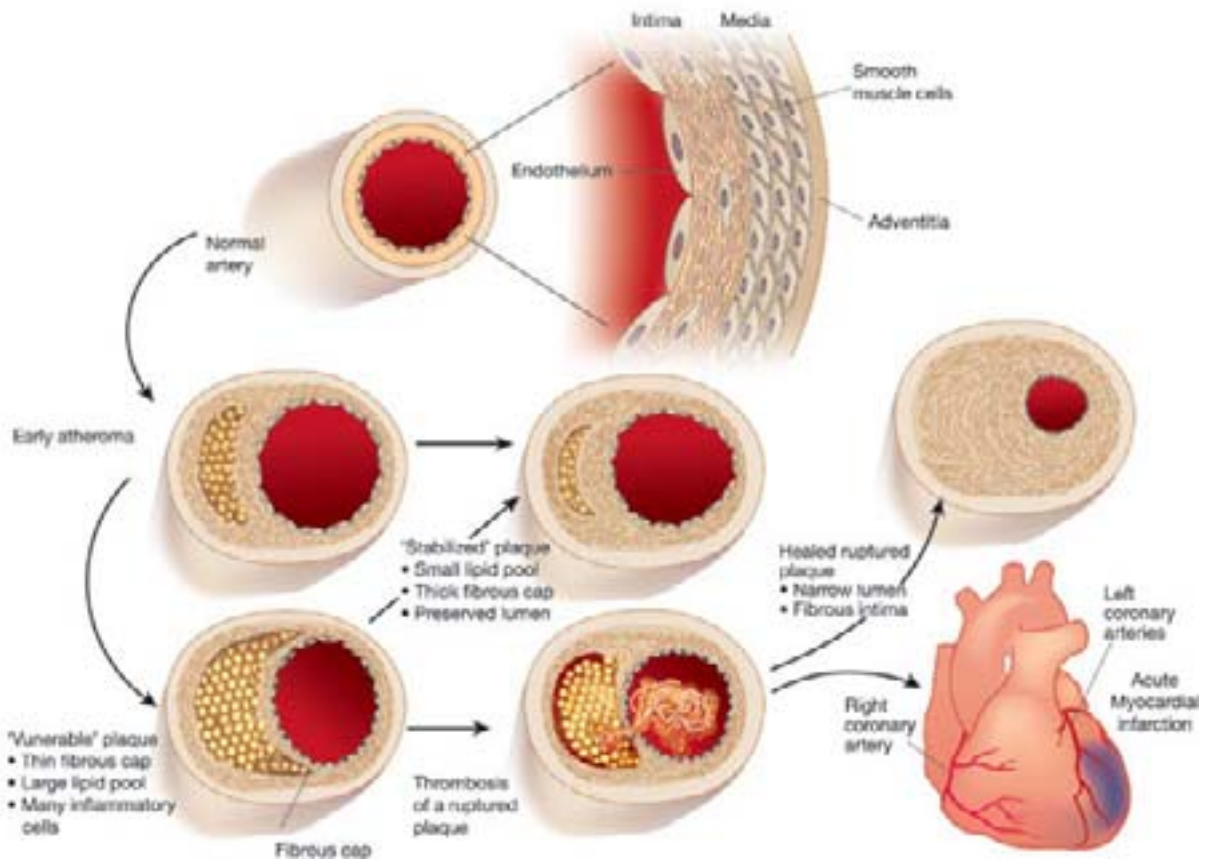
**Fig. 13. Représentation du stade « chape fibreuse ».**  
D'après Ross, R. N. Atherosclerosis, an inflammatory process. 1999. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126

L'évolution de la plaque se déroule de façon lente, sur plusieurs années en général. Progressivement, la plaque d'athérome se développe et la lumière artérielle se réduit, entraînant une sténose artérielle. Au début de la maladie, l'artère est capable de réagir et compense cette sténose en se dilatant, elle effectue un remodelage vasculaire. Petit à petit, les efforts de compensation sont trop importants à mettre en place et la sténose prend le pas sur l'artère. Plusieurs complications surviennent : rupture de plaque entraînant une occlusion de la lumière artérielle et un syndrome coronarien aigu de type angor instable ou infarctus du myocarde. Après rupture, le contenu de la plaque est alors exposé à la circulation sanguine, le système de coagulation s'installe, les plaquettes adhèrent et les risques de thromboses sont élevés (Davies *et al*, 1993) (Fig.14, ci-dessous). Cependant, certaines plaques dites stables, très fibreuses et dures, n'entraînent pas de complications majeures (Fig.15, page 36). Les facteurs de rupture de la plaque sont généralement liés à leur composition en lipides et en tissus fibreux : un centre lipidique important et une chape fibreuse très fine (Lee and Libby, 1997) ; ainsi qu'à leur contenu en métalloprotéinases (Galis *et al*, 1994). De plus, cette chape fibreuse fine doit être relativement peu solide, ce qui implique qu'elle contienne peu d'élastine et de collagène. D'autres facteurs sont également impliqués dans l'instabilité de la plaque : l'apoptose des cellules de la plaque, la rupture de néo-vaisseaux intra-plaque et l'infection.



**Fig.14, plaque instable fibreuse-rupture.**

**D'après Ross, R. N. Atherosclerosis, an inflammatory process. 1999. *N. Engl. J. Med.* 340:115-126**



**Fig. 15. Représentation schématique de l'évolution possible des plaques d'athérome.**

D'après Libby, P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420 :868-874

## *CHAPITRE 5-LE TGF $\beta$ 1*

*Nous sommes intéressés par le rôle du TGF $\beta$ 1 dans la différenciation des cellules myélo-monocytaires ; ainsi, dans ce chapitre, nous présentons les caractéristiques du TGF $\beta$ 1, ses récepteurs, les voies de signalisation induites et son rôle dans certaines pathologies.*

## CHAPITRE V: Le TGF $\beta$

### **-5-1-La famille du TGF $\beta$ :**

Le *transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ , est le chef de file d'une famille de cytokines. Cette famille comporte différentes molécules, aujourd'hui au nombre de 50 environ, dont : les TGF $\beta$ s, les *activins* et *inhibins*, les *growth and differentiation factors* (GDFs), les *Müllerian inhibitory substance* (MIS), les *glial cell line-derive neurotropic factors* (GDNF) et les *bone morphogenetic proteins*, BMPs (Kingsley, 1994).

Ces cytokines, dont les structures relativement similaires ont servi à élaborer leur classification, ont été identifiées chez la plupart des espèces, tant chez les insectes que chez les mammifères. Elles sont réparties dans tous les tissus et agissent aussi bien dans la différenciation cellulaire que dans la prolifération, la migration, l'adhésion, la réparation tissulaire et l'apoptose (Massague, 1998). De part cette distribution et ce partage de fonctions, les membres de la famille des facteurs de croissance participent dans une grande mesure à la signalisation inter- et intracellulaire qui détermine le devenir des cellules.

Nous sommes intéressés par le TGF $\beta$ (1) dont les caractéristiques sont présentées ci-dessous.

### **-5-2-Le TGF $\beta$ 1 :**

Il existe trois TGF $\beta$  différents : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3. Le TGF $\beta$ 1 est celui qui a fait l'objet d'une multitude d'études afin de cibler au mieux ses caractéristiques.

### **Les récepteurs :**

Les récepteurs aux TGF $\beta$  sont de deux types : T $\beta$ R-I et T $\beta$ R-II. Ce sont des récepteurs qui possèdent un domaine transmembranaire cytoplasmique à sérine/thréonine kinase, dont l'action est facilitée par des co-récepteurs dont le rôle est indirect. Ces co-récepteurs sont



également de deux types : le T $\beta$ R-III et l'endogline (Heldin *et al*, 1997). Ils ont été reconnus pour faciliter la présentation du TGF $\beta$  à ses récepteurs proprement dits.

Les travaux réalisés sur la caractérisation des récepteurs au TGF $\beta$  ont ainsi permis de mettre en évidence l'implication de chaque récepteur et co-récepteur dans la réponse cellulaire à cette cytokine.

#### *Les récepteurs de type II- T $\beta$ R-II :*

Les récepteurs de type II sont des glycoprotéines de 70 kDa, constituées d'un domaine extramembranaire riche en résidus cystéine, d'un seul domaine transmembranaire et d'un domaine intra-cellulaire à activité sérine/thréonine kinase suivi d'une extension C-terminale riche en résidus sérine et thréonine. Le domaine sérine/thréonine kinase de la majorité des récepteurs de type II est capable de s'autophosphoryler au niveau des résidus sérine et thréonine, ces récepteurs sont de ce fait constitutivement actifs.

#### *Les récepteurs de type I-T $\beta$ R-I :*

Les récepteurs de type I sont des glycoprotéines de 55 kDa comprenant un seul domaine transmembranaire ; elles sont constituées de 4 domaines : un domaine extracellulaire, un domaine cytoplasmique accolé à la membrane plasmique, un domaine riche en résidus glycine et sérine (SGSGSG) connu sous l'appellation de *GS domain* et un domaine C-terminal à activité sérine/thréonine kinase. Les récepteurs connus sont Alk1 et Alk5, Alk5 est exprimé dans toutes les cellules, Alk1 serait spécifique des cellules endothéliales (Lebrin *et al*, 2005). Les récepteurs de type I et II ont des structures relativement proches et conservées dans toutes les espèces. Cependant, les séquences en acides aminés des domaines extracellulaires divergent complètement. Néanmoins, il existe des résidus cystéines dans la portion extracellulaire qui leur confère une parenté structurale (Ebner *et al*, 1993).

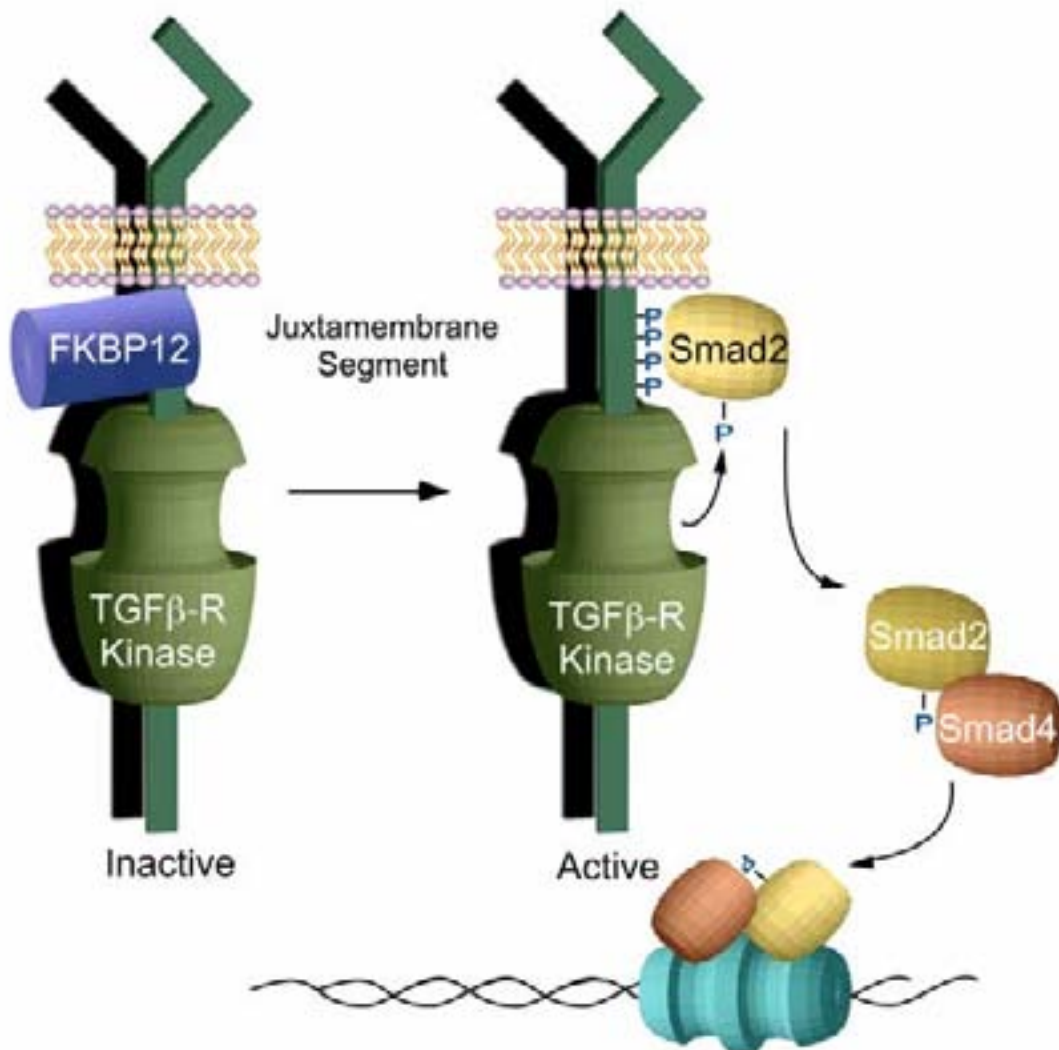
#### *Les mécanismes de liaison*

Le TGF $\beta$ , sous la forme d'un dimère, se lie au T $\beta$ R-III (dimère), ce qui facilite la présentation du TGF $\beta$  à ses récepteurs ; l'endogline joue ce même rôle dans les cellules endothéliales. Il s'ensuit alors la formation d'un complexe entre le T $\beta$ R-III (ou l'endogline), le TGF $\beta$  et le T $\beta$ R-II (dimère). T $\beta$ R-III libère alors le TGF $\beta$  et le T $\beta$ R-II, ce complexe est ainsi capable de se lier à un dimère de T $\beta$ R-I.

Le T $\beta$ R-II, qui est constitutivement actif, est capable de phosphoryler et par conséquence

d'activer le T $\beta$ R-I dans la région appelée *GS domain* (domaine riche en résidus glycine et sérine), située près de l'extrémité N-terminale du *kinase domain*. Ce qui permet de ce fait la phosphorylation de substrats et la transmission de signaux en aval. Ces substrats sont connus sous l'appellation « Smads ». Il existe plusieurs types de Smads associées à chaque membre de la famille des facteurs de croissance (Fig.16, ci-dessous).

### TGF $\beta$ receptor serine/threonine kinase



**Fig.16. Schéma des récepteurs au TGF $\beta$ .**  
D'après [www.mshri.on.ca/pawson/axonguidance.html](http://www.mshri.on.ca/pawson/axonguidance.html).

### **-5-3-La transduction du signal dépendante des Smads :** (Fig.17, page 42).

L'appellation de « Smad » provient de travaux effectués chez la *Drosophile* et chez *C. elegans*. En effet, l'implication des gènes *Sma* de la *Drosophile* et des gènes *Mad* de *C. elegans* a été mise en évidence par les travaux de Sekelsky et ses collaborateurs (Sekelsky *et al*, 1995) et de Raftery et ses collaborateurs (Raftery *et al*, 1995), lors d'études réalisées afin

de déterminer le mécanisme de signalisation en aval des récepteurs à sérine/thréonine kinase. Leurs homologues découverts chez les vertébrés ont alors été appelés gènes Smads.

Les Smads sont des facteurs de transcription dont 9 membres ont actuellement été identifiés. Leur structure est relativement comparable : deux domaines sont conservés. Il s'agit des domaines MH1 (N-terminal Mad Homology) en N-terminal, et MH2 en C-terminal, séparés par une région moins bien conservée, appelée *L segment* (Zhang and Derynck, 1999). Leur poids moléculaire est compris entre 42 kDa et 65 kDa.

Il existe 3 groupes de protéines Smads : R-Smad pour *receptor-activated Smad* (Smad 1, 2, 3, 5 et 8), Co-Smad pour *common-partner Smad* (Smad 4a et b) et I-Smad pour *inhibitory Smad* (Heldin *et al*, 2001) (Smad 6 et 7).

Le mécanisme classique de transduction du signal en réponse au TGFβ est relativement bien identifié. Après liaison du TGFβ sur ces récepteurs et activation de ces derniers, Smad2/Smad3 se lie de manière transitoire au TβR-I-Alk5 activé. Celui-ci peut alors phosphoryler Smad2/Smad3 en position C-terminale. Il s'ensuit un changement de conformation des Smads activées provoquant leur dissociation du TβR-I et leur liaison à Smad4. Ce trimère complexe est alors transloqué vers le noyau où il peut activer la transcription de gènes donnés.

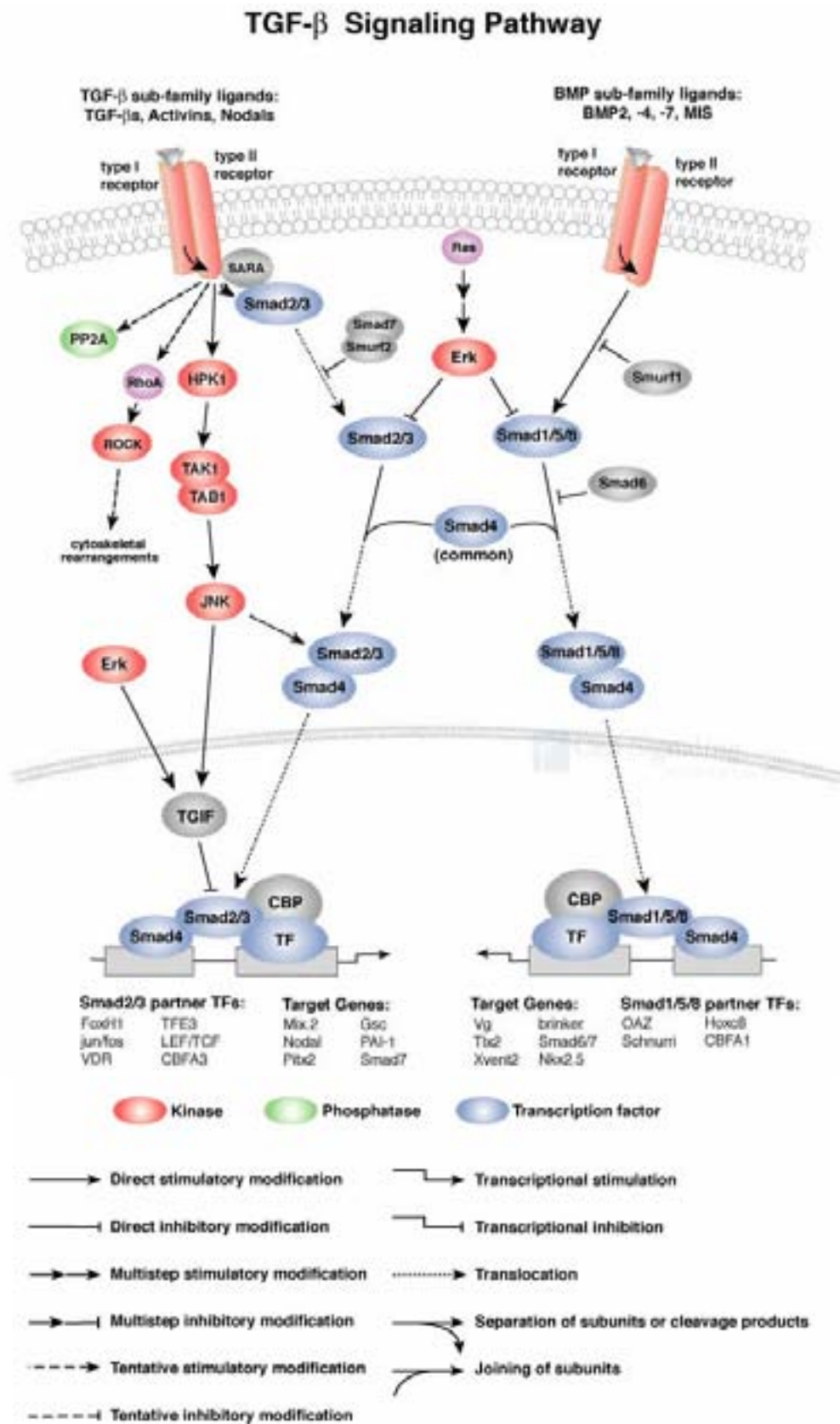
La liaison directe de Smad2 ou Smad3 au TβR-I activé n'a pour l'instant jamais été démontrée. Cependant, les travaux de Tsukazaki et ses collaborateurs (Tsukazaki *et al*, 1998) ont révélé la présence d'une protéine stabilisatrice de l'interaction de Smad2/3 avec le TβR-I : la protéine SARA, pour *Smad Anchor for Receptor Activation*, qui est une protéine adaptatrice associée à un récepteur. SARA est attachée à la membrane plasmique via un domaine FYVE (double motif appelé « doigts de zinc ») qui reconnaît le phosphatidylinositol 3'-phosphate (PI-3P). Elle possède également un domaine qui peut interagir directement avec Smad2/3 non phosphorylée. Le mécanisme mis en œuvre est le suivant : SARA recrute Smad2 ou Smad3 en membrane, proche du TβR-I et stabilise l'interaction entre ce dernier et Smad2/3. Ce qui permet l'activation et la phosphorylation des Smads de manière beaucoup plus efficace. Après la phosphorylation des Smads par le TβR-I, le complexe récepteur-SARA-Smad se dissocie et libère la protéine SARA qui pourra à nouveau interagir avec d'autres Smads non activées. Ensuite, comme expliqué précédemment, Smad2/3 interagissent avec Smad4 et sont aigüillés vers le noyau. En ce qui concerne les récepteurs au TGFβ1, Smad1/5/8 est spécifique de Alk1.

A l'instar de SARA avec Smad2/3, TRAP1 (*T $\beta$ RI-associated protein-1*) est une protéine qui interagit avec Smad4 et a été identifiée comme transporteur de celle-ci. TRAP1, se liant de manière préférentielle au T $\beta$ R-I activé, servirait à augmenter localement la concentration en Smad4 et favoriserait ainsi la formation des complexes hétéromériques Smad-2-3-4 (Wurthner *et al*, 2001).

Après son entrée dans le noyau, le complexe Smad2/3/4 se lie directement aux gènes cibles via leurs domaines MH1. Shi et ses collaborateurs ont mis en évidence dans un co-cristal de Smad3-MH1 et d'ADN que la liaison à cet ADN dépendait d'une boucle  $\beta$  (11 acides aminés) située sur le domaine MH1; et plus précisément trois acides aminés de cette boucle sont impliqués, ils forment des liaisons hydrogène avec les nucléotides des gènes cibles des Smads (Shi *et al*, 1998)

Les Smads se liant avec une faible affinité à l'ADN, des partenaires coopèrent afin d'augmenter cette affinité et permettent une spécificité du « ciblage » des gènes. En effet, les Smads sont capables de s'associer avec des protéines qui se lient également à l'ADN. Ces protéines sont soit des co-activateurs, tels c-Jun et c-Fos (Zhang *et al*, 1998), soit des co-répresseurs, tel TGIF (TGT interacting factor). Les complexes ainsi formés permettent la régulation de l'expression des gènes concernés. Le premier facteur pouvant jouer ce rôle a été identifié en 1996 chez *Xenopus* : FAST1, *forkhead activin signal transducer 1*, plus connu sous l'appellation de FoxH1 (Chen *et al*, 1996).

Parmi les gènes induits par la voie TGF $\beta$ /Smad, il y a les gènes codant pour les chaînes  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 du collagène de type I et le gène codant pour le *connective tissue growth factor* (Verrecchia *et al*, 2002). Et parmi ceux qui sont réprimés, il y a le gène codant pour la collagenase1-MMP-1 (Yuan and Varga, 2001). Ces gènes codent pour des protéines qui interviennent notamment dans la pathologie de l'athérosclérose, lors des étapes conduisant à la construction de la chape fibreuse.



**Fig.17. Voie de signalisation du TGFβ.**  
 D'après Cell Signaling Technology.

#### **-5-4-La transduction du signal non dépendante des Smads :**

Parmi les voies de signalisation induites par le TGFβ, il existe d'autres chemins indépendants des Smads.

Ainsi, le TGFβ peut activer la cascade de signalisation conduisant à la voie MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinase*, et particulièrement Erk (Extracellular Regulated Kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38MAPK. L'activation de ces voies présente cependant un caractère particulier. Effectivement, dans certains cas l'activation de ces kinases est lente et retardée, ce qui suggère un effet indirect ; dans d'autres cas l'activation est rapide et doit coïncider avec l'activation du processus de transcription de manière directe (Massague, 2000). Les mécanismes impliqués dans la réponse au TGFβ indépendamment des Smads, ainsi que leurs conséquences biologiques, ne sont pas complètement identifiés. Les kinases engagées dans de tels processus sont entièrement dépendantes des types cellulaires étudiés. Ainsi, dans les cellules épithéliales, l'activation de la GTPase Ras par le TGFβ aurait pour conséquence d'activer Erk MAPK. Wilkes et ses collaborateurs ont mis en évidence, dans les fibroblastes de mammifères, l'activation de PAK2 (p21-Activated Kinase 2) en réponse au TGFβ. Cette activation est modulée par les GTPases Rac1 et Cdc42 (Wilkes *et al*, 2003). Le TGFβ est capable également d'activer TAK1, TGFβ Associated Kinase 1, qui est une MAPK kinase kinase (MAPKKK). En retour, via MAPK kinase 4 (MKK4), TAK1 peut activer JNK (Mehra and Wrana, 2002).

Bien que ces voies soient indépendantes des Smads, la réponse au TGFβ reste complexe et peut faire apparaître une coopération de plusieurs voies ou impliquer la régulation de ces mêmes voies de signalisation entre elles. Ainsi, l'activation de Erk et JNK par le TGFβ peut aboutir à la phosphorylation des Smads et donc réguler leur activation (Funaba *et al*, 2002). L'activation de Ras/Erk MAPK par le TGFβ peut induire l'expression du TGFβ1 et de ce fait amplifier « les réponses » au TGFβ (Yue and Mulder, 2000). L'activation de la voie MAPK par le TGFβ peut aussi agir sur la voie Smad via les facteurs de transcription qui interagissent avec les Smads : c-jun, un substrat de JNK ou ATF-2 (Activating Transcription Factor 2), un substrat de p38MAPK. Ce qui montre que les différentes voies de réponse au TGFβ peuvent être en connectées entre elles. Ce qui a été mis en évidence dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Bakin *et al*, 2002). Pessah et ses collaborateurs ont aussi mis en évidence que dans la voie JNK, c-jun pouvait inhiber la signalisation via Smad2 en favorisant l'association de ce dernier avec des co-répresseurs (Pessah *et al*, 2002). Il existe ainsi une

balance entre l'activation directe des Smads et la voie MAPK qui précise la réponse cellulaire au TGFβ.

### **-5-5- Le TGFβ dans le plasma :**

Il y a plusieurs sources possibles pour le TGFβ présent dans le plasma. Une grande partie provient des plaquettes, soit par dégranulation d'une petite fraction, soit par sécrétion régulée. Ensuite, les leucocytes contiennent une grande quantité de TGFβ1 (Grotendorst *et al*, 1989 ; Assoian *et al*, 1987), plus que les plaquettes mais ces dernières sont plus nombreuses. Certains tissus en secrètent une petite quantité tels les os et les muscles (Pfeilschifter *et al*, 1999).

Le TGFβ est sécrété sous la forme d'un homodimère inactif, associé au LAP, *TGFβ Latency Associated Peptide*, et au *latent TGFβ-binding protein-LTBP*, et forme un complexe appelé « large latent complex » (Munger *et al*, 1997) ; il nécessite donc d'être activé pour agir sur les cellules et les tissus (Annes *et al*, 2003). La convertase furine peut cliver le TGFβ inactif, ce qui lui permet dès lors d'être sous forme active (Dubois *et al*, 1995).

Les travaux de Grainger et ses collaborateurs ont permis de déterminer la quantité de TGFβ dans le plasma. Cette quantité est évaluée à plus ou moins 330pmol/L, parmi celle-ci seulement 230pmol/L est sous forme activée (Grainger *et al*, 1995).

### **-5-6- Les effets pléiotropes du TGFβ :**

Le TGFβ a plusieurs rôles dans différentes fonctions biologiques normales et pathologiques.

#### *L'inflammation :*

Le TGFβ exerce des effets contradictoires dans l'inflammation : un effet pro-inflammatoire et un effet anti-inflammatoire.

*In vitro*, les effets pro-inflammatoires ont été mis en évidence notamment dans des tests mimant la réparation tissulaire : lorsque des anticorps anti-TGFβ sont introduits dans une blessure, elle se referme mais présente moins de macrophages, moins de vaisseaux sanguins et de matrice extra-cellulaire qu'une blessure non traitée (Shah *et al*, 1992 ; Shah *et al*, 1995).

Par contre, des injections intra-musculaires d'ADN plasmidique codant pour le TGFβ humain chez des rats atteints d'arthrite inhibe la progression inflammatoire de cette pathologie (Song *et al*, 1998).

Ces effets opposés s'expliqueraient de la sorte : pendant les stades précoces de l'inflammation, le TGFβ agirait de façon pro-inflammatoire en recrutant et activant les monocytes quiescents ; puis de façon anti-inflammatoire lorsque ces monocytes déjà activés se différencient en macrophages et perdent leur faculté de répondre au TGFβ (Ashcroft, 1999).

#### *L'athérosclérose:*

L'implication du TGFβ dans la pathologie de l'athérosclérose a été mise en évidence depuis quelques années. Cette maladie est considérée comme une pathologie inflammatoire chronique (Class and Witztum, 2001) où le TGFβ a un rôle à jouer.

Cette réponse inflammatoire consiste, dans une première étape, en l'activation des cellules endothéliales qui deviennent alors pro-adhésives et pro-thrombotiques. Dans ce contexte inflammatoire, il a été démontré que le TGFβ était un régulateur négatif. Il inhibe l'adhésion des neutrophiles et des lymphocytes T, et donc la migration transendothéliale qui s'ensuit (Gamble *et al*, 2001). Ce processus est contrôlé par l'inhibition sélective d'une molécule d'adhésion située à la surface des cellules endothéliales, la E-sélectine, ainsi que par l'inhibition du facteur chémoattractant IL-8 produit par l'endothélium et conduisant au recrutement des neutrophiles et des lymphocytes (Smith *et al*, 1996).

Il a été montré également que des forces de cisaillement, ou *shear stress*, pouvaient non seulement induire l'expression de molécules d'adhésion en surface des cellules endothéliales, mais également la transcription du TGFβ1, son expression et surtout son activation (Ohno *et al*, 1995). Récemment, Mallat et ses collaborateurs ont mis en évidence le rôle protecteur du TGFβ dans l'athérosclérose (Mallat *et al*, 2001). En effet, chez des souris ApoE déficientes, l'utilisation d'un anticorps anti-TGFβ1, afin d'inhiber la signalisation induite par le TGFβ1, entraîne une accélération du développement des lésions athéroscléreuses. Chez ces mêmes souris, le TGFβ1 a également été impliqué dans la stabilisation des plaques d'athéromes. En effet, l'inhibition du TGFβ1 entraîne un changement de morphologie des plaques, elles acquièrent un phénotype inflammatoire : le tissu fibreux diminue, les corps lipidiques augmentent de volume et le nombre de cellules inflammatoires augmente. De plus, les hémorragies intraplaques sont plus fréquentes et il y a accumulation de fibrine (Lutgens *et al*, 2002). Chez des patients présentant des plaques d'athérome asymptomatiques, le taux de TGFβ1 intraplaque est plus élevé, en comparaison avec le taux de TGFβ1 de plaque symptomatiques. Dans ce contexte, le TGFβ1 pourrait jouer un rôle dans la stabilisation des



plaques (Cipollone *et al*, 2004).

#### *La pathologie cancéreuse:*

Le TGF $\beta$  est impliqué en tant que suppresseur de tumeurs dans les stades précoces de la maladie, mais dans les stades avancés il peut activer la croissance tumorale en agissant sur l'angiogenèse, la formation de la matrice extracellulaire et l'immunosuppression. Ce double rôle a été mis en évidence dans un modèle de souris transgéniques mimant la carcinogenèse épidermique (Cui *et al*, 1996).

Des mutations à chaque étape de la voie de signalisation dépendante des Smads ont été mises en évidence par différentes équipes. Les travaux de Markowitz et ses collaborateurs ont permis d'identifier que le gène codant pour le T $\beta$ R-II était régulièrement muté dans les formes héréditaires du cancer du colon (Markowitz *et al*, 1995). D'autre part, des mutations dans le gène codant le T $\beta$ R-I ont été découvertes dans les cellules du cancer de la prostate (Kim *et al*, 1996), dans la leucémie chronique lymphatique (DeCoteau *et al*, 1997), dans les carcinomes pancréatiques (Goggins *et al*, 1998) et les cancers du sein de stade avancé (Chen *et al*, 1998). Dans de nombreux cancers du pancréas, des mutations au niveau du gène codant pour Smad4 ont été mises en évidence (Hans *et al*, 1996) quant au gène codant pour Smad2, il a été impliqué dans les cancers colorectaux et du poumon (Riggins *et al*, 1997).

#### *L'angiogenèse:*

L'angiogenèse est un mécanisme de neovascularisation qui prend naissance à partir d'un réseau capillaire préexistant. Particulièrement importante et indispensable à de nombreux processus physiologique tels que le développement embryonnaire, l'implantation du placenta, la cicatrisation, l'angiogenèse intervient également dans des processus pathologiques, en particulier lors de la croissance des tumeurs et le développement des métastases. Ce processus implique plusieurs étapes. Une phase d'activation : activation des cellules endothéliales, migration et prolifération ; et une phase de résolution : réorganisation et finalement stabilisation du néovaisseaux. Le TGF $\beta$  peut agir à chaque étape et dès lors exercer des effets pro-angiogéniques et anti-angiogéniques.

Ainsi, le TGF $\beta$  induit la différenciation des cellules précurseurs en péricytes et en cellules musculaires lisses, il induit la production de matrice extracellulaire et il inhibe la prolifération des cellules endothéliales (Carmeliet, 2000). Il peut agir également sur d'autres facteurs de croissance tels que le VEGF et le bFGF et modifier leurs actions dans le processus

d'angiogenèse (Pepper, 1997).

### **-5-7- Le TGF $\beta$ et l'hématopoïèse:**

Les cellules sanguines sont générées par des cellules souches hématopoïétiques selon un processus appelé hématopoïèse. Ce processus débute au niveau du mésoderme extra-embryonnaire par l'apparition d'îlots sanguins issus d'hémangioblastes précurseurs : des ensembles d'érythrocytes primitifs nucléés entourés de cellules endothéliales (Mikkola and Orkin, 2002). Pendant le développement embryonnaire, ces précurseurs migrent vers le sac vitellin et l'aorte dorsale, puis vers le foie fœtal et vers la moelle osseuse, peu avant la naissance (Yoder *et al*, 1997 ; Larsson and Karlsson, 2005).

Au niveau de l'hématopoïèse, le TGF $\beta$  exerce des effets plus ou moins importants durant les différents stades du développement embryonnaire. Les travaux de Larsson et ses collaborateurs ont montré que le TGF $\beta$ 1 n'était pas impliqué dans l'hématopoïèse et particulièrement dans le développement des cellules progénitrices hématopoïétiques (Larsson *et al*, 2003 ; Larsson and Karlsson, 2005). Il exercerait même un rôle inhibiteur de l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques (Park *et al*, 2004). Cependant, le rôle exercé par le TGF $\beta$  sur les progéniteurs plus matures, c'est-à-dire les cellules plus avancées dans la différenciation, semble complexe. *In vitro*, le TGF $\beta$  inhibe les divisions cellulaires de cellules souches hématopoïétiques murines ou humaines (Sitnicka *et al*, 1996 ;). Et *in vivo*, le TGF $\beta$  inhibe la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques issus de la moelle osseuse (Goey *et al*, 1989). Les effets du TGF $\beta$  sur la croissance des cellules et leur maintien dans un état de quiescence s'exercerait soit par la régulation du cycle cellulaire soit par l'induction de l'apoptose (Batard *et al*, 2000 ; Dybedal *et al*, 1997).

*CHAPITRE 6 – CD44 ET SON LIGAND, LE  
HYALURONAN*

*CD44 et son ligand, le hyaluronan, sont présentés dans ce chapitre. Les résultats impliquant le TGFβ1 et CD44 dans la différenciation des cellules U937 font l'objet de notre seconde étude qui est présentée dans la deuxième partie des résultats.*

## CHAPITRE VI: CD44 et son ligand, le hyaluronan

### **-6-1-Le hyaluronan:**

Le hyaluronan ou acide hyaluronique est un polysaccharide composé de motifs répétés d'acide glucuronique et de N-acetylglucosamine. Il appartient à la famille des glucosaminoglycanes qui comporte l'héparan sulfate et le chondroïtine sulfate. Après synthèse, le hyaluronan est incorporé soit à la membrane plasmique soit à la matrice extracellulaire (Weigel *et al*, 1997). Le hyaluronan possède des caractéristiques hydrodynamiques particulières : il présente une certaine viscosité et a la possibilité de retenir des particules d'eau. Il joue ainsi un rôle important dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et l'intégrité biomécanique ; il intervient dans la motilité cellulaire, il régule les interactions entre cellules et entre cellule-MEC, il induit la prolifération cellulaire, etc (Stern, 2004).

Le hyaluronan peut interagir avec des récepteurs membranaires spécifiques tels que le récepteur CD44 et le récepteur RHAMM (receptor for hyaluronic-acid-mediated motility), et de ce fait induire la transduction de signaux intracellulaires divers, de manière directe ou par l'intermédiaire d'autres récepteurs (Turley *et al*, 2002). Ces signaux influencent la prolifération cellulaire, la survie et la motilité. Le gène codant pour le récepteur RHAMM subit un épissage alternatif qui a pour résultat d'engendrer des récepteurs de différentes formes, localisés aussi bien au niveau des membranes cellulaires internes qu'externes. De même, le gène codant pour CD44 peut subir un épissage alternatif. Bien que le hyaluronan soit le ligand majeur de CD44, d'autres protéines peuvent interagir avec CD44 : l'ostéopontine, des facteurs de croissance et des métalloprotéinases (Ponta *et al*, 2003). La synthèse du hyaluronan fait intervenir des HAS, *Hyaluronan Synthase*. Elles sont au nombre de 3 : HAS-1, HAS-2 et HAS-3 (Itano *et al*, 1999). Et sa dégradation fait intervenir des hyaluronidases, HYAL, dont 6 ont été identifiées dans le génome humain.

### **-6-CD44**

CD44 est un récepteur membranaire qui participe à de nombreux processus tels la croissance, la survie, la différenciation et la motilité cellulaire. Le gène codant pour CD44 est extrêmement bien conservé à travers les espèces et génère par épissage alternatif différentes

isoformes de CD44 (Screaton *et al*, 1992).

L'inactivation du gène codant pour CD44 au niveau de plusieurs exons résulte en divers phénotypes. Ainsi, des souris CD44<sup>-/-</sup> qui sont viables présentent cependant certaines anomalies : migration des progéniteurs myéloïdes perturbée, colonisation de la moelle osseuse, migration des lymphocytes vers les nodules lymphatiques et le thymus (Schmits *et al*, 1997 ; Protin *et al*, 1999). De plus, lorsque ces souris CD44<sup>-/-</sup> sont croisées avec des souris apoE<sup>-/-</sup>, le nombre de lésions athéroscléreuseuses est réduit ainsi que le nombre de macrophages présents dans ces lésions (Cuff *et al*, 2001). La migration cellulaire, processus où le CD44 est impliqué, nécessite un réarrangement du cytosquelette. In vitro, CD44 est localisé au niveau des microvillosités et des régions riches en actine polymérisée, où CD44 s'associe au cytosquelette d'actine. Cependant, cette interaction n'est pas directe mais CD44 interagit avec des protéines associées au cytosquelette : les protéines ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) et MERLIN (Moesin-Ezrin-Radixin-Like-Protein) qui relient les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine (Thorne *et al*, 2003). Dans un modèle murin de carcinome mammaire, CD44 interagit avec MMP-9 qui dégrade le collagène IV, ce qui a pour conséquence d'induire une invasion cellulaire tumorale (Yu *et al*, 1999).

### **-6-3-Interactions avec le TGFβ:**

L'interaction du TGFβ1 avec CD44 et le hyaluronan n'a pas été explorée de manière exhaustive. Peu de données sont à ce jour disponibles. Cependant, quelques travaux ont permis d'identifier les implications de cette interaction.

Les travaux de Ito et ses collaborateurs ont récemment mis en évidence l'association de CD44 avec le TβR-I dans des cellules épithéliales de reins préalablement traitées à l'acide hyaluronique (Ito *et al*, 2004). Le TGFβ1 joue un rôle dans la synthèse du hyaluronan. Ainsi, Stuhlmeyer et ses collaborateurs ont montré que chez des cellules humaines de type fibroblastes, le TGFβ1 était un puissant activateur de la transcription du gène codant pour la HAS-1 (Stuhlmeyer and Pollaschek, 2004). Puis, dans des fibroblastes de lapin, un traitement au TGFβ1 induit une augmentation de l'expression de la HAS-2 mais pas de la HAS-3 (Tanimoto *et al*, 2004).

## *OBJECTIFS DES TRAVAUX*

### **Objectifs de ces études :**

Les objectifs de ces travaux sont d'élucider le ou les rôles du TGF $\beta$ 1 dans la différenciation myélo-monocytaire.

Ainsi, dans la lignée U937, lignée promyéloïde humaine, nous avons dans un premier temps étudié l'implication du TGF $\beta$ 1 avec l'intention de mettre, éventuellement, en évidence son rôle dans une voie de transduction du signal qui serait indépendante des Smads. Le protocole que nous utilisons et qui est expliqué dans la publication ci-après permet de mimer le processus qui se met en place *in vivo*. Ainsi, les cellules se différencient et acquièrent un phénotype de monocyte circulant ou de macrophage. Nous avons mis en évidence que le TGF $\beta$ 1 réduisait considérablement l'expression du néo-épitope d'activation de CD11b ( $\alpha_M$ ). Ce qui nous a conduit à rechercher le mécanisme sous-jacent à ce phénomène. Les travaux de Caron et Hall sur la GTPase Rap1 et la modulation des intégrines nous ont permis de nous orienter vers cette voie de signalisation. Donc, des expériences de précipitation sélective de la forme active de Rap1, Pull Down de Rap1-GTP, ont été réalisées sur les U937 à différents stades de différenciation. Il se trouve que Rap1-GTP est considérablement réduit après traitement au TGF $\beta$ 1. Nous avons ensuite tenté d'identifier un ou des candidats responsable(s) de la transmission du signal initié par le TGF $\beta$ , passant par Rap1 et conduisant aux intégrines. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'expression d'une GEF de Rap1, EPAC, était considérablement réduite après traitement au TGF $\beta$ 1.

En conclusions, nous avons mis en évidence que la régulation des intégrines  $\alpha_M\beta_2$  par le TGF $\beta$ 1 impliquait la régulation de l'expression de EPAC et la réduction en quantité de Rap1-GTP. Nous avons ainsi identifié un rôle du TGF $\beta$ 1 dans une voie de transduction du signal.

Dans un second temps, nous avons tenté d'identifier le rôle du TGF $\beta$ 1 et du CD44 dans la différenciation de cellules U937. En effet, CD44, qui est un récepteur pour le hyaluronan, est impliqué dans la différenciation myéloïde normale, c'est un composant majeur de la matrice extracellulaire de la moelle osseuse. De plus, en présence de hyaluronan, CD44 permet aux cellules leucémiques myéloïdes de se différencier complètement. Des études récentes ont également montré que CD44 et le TGF $\beta$ RI pouvaient s'associer.

Pour ce faire, nous avons cultivé les U937 en présence de TGF $\beta$ 1 seul, d'un anticorps anti-CD44 ou de hyaluronan et de TGF $\beta$ 1 + anti-CD44 ou hyaluronan. La différenciation des

monocytes permettant à la NADPH oxydase de devenir fonctionnelle, nous avons suivi la présence d'un de ses composants, P47<sup>phox</sup>, en présence des différents stimuli cités plus haut. Nous avons mis en évidence que le TGF $\beta$ 1 seul ne permet pas l'expression d'une NADPH oxydase fonctionnelle. De même, le hyaluronan (ou l'anti-CD44) ne permet pas non plus l'expression d'une NADPH fonctionnelle. Par contre, la combinaison des deux augmente l'expression de P47<sup>phox</sup>. Le TGF $\beta$ 1 et le hyaluronan combinés interagissent dans la différenciation des cellules U937.



## *RESULTATS*

## *RESULTS*

### **-1- Inhibitory control of TGF $\beta$ 1 on the activation of Rap1, CD11b, and transendothelial migration of leukocytes**

*Basoni C, Nobles M, Grimshaw A, Desgranges C, Davies  
D, Perretti M, Kramer IM, Genot E.*

**FASEB J. 2005 May; 19:822-4.**

*The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.04-3085fje. Published online March 3, 2005.

## Inhibitory control of TGF- $\beta$ 1 on the activation of Rap1, CD11b, and transendothelial migration of leukocytes

Caroline Basoni,<sup>\*,†</sup> Muriel Nobles,<sup>‡</sup> Andrew Grimshaw,<sup>§</sup> Claude Desgranges,<sup>\*</sup> Derek Davies,<sup>¶</sup> Mauro Perretti,<sup>||</sup> IJsbrand M. Kramer,<sup>\*,†</sup> and Elisabeth Genot<sup>\*,†</sup>

<sup>\*</sup>U441 INSERM, 33600 Pessac; <sup>†</sup>Molecular and Cellular Biology Section, European Institute of Chemistry and Biology, 33600 Pessac, France; <sup>‡</sup>Department of Medicine, Rayne Institute, University College London, London WC1E 6BT; <sup>§</sup>Imperial College, Kennedy Institute, London W8 8LH; <sup>¶</sup>Cancer Research UK, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX; and <sup>||</sup>Department of Biochemical Pharmacology, Barts & the London School of Medicine, London E1 2AD, United Kingdom

Corresponding author: Dr. IJsbrand Kramer, European Institute of Chemistry and Biology, INSERM U441, University of Bordeaux-1, C/o Avenue des Facultés, 33405 Talence, France.  
E-mail: i.kramer@iecb.u-bordeaux.fr

### ABSTRACT

$\beta$ 2-Integrins are a family of dimeric adhesion molecules expressed on leukocytes. Their capacity to bind ligand is regulated by their state of activation. CD11b, an  $\alpha$ M $\beta$ 2 integrin, is implicated in a number of physiological and pathological events such as inflammation, thrombosis, or atherosclerosis. The GTPase Rap1 is essential for its activation and could therefore play a strategic role in the regulation of leukocyte functioning. Because low levels of circulating TGF- $\beta$  have been linked with severe atherosclerosis, we have assessed the role of this cytokine in the regulation of Rap1 and CD11b activation in differentiated U937 cells and in human peripheral blood monocytes. TGF- $\beta$ 1 caused a significant reduction in the expression of CD11b but not in the expression of other integrins tested. More importantly, TGF- $\beta$ 1 greatly reduced the capacity of PMA or chemokines to activate CD11b and Rap1, a phenomenon paralleled by a loss of the Epac transcript and a reduction in 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-mediated activation of Rap1. This inhibition diminished the capacity of monocytes to migrate across a monolayer of endothelial cells. The inhibitory effect of TGF- $\beta$ 1 on Rap1 activity may exert a general protective influence against aberrant transendothelial migration, thereby holding inflammatory responses in check.

Key words: monocytes • endothelium • integrins • Epac • atherosclerosis

**I**nfiltration of tissues by leukocytes contributes to the normal process of surveillance and occurs in response to local inflammation. Integrins of the  $\beta$ 2-family play an important role in these processes (1, 2). These are dimeric adhesion molecules composed of noncovalently linked  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits that exist in four different combinations:  $\alpha$ L $\beta$ 2 (CD11a or LFA-1),  $\alpha$ M $\beta$ 2 (CD11b, Mac-1, or CR3),  $\alpha$ X $\beta$ 2 (CD11c or p150/95), and  $\alpha$ D $\beta$ 2 (CD11d). Their capacity to bind ligand is determined by their activation state. Although  $\beta$ 2 integrins are rather inert on circulating leukocytes, they turn into highly active adhesion molecules at sites of inflammation

(3). Activation is induced by chemokines (4) and certain bacterial products such as formylmethionyl peptides or lipopolysaccharides (endotoxin) (5). Activation of  $\beta$ 2-integrins results in the arrest and spreading of leukocytes on the vascular endothelium and this is followed by their migration into the tissues. This protects the organism against infection and, in case of damage, initiates the process of tissue remodeling (1, 2, 3). CD11b is of particular importance in these respects because it has a remarkably large repertoire of ligands, all involved in the inflammatory process (6–9).

At the intracellular level, Rap1, a member of the Ras superfamily of monomeric GTPases, is the main mediator of activation of  $\beta$ 2-integrins by a number of extracellular signals (10, 11, 12, 13). Its GTPase activity is regulated by a number of guanine exchange factors (GEFs) and GTPase-activating proteins (GAPs). Amongst these are Epac1, a cAMP-sensitive GEF known to be involved in integrin activation (14, 15), and SPA-1, a GAP, which has been shown to down-regulate adhesion (16, 17). Importantly, Rap1 appears to be instrumental in lymphocyte trafficking (18). From this and the preceding information, it follows that Rap1 could be important in the regulation of the inflammatory response and that it may therefore play a critical role in the organization of localized chronic inflammatory conditions such as atherosclerosis.

Several lines of evidence indicate that TGF- $\beta$ 1 might exert an inhibitory effect on the events described above. For instance, it attenuates the PMA-stimulated respiratory burst of macrophages (19). Lack of expression of TGF- $\beta$ 1 in knockout mice causes a wasting syndrome due to excessive tissue infiltration by peripheral blood leukocytes (20, 21). Blocking TGF- $\beta$ 1 activity in ApoE<sup>-/-</sup> mice through the administration of neutralizing antibodies causes destabilization of atherosclerotic plaques. This is due to increased infiltration by lymphocytes and monocyte-derived macrophages and reduced deposition of collagen (22). The advanced stages of atherosclerosis are characterized by depleted levels of circulating active TGF- $\beta$ 1 in the blood plasma (23). Lastly, in our studies on the effects of TGF- $\beta$ 1 on mink lung epithelial cells, we have noted an increase in cell motility (24) and we have taken this as an indication that TGF- $\beta$ 1 is somehow able to influence the activation state of the integrins (25).

In the present investigation, we have studied the effect of TGF- $\beta$ 1 on the activation state of CD11b and Rap1 and related these findings to transendothelial cell migration as a functional parameter. We decided to focus on this process because aberrant tissue infiltration is at the basis of a number of inflammatory disorders, in particular atherosclerosis. We have performed most of the studies with fully differentiated U937 cells as a model for blood monocytes (26). However, a number of the experiments were repeated using freshly prepared human peripheral blood monocytes. We have used plasma, rather than serum, in our experiments to reduce baseline levels of active TGF- $\beta$ 1 and to exclude the presence of large quantities of the nonactive form of this cytokine (27). We present evidence that TGF- $\beta$ 1 inhibits the PMA- and chemokine-mediated activation of CD11b and of Rap1 in a time-dependent manner. This inhibition is paralleled by a strong reduction in 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-mediated activation of Rap1, an indirect measure of functional expression of the Rap1 guanine exchange factor Epac. We also observed a loss of the Epac transcript in TGF- $\beta$ 1 treated cells. This inhibition coincides with a significant reduction of CD11b-dependent leukocyte migration across a monolayer of vascular endothelial cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

1 $\alpha$ ,25-Dihydroxy-vitaminD<sub>3</sub>, was purchased from Calbiochem. All trans-retinoic acid (vitamin A), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), L-glutamine, gentamycin, HAT, FITC- or PE-conjugated anti-mouse, anti-chicken IgG whole molecule, anti-Rabbit IgG antibodies-conjugated to horseradish peroxidase (A-6154), mouse IgG1 (control for BCA2 antibody), orthophenylenediamine, Rose Bengal, and “dissociation medium” were purchased from Sigma. rhMIP-1 $\alpha$ , rhMCP-1, human TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , anti-human CD11b (C3b receptor, clone BCA2), rabbit anti-TGF- $\beta$  (BDA47), chicken anti-TGF- $\beta$  (BDA19), anti-human CD11c, and anti-human CD18 were obtained from R&D Systems. Anti-CD11a (LFA-1 $\alpha$ ) and anti-integrin- $\alpha$ 4 antibody (CD49d) were purchased from BD BioSciences. Anti-Rap1 antibodies were obtained from Santa Cruz. Anti-human monocyte-CD14 and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies were purchased from DAKO. ECL and Ficoll Paque were obtained from Amersham Biosciences. CBRM1/5 antibodies were a kind gift of Dr. Springer (Harvard Medical School, Boston, MA). 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP was obtained from Biolog (Germany). Taq polymerase was obtained from Promega, and MMLV reverse transcriptase was obtained from Invitrogen. Transwell plates were obtained from Costar. Fibronectin, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with HEPES, RPMI, fetal bovine serum (FBS), Maxisorp 96-well ELISA plates, and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco-BRL. Centricon was purchased from Millipore Ltd. RalGDS-Rap binding domain (RalGDS-RBD) was a kind gift of Dr. Spaargaren (Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands). Dr. J. Bos (Department of Physiological Chemistry, University of Utrecht, The Netherlands) provided the pMT-V12Rap1 construct, and Dr M. Hattori (Department of Pediatrics, Kyoto, Japan) provided us with the SPA-1-GFP construct and anti-SPA-1 antibodies. Recombinant Fc/VCAM-1 was a kind gift of Dr. A. Shock (Celltech Ltd., Slough, UK).

### Heat-inactivated human plasma

Citrated blood from male AB donors was centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C. The presence of platelets was assessed by microscopy. If platelets were found in the supernatant, another centrifuge run was followed under similar conditions. Two millimolars of CaCl<sub>2</sub> were added to the clear supernatant (plasma) and left overnight at 4°C to clot. After spinning at 10,000 rpm for 5 min at 4°C, the supernatant was removed and heated at 54°C for 20 min to inactivate complement. Plasma was pooled and stored at -20°C until use. The concentration of active TGF- $\beta$ 1 in this pool was estimated at 88 pM (2.2 ng/ml) as measured by Dr. D. Grainger (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK; for protocol see below). The concentration of total TGF- $\beta$ , active and inactive, was estimated at 96 pM (2.4 ng/ml). This estimate excludes the potential production of TGF- $\beta$  by U937 cells or monocytes during the experiment.

We used a heat-inactivated human plasma preparation to supplement (10% v/v) the medium because this more accurately mimics the blood environment. U937 cells grow perfectly in the presence of human plasma as tested over a period of 3 months, during which cell proliferation and expression of CD14, CD11b, and the NADPH oxidase-differentiation marker p47<sup>phox</sup> were carefully monitored. With respect to these parameters, no differences were found between the heat-inactivated human plasma and FBS, with the exception of the expression of CD11b, which is higher under plasma conditions (mean fluorescence intensity increased from 2.1 to 7.2).

## **Detection of active and total TGF- $\beta$ in heat-inactivated plasma preparation**

Active TGF- $\beta$ 1 was detected in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the extracellular domain of the TGF- $\beta$  type II receptor (fused to GST) as the capture reagent. Total TGF- $\beta$  (active and inactive) was also measured on the basis of an ELISA but with an anti-TGF- $\beta$ -antibody as capture reagent (chicken anti-TGF- $\beta$ ). Both methods are described in detail in Grainger et al. (28).

## **U937 cell differentiation and plasma incubation**

U937 cells were routinely cultured in RPMI containing 10% FBS. For differentiation, cells were transferred to DMEM/HEPES supplemented with 10% FBS ( $2 \times 10^5$  cells per ml).  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-vitaminD3 and all-trans retinoic acid were made up as a stock of 1 mM in 100% ethanol and stored in glass at  $-20^\circ\text{C}$ . A 100  $\mu\text{M}$  solution in DMEM was made before use in the differentiation protocol. Differentiation was started with the addition of retinoic acid and  $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitaminD3 (both at 0.1  $\mu\text{M}$ ) (a protocol derived from refs 29-31) plus the addition of TGF- $\beta$ 1 at 120 pM (3 ng/ml). U937 cells were left to differentiate for 3 days, with the addition of fresh differentiation medium at day 1. After 3 days, the cells were transferred to DMEM/HEPES/10% heat-inactivated human plasma without or with additional TGF- $\beta$ 1 (23 pM (0.58 ng/ml) or 110 pM (2.75 ng/ml). Using this protocol, we estimated that the resultant total concentration of active TGF- $\beta$ 1 in the culture medium would be  $\sim 8.8$  pM (0.22 ng/ml), 32 pM (0.8 ng/ml), and 120 pM (3.0 ng/ml), respectively. Cells were used for various measurements either at the end of differentiation or during the subsequent incubation in heat-inactivated human plasma.

## **Human peripheral blood monocytes**

Blood was obtained through venipuncture and, after a threefold dilution in PBS, layered on a Ficoll Paque cushion. After centrifugation at room temperature for 30 min at 400 g (1500 rpm), the ring fraction was removed, washed in PBS, and finally resuspended in heat-inactivated human plasma. The cells were kept in 25  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks. TGF- $\beta$ 1 was added at 110 pM (2.75 ng/ml) to one of the flasks ( $\sim 4.0 \times 10^6$  cells), and the cells were kept in culture for 40 h. This population contained 86% CD11b-positive cells as determined by flow cytometry. Before the transendothelial migration experiment, cell viability was checked using trypan blue dye exclusion. No difference was found between the different populations (3% of the cells took up the dye).

## **Plasmids and cell transfection protocol**

U937 cells were differentiated for 3 days as described above, washed, and transfected by electroporation (Gene pulser, Bio-Rad) with plasmids encoding V12Rap1 (pMT2V12Rap1), GFP (pEGFP, Clontech), or SPA-1-GFP (pEGFP-Spa1) (each at 20  $\mu\text{g}$  per transfection). Cells were pulsed (at  $1 \times 10^7$  cells/0.5 ml) in plasma-free DMEM at 950  $\mu\text{F}$  and 300 V. Experiments were carried out 24 h post-transfection to allow for cell recovery and plasmid expression.

## Flow cytometry

U937 cells, or peripheral blood monocytes, in suspension were removed from the flask, and adherent cells were treated briefly with ice-cold “dissociation medium.” The two cell populations were pooled and spun for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in PBS/10% FBS at 4°C (to match with the transendothelial migration conditions), and 100 µl aliquots were added to the wells of a 96-well plate. In case of measurement of the activation neo-epitope of CD11b (using the CBRM1/5 antibody, ref 32), the cells were warmed to 37°C and PMA was added at 100 ng/ml for 10 min. After this incubation, PMA-treated and nontreated cells were spun down and resuspended in PBS supplemented with BSA (10 mg/ml) at 4°C. All subsequent washings, dilutions, and incubations took place in PBS supplemented with BSA (10 mg/ml) at 4°C. The first antibody (4 µg/ml) was added (total volume 50 µl), and the incubation was continued for 45 min. After three washes, the second antibody (4 µg/ml and conjugated with either FITC or PE) was added (total volume 50 µl) for another 45 min. The cells were washed five times, resuspended in PBS, and fixed in formaldehyde (final concentration 2% (w/v)). Expression of adhesion molecules was determined in the “monocyte window” (CD11b-expressing cells) and was presented as mean fluorescence intensity (MFI) after background correction (conjugated antibody only).

In the case of SPA-1-GFP and V12Rap1/GFP transfected cells, expression of the CD11b activation neo-epitope was determined by measuring antibody binding to cells in the “GFP-window” only.

## Transendothelial migration

The method we used is essentially as described previously (33, 34). EA.hy926 cells were kindly provided by Dr. C.-J. Edgell (Department of Pathology, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC). This hybridoma cell line has been established by fusing human umbilical vein endothelial cells with epithelioma A549. They retain most of the features of human umbilical vein endothelial cells, including the human factor VIII-related antigen (35). EA.hy926 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin solution, 0.5% gentamycin, and 1% L-glutamine and HAT and subcultured 1:3 twice a week. Cells were used between passages 25 and 45. For transmigration, EA.hy926 cells ( $5 \times 10^4$  cells in 700 µl of DMEM-F12 supplemented with 10% fetal calf serum plus antibiotics) were seeded onto fibronectin-coated (40 µg/ml in PBS for 60 min at 37°C) Transwell filters (6.5 mm diameter and 8.0 µm pore size) and grown to confluence (2-3 days) at 37°C in an atmosphere of 95% air/5% CO<sub>2</sub>. Medium was then removed, and the cells were incubated with TNF-α (at 10 ng/ml) for a further 18 h incubation period. Then, 600 µl of medium supplemented with 2.5% fetal calf serum and MCP-1 or MIP-1α (each at 1 nM respectively) were added to the wells of a 24-well plate. Using RT-PCR, we had evidence of strong expression of the MIP-1α receptor and a moderate expression of the MCP-1 receptor, both in nondifferentiated and differentiated U937 cells (unpublished observations, Dr. Ian Hayes, Rhone-Poulenc Rorer, Dagenham, UK). For human peripheral blood monocytes, we used MCP-1, at a concentration of 0.8 nM, because of evidence of its elevated presence in atherosclerotic lesions. EA.hy926 cells were then washed to remove TNF-α, and the transwells were added to the 24-well plate. Lastly, 50 µl of medium containing  $1.5 \times 10^6$  differentiated U937 cells or human peripheral blood monocytes were added to the top compartment. After 2 h at 37°C in

95% air/ 5% CO<sub>2</sub>, cells that had migrated through the filters were retrieved from the lower compartment and counted using a Neubauer hemocytometer after being stained in Turk's solution.

To assess the role of CD11b in transendothelial migration, we added blocking antibodies (clone BCA2 at 5 µg/ml) to the differentiated U937 or cultured monocytes 20 min before their addition to the transwells. The control population received a nonspecific mouse IgG1 antibody also at 5 µg/ml. Both antibodies (BCA2 and control IgG1) were dialyzed against PBS using Centricon at 10,000 cut-off to remove azide. Transendothelial migration is presented as CD11b-dependent migration (total migration minus the fraction that passed the filter in the presence of the blocking antibody). For U937 and cultured monocytes, we obtained transendothelial migration figures in the range of 4 and 6% of total cells added, respectively (see also ref 34). Anti-CD11b antibodies reduced this migration by 63.7% ( $P=0.0027$ ).

### **Rose Bengal staining of adherent cells**

A 96-well dish was coated with fibronectin (5 µg/cm<sup>2</sup>) reconstituted in sterile water for 1 h at 37°C. For VCAM-1, the wells were first coated overnight at 4°C with anti-human-Fc antibody at 20 µg/ml in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.4). After being washed with PBS (using a multichannel pipette), the dish was incubated for 1 h with PBS/1% BSA (w/v) at room temperature to block nonspecific binding sites. The dish was then treated with VCAM-1-Ig (100 ng/ml) for 1 h at room temperature, after which free VCAM-Ig was removed by repeated washing of the wells with PBS. The dish was either used immediately or stored at 4°C for up to 3 days. An appropriate number of U937 cells were spun down and resuspended in DMEM/10% FCS at  $0.5 \times 10^6$ /ml. After addition of PMA at 100 ng/ml, or only dimethyl sulfoxide, 200 µl of cells were added to the wells and left to incubate for 30 min at 37°C. The dish was washed to remove unbound cells (addition of 200 µl of PBS followed by gently flicking the dishes on tissue paper). Adherent cells were fixed in 100 µl of methanol for 10 min, the dish was washed, and 100 µl of 0.5% (w/v) of Rose Bengal in PBS were added for 10 min. After being washed repeatedly (3×) in PBS, 100 µl of 1:1 PBS:ethanol was added and the dish was left on a rocking platform for 1 h. Absorbance was read at 540 nm in a spectrophotometer.

### **Rap1 pull-down**

This assay was performed essentially as described by Franke et al. (36). For these experiments, we either used human peripheral blood monocytes, differentiated U937 cells, or U937 cells further incubated for 3 days in medium supplemented or not with 110 pM (2.75 ng/ml) of TGF-β1. Cells ( $20 \times 10^6$  per point) were harvested, spun down, and resuspended in 1 ml of DMEM/10%FBS. PMA (at 100 ng/ml), MCP-1 (at 1 nM), or MIP-1α (at 1 nM) was added to one batch of cells, while the carrier only (DMSO in the case of PMA) was added to the other. After 10 min at 37°C, cells were spun down (12,000 g, 15 s, at room temperature) and resuspended in 200 µl of "GST-fish buffer," consisting of 10% (v/v) glycerol, 50 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.8% (v/v) NP-40, 2 MgCl<sub>2</sub>, and 0.5 mM of PMSF, aprotinin, leupeptin, and benzamidin. The lysate was left to rotate end-over-end for 45 min at 4°C, vortexed, and cleared from insoluble material by centrifugation at 12,000 g, 5 min at 4°C. To each tube, 25 µl of RalGDS-RBD bound to glutathione beads (~10 µg protein) were added and left to rotate end-over-end for 4 h at 4°C. The beads were washed three times with 1.5 ml of fish buffer and were



resuspended in 100  $\mu$ l of Laemmli sample buffer (LSB) after aspiration of the remaining liquid. After being heated at 100°C for 8 min, proteins were separated on a 15% acrylamide gel supplemented with sodium dodecyl sulfate (SDS) and transferred to Immobilon membrane. The membrane was probed in a Western blot protocol with mouse anti-Rap1 antibodies and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibodies. Antibody binding was revealed by chemiluminescence using ECL reagents. To verify the cellular content of Rap1, 5% of the volume of the fresh lysate was removed, before Rap1-GTP precipitation, and subjected to gel electrophoresis and Western blotting, as described above.

## RT-PCR

Total mRNA was isolated from cultured cells following the Chomczynski and Sacchi (37) method. cDNAs were synthesized by reverse transcription from total RNAs according to classic procedures using M-MLV reverse transcriptase.

For PCR analysis of the Epac mRNA content, cDNAs were amplified by 30 cycles (94°C for 0.5 min, 62°C for 0.5 min, 72°C for 1 min) in the presence of two oligonucleotide primers (0.8  $\mu$ M) corresponding to position 2747-2767 and 2860-2879 of the human Epac cDNA sequence (NM\_006105) and 50 u/ml Taq polymerase. PCR analysis of GAPDH was done in parallel using only 18 cycles and an annealing temperature of 60°C. PCR products were submitted to electrophoresis on 2% agarose gels.

## Statistics

Data were analyzed for significance using a two-tailed paired *t* test.

## RESULTS

### **TGF- $\beta$ 1 reduces the expression of the CD11b activation neo-epitope on differentiated U937 cells and on peripheral blood monocytes**

Differentiation of U937 cells was verified by measuring expression levels of the  $\beta$ 2-integrins and CD14. A combination of  $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitaminD<sub>3</sub>, all-trans retinoic acid, and TGF- $\beta$ 1 caused maximal expression of all markers after 3 days of incubation (Fig. 1). The differentiation cocktail proved to be particularly effective in raising the expression levels of CD11b but failed to enhance the expression of CD11c. Further incubation was without effect (data not shown). After the cells were removed from the differentiation medium and transferred to one containing plasma together with various concentrations of active TGF- $\beta$ 1, we assessed expression of the  $\beta$ 2 integrins CD14, and CD49d (VLA-4 or  $\alpha$ 4 $\beta$ 1) after another 3 days of incubation. TGF- $\beta$ 1 at 120 pM reduced the expression of CD11b by 30% but had no effect on the expression of the other markers (Fig. 2A). A much stronger reduction, ~70%, occurred when expression of the CD11b activation neo-epitope was measured after addition of PMA (Fig. 2B). The expression of this epitope constitutes 17% of total CD11b under control conditions, as estimated by the level of mean fluorescence in a flow cytometric analysis. This percentage is within the range reported for human peripheral blood neutrophilic granulocytes (32). Subsequent incubation in plasma together with high levels of TGF- $\beta$ 1 reduced its expression to only 8% of total CD11b levels. We failed to detect any inhibition when TGF- $\beta$ 1 was added simultaneously or 20 min before

PMA addition (data not shown) and from this we conclude that it causes no immediate effect on the activation of integrins.

To assess the physiological relevance of our findings, we tested the effect of TGF- $\beta$ 1 on peripheral blood monocytes maintained in culture for 40 h. We deliberately chose a shorter incubation interval because the culture of monocytes inevitably results in the acquisition of a macrophage phenotype with a change in the expression of a number of chemokine receptors (38). Expression levels of CD11b were reduced by 30% when partly purified human peripheral blood monocytes were incubated in heat-inactivated human plasma with additional active TGF- $\beta$ 1. The expression level of the CD11b activation neo-epitope was reduced by 50% (Fig. 3). As with the U937 cells, TGF- $\beta$ 1 had no immediate effect (within 20 min of addition) on expression of CD11b or its activation neo-epitope (data not shown).

To test whether TGF- $\beta$ 1 also affected the activation state of the  $\beta$ 1 integrin CD49 (VLA-4), we measured the binding of fully differentiated U937 cells, treated with TGF- $\beta$ 1 for 2 or 3 days, to culture dishes coated with fibronectin or VCAM-1. After the culture dishes were washed repeatedly with PBS (37°C), binding was quantified by staining of the cells with Rose Bengal dye and by observation under the microscope. We failed to detect any changes in the binding of the cells to the substrate under any of the various conditions tested (presence or absence of TGF- $\beta$ 1 after differentiation) (Fig. 4).

### **TGF- $\beta$ 1 reduces the activation level of the GTPase Rap1 in differentiated U937 cells and in monocytes**

Because Rap1 is intimately linked with activation of  $\beta$ 2-integrins, we wondered whether or not TGF- $\beta$ 1 would also have an inhibitory effect on this GTPase. We studied PMA and chemokine-induced Rap1 activation (GTP loading) under the conditions described above. For this purpose, we used a Rap1 pull-down assay based on the principle that activated Rap1 (Rap1<sup>GTP</sup>) interacts with the Rap1 binding domain of its effector protein RalGDS (39). Rap1 was expressed in both nondifferentiated and differentiated U937 cells, but a robust activation of Rap1 was evident only in the differentiated cells after treatment with PMA or MIP-1 $\alpha$ . However, activation of Rap1 was abrogated when fully differentiated cells were subsequently cultured in the presence of 120 pM of TGF- $\beta$ 1 (Fig. 5). This treatment did not reduce the expression of Rap1 but had the effect of elevating slightly the background level of the Rap1<sup>GTP</sup> content (active form) (Fig. 5). We take these findings to mean that long-term treatment with TGF- $\beta$ 1 prevents activation of Rap1 in fully differentiated U937 cells. We reasoned that such inhibition could be achieved either by reducing the activity of Rap1 GEF or by increasing its GAP activity.

The results of comparable experiments performed with peripheral blood monocytes kept in culture were similar. Addition of TGF- $\beta$ 1 for 40 h abrogated MCP-1 and MIP-1 $\alpha$ -mediated activation of Rap1 (Fig. 6). In this particular image, there is a reduction in activated form of Rap. We have no explanation for this phenomenon that appears to be manifest only in the cells of some donors.

### **Rap1 is instrumental in activation of CD11b in U937 cells**

To obtain evidence that Rap1 is instrumental in the regulation of integrin activation in differentiated U937 cells we studied the effect of ectopic expression of a Rap1-specific GTPase,

SPA-1 (17) (fused to GFP). This should switch off Rap1 activity. Also, we tested the effect of ectopic expression of a constitutively active form of Rap1, V12Rap1, using a transient transfection protocol. We measured expression of CD11b and its activation neo-epitope 24 h later. Ectopic expression of SPA-1-GFP, but not GFP alone, abrogates expression of the CD11b neo-activation epitope after treatment of cells with PMA or MIP-1 $\alpha$ , while having no effect on the expression of CD11b (Fig. 7A). Ectopic expression of V12Rap1 (together with GFP to select the transfected cells) caused a marked increase in expression of the neo-activation epitope of CD11b (Fig. 7B).

### **TGF- $\beta$ 1 inhibits expression of Epac in fully differentiated U937 cells**

The next question to be answered was how TGF- $\beta$ 1 alters Rap1 activity. A number of guanine exchange factors have been reported to activate Rap1. We focused on Epac since it has been shown to be involved in cAMP-mediated regulation of cell adhesion (14). Because we were unable to measure cellular levels of Epac protein, we quantified its presence by measuring the activation of Rap1 using 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. This cAMP analog is a direct activator of Epac (40), and its effect on Rap1 activation (loading of GTP) can be taken as an indirect measure for the cellular level of Epac protein. We also studied expression of Epac transcripts (mRNA) in an RT-PCR protocol. Nondifferentiated cells showed a weak response to 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8pCPT), indicating the presence of Epac. Differentiated U937 cells subsequently incubated in control medium showed a strong response, but those cultured in the presence of TGF- $\beta$ 1 (at 120 pM) had a strongly diminished 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-mediated activation of Rap1 (Fig. 8A). In addition, we detected a substantial loss of the Epac transcript in TGF- $\beta$ 1-treated cells (Fig. 8B) (41). The expression levels of the SPA-1 and Rap1GAP transcripts remained stable (and this is also true for the protein content of SPA-1 as measured in a Western blot, data not shown). These observations suggest that TGF- $\beta$ 1 may exert its inhibitory effect on Rap1 by diminishing the expression level the Rap1 guanine exchange factor Epac.

Similar experiments were performed with peripheral blood monocytes and here too we observed a decrease in 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-mediated activation of Rap1 together with a slight reduction in the expression levels of Rap (although this varies from donor to donor) (Fig. 8C).

### **TGF- $\beta$ 1 reduces transendothelial migration**

Having established that TGF- $\beta$ 1 has a strong inhibitory action on the activation of CD11b and Rap1, we wondered how this would reflect on monocyte functioning. We focused our study on the capacity of these cells to traverse vascular endothelium, a process that, in the case of monocytes, is dependent on active CD11b and determines the scale of an inflammatory response (and its pathological consequences). We observed a 65% reduction in CD11b-dependent migration when additional TGF- $\beta$ 1 (120 pM) was present during the 3 days of culture of differentiated U937 cells (Fig. 9A). As in our previous experiments measuring the activation of CD11b, TGF- $\beta$ 1 has no immediate effect in this system (data not shown).

Because monocytes express the receptor (CCR2) for MCP-1 (42), we also measured the transendothelial migration of peripheral blood monocytes in response to this chemokine. In addition, there is mounting evidence that MCP-1 is involved in the recruitment of monocytes in atherosclerotic lesions (43, 44). In this protocol, a 45% reduction in CD11b-dependent

transendothelial migration was observed when monocytes were pretreated for 40 h with additional TGF- $\beta$ 1 ([Fig. 9B](#)).

## DISCUSSION

Prolonged treatment of differentiated U937 cells with TGF- $\beta$ 1 reduces the expression of the  $\beta$ 2-integrin CD11b to a moderate degree but strongly reduces the expression of its activation neo-epitope as recognized by the CBRM1/5 antibody. The expression of CD11a, CD11c, and CD49d (VLA-4) was unaffected. Expression of CD11b and its neo-activation epitope is also inhibited in peripheral blood monocytes. Importantly, this did not occur when U937 cells had not attained high levels of expression of CD11b, e.g., after 3 days of differentiation in the presence of  $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitaminD<sub>3</sub>. In that case, addition of TGF- $\beta$ 1 to cells transferred into fresh medium further augments expression of both CD11b and its neo-activation epitope (data not shown). We take these observations to indicate that the response to TGF- $\beta$ 1 is determined by the differentiation “history” of leukocytes, an example of cytokine action being dependent on the cellular context. We also examined the response to TGF- $\beta$ 1 in U937 cells that had been differentiated for 3 days in the presence of conditioned medium obtained from primary cultures of human stromal fibroblasts (from bone marrow). Here, we found a high level of expression of CD11b and then subsequent treatment with TGF- $\beta$ 1 caused a reduction in expression of both its epitopes but not of other integrins (data not shown). From these observations and those obtained using peripheral blood monocytes, we conclude that TGF- $\beta$ 1 exerts an inhibitory effect on the expression level and, more importantly, exerts an inhibitory effect on the activation state of CD11b once fully differentiated leukocytes are discharged from the bone marrow. Inappropriately differentiated leukocytes, for instance in the case of deficient expression of TGF- $\beta$ 1 in the bone marrow, might respond differently.

Whether or not regulation of the activation state of CD11b is unique among the  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins requires further study. We have assessed a possible role for TGF- $\beta$ 1 in the regulation of expression and the binding activity of the  $\beta$ 1 integrin CD49d ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1 or VLA-4). This integrin binds to VCAM-1 (45) (and fibronectin) and plays an important role as a determinant of rolling and arrest of monocytes on endothelial cell layers (46, 47). However, under similar experimental conditions where the alteration in the expression and activation state of CD11b was observed, no change in the expression or binding activity of CD49d was discernible as assessed by binding of the differentiated U937 cells to either immobilized VCAM-1 or fibronectin. Thus, TGF- $\beta$ 1 appears to exert a differential effect on integrins. Such differential regulation has also been demonstrated in chemokine-mediated activation of eosinophils, where increased expression of the neo-activation epitope of CD11b (but not that of VLA-4) has been described (48). We will return to this topic later in this discussion.

Because ectopic expression of SPA-1, a Rap1 GAP, prevents activation of CD11b, we conclude that Rap1 is instrumental in the activation of CD11b. By contrast, expression of the constitutively active mutant V12Rap1 promotes activation of CD11b. Moreover, the suppression of activation of Rap1 after prolonged treatment with TGF- $\beta$ 1 coincides with a lack of stimulation of expression of the activation neo-epitope of CD11b. Rap1 expression was always detected in U937 cells, independent of their differentiation state or treatment, but its extent of GTP loading, after treatment with different stimuli, varied enormously. This suggests that regulation occurs predominantly by functional expression of its regulators, Rap1 GEFs and GAPs. In the case of

TGF- $\beta$ 1, regulation occurs at the level of functional expression of Epac, as detected by a lack of activity after treatment of cells with the cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. We do not exclude the possibility that regulation of other Rap1 GEFs may also occur. How TGF- $\beta$ 1 regulates expression of Epac and how Epac fits into a chemokine- or PMA-mediated activation of integrins remain to be investigated.

Our findings provide a molecular explanation of how TGF- $\beta$ 1 reduces expression of the activation neo-epitope of CD11b. They also account for the observed delay in the response. Our RT-PCR experiments show that regulation probably occurs at the level of expression of the Epac transcript and, depending on the half life of the Rap1 protein, this must have a delayed effect on functional expression of Epac. A similar delay in the action of TGF- $\beta$ 1 has been reported in studies with mouse peritoneal macrophages where TGF- $\beta$ 1 strongly inhibits the phorbol ester-stimulated respiratory burst after 48 h of preincubation (19). A delayed response was also observed in lung epithelial cells where TGF- $\beta$ 1 promotes motility; here, a minimum incubation time of 4 h was required and a full response occurred only after 16 h of incubation (24). A delayed effect, detected as a slow onset activation of Rap1, occurs in G-CSF-treated promyelocytic 32D cells. A gradual increase in the content of Rap1GTP occurred over 3 days, and this was concomitant with a gradual increase in binding to the culture dish (coated by components of serum) (15).

Several studies have shown Rap1 to be essential for the activation of both  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins (10–13), and these findings indicate that lack of activation of Rap1 would necessarily prevent activation of both families of integrins. The lack of effect of TGF- $\beta$ 1 on VLA-4-mediated adhesion is therefore surprising. We have focused our studies on CD11b, but we do not exclude possible effects of TGF- $\beta$ 1 on other  $\beta$ 1 or  $\beta$ 2 integrins. Matters are unlikely to be straightforward as highlighted by a number of observations. As mentioned previously, differential activation of  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins occurs in eosinophils (48). Moreover, a number of studies indicate a sequential activation in which chemokines only exert a brief stimulatory effect on the  $\beta$ 1 integrin VLA-4 but a prolonged effect on  $\beta$ 2 integrins. This shift in activation, it was suggested, would enable eosinophil migration (49).

The reduction in CD11b activation is reflected in a reduced ability of U937 cells and monocytes to migrate through a monolayer of endothelial cells. The observation by others that preincubation of vascular endothelial cells with TGF- $\beta$ 1 also inhibits transendothelial migration (50) and reduces E-selection expression (51) supports the notion that TGF- $\beta$ 1 plays a general protective role in the migration of leukocytes into the tissues, by preventing interactions between adhesion molecules.

In the context of atherosclerosis, aberrant low levels of active TGF- $\beta$ 1 in plasma (<8 pM or 0.2 ng/ml) might favor the accumulation of monocytes in the intimal layer of arteries and hence promote the development of vascular lesions (23). Sufficiently high levels of TGF- $\beta$ 1 could exert a general protective action by raising the threshold for integrin activation. This has indeed been observed in a mouse model of atherosclerosis where treatment with tamoxifen, which increases the fraction of active TGF- $\beta$ 1, resulted in the reduction of fatty streak formation compared with nontreated mice (52, 53). Moreover, once atherosclerotic lesions have been formed, TGF- $\beta$ 1, due to its immunosuppressive and profibrotic effects, may also have an additional protective effect by preventing their transition into unstable plaques (54). Given these observations, it would be

interesting to relate the expression of the CD11b activation neo-epitope on monocytes with the severity of atherosclerotic lesions (and the concentration of active TGF- $\beta$ 1 in the plasma). The outcome of this study would give additional information for a putative inhibitory role of TGF- $\beta$ 1 in regulating the activation state of this integrin.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the British Heart Foundation to I. M. Kramer and a grant of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) to E. Genot. C. Basoni is a recipient of a FRM fellowship. We thank Dr. J. Bos for the gift of pMT-V12Rap1. Ms. Durrieu of the IECB is acknowledged for help with flow cytometry. D. Grainger is acknowledged for measurements of the active TGF- $\beta$ 1 content in plasma preparations. We thank Dr. M. Hattori for the provision of anti-SPA-1 antibodies and the SPA-1-GFP construct. We acknowledge the supply of recombinant Fc/VCAM-1 by Dr. A. Shock. Dr. T. Springer is acknowledged for the supply of antibodies against the activation neo-epitope of CD11b (CBRM1/5). Dr. M. Spaargaren is acknowledged for provision of the RalGDS-RBD construct. We thank Dr. B. Gomperts for improving the presentation of this manuscript.

## REFERENCES

1. Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301–314
2. Gomperts, B. D., Kramer, I. M., and Tatham, P. E. R. (2002). Adhesion molecules and trafficking of leukocytes. In *Signal Transduction* (Gomperts, B. D., Kramer, I. M., and Tatham, P. E. R., eds), Elsevier/Academic Press, San Diego
3. Luscinskas, F. W., Kansas, G. S., Ding, H., Pizcueta, P., Schleiffenbaum, B. E., Tedder, T. F., and Gimbrone, M. A., Jr. (1994) Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J. Cell Biol.* **125**, 1417–1427
4. Uguccioni, M., D'Apuzzo, M., Loetscher, M., Dewald, B., and Baggiolini, M. (1995) Actions of the chemotactic cytokines, MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur J. Immunol* **25**, 64–68
5. Wright, S. D., Ramos, R. A., Hermanowski-Vosatka, A., Rockwell, P., and Detmers, P. A. (1991) Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *J. Exp. Med.* **173**, 1281–1286
6. Altieri, D. C., Bader, R., Mannucci, P. M., and Edgington, T. S (1988) .Oligospecificity of the cellular adhesion receptor Mac-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell Biol.* **107**, 1893-1900
7. Diamond, M. S., Staunton, D. E., Marlin, S. D., and Springer, T. A. (1991) Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**, 961–971

8. Santoso, S., Sachs, U. J., Kroll, H., Linder, M., Ruf, A., Preissner, K. T., and Chavakis, T. (2002) The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counter receptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J. Exp. Med.* **196**, 679–691
9. Wright, S. D., Levin, S. M., Jong, M. T., Chad, Z., and Kabbash, L. G. (1989) CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **169**, 175–183
10. Reedquist, K.A., Ross, E., Koop, E. A., Wolthuis, R. M., Zwartkruis, F. J., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C. D., and Bos, J. L. (2000). The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J. Cell Biol.* **148**, 1151-1158
11. Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N., Irie, S., Takatsu, K., and Kinashi, T. (2000) Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1956–1969
12. Caron, E., Self, A. J., and Hall, A. (2000) The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Curr. Biol.* **10**, 974–978
13. de Bruyn, K. M., Rangarajan, S., Reedquist, K. A., Figdor, C. G., and Bos, J. L. (2002) The small GTPase Rap1 is required for Mn(2+)- and antibody-induced LFA-1- and VLA-4-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **277**, 29468–29476
14. Rangarajan, S., Enserink, J. M., Kuiperij, H. B., de Rooij, J., Price, L. S., Schwede, F., and Bos, J. L. (2003) Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *J. Cell Biology* **160**, 487–493
15. de Rooij, J., Zwartkruis, F. J., Verheijen, M. H., Cool, R. H., Nijman, S. M., Wittinghofer, A., and Bos, J. L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclicAMP. *Nature* **396**, 474–477
16. Kurachi, H., Wada, Y., Tsukamoto, N., Maeda, M., Kubota, H., Hattori, M., Iwai, K., and Minato, N. (1997) Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. *J. Biol. Chem.* **272**, 28081–28088
17. Tsukamoto, N., Hattori, M., Yang, H., Bos, J. L., and Minaot, N. (1999) Rap1 GTPase-activating protein SPA-1 negatively regulates cell adhesion. *J. Cell Biol. Chem.* **274**, 18463–18469
18. Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T. (2003) Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol.* **161**, 417–427
19. Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., and Nathan, C. (1988) Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* **334**, 260–262
20. Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., et al. (1992) Targeted disruption of the mouse

transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699

21. Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M., and Karlsson, S. (1993) Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 770–774
22. Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., Fradelizi, D., and Tedgui, A. (2001) Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* **89**, 930–934
23. Grainger, D. J., Kemp, P. R., Metcalfe, J. C., Liu, A. C., Lawn, R. M., Williams, N. R., Grace, A. A., Schofield, P. M., and Chauha, A. (1995) The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat. Med.* **1**, 74–79
24. Zicha, D., Genot, E., Dunn, G. A., and Kramer, I. M. (1999) TGF-beta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112**, 447–454
25. Palecek, S. P., Loftus, J. C., Ginsberg, M. H., Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**, 537–540
26. Sündström, C., and Nilsson, K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* **17**, 565–577
27. Grainger, D. J., Mosedale, D. E., and Metcalfe, J. C. (2000) TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 133–145
28. Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C., Weissberg, P. L., and Kemp, P. R. (1995b) Active and acid-activatable TGF-beta in human sera, platelets and plasma. *Clin. Chim. Acta* **235**, 11–31
29. Olsson, I. L., Breitman, T. R., and Gallo, R. C. (1982) Priming of human myeloid leukemic cell lines HL-60 and U-937 with retinoic acid for differentiation effects of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents and a T-lymphocyte-derived differentiation factor. *Cancer Res.* **42**, 3928–3933
30. Olsson, I., Gullberg, U., Ivhed, I., and Nilsson, K. (1983) Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* **43**, 5862–5867
31. Kelsey, S. M., Makin, H. L. J., and Newland, A. C. (1992) Functional significance of induction of differentiation in human myeloid leukemic blasts by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and G-CSF. *Leukemia Res.* **16**, 427–434

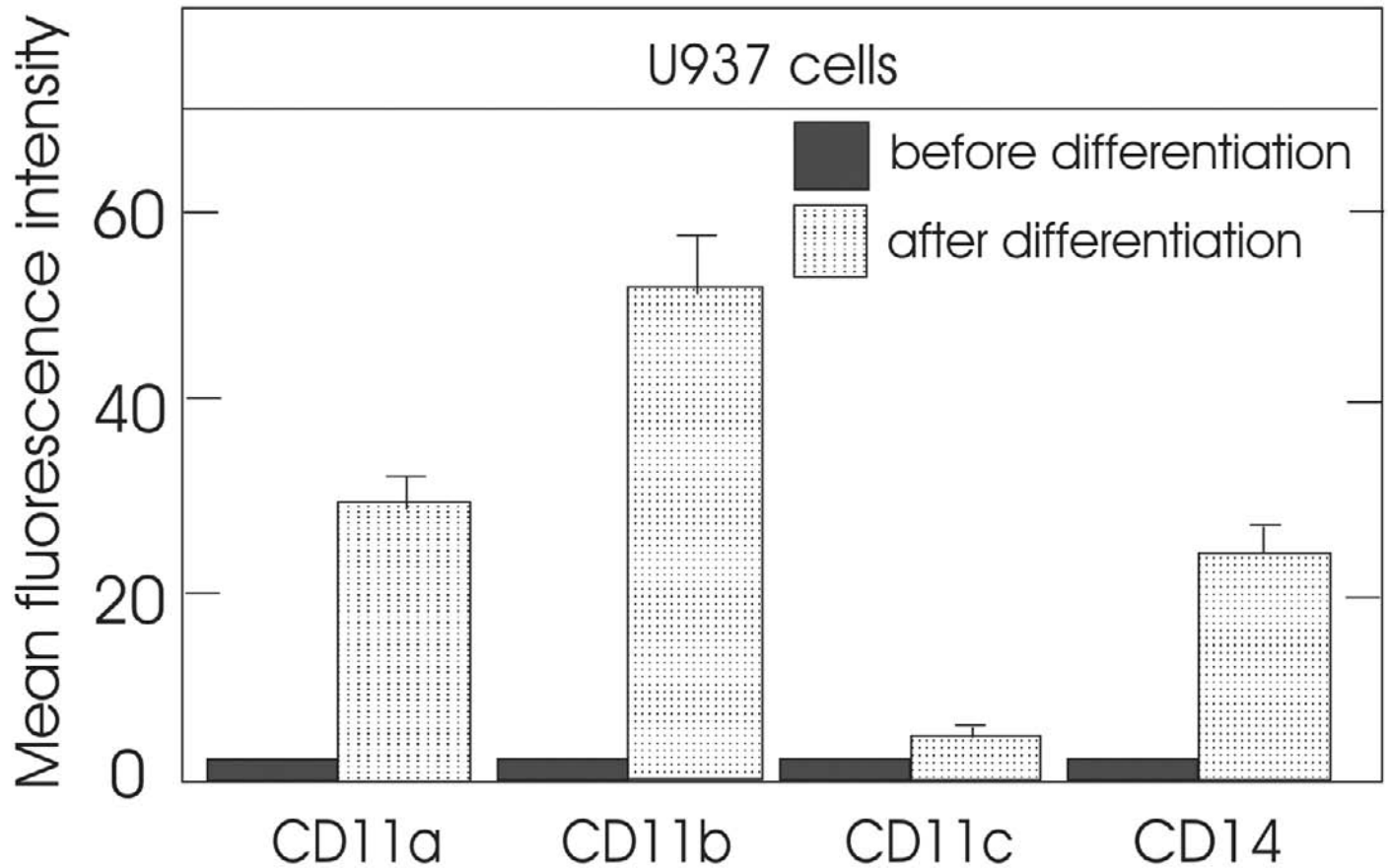


32. Diamond, M. S., and Springer, T. A. (1993) A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J. Cell Biol.* **120**, 545–556
33. Perretti, M., Croxtall, J. D., Wheller, S. K., Goulding, N. J., Hannon, R., and Flower, R. J. (1996) Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. *Nat. Med.* **2**, 1259–1262
34. Wheller, S. K., and Perretti, M. (1997) Dexamethasone inhibits cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on endothelial cell lines. *Eur. J. Pharm.* **331**, 65–71
35. Edgell, C. J., McDonald, C. C., and Graham, J. B. (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3734–3737
36. Franke, B., Akkerman, J. W., and Bos, J. L. (1997) Rapid Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.* **16**, 252–259
37. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159
38. Fantuzzi, L., Borghi, P., Ciolli, V., Pavlakis, G., Belardelli, F., and Gessani, S. (1999) Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood* **94**, 875–883
39. Spaargaren, M., and Bischoff, J. R. (1994) Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12609–12613
40. Enserink, J. M., Christensen, A. E., de Rooij, J., van Triest, M., Schwede, F., Genieser, H. G., Doskeland, S. O., Blank, J. L., and Bos, J. L. (2002) A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat. Cell Biol.* **4**, 901–906
41. Rubinfeld, B., Munemitsu, S., Clark, R., Conroy, L., Watt, K., Crosier, W. J., McCormick, F., and Polakis, P. (1991) Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21rap1. *Cell* **65**, 1033–1042
42. Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Gordon, D., and Wilcox, J. N. (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.* **88**, 1121–1127
43. Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C. H., Young, S. G., Rollins, B. J., and Charo, I. F. (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* **103**, 773–778
44. Boring, L., Gosling, J., Clearly, M., and Charo, I. F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**, 894–897

45. Osborn, L., Hession, C. L., Tizard, R. L., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989) Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **59**, 1203–1211
46. Alon, R., Kassner, P. D., Carr, M. W., Finger, E. B., Hemler, M. E., and Springer, T. A. (1995) The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* **128**, 1243–1253
47. Meerschaert, J., and Furie, M. B. (1995) The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J. Immunol.* **154**, 4099–4112
48. Weber, C., Kitayama, J., and Springer, T. A. (1996) Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10939–10944
49. Tachimoto, H., Burdick, M. M., Hudson, S. A., Kikuchi, M., Konstantopoulos, K., and Bochner, B. S. (2000). CCR3-active chemokines promote rapid detachment of eosinophils from VCAM-1 in vitro. *J. Immunol.* **165**, 2748-2754
50. Smith, W. B., Noack, L., Khew-Goodall, Y., Isenmann, S., Vadas, M. A., and Gamble, J. R. (1996) Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J. Immunol.* **157**, 360–368
51. Gamble, J. R., Khew-Goodall, Y., and Vadas, M. A. (1993) Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J. Immunol.* **150**, 4494–4503
52. Grainger, D. J., Witchell, C. M., and Metcalfe, J. C. (1995) Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat. Med.* **1**, 1067–1073
53. Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C., and Bottinger, E. P. (2000) Dietary fat and reduced levels of TGF-beta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J. Cell Sci.* **113**, 2355–2361
54. Lutgens, E., Gijbels, M., Smook, M., Heeringa, P., Gotwals, P., Kotliansky, V. E., and Daemen, M. J. (2002) Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 975–982

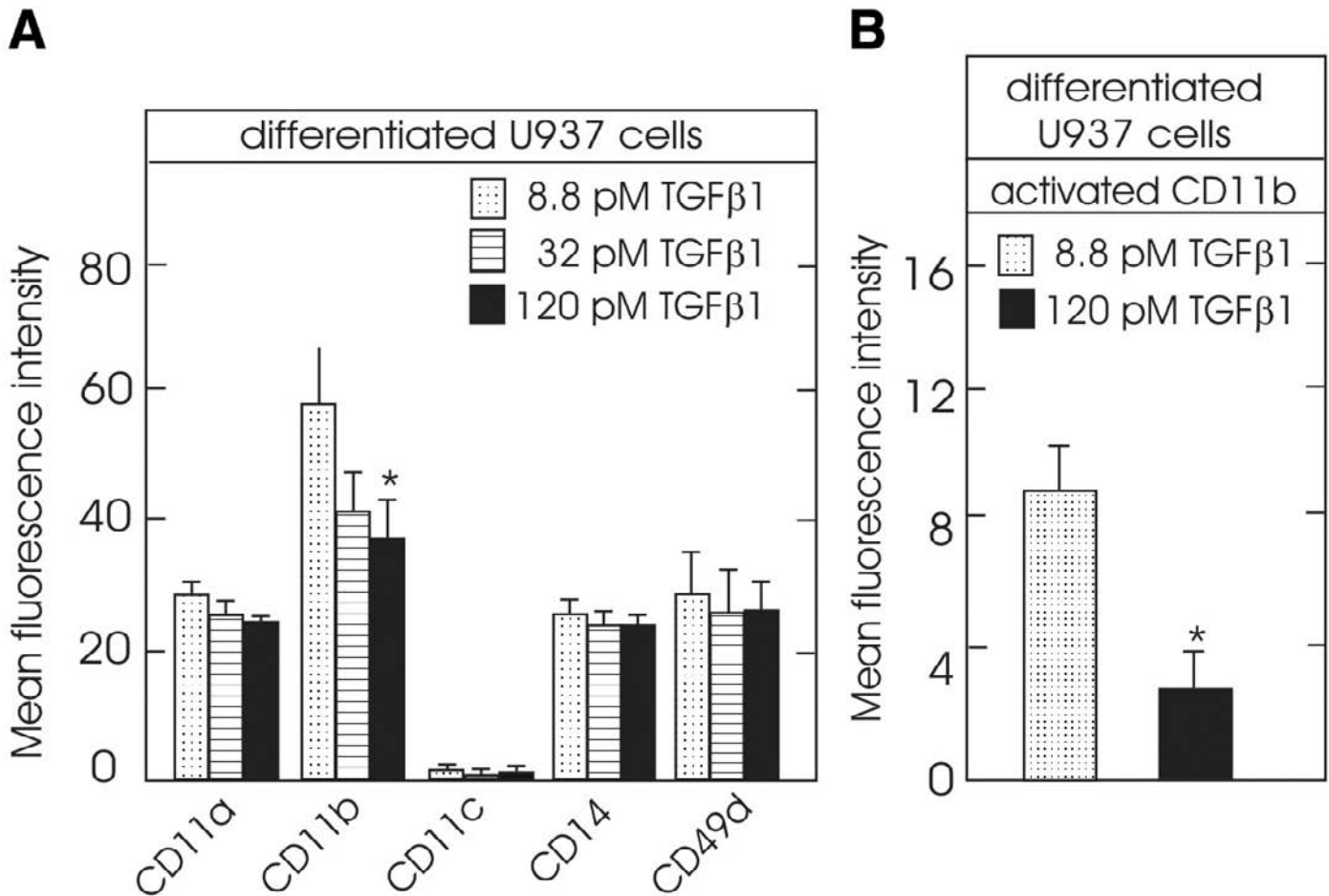
*Received September 8, 2004; accepted January 18, 2005.*

Fig. 1



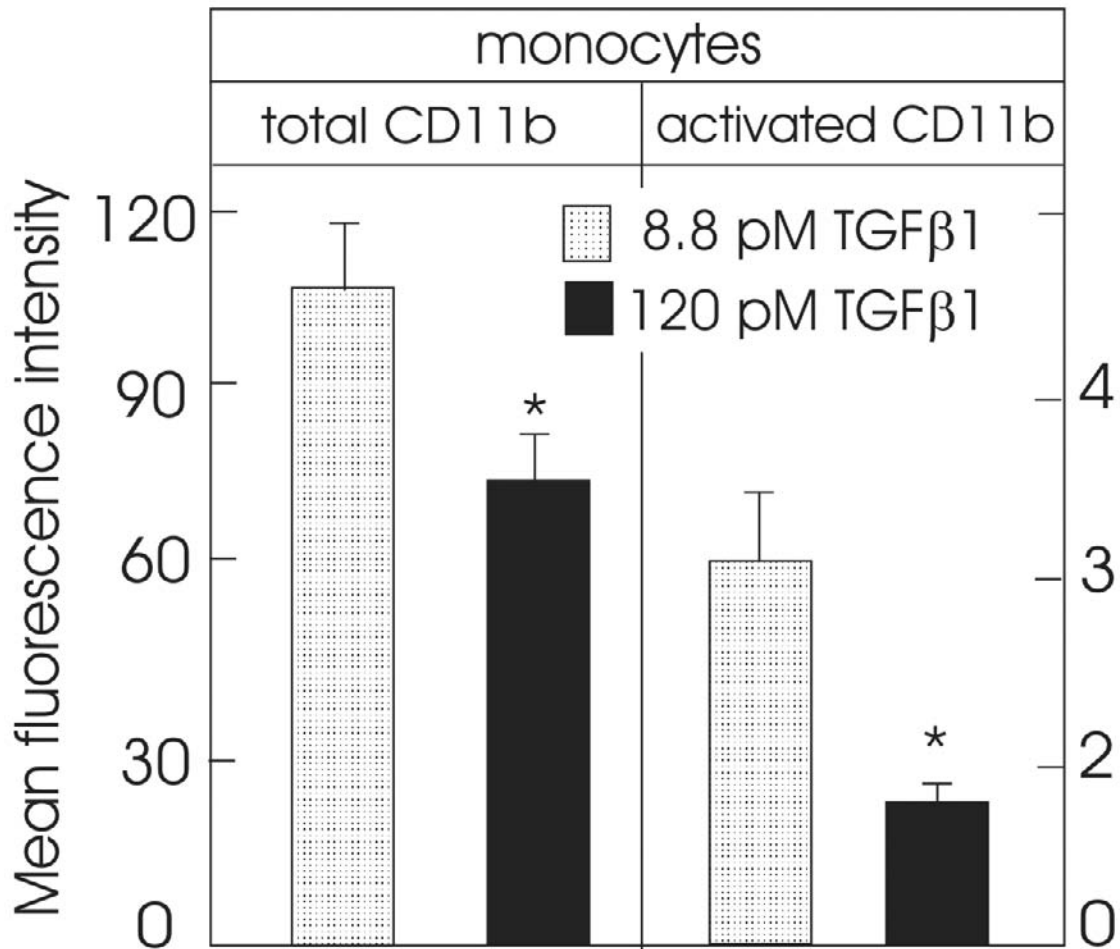
**Figure 1. Expression of  $\beta$ 2-integrins and CD14 on nondifferentiated and differentiated U937 cells.** Cells were incubated for 3 days in the absence or presence of  $1\alpha,25$ -dihydroxy-vitaminD3, retinoic acid, and TGF- $\beta$ 1. Cell surface expression of  $\beta$ 2-integrins and CD14 (a monocyte marker) was measured using flow cytometry ( $n=6$ ).

Fig. 2



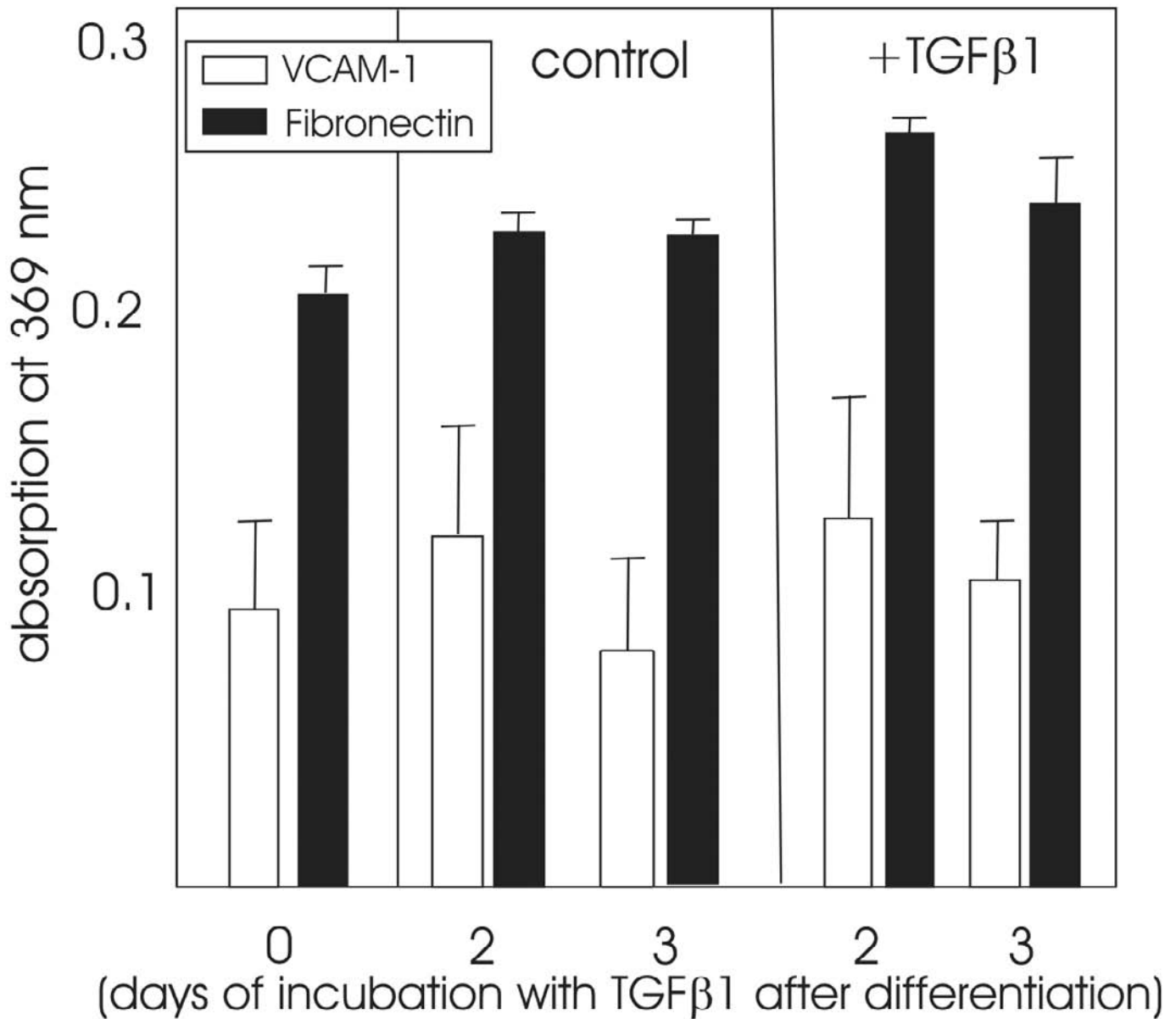
**Figure 2.** A) Expression of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-integrins and CD14 on differentiated U937 after further incubation in heat-inactivated human plasma in the presence of various concentrations of TGF- $\beta$ 1. Cell surface expression of integrins and CD14 was measured using flow cytometry. Note a significant reduction in CD11b expression on cells cultured in medium containing 120 pM of TGF- $\beta$ 1 ( $n=6$  and  $P<0.05$ ). B) Expression of the activation neo-isotope of CD11b, after a 10 min treatment with PMA, on differentiated U937 that had been incubated for 3 days in medium containing heat-inactivated human plasma (8.8 pM TGF- $\beta$  baseline concentration) or incubated for 3 days in the same medium but supplemented with TGF- $\beta$ 1 (final concentration of 120 pM). TGF- $\beta$ 1 strongly reduces the expression of the activation neo-epitope ( $n=4$  and  $P<0.05$ ).

Fig. 3



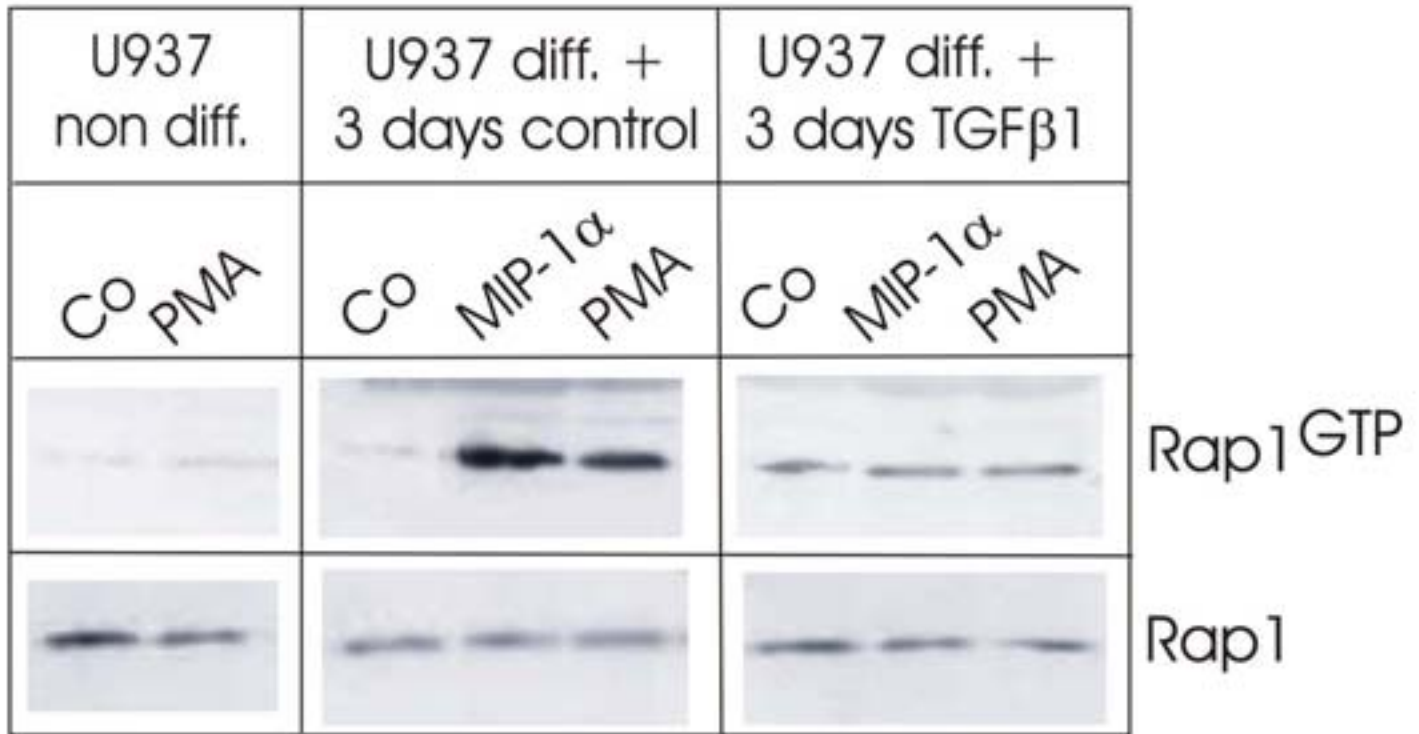
**Figure 3. Effect of TGF-β1 on expression of CD11b on human peripheral blood monocytes.** Cell surface expression was measured using flow cytometry ( $n=5$  and  $P<0.05$ ). **Left)** Expression of CD11b on peripheral blood monocytes is reduced by 30% after culture for 40 h in presence of additional TGF-β1 (final concentration of 120 pM). **Right)** High levels of TGF-β1 strongly reduce (50%) the expression of the activation neo-epitope of CD11b ( $n=5$  and  $P<0.05$ ).

Fig. 4



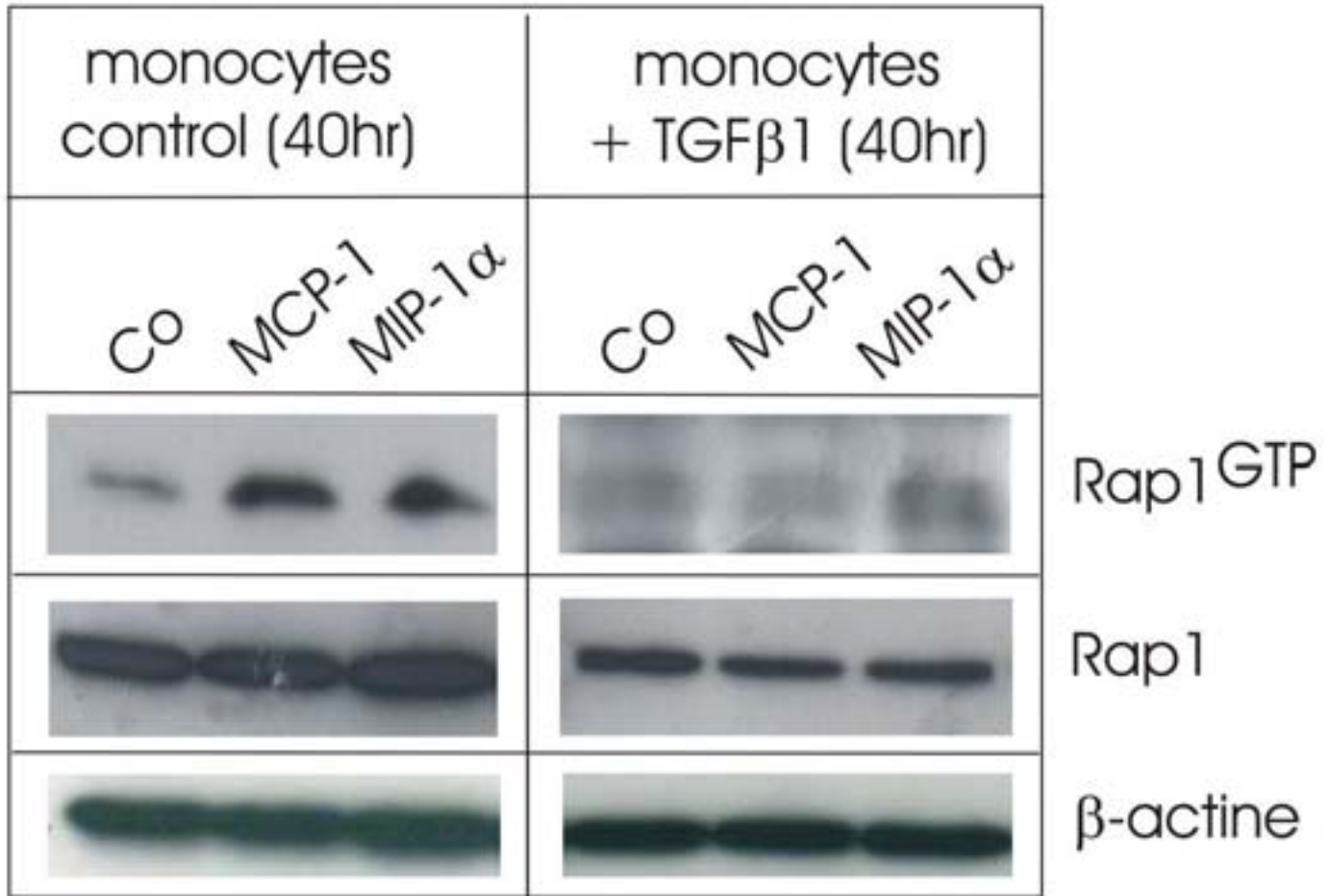
**Figure 4.** Binding of differentiated U937 cells to the adhesion molecule VCAM-1 or the extracellular matrix component fibronectin after subsequent culture in the absence or presence of TGF-β1 (final concentration of 120 pM). Cell binding was measured by the uptake of Rose Bengal by adherent cells (absorption at 369 nm). Incubation in the presence of TGF-β1 for up to 3 days did not alter cell binding to either ligand ( $n=3$ ).

**Fig. 5**



**Figure 5. Activation (Rap1<sup>GTP</sup>) and expression of Rap1 in U937 cells kept under different culture conditions and after treatment with various stimuli.** Rap1<sup>GTP</sup> was determined by a RaIGDS pull-down assay followed by a Western blotting protocol using anti-Rap1 antibodies. Cellular Rap1 expression was determined by the application of a similar Western blotting protocol on a fraction of whole cell lysates harvested before performing the pull down. **Left**) No stimulation of Rap1 in nondifferentiated U937 cells. **Middle**) Robust activation of Rap1 after the addition of MIP-1α or PMA to fully differentiated U937 that were left in culture for an additional 3 days without medium supplement. **Right**) The presence of TGF-β1 (final concentration of 120 pM) for 3 days after cell differentiation abrogates the MIP-1α or PMA-mediated activation of Rap1 (*n*=4).

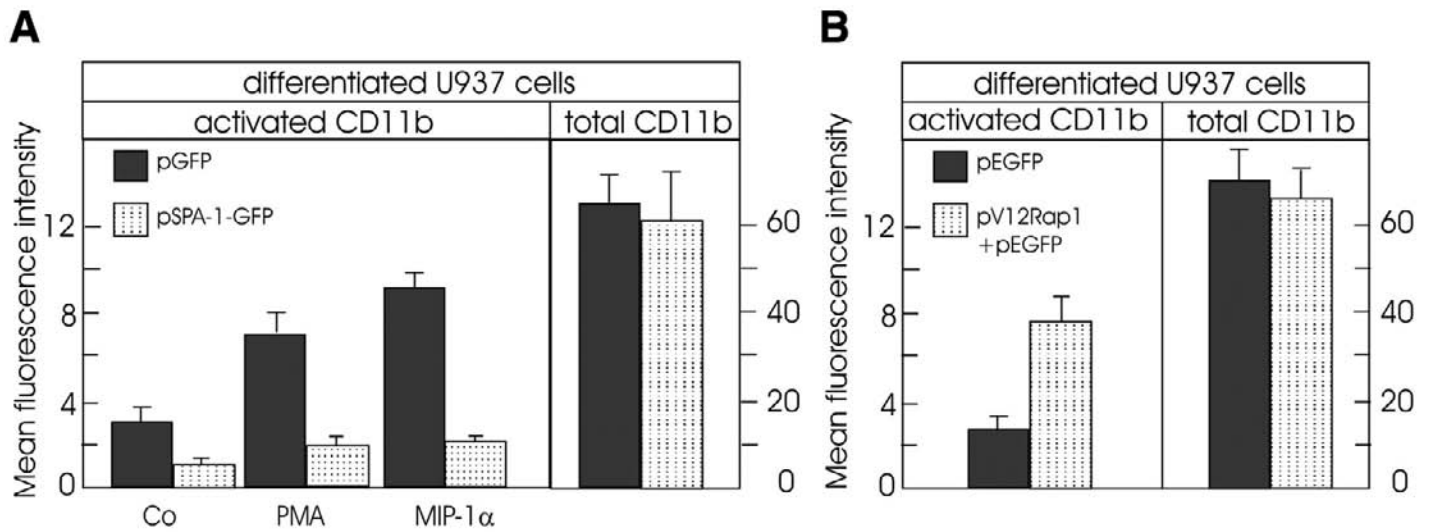
Fig. 6



**Figure 6. Activation (Rap1<sup>GTP</sup>) and expression of Rap1 in peripheral blood monocytes kept in culture for 40 h in the absence of presence of TGF-β1 (final concentration of 120 pM) and after a brief treatment with chemokines.** Rap1<sup>GTP</sup> was determined by a RalGDS pull-down assay followed by Western blotting protocol using anti-Rap1 antibodies. Expression of cellular Rap1 was determined by the application of a Western blotting protocol to whole cell lysates using anti-Rap1 antibodies. *Left*) Robust stimulation of Rap1 in response to MCP-1 or MIP-1α. *Right*) Prolonged presence of TGF-β1 abrogates the activation of Rap1 by MCP-1 or MIP-1α ( $n=4$ ).

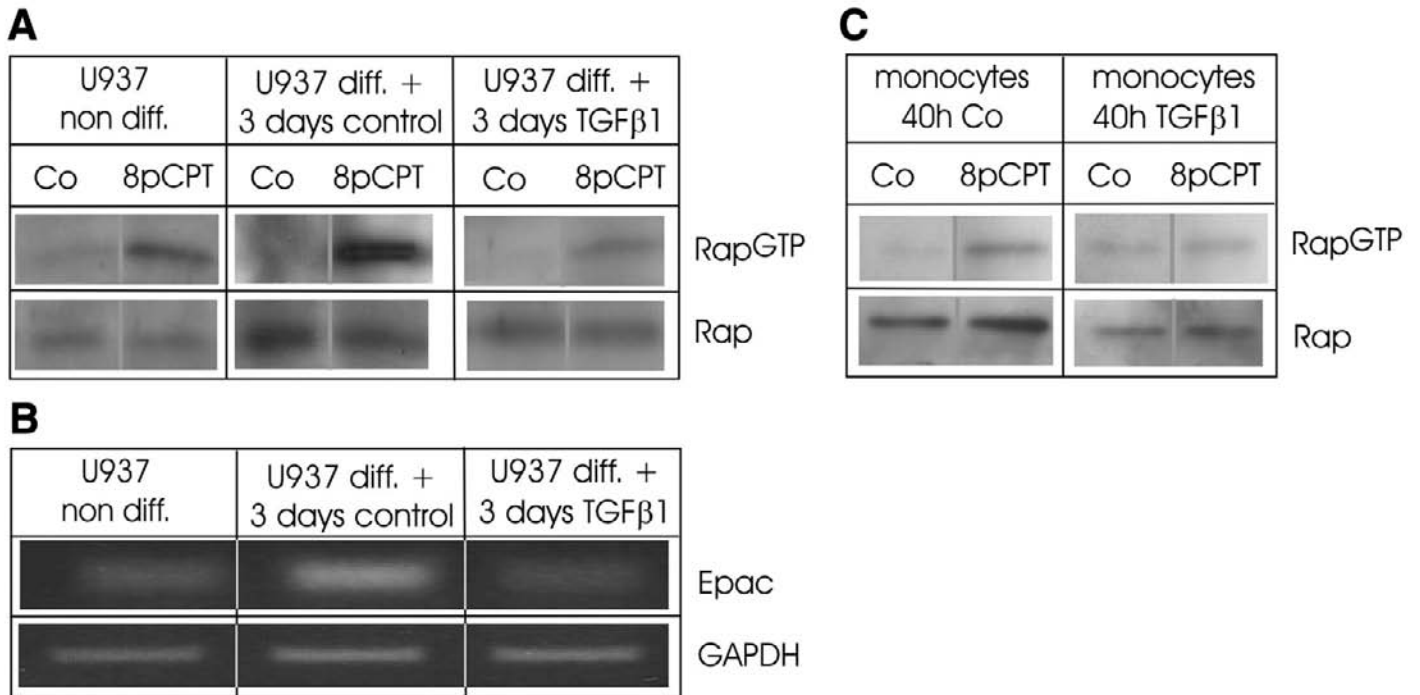


**Fig. 7**



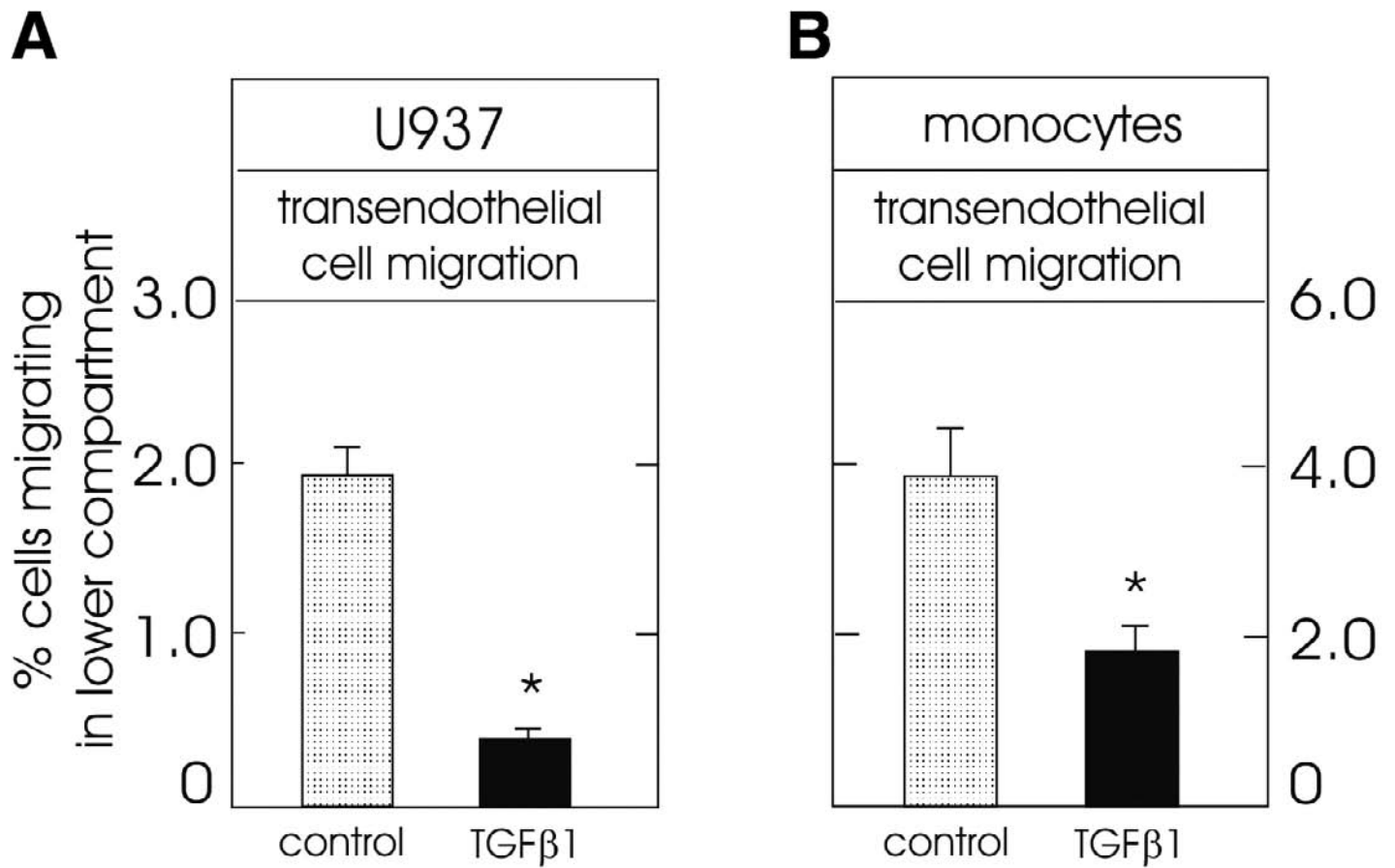
**Figure 7. Ectopic expression of SPA-1 precludes activation of CD11b whereas that of V12Rap1 induces its activation.** **A)** Differentiated U937 cells were transfected with pSPA1-GFP or pGFP alone as a control. After 24 h in culture, cells were briefly treated with PMA or MIP-1 $\alpha$  and expression of CD11b or its activation neo-isotope was measured in the “GFP-window” in a flow cytometry protocol (n=3). **B)** Differentiated U937 cells were transfected with V12Rap1 plus GFP or GFP alone as a control. Further treatment of cells as described in **A** (n=3).

**Fig. 8**



**Figure 8.** **A)** Expression of Epac in U937 cells under different culture conditions. Expression levels were assessed indirectly by evaluation of 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (8pCPT) mediated activation of Rap1. Nondifferentiated cells show a weak presence, as indicated by a weak GTP loading of Rap1, differentiated cells kept in culture show a strong level that is lost if the medium is supplemented with TGF- $\beta$ 1 (final concentration of 120 pM;  $n=4$ ). **B)** Expression of Epac mRNA in U937 cells kept under different culture conditions. Expression was assayed in an RT-PCR protocol using Epac-specific primers. Sample cDNA content was verified by assaying the presence of the GAPDH transcript. Prolonged treatment with TGF- $\beta$ 1 causes a loss of expression of the Epac transcript to levels of undifferentiated cells ( $n=3$ ). **C)** Treatment of peripheral blood monocytes for 40 h with TGF- $\beta$ 1 (final concentration of 120 pM) causes a reduction in the functional expression of Epac as measured by 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-mediated GTP loading of Rap1. A reduction of expression of Rap1 is also observed, but the level of diminution is highly donor dependent.

Fig. 9



**Figure 9.** Transendothelial migration of fully differentiated U937 cells (A) or of peripheral blood monocytes (B) kept in culture in the absence or presence of additional TGF-β1 (final concentration of 120 pM). Migration across a monolayer of endothelial cells was studied in a Transwell protocol. Cell migration into the lower compartment is greatly diminished in cells treated with additional TGF-β1 ( $n=4$  and  $P<0.05$ ).

## *RESULTATS*

**-2- CD44 enforces TGF $\beta$ 1-mediated  
expression of NADPH oxidase components in  
promyelocytic cells**

*Caroline Basoni, Edith Reuzeau, Daniel Croft, Elisabeth  
Genot and IJsbrand M. Kramer.*

*Soumis, J. Biol. Chem.*

## CD44 enforces TGF $\beta$ 1-mediated expression of NADPH oxidase components in promyelocytic cells<sup>1</sup>

Caroline Basoni\*, Edith Reuzeau,\* Daniel Croft†‡, Elisabeth Genot<sup>2\*</sup> and IJsbrand M. Kramer†\*.

**Running title** : U937 cell differentiation with hyaluronan and TGF $\beta$ 1

\* European Institute for Biology and Chemistry and INSERM U441/Université Victor Segalen  
2 rue Robert Escarpit, 33607 PESSAC CEDEX

† University College London, Department of Pharmacology, London WC1E 6BT, UK

‡ Present address : The Beatson Institute for Cancer Research, Garscube Estate, Switchback Road, Glasgow G61 1BD, UK

**Key words** : Cell differentiation, monocytes/macrophages, hematopoiesis, TGF $\beta$ 1, hyaluronan

**Abstract word count** : 208

### Footnotes :

1 This work was supported by institutional grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Ministère de la Recherche, specific grants from Fondation pour la Recherche Médicale

2 Address correspondence and reprint requests to Dr. Elisabeth Genot, European Institute for Biology and Chemistry/U441 INSERM, 2 rue Robert Escarpit  
33607 PESSAC CEDEX, Tel : +33 (0)5 4000 3038, e.genot@iecb.u-bordeaux.fr

3 Abbreviations used in this paper: BSA, bovine serum albumin; CD44, cluster of differentiation antigen-44; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylene diamine tetra-acetic acid; FITC, fluorescein isothiocyanate; HA, hyaluronan; HP, human plasma; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; INF- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; M-CSF, macrophage-colony stimulating factor; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; LPS, lipopolysaccharide; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NBT, nitroblue tetrazolium; PDBu, 4-beta-phorbol-12,13-dibutyrate; PECAM, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1; RPMI, Roswell Park Memorial Institute, TBS, Tris-buffered saline; TGF $\beta$ R, transforming growth factor- $\beta$  receptor; TNF- $\alpha$ , tissue necrosis factor- $\alpha$ ; VLA-4, very late antigen-4.

## Abstract

Bone marrow stromal cells produce large amounts of extracellular matrix and cytokines. Amongst them, hyaluronan, a glycosaminoglycan which constitutes the main ligand for the cell surface molecule CD44, and TGF $\beta$ 1 which is particularly important in monocyte differentiation. Compared to mature monocytes, U937 cells lack a number of monocyte markers such as NADPH-oxidase, CD14, and the integrins CD11b and VLA-4. We have studied *in vitro* the role of both hyaluronan and TGF $\beta$ 1, under plasma or serum culture conditions, in the differentiation of the human promonocytic cell line U937 (a neoplastic derivative of committed progenitors of monocytes). We present evidence that, in the presence of serum, the addition of hyaluronan is sufficient to induce expression of NADPH-oxidase components but not of other monocytic markers. In contrast, NADPH-oxidase was not induced by hyaluronan in cells cultured in plasma revealing that factors present in serum contribute to cell differentiation. By replacing serum with plasma, TGF $\beta$ 1 and hyaluronan were found to act synergistically in the induction of the NADPH-oxidase. Similar results were obtained when cells were cultured in the presence of TGF $\beta$ 1 and CD44 was crosslinked with anti-CD44 antibodies, thus showing that hyaluronan mediates its effect through CD44. We conclude that cell matrix factors act cooperatively with cytokines to induce expression of components of the NADPH-oxidase of monocytic progenitor cells.

## Introduction

The promyelocytic cell line U937, originates from the pleural fluid of a patient with diffuse histiocytic lymphoma (1). These blast cells are

believed to represent the neoplastic derivatives of committed progenitors of monocytes (2). Compared to mature monocytes, U937 cells lack a number of monocyte markers (3). For instance, U937 cells have an incomplete NADPH oxidase, lack high expression of a number of adhesion molecules such as members of the  $\beta$ 2 integrin family (CD11a, b, c) and members of the immunoglobulin superfamily, ICAM-1 and PECAM-1. In addition, these cells lack the LPS receptor CD14. Retinoic acid and vitamin D3 have been found to induce partial differentiation of promyelocytic cells but are not able to achieve terminal maturation mimicking the physiological pattern of monocytes (3, 4). Addition of cytokines such as TNF- $\alpha$  (5), INF- $\gamma$  (6) or TGF $\beta$ 1 completes the differentiation process (7). Conversely, in the absence of retinoic acid or vitamin D3, a combination of cytokines, for instance TGF $\beta$ 1 plus TNF- $\alpha$ , causes only partial differentiation (8, 9). The physiological role of TGF $\beta$ 1 in the process of hematopoiesis is highlighted by the observation that cells present in the bone marrow produce TGF $\beta$ 1 (10) and by the observation that disruption of the TGF $\beta$ 1-gene in mice results in a significant increase in the number of circulating immature neutrophils and monocytes (11). In addition, the administration of a single bolus of TGF $\beta$ 1, upstream of bone marrow in mice, inhibited early hematopoietic progenitor cell proliferation (12).

Bone marrow cells produce large amounts of a glycosaminoglycan component of the extracellular matrix, hyaluronan, which is released from the cells in a soluble form (13). Its main receptor is the highly glycosylated transmembrane protein CD44, (14, 15) which has important functions in cell-cell and cell-matrix interactions and signal transduction. Hyaluronan and its receptor play an important role in the adhesion of lymphoid cells to bone marrow stromal cells and

possibly to lymphoid organs (16), in the development of pro-NK cells into cytotoxic effector cells (17) and contribute to lymphopoiesis (18). Primitive myeloid cells also have the ability to bind hyaluronan (19). Moreover, CD44 is involved in normal myeloid differentiation as function blocking monoclonal antibodies against CD44 inhibit myelopoiesis (18). It is also a signaling molecule when engaged with specific activating monoclonal antibodies or with hyaluronan, its natural ligand (14, 20) and may therefore be used to activate cellular function (21). Thus, ligation of CD44 with activating antibodies against CD44 or with hyaluronan trigger terminal differentiation of leukemic acute myeloid leukemia cells (22). Fully differentiated human monocytes have retained the hyaluronan receptor CD44 and antibodies against CD44 elicit the release of TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  and M-CSF (23, 24). Monocytes can bind soluble hyaluronan and soluble hyaluronan induces IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IGF1 production in murine macrophages (20). Because cytokines like TGF $\beta$ 1 possess glycosaminoglycan binding sites which may affect their action (25-27) and that TGF $\beta$ RI can interact with CD44 (28), we set out a series of experiments to address the individual role of hyaluronan and TGF $\beta$ 1 in the differentiation process of the human promonocytic cell line U937. Differentiation was studied in the presence of either heat inactivated serum or plasma as culture supplements. Serum is the soluble fraction obtained after clotting and contains mediators released from blood cells and platelets during this process (29-31). Using criteria specific to normal differentiated monocytic cells (the ability to produce oxidative bursts, the expression of differentiation specific antigens and cellular behaviour changes), our results show that factors present in the serum partly obscure the study of individual cytokines in the process of myeloid differentiation. We reveal that in plasma culture conditions, in the presence of hyaluronan, TGF $\beta$ 1 is a potent inducer of the expression of components of

the NADPH-oxidase but not of other markers of U937 cell differentiation such as CD11b, VLA-4 or CD14.

## Materials and methods

### *Antibodies and reagents*

Polyclonal antibodies for the detection of the NADPH components p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> were kindly provided by Dr. A.W. Segal (Department of Medicine, UCL, London, UK). Monoclonal antibodies against p91<sup>phox</sup> were provided by Dr. A. Verhoeven, (Department of Experimental Hematology, Central Lab of Blood Transfusion Service, Amsterdam, The Netherlands). Antibodies against CD44 clone J-173, for flow cytometry analysis of CD44 expression, were obtained from Serotec (Marseille, France). Anti-CD44 monoclonal activating antibodies, clone A3D8 used in the differentiation experiments were kindly provided by Pr. Marilyn J. Telen, (Department of Medicine, Duke University, Durham, USA). Antibodies against CD11b and VLA4 were from Becton & Dickinson (Cowley, UK) and those against CD14 were obtained from DAKO, (High Wycombe, UK). FITC conjugated secondary antibodies were from Sigma. <sup>125</sup>I-TGF $\beta$ 1 was obtained from Amersham (Amersham, UK). DMEM, RPMI 1640, L-glutamine, streptomycin, sulphate, benzyl penicillinate, trypan blue and foetal bovine serum were from Invitrogen (Paisley, UK). TGF $\beta$ 1 and IFN- $\gamma$  were purchased from R&D Systems Europe (Abingdon, UK). Human umbilical hyaluronan was obtained from Sigma and Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, UK). Rooster comb hyaluronan was obtained from Sigma.

### *Heat inactivated Human Plasma*

Male AB donors were selected for plasma preparation. Fresh citrated buffy coats were spun at 10,000 x g for 20 min at 4°C under sterile conditions to remove blood cells and platelets. The supernatant was removed and CaCl<sub>2</sub> was added to reach a concentration of 4

mM  $\text{Ca}^{2+}$ . The plasma was left overnight at 4°C to allow clotting, then incubated for 30 min at 54°C to inactivate complement. An additional centrifugation (10,000 x g for 20 min at 4°C) was performed to clear the plasma. Sterility was assessed by incubating the plasma at 10% in DMEM for a week.

#### *Hyaluronan and chondroitin sulfate*

Human hyaluronan was dissolved at 1 or 3 mg/ml in DMEM overnight at 37°C under sterile conditions whilst shaking on a rotary shaker. Chondroitin sulfate was dissolved in DMEM at 37°C and the sterility of the solution was tested as above.

#### *Cell culture*

U937 cells were routinely cultured in RPMI 1640 medium supplemented with streptomycin and penicillin and 10% (v/v) fetal bovine serum. The cells were seeded at  $1 \times 10^5$ /ml and passaged twice a week. For NADPH induction experiments, cells were resuspended in DMEM with antibiotics and plated out at  $0.5 \times 10^6$  cells in 5 ml of medium in 9.6 cm<sup>2</sup> wells, with the addition of either fetal bovine serum or human plasma at 10% (v/v). Other supplements were hyaluronan and/or TGFβ1 at concentrations indicated in the text or figure legends.

#### *Western Blotting analysis and quantification of protein expression*

Cells were incubated in the various media as described in the figure legends for a period of 3 days, then collected, washed in PBS and counted. Cells were lysed directly in Laemmli sample buffer at a concentration of  $1 \times 10^6$ /200 μl. The samples were run onto 10% acrylamide gels, blotted onto nitrocellulose and probed overnight with antibodies at 4°C in TBS supplemented with 5% dried skimmed milk (w/v) and 0.02% azide (w/v). Antibody binding was detected after a 2 h incubation period with <sup>125</sup>I-Protein-A, followed by exposure to phosphor screen and analysis with a Fuji Bioimager. Linearity for screen activation was assessed with a dilution series

of sample with PDBu-induced NADPH oxidase expression. Radioactivity of the relevant protein band was measured and expressed as arbitrary units on the y-axis of the graphs.

#### *Flow cytometry analysis of cell surface markers*

Cells were washed twice with PBS supplemented with 4 mM EDTA and then distributed over a 96 well microtiter plate, followed by incubation in PBS supplemented with 3% human AB serum (v/v) and 0.05% azide (w/v). After two washes in PBS, the cells were resuspended in PBS, 1% BSA (w/v) and 0.05% azide (w/v) and incubated with the various antibodies for 45 min at 4°C. After one wash, FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin was added in PBS, 1% BSA (w/v) and 0.05% azide (w/v) and left at 4°C for another 45 min. Cells were washed 3 times in PBS, 1% BSA and fixed in 1% paraformaldehyde. Analysis of fluorescence was performed with a FACScan (Becton Dickinson).

#### *Nitroblue tetrazolium (NBT) reduction*

The NBT solution was prepared by dissolving 10 mg of NBT in 0.8 ml of Tyrode's solution, 1% BSA (w/v) and 1 mM  $\text{CaCl}_2$  containing 25% DMSO (v/v). Fresh solution was prepared for each experiment. After a 3 days incubation period in the various media, cells were transferred to an eppendorf cup and 40 μl of the NBT solution was added in the absence or presence (positive control) of 100 ng/ml PDBu to stimulate the NADPH oxidase. Cells were left at 37°C for 45 min whilst shaking and vortexed twice during the incubation to resuspend the slowly developing cell pellet. Cells were then washed once in Tyrode's and analysed under the microscope.

#### *Hyaluronan binding to U937 cells*

Fluorescein-conjugated hyaluronan (Fl-HA) was prepared as described (32) using rooster comb hyaluronan. U937 cells were washed twice with PBS, 1% BSA (w/v) and 0.05%



azide (w/v) followed by a 1h treatment with hyaluronidase (2 mg/ml) at 37°C to remove residual hyaluronan. The cells were washed twice in PBS, 1% BSA (w/v) and 0.05% azide (w/v), then incubated with Fl-HA for 30 min at a concentration of 2 µg/ml at 4°C. The cells were washed and observed under an epifluorescence microscope. As a negative control, chondroitin sulphate was used instead of hyaluronan. In addition, petri dishes were coated overnight with 3mg/ml of hyaluronan in DMEM at 4°C and cell attachment to the dish was measured after 10, 20, 30 and 60 min of incubation in DMEM at 37°C. Cell attachment was studied under the phase contrast microscope.

#### *CD44 ligation*

CD44 activating antibodies (clone A3D8) were diluted to reach a 20 µg/ml concentration in PBS (pH8) to coat 6-well tissue culture plates, overnight at 4°C. Plates were subsequently gently rinsed once with RPMI 1640 to remove unbound antibodies and used for stimulation studies as described below.

#### *<sup>125</sup>I-TGFβ1 binding to U937 cells*

Cells were spun (300 x g, 5 min) and resuspended in DMEM without any supplement for 90 min at 37°C, to remove any bound TGFβ1. Cells were spun again and resuspended in icecold DMEM supplemented with 25 mM Hepes (pH 7.4), 0.1% BSA (w/v) plus or minus hyaluronan (1mg/ml) at 1 x 10<sup>6</sup> cells/0.2 ml of medium. Cells were distributed in a 96 well microtiter plate. One to 500 pM of <sup>125</sup>I-TGFβ1 was added to the cells. For measuring non-specific binding, 20 nM cold TGFβ1 was included. The cells were left at 4°C for another 2 h whilst shaking on a rotary shaker. Cells were washed 5 times with 400 µl of DMEM/BSA/Hepes and resuspended in 50 µl of the same medium ; a 25 µl aliquot was used for quantitation using a γ-counter. Non-specific binding was subtracted from the total binding value and saturation binding curves were fitted to the data using a one to two hyperbola, non-linear, least squares curve,

provided by Dr. D. Colquhoun (Department of Pharmacology, UCL, London, UK). The results of non linear fitting are presented as a linear scale plot. The TGFβ1 dissociation equilibrium constant (Kd) and Bmax values were calculated.

## **Results**

### **Addition of hyaluronan induces expression of the cytosolic NADPH oxidase component p47<sup>phox</sup> in the presence of serum but not in the presence of plasma**

U937 cells are usually cultured in 10% fetal bovine serum. However, we reasoned that serum may not be the correct source of cell culture supplement for studying the role of individual cytokines because of the many inflammatory mediators released during the clotting process. Moreover, in the body, tissues are perfused with plasma and plasma supports proliferation and differentiation of bone marrow progenitor cells (33). We therefore compared cell proliferation in 10% plasma versus 10% serum over a one week period and found no significant difference in cell numbers in these conditions (see table I, top line section A). In addition, cell viability in the presence of either plasma or serum was also found to be similar between the 2 populations as measured by trypan blue exclusion. The effect of hyaluronan on p47<sup>phox</sup> expression, the cytosolic component of the NADPH oxidase that we used as a marker of monocyte differentiation (34, 35), was then assessed using U937 cells cultured in medium supplemented with either 10% human plasma or 10% fetal bovine serum over a 3 day incubation period. The combination of serum with increasing concentrations of hyaluronan induced a dose-dependent expression of p47<sup>phox</sup>. The induction at 3 mg/ml of hyaluronan was similar to the induction with the phorbol ester PDBu (100 ng/ml), employed as positive control. However, when serum was replaced by plasma, no such induction was seen (Fig. 1). The absence of

p47<sup>phox</sup> induction in human plasma could not be explained by the presence of a putative inhibitor because strong induction could be achieved with PDBu stimulation. We concluded that factors present in serum but not in plasma, are instrumental in the induction of p47<sup>phox</sup> in the presence of hyaluronan. Therefore the use of serum partly obscures the study of the role of individual cytokines in the process of U937 cell differentiation.

No change in the expression of the monocyte differentiation markers, CD14 or CD11b was observed under both serum and plasma conditions. Cells remained in suspension, reflecting a limited progression in the differentiation process. The expression of VLA-4 and CD44 also remained unchanged (data not shown). Different sources of hyaluronan produced similar results (data not shown). To ensure that the observed effects were not due to contaminating chondroitin sulphate, which may in some preparations contribute between 1-3% (w/w) of the total mass of hyaluronan, we repeated the p47<sup>phox</sup> induction experiments in the presence of chondroitin sulphate at 20-100 µg/ml. A modest response, not attaining more than 25% of that seen with 100 µg/ml hyaluronan, was observed.

### **TGFβ1 induces expression of p47<sup>phox</sup> in the presence of hyaluronan and plasma**

The combination of plasma and hyaluronan did not result in a marked expression of p47<sup>phox</sup>. We therefore used 10% plasma plus or minus 1 mg/ml of hyaluronan to study the effect of TGFβ1. In the sole presence of plasma, TGFβ1 was not able to induce p47<sup>phox</sup> expression at concentrations ranging from 0.01 to 1.0 ng/ml. With the addition of hyaluronan, p47<sup>phox</sup> was markedly induced (Fig. 2). The addition of TGFβ1 together with fetal bovine serum and hyaluronan also gave an increase in p47<sup>phox</sup> expression above the elevated background levels (data not shown). In terms of cell numbers, the combination of

hyaluronan and TGFβ1 gave a lower cell count under the various conditions, indicative of a reduced cell proliferation rate (table I).

### **TGFβ1 also induces the expression of p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and p91<sup>phox</sup> resulting in the formation of a functional NADPH oxidase**

A functional NADPH oxidase complex is made up of a number of proteins. The p22<sup>phox</sup> and Rac are constitutively expressed in the U937 cell line (36, 37) but the other components, the heavy chain cytochrome b558, p91<sup>phox</sup> and the cytosolic components p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and p40<sup>phox</sup> are absent. The uninduced U937 cells are therefore unable to mount a respiratory burst (37). Addition of TGFβ1 in the presence of plasma and hyaluronan, not only induced the expression of p47<sup>phox</sup> but also that of all the necessary NADPH oxidase components (Fig. 3). It should be mentioned that the p40<sup>phox</sup> is present in U937 cells cultured in 10% fetal bovine serum alone, but this expression is undetectable when the cells were cultured in 10% human plasma. NADPH oxidase activity of U937 cells was followed using Nitro Blue Tetrazolium (NBT), after stimulation of the cells with PDBu (100 ng/ml), in parallel with the expression of the NADPH oxidase components. We could detect abundant NBT reduction after a minimum of 3 days incubation in plasma plus TGFβ1 and hyaluronan (Fig. 4). The combination of plasma plus hyaluronan or plasma plus TGFβ1 had no effect. Treatment of cells with 1,000 U/ml of rINF-γ in the presence of serum, which was used as a positive control, required a similar duration for induction of oxidase activity (data not shown).

### **Antibody crosslinking of CD44 enhances TGF-β1-mediated expression of p47<sup>phox</sup>**

The presence of hyaluronan and its role in facilitating the TGFβ1-induced differentiation could be explained in two ways. On the one hand, hyaluronan binding to the CD44

receptor would trigger receptor activation and subsequent signal transduction, its signal would converge with that emanating from the TGF $\beta$ 1 receptor and the two signals could be required for strong expression of the NADPH oxidase components. On the other hand, hyaluronan might affect binding of TGF $\beta$ 1 to its receptor, in a manner analogous to that described in the model of bFGF and heparan sulfate cooperation (38).

To test the first possibility, we added U937 cells to culture dishes coated with anti-CD44 antibodies. This approach eliminated the possibility that components contaminating the hyaluronan preparation would affect cell differentiation. Undifferentiated U937 cells express the CD44 receptor, as revealed by a flow cytometric analysis (Fig. 5a). Presentation of anti-CD44 antibodies to U937 cells induced their adhesion to the dish but had little effect on p47<sup>phox</sup> expression. However, a synergistic effect was observed when TGF $\beta$ 1 (at 1ng/ml) was added. After 3 days of incubation, about 50% of the maximal response obtained in the positive control was achieved (Fig. 5b). This finding provided further evidence for a role of CD44 in U937 cell differentiation.

To test whether hyaluronan may affect of TGF $\beta$  to its receptor, we measured the binding of <sup>125</sup>I-TGF $\beta$ 1 to U937 cells. U937 cells express specific binding sites with a Kd of 3.76 pM and a Bmax of 0.101 fmol/10<sup>6</sup> cells (Fig. 6). A similar single type of high affinity receptor is also found on mature human monocytes with a Kd of 6.0 pM (39). The addition of hyaluronan at a concentration of 1 mg/ml had no effect on binding to the high affinity receptor and we took this to mean that hyaluronan has no effect on ligand binding. These data indicated to us that the effect of hyaluronan is independent of TGF $\beta$ 1 binding to its receptor and thereby excluded the second hypothesis.

## Discussion

In this report, we demonstrate that, in the presence of plasma and the glycosaminoglycan hyaluronan, TGF $\beta$ 1 strongly induces expression of components of the NADPH-oxidase but not of other markers of monocytic differentiation such as CD11b, CD14, VLA-4, in U937 cells. The combination of plasma, hyaluronan and TGF $\beta$ 1, does not cause adhesion to the substratum, confirming that integrin expression and/or activation were not involved. The combination of plasma, hyaluronan and TGF $\beta$ 1 caused only a modest reduction in the cell proliferation rate, thus reflecting that only partial differentiation was achieved. The observed hyaluronan-mediated switch, from weak to strong-induction of components of the NADPH-oxidase by TGF $\beta$ 1, could be mimicked by crosslinking CD44 antibodies bound to CD44 at the membrane. These results provide compelling evidence that engagement of the CD44 receptor influences expression of components of the NADPH oxidase.

In these studies, we examined two aspects of cell differentiation: the type of medium supplement, plasma or serum, and the importance of the extracellular matrix. Our experiments show that the choice of supplement matters in the outcome of myeloid cell differentiation. Firstly, in undifferentiated cells, the expression p40<sup>phox</sup> is absent when cultured in plasma whereas it is expressed in cells incubated with serum (40). Secondly, TGF $\beta$ 1 was not recognized as an inducer of expression of components of the NADPH-oxidase when cells were cultured in the presence of serum because under this condition hyaluronan alone was sufficient for maximal induction of these components. A number of arguments question the standard choice of serum as medium supplement for differentiation studies. Serum is the soluble fraction obtained after clotting and represents a pathological rather than physiological state

of the blood fluid. This process causes the release of inflammatory mediators from blood cells and platelets. For instance increased levels of angiogenin, EGF, GRO $\alpha$ , IL-3, IL-6, PDGF, RANTES, latent TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2 are measured in bovine serum in comparison with those detected in platelet free citrate plasma (30, 31). The high level of latent TGF $\beta$ 1 raises difficulties in controlling levels of active TGF $\beta$ 1 during cell culture (29, 31). Apart from inflammatory cytokines, histamine, leukotrienes, thromboxanes, lysophosphatidic acid and PAF are also released during the clotting process and these mediators have all been demonstrated to have an effect on cellular behaviour. In particular, lysophosphatic acid has been shown to act as a cytokine with a specific cell surface receptor (29, 41). Histamine has been shown to play a role in HL-60 differentiation towards neutrophils and has a role in the action of GM-CSF stimulated proliferation of bone marrow progenitor cells (42-44). The extracellular fluid that perfuse body tissues contains approximately 10% of blood plasma. This percentage could be higher in the bone marrow because of the intense exchange of fluid and cells between blood and this particular tissue. It is likely that numerous studies on the colony forming behaviour of bone marrow progenitor cells were performed in plasma rather than in serum for this specific reason (33).

Our studies also show that the extracellular matrix contributes to the differentiation process. Addition of hyaluronan or crosslinking by anti-CD44 antibodies stimulates expression of components of the NADPH-oxidase in the presence of TGF $\beta$ 1 under conditions where either component alone had little effect. We did not observe expression of other differentiation markers such as CD11b, VLA-4 or CD14. We take this to mean that TGF $\beta$ 1 and CD44 induce only partial differentiation. Glycosaminoglycans have been shown to be involved in cytokine regulation (26, 27) most

notably heparan sulfate. This glycosaminoglycan, when linked to proteins, enables bFGF to bind its high affinity receptor (38). We show that hyaluronan had no effect on TGF $\beta$ 1 binding and we therefore exclude a possible synergy at this level. These results indicate that synergistic effects must occur intracellularly (28).

The induction of expression of the NADPH oxidase in U937 cells through the presence of TGF $\beta$ 1 in combination with plasma and hyaluronan, coincides with a reduced rate of cell proliferation. This observation is in agreement with previous findings reporting that TGF $\beta$ 1 knock-out mice display a threefold increase of immature neutrophils and monocytes (12) and that addition of TGF $\beta$ 1 to bone marrow *in vivo* can restore a normal myeloid cell number (11). In the context of our study, it would be of great interest to examine the state of development of the NADPH oxidase in circulating neutrophils and monocytes in TGF $\beta$ 1 knock-out mice. Mice that lack the production of hyaluronan, by disruption of the *has2* gene (hyaluronan synthetase-2), show serious cardiovascular defects and die during mid-gestation (45). Detailed analysis showed that the absence of hyaluronan had two effects : 1) lack of formation of highly hydrated and expanded ECM, forming the so called cardiac jelly necessary for cell migration and 2) lack of "epithelial-mesenchymal transformation" of cushion endothelium. TGF $\beta$ 1 is one of the mediators of epithelial-mesenchymal transformation *in vitro* (46) and it is possible that the lack of hyaluronan prevents certain actions of TGF $\beta$ 1. Our findings provide an explanation for these observed cardiac defects.

In conclusion, the combination of plasma, hyaluronan and TGF $\beta$ 1, components that are present in the bone marrow, is sufficient to allow full expression of a functional NADPH oxidase in the promonocytic U937 cells. In this process, hyaluronan acts as a switch for the differentiating action of TGF $\beta$ 1, which

could be mimicked by the addition of crosslinking anti-CD44 antibodies. An exciting possibility exists that hyaluronan may have an effect on TGF $\beta$ 1 receptor complex formation and thus determine the signal that is transduced into the cell.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Dr. Peter Parker (Cancer Research UK, London Research Institute, London, UK) for the supply of U937 and initial support of this study. The members of the laboratory of Dr. Tony Segal, (Dpt of Medicine, UCL, London UK) are acknowledged for their generous supply of antibodies. Dr. Arthur Verhoeven (Central Laboratory of Blood transfusion Service, Amsterdam) is acknowledged for the supply of antibodies against cytochrome b. Dr. Alaisdair Gibb (Dpt of Pharmacology, UCL, London, UK) has helped us with the analysis of the TGF $\beta$ 1 binding data. Dr. Marilyn J. Telen, (Dpt of Medicine, Duke University, Durham, USA) for the generous supply of anti-CD44 antibodies. We thank Pr. Jacques Bonnet (U441, INSERM, Pessac, France) for constant support.

## References

1. Harris, P., and P. Ralph. 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol* 37:407.
2. Sundstrom, C., and K. Nilsson. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17:565.
3. Lubbert, M., F. Herrmann, and H. P. Koeffler. 1991. Expression and regulation of myeloid-specific genes in normal and leukemic myeloid cells. *Blood* 77:909.
4. Dodd, R. C., M. S. Cohen, S. L. Newman, and T. K. Gray. 1983. Vitamin D metabolites change the phenotype of monoblastic U937 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:7538.
5. Takeda, K., S. Iwamoto, H. Sugimoto, T. Takuma, N. Kawatani, M. Noda, A. Masaki, H. Morise, H. Arimura, and K. Konno. 1986. Identity of differentiation inducing factor and tumour necrosis factor. *Nature* 323:338.
6. Perussia, B., E. T. Dayton, V. Fanning, P. Thiagarajan, J. Hoxie, and G. Trinchieri. 1983. Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway. *J Exp Med* 158:2058.
7. Testa, U., R. Masciulli, E. Tritarelli, R. Pustorino, G. Mariani, R. Martucci, T. Barberi, A. Camagna, M. Valtieri, and C. Peschle. 1993. Transforming growth factor-beta potentiates vitamin D3-induced terminal monocytic differentiation of human leukemic cell lines. *J Immunol* 150:2418.
8. Nambu, M., M. Morita, H. Watanabe, Y. Uenoyama, K. M. Kim, M. Tanaka, Y. Iwai, H. Kimata, M. Mayumi, and H. Mikawa. 1989. Regulation of Fc gamma receptor expression and phagocytosis of a human monoblast cell line U937. Participation of cAMP and protein kinase C in the effects of IFN-gamma and phorbol ester. *J Immunol* 143:4158.
9. Kamijo, R., K. Takeda, M. Nagumo, and K. Konno. 1990. Effects of combinations of transforming growth factor-beta 1 and tumor necrosis factor on induction of differentiation of human myelogenous leukemic cell lines. *J Immunol* 144:1311.
10. Ellingsworth, L. R., J. E. Brennan, K. Fok, D. M. Rosen, H. Bentz, K. A. Piez, and S. M. Seyedin. 1986. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor beta. Immunohistochemical localization and association with differentiating cells. *J Biol Chem* 261:12362.
11. Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693.
12. Goey, H., J. R. Keller, T. Back, D. L. Longo, F. W. Ruscetti, and R. H. Wiltout. 1989. Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 143:877.
13. Gallagher, J. T., E. Spooncer, and T. M. Dexter. 1983. Role of the cellular matrix in haemopoiesis. I. Synthesis of glycosaminoglycans by mouse bone marrow cell cultures. *J Cell Sci* 63:155.
14. Aruffo, A., I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, and B. Seed. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61:1303.
15. Culty, M., K. Miyake, P. W. Kincade, E. Sikorski, E. C. Butcher, and C. Underhill. 1990. The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins. *J Cell Biol* 111:2765.

16. Miyake, K., C. B. Underhill, J. Lesley, and P. W. Kincade. 1990. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J Exp Med* 172:69.
17. Delfino, D. V., K. D. Patrene, A. B. DeLeo, R. DeLeo, R. B. Herberman, and S. S. Boggs. 1994. Role of CD44 in the development of natural killer cells from precursors in long-term cultures of mouse bone marrow. *J Immunol* 152:5171.
18. Miyake, K., K. L. Medina, S. Hayashi, S. Ono, T. Hamaoka, and P. W. Kincade. 1990. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. *J Exp Med* 171:477.
19. Morimoto, K., E. Robin, M. C. Le Bousse-Kerdiles, Y. Li, D. Clay, C. Jasmin, and F. Smadja-Joffe. 1994. CD44 mediates hyaluronan binding by human myeloid KG1A and KG1 cells. *Blood* 83:657.
20. Noble, P. W., F. R. Lake, P. M. Henson, and D. W. Riches. 1993. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest* 91:2368.
21. Charrad, R. S., Z. Gadhoun, J. Qi, A. Glachant, M. Allouche, C. Jasmin, C. Chomienne, and F. Smadja-Joffe. 2002. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* 99:290.
22. Charrad, R. S., Y. Li, B. Delpech, N. Balitrand, D. Clay, C. Jasmin, C. Chomienne, and F. Smadja-Joffe. 1999. Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia. *Nat Med* 5:669.
23. Webb, D. S., Y. Shimizu, G. A. Van Seventer, S. Shaw, and T. L. Gerrard. 1990. LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 249:1295.
24. Gruber, M. F., D. S. Webb, and T. L. Gerrard. 1992. Stimulation of human monocytes via CD45, CD44, and LFA-3 triggers macrophage-colony-stimulating factor production. Synergism with lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 148:1113.
25. Hildebrand, A., M. Romaris, L. M. Rasmussen, D. Heinegard, D. R. Twardzik, W. A. Border, and E. Ruoslahti. 1994. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 302 ( Pt 2):527.
26. Ruoslahti, E., and Y. Yamaguchi. 1991. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64:867.
27. Tanaka, Y., D. H. Adams, and S. Shaw. 1993. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* 14:111.
28. Bourguignon, L. Y., P. A. Singleton, H. Zhu, and B. Zhou. 2002. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem* 277:39703.
29. Eichholtz, T., K. Jalink, I. Fahrenfort, and W. H. Moolenaar. 1993. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291 ( Pt 3):677.
30. Grainger, D. J., P. R. Kemp, J. C. Metcalfe, A. C. Liu, R. M. Lawn, N. R. Williams, A. A. Grace, P. M. Schofield, and A. Chauhan. 1995. The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med* 1:74.
31. Lyons, R. M., J. Keski-Oja, and H. L. Moses. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106:1659.

32. de Belder, A. N., and K. O. Wik. 1975. Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydr Res* 44:251.
33. McLeod, D. L., M. M. Shreeve, and A. A. Axelrad. 1974. Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E. *Blood* 44:517.
34. Segal, A. W., P. G. Heyworth, S. Cockcroft, and M. M. Barrowman. 1985. Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* 316:547.
35. Kramer, I. M., A. J. Verhoeven, R. L. van der Bend, R. S. Weening, and D. Roos. 1988. Purified protein kinase C phosphorylates a 47-kDa protein in control neutrophil cytoplasts but not in neutrophil cytoplasts from patients with the autosomal form of chronic granulomatous disease. *J Biol Chem* 263:2352.
36. Abo, A., E. Pick, A. Hall, N. Totty, C. G. Teahan, and A. W. Segal. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353:668.
37. Cassatella, M. A., L. Hartman, B. Perussia, and G. Trinchieri. 1989. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b-245 heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J Clin Invest* 83:1570.
38. Yayon, A., M. Klagsbrun, J. D. Esko, P. Leder, and D. M. Ornitz. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64:841.
39. Wahl, S. M., D. A. Hunt, L. M. Wakefield, N. McCartney-Francis, L. M. Wahl, A. B. Roberts, and M. B. Sporn. 1987. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5788.
40. Wientjes, F. B., J. J. Hsuan, N. F. Totty, and A. W. Segal. 1993. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J* 296 ( Pt 3):557.
41. van der Bend, R. L., J. Brunner, K. Jalink, E. J. van Corven, W. H. Moolenaar, and W. J. van Blitterswijk. 1992. Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *Embo J* 11:2495.
42. Keyzer, J. J., B. G. Wolthers, F. A. Muskiet, H. Breukelman, H. F. Kauffman, and K. de Vries. 1984. Measurement of plasma histamine by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: methodology and normal values. *Anal Biochem* 139:474.
43. Nonaka, T., M. Mio, M. Doi, and K. Tasaka. 1992. Histamine-induced differentiation of HL-60 cells. The role of cAMP and protein kinase A. *Biochem Pharmacol* 44:1115.
44. Piquet-Pellorce, C., E. Schneider, and M. Dy. 1991. GM-CSF in association with IL-1 triggers day-8 CFU-S into cell cycle: role of histamine. *J Cell Physiol* 149:18.
45. Camenisch, T. D., A. P. Spicer, T. Brehm-Gibson, J. Biesterfeldt, M. L. Augustine, A. Calabro, Jr., S. Kubalak, S. E. Klewer, and J. A. McDonald. 2000. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 106:349.
46. Ellenrieder, V., S. F. Hendler, W. Boeck, T. Seufferlein, A. Menke, C. Ruhland, G. Adler, and T. M. Gress. 2001. Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61:4222.



## Figure legends

### **Table I. Proliferation of U937 cells with different media supplements.**

The table depicts the total number of cells (per  $1 \times 10^6 \pm$  SEM) and percentage of growth of U937 cells incubated in DMEM plus human plasma (HP) or fetal bovine serum (FBS) for 3 days with a) hyaluronan, ranging from 0.1 mg/ml to 3 mg/ml; b) with TGF $\beta$ 1 ranging from 0.01 to 1 ng/ml; c) or with hyaluronan (1 mg/ml) plus TGF $\beta$ 1 ranging between 0.01 and 1 ng/ml. All experiments were repeated 3 times in duplicate.

### **Figure 1. p47<sup>phox</sup> expression in U937 cells with increasing concentrations of hyaluronan in the presence of serum or plasma.**

**Top left:** Increasing concentrations of hyaluronan were added to U937 cells in the presence of either serum or plasma. PDBu served as a positive control. Cells were incubated for a 3 day period in DMEM at 37°C with various supplements as indicated. Cells were then washed, counted and solubilized in Laemmli sample buffer. Samples were run onto a 10% acrylamide gel, blotted and probed with an anti-p47<sup>phox</sup> antibody. Antimbody binding was detected with <sup>125</sup>I-protein.

**Right:** <sup>125</sup>I-protein A bound to the blot as shown in the left panel was quantitated on a Fuji BAS1000 bioimager. Radioactivity is presented as arbitrary units. The data shown are the average of four separate experiments. HA = hyaluronan, HP = human plasma, FBS = fetal bovine serum.

### **Figure 2. Expression of p47<sup>phox</sup> in U937 cells in the presence of hyaluronan, human plasma and increasing doses of TGF $\beta$ 1.**

Cells were incubated in DMEM for 3 days with the various media supplements as indicated. Cells were then prepared for electrophoresis and western blotting as described in figure 1. Expression of p47<sup>phox</sup> is presented in arbitrary units of radioactivity. The data represent four separate experiments. HA = hyaluronan; HP = human plasma.

### **Figure 3. Expression of p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and p91<sup>phox</sup> in U937 in the presence of hyaluronan, human plasma and increasing doses of TGF $\beta$ 1.**

Western blot analysis of p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and p91<sup>phox</sup> expression after incubation of U937 cells for 3 days in the presence of TGF $\beta$ 1 plus or minus hyaluronan (1mg/ml). Cells were subjected to electrophoresis, followed by western blotting as described in figure 1. Induction of expression is presented in arbitrary units of radioactivity. The data represent the average of three separate experiments. HA = hyaluronan; HP = human plasma.

### **FIGURE 4. NADPH oxidase activity of U937, detected by NBT reduction (dark blue cells), after treatment with hyaluronan, TGF $\beta$ 1 or a combination of the two.**

Cells were cultured with plasma supplemented with hyaluronan and TGF $\beta$ 1 as indicated. PDBu and NBT were added simultaneously and the cells were left for 40 min at 37°C. Data shown is representative of 6 separate experiments. Note that reduction of NBT only occurs in cells treated with the combination of human plasma, hyaluronan and TGF $\beta$ 1.

**Figure 5. CD44 and TGFβ1 cooperate in the induction of expression of p47<sup>PHOX</sup>**

**a) Expression of CD44 on U937 cells.** Cells were incubated with anti-CD44 antibodies for 2 h at 4°C, washed in PBS and incubated with anti-IgG-FITC for 45 min. After fixation with paraformaldehyde cell fluorescence was analysed using a Becton Dickenson FACScan.

**b) p47<sup>phox</sup> expression in U937 cells with different treatments of TGFβ1 and anti-CD44.**

Western blot analysis of p47<sup>phox</sup> expression after incubation of U937 cells for three days with TGFβ1 alone or with anti-CD44 or control antibodies coated on the tissue culture dishes. Cells were subjected to electrophoresis followed by western blotting as described above. Quantification of the band intensities are shown in the bottom panel. Note the synergistic effect of the combination of anti-CD44 and TGFβ1. Data shown are the average of 3 separate experiments.

**FIGURE 6. Binding of TGFβ1 to U937 cells in the absence or presence of hyaluronan**

Linear plot analysis of <sup>125</sup>I- TGFβ1 binding to undifferentiated U937 cells in the presence or absence of hyaluronan. Cells were left at 4°C for 2h in the presence of varying concentrations (1-500 pM) of <sup>125</sup>I-TGFβ1 with or without an excess of cold TGFβ1 (20 nM). After washing, radioactivity was measured in a γ-counter and data were analyzed using a non-linear least square curve fitting programme. Linear plot analysis shows no change in the number of binding sites or the dissociation equilibrium constant (Kd) after addition of hyaluronan. The plots show the mean values of 4 identical experiments performed in duplicate.

**Table I**

	HP	%	FBS	%
(A) control	1.10 +/- 0.36	100	1.00 +/- 0.33	100
HA dR 0.1	0.91 +/- 0.12	83	0.98 +/- 0.24	98
0.3	0.89 +/- 0.19	81	0.86 +/- 0.22	86
1.0	0.84 +/- 0.19	76	0.90 +/- 0.14	90
3.0	0.60 +/- 0.13	55	0.62 +/- 0.25	62
(B) control	1.55 +/- 0.33	100	1.30 +/- 0.33	100
TGFβ 0.01	2.06 +/- 0.65	133	1.94 +/- 0.85	149
0.03	2.10 +/- 0.42	135	1.26 +/- 0.81	97
0.1	2.20 +/- 0.70	142	1.66 +/- 0.44	128
0.3	1.88 +/- 0.64	121	1.51 +/- 0.72	116
1.0	1.78 +/- 0.65	114	1.89 +/- 1.18	145
(C) control	1.19 +/- 0.14	100	0.99 +/- 0.27	100
HA + TGFβ 0.01	1.47 +/- 0.85	124	1.11 +/- 0.57	112
0.03	1.08 +/- 0.56	91	1.14 +/- 0.38	115
0.1	0.81 +/- 0.42	68	1.18 +/- 0.49	119
0.3	0.81 +/- 0.40	68	0.94 +/- 0.42	95
1.0	0.72 +/- 0.71	61	0.63 +/- 0.37	64

**Table I. Proliferation of U937 cells with different media supplements.**

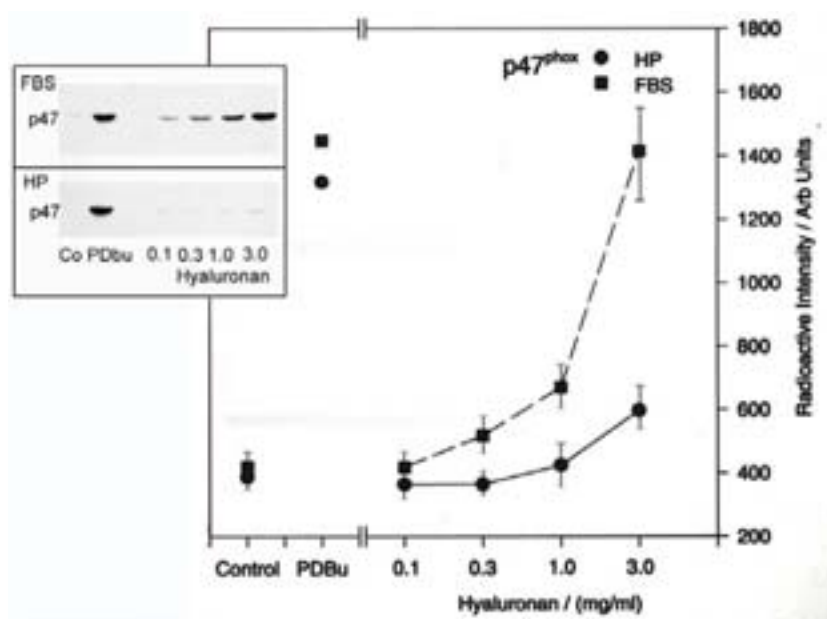
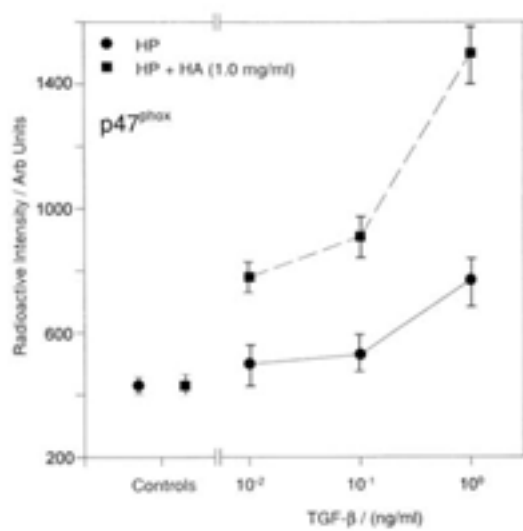
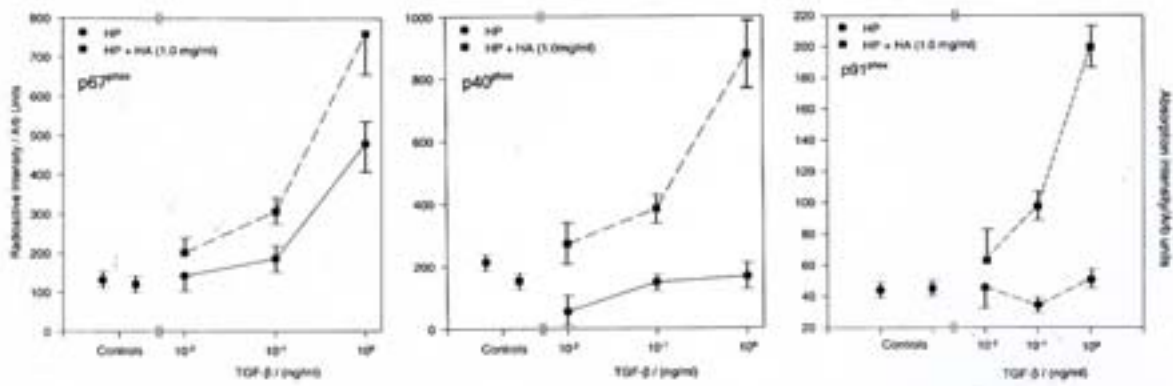


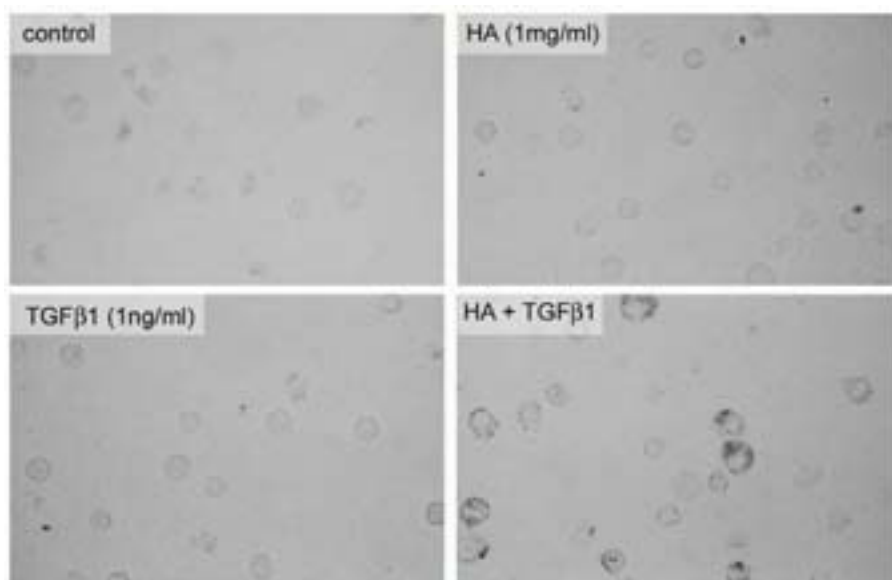
Figure 1.  $p47^{\text{phox}}$  expression in U937 cells incubated with increasing concentrations of hyaluronan in the presence of serum or plasma.



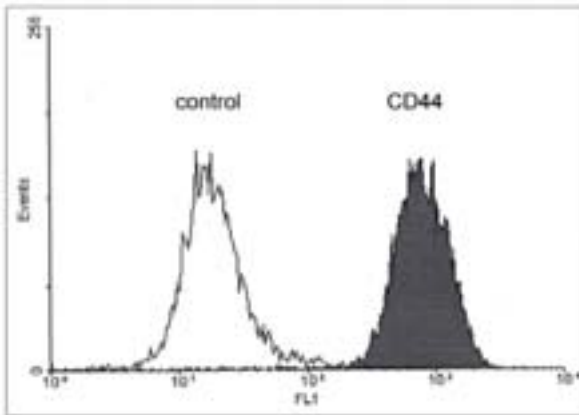
**Figure 2. Expression of p47<sup>phox</sup> in U937 cells in the presence of hyaluronan, human plasma and increasing doses of TGFβ<sub>1</sub>.**



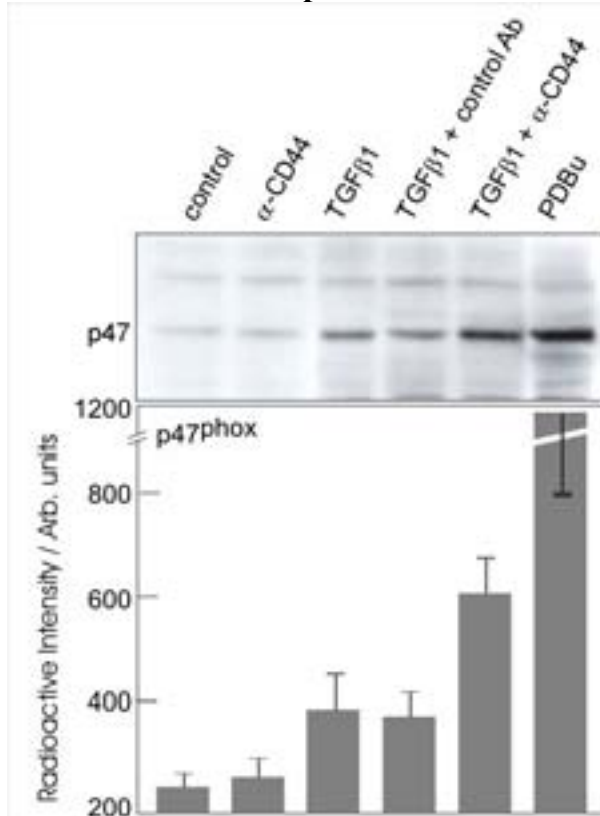
**Figure 3. Expression of p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> and p91<sup>phox</sup> in U937 in the presence of hyaluronan, human plasma and increasing doses of TGFβ<sub>1</sub>.**



**FIGURE 4. NADPH oxidase activity of U937, detected by NBT reduction (dark blue cells), after treatment with hyaluronan, TGFβ1 or a combination of the two.**

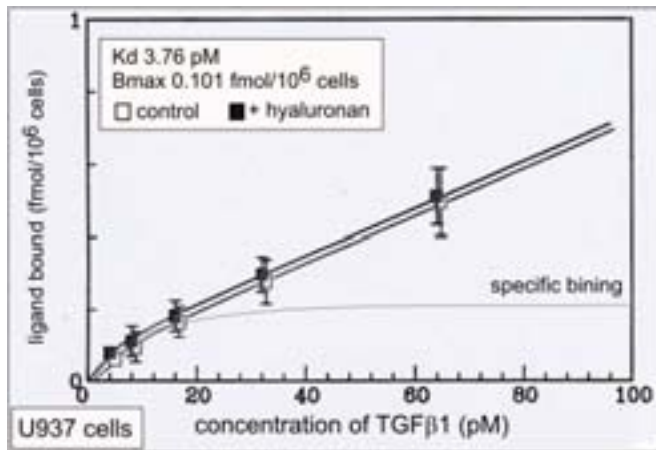


**FIGURE 5 a.** CD44 expression on non-differentiated U937 cells.



**Figure 5b**  
CD44 and TGF $\beta$ 1 cooperate in the induction of expression of p47<sup>PHOX</sup>





**FIGURE 6. Binding of TGFβ1 to U937 cells in the absence or presence of hyaluronan**

## *CONCLUSION*

## **CONCLUSION :**

Le TGFβ1 est un facteur de croissance reconnu pour ses effets pléiotropes sur les cellules. Nous avons mis en évidence plusieurs effets de celui-ci dans la différenciation des cellules myélo-monocytaires U937 : d'une part le TGFβ1 agit sur l'expression et l'état d'activation de l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  et sur l'activation de la GTPase Rap1, et d'autre part, en présence de hyaluronan, il induit l'expression de p47<sup>phox</sup>, un composant de la NADPH oxydase.

Les cellules U937 sont utilisées en tant que précurseurs des cellules monocytaires. Après différenciation en présence d'un cocktail défini, elles acquièrent un phénotype de type monocyte circulant. Nous avons ainsi mimé *in vitro* les étapes suivies par ces précurseurs lors de leur différenciation en monocytes. Et dans ce processus, nous avons pu mettre en évidence l'effet du TGFβ1 sur l'expression et l'activation des intégrines  $\alpha_M\beta_2$  chez les U937 : un traitement prolongé par le TGFβ1 réduit l'expression de ces intégrines ainsi que leur néo-épitope d'activation. De plus, dans ces mêmes conditions, le TGFβ1 réduit l'activation de la GTPase Rap1 et en parallèle réduit l'expression de EPAC, une GEF spécifique de Rap1. Plusieurs études ont démontré l'implication de Rap1 dans l'activation des intégrines  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , (Caron *et al*, 2000 ; Sebzda *et al*, 2002 ; de Bruyn *et al*, 2002). Et récemment, Rap1 a été mis en évidence dans l'inhibition de l'intégrine  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1) après traitement des Lymphocytes T à la somatostatine (Yoon *et al*, 2005). Ce contrôle des intégrines par Rap1 semble être un mécanisme consensus mis en place dans les cellules du système immunitaire, soit pour faciliter l'adhérence des cellules entre elles (Katagiri *et al*, 2002) ou à l'endothélium (Reedquist *et al*, 2000 ; Arai *et al*, 2001), soit pour induire la migration (Tohyama *et al*, 2003 ; Shimonaka *et al*, 2003).

Cependant, ce mécanisme de contrôle n'est pas complètement identifié. Dans notre étude, nous avons montré que le TGFβ1 réduisait l'activation de Rap1 et qu'en parallèle l'expression d'EPAC était diminuée. Dans ce modèle U937, nous proposons que le TGFβ1 pourrait ainsi agir via EPAC pour réduire l'activation de Rap1 qui alors n'exercerait plus de contrôle positif sur l'intégrine Mac-1. Si nous avons pu mettre en évidence une GEF de Rap1 dans ce mécanisme, nous n'avons pas identifié le ou les effecteurs impliqués dans le contrôle des intégrines Mac-1. RAPL, un effecteur de Rap1, a été identifié dans les lymphocytes et transmet les signaux entre Rap1 et l'intégrine  $\alpha_L\beta_2$ . RAPL pourrait se lier directement aux intégrines ou à d'autres protéines interagissant avec les intégrines (Katagiri *et al*, 2003). Une

première perspective de ce travail serait d'une part de vérifier l'implication de RAPL dans cette voie de signalisation induite par le TGFβ1, et d'autre part d'identifier d'autres effecteurs de Rap1, s'il y a lieu. Afin de mettre en évidence un ou des processus de contrôle des intégrines Mac-1 par le TGFβ1. Une étude récente sur les lymphocytes T a mis en évidence pour PKD1, une protéine kinase effectrice de PKC, le rôle de protéine adaptatrice de Rap1 (Medeiros et al, 2005). Ainsi, après stimulation, PKD1 induit la translocation de Rap1 en membrane où ce dernier peut être activé. De plus, ils ont également mis en évidence que ce complexe PKD1-Rap1 s'associait au domaine cytoplasmique des intégrines β1, et précisément au niveau du domaine C-terminal. Cependant, ce serait PKD1 qui serait impliqué dans la liaison directe à l'intégrine. Bien que ces travaux impliquent les intégrines β1, cette voie pourrait néanmoins être explorée afin de vérifier si ce processus est en place dans notre modèle. Dans un second temps, il serait intéressant d'identifier le ou les facteurs impliqués dans la réduction de l'expression de EPAC par le TGFβ1. Bien que la voie Smads de régulation de l'expression de gènes par le TGFβ1 soit bien identifiée, il reste encore à découvrir quels sont les gènes régulés et quel est le processus engagé par le TGFβ1 dans cette étude.

Le TGFβ1 a fait l'objet de différentes études afin de déterminer notamment son rôle dans les pathologies cardio-vasculaires. Ainsi, le TGFβ1 possède un effet protecteur dans l'athérosclérose : chez des patients atteints d'athérosclérose avancée (vaisseaux de moyen et gros calibres touchés), les taux sanguins de TGFβ1 sont faibles en comparaison avec des patients dont les vaisseaux sont sains (Grainger *et al*, 1995); chez des souris TGFβ1<sup>+/-</sup>, un régime enrichi en cholestérol augmente l'apparition de lésions riches en lipides et en macrophages, ces lésions sont semblables aux plaques d'athérome visibles dans les étapes précoces de l'athérosclérose chez les humains (Grainger *et al*, 2000) ; de plus, chez des souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE), l'inhibition de la voie de signalisation induite par le TGFβ entraîne le développement de lésions athérosclérotiques inflammatoires ainsi qu'une diminution du contenu en collagène de ces lésions, ce qui favorise une instabilité au niveau des plaques d'athérome (Mallat *et al*, 2001). Nos résultats seraient dès lors intéressants à mettre en relation avec l'athérosclérose puisque nous avons montré que le TGFβ1 agissait sur l'activation des intégrines Mac-1 et réduisait la migration transendothéliale de monocytes sanguins humains. Une perspective clinique de ce travail pourrait être d'agir sur la production du TGFβ1 chez des patients atteints d'athérosclérose peu avancée et de vérifier son action sur

les monocytes afin de diminuer leur prolifération au niveau des plaques d'athéromes, et ainsi de réduire l'état inflammatoire de l'endothélium ce qui pourrait permettre de stabiliser les plaques et bloquer le processus pathologique. Et vérifier sur le long terme les effets du TGFβ1.

Nous avons également étudié l'effet du TGFβ1 sur la différenciation des U937, cultivées en plasma humain, en présence de hyaluronan. Le TGFβ1 et le hyaluronan sont présents dans la moëlle osseuse où les cellules hématopoïétiques acquièrent leurs propriétés particulières. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'effet du TGFβ1, en combinaison avec le hyaluronan, sur un des composants de la NADPH oxydase, p47<sup>phox</sup>, qui est un marqueur de la différenciation des monocytes. En présence de sérum, le hyaluronan seul induit l'expression de p47<sup>phox</sup>, un composant cytosolique de la NADPH oxydase. Cependant, le plasma étant un liquide naturel qui permet *in vitro* la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs de la moëlle osseuse (McLeod *et al*, 1974), nous avons répété l'expérience en présence de plasma et de hyaluronan: il n'y pas d'induction de l'expression de p47<sup>phox</sup>. Les expériences suivantes ont été réalisées en présence de plasma. Le TGFβ1 seul est incapable d'induire l'expression de p47<sup>phox</sup>. Par contre, en présence de hyaluronan, p47<sup>phox</sup> est induit massivement ainsi que p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et p91<sup>phox</sup>, d'autres composants de la NADPH oxydase, celle-ci devient alors fonctionnelle. En effet, les U937 (Abo *et al*, 1994 ; Cassatella *et al*, 1989) expriment constitutivement p21<sup>phox</sup> et p21<sup>rac</sup>, et l'addition de TGFβ1 et de hyaluronan en présence de plasma permet l'expression des autres composants de la NADPH oxydase. Nous avons ensuite tenté de mettre en évidence un mécanisme qui expliquerait la contribution du TGFβ1 et du hyaluronan dans la différenciation des U937. En effet, soit l'expression des composants de la NADPH oxydase résulte en la convergence du signal issu des récepteurs au TGFβ1 et des récepteurs CD44 (récepteurs au hyaluronan) soit le hyaluronan agit sur la liaison du TGFβ1 à son récepteur, comme pour le bFGF et l'heparan sulfate (Yayon *et al*, 1991). Les U937 ont ainsi été cultivées en puits recouverts d'un anti-CD44, nous observons une augmentation de l'expression de p47<sup>phox</sup> en présence de TGFβ1. Nous avons ensuite mesuré la liaison du TGFβ1 à ses récepteurs en présence de hyaluronan : il n'y a pas de modification au niveau des récepteurs exprimés par les U937. Au vu de ces résultats, le hyaluronan ne modifie pas la liaison du TGFβ1 à ses récepteurs, mais tous deux contribuent à l'expression des composants de la NADPH oxydase. Ils coopèrent dans la différenciation des U937.

L'implication du CD44, le récepteur au hyaluronan, dans la différenciation cellulaire a été mise en évidence d'une part dans la différenciation myéloïde normale (Miyake *et al*, 1990 ; Ghaffari *et al*, 1995) et dans les leucémies myéloïdes aiguës, LMA (Charrad *et al*, 1999). Cette pathologie est caractérisée par une accumulation de cellules dites myéloïdes (blastes) bloquées à différents stades de différenciation (Bennett *et al*, 1985). De plus, l'anti-CD44 a été utilisé dans des lignées cellulaires de leucémie myéloïde aiguë et permet de lever le blocage de la différenciation, une caractéristique de ces cellules (Charrad *et al*, 2002). Cependant, la différenciation cellulaire qui est induite, soit par le hyaluronan, soit par l'anti-CD44, est incomplète. Le TGFβ1 joue un rôle majeur dans le processus d'hématopoïèse : il a été localisé dans la moelle osseuse où les cellules en produisent (Ellingsworth *et al*, 1986), et il y a prolifération de cellules immunitaires immatures chez des souris dont le gène codant pour le TGFβ1 a été invalidé (Shull *et al*, 1992). Il serait ainsi intéressant de vérifier l'état d'expression des composants de la NADPH oxydase dans les cellules issues de ces souris. Notamment parce qu'il existe une pathologie liée à la présence de NADPH oxydase non-fonctionnelle : la granulomatose septique chronique ou GSC. Cette maladie est caractérisée par des infections graves et récidivantes où les cellules immunitaires sont incapables de produire des anions superoxyde  $O_2^-$  ainsi que des dérivés oxygénés bactéricides. Dans 1/3 des cas, cette pathologie est liée à une mutation dans le gène codant pour P47<sup>phox</sup> (Cobbs *et al*, 1992). Bien que les cellules immunitaires soient présentes en nombre important, elles ne peuvent exercer leur rôle de cellules défenses. Le TGFβ1 joue également un rôle dans la transformation épithélio-mésenchymateuse de différents types cellulaires comme les cellules d'adénosarcomes ovariens (Kitagawa *et al*, 1996) ou les cellules pancréatiques cancéreuses (Ellenrieder *et al*, 2001).

Le hyaluronan est aussi impliqué dans la transformation épithélio-mésenchymateuse notamment dans des cellules épithéliales (Zoltan-Jones *et al*, 2003) ainsi que dans des cellules endothéliales (Camenisch *et al*, 2000). Chez des souris déficientes en CD44, traitées à la bléomycine au niveau intra-pulmonaire, les cellules immunitaires s'accumulent au niveau des espaces alvéolaires, et les taux de TGFβ1 actif dans le mucus broncho-alvéolaire sont faibles (Teder *et al*, 2002). Par contre, le taux de TGFβ1 latent est élevé. Un nouveau mécanisme de clivage du TGFβ1 latent en TGFβ1 actif faisant intervenir MMP-9 et CD44 a été mis en évidence (Yu and Stamenkovic, 2000). Ce qui corrèle avec cette accumulation cellulaire au niveau des poumons chez les souris CD44 déficientes où le TGFβ1 latent ne peut être transformé en TGFβ1 actif entraînant l'accumulation des cellules immunitaires. Dans notre

travail par contre, la coopération entre CD44-hyaluronan et le TGF $\beta$ 1 actif passerait plutôt par la convergence des signaux induits par leurs récepteurs respectifs que par l'action du hyaluronan-CD44 sur le TGF $\beta$ 1.

Dans ces travaux, nous avons pu mettre en évidence le rôle du TGF $\beta$ 1 dans la différenciation des cellules U937 et nous avons permis de préciser certains mécanismes d'action du TGF $\beta$ 1. Ces mécanismes feraient défaut dans deux pathologies : premièrement dans un contexte de pathologie vasculaire en rapprochant nos observations avec les caractéristiques inflammatoires de l'athérosclérose ; deuxièmement en rapprochant nos résultats de ceux obtenus dans le contexte de la leucémie myéloïde aigue. Les protocoles utilisés se réfèrent aux conditions rencontrées *in vivo* par les cellules immunitaires en cours de différenciation et/ou de maturation, dans un organisme sain, et nous permettent ainsi d'expliquer certains manques liés aux pathologies citées précédemment. Cependant, ces expériences sont réalisées dans un contexte fondamental, mais les résultats obtenus nous encouragent à compléter les voies induites afin de vérifier si ces mécanismes sont mis en oeuvre *in vivo* dans les pathologies présentées ci-dessus; et si ces voies de signalisations ainsi que les processus mis en évidence peuvent être des cibles thérapeutiques potentielles, et dans ce cas quelles en seraient les conséquence physiologiques ?

## *BIBLIOGRAPHIE*



- Abo, A., Webb, M. R., Grogan, A. and Segal, A. W. 1994. Activation of NADPH oxidase involves the dissociation of p21<sup>rac</sup> from its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rhoGDI) followed by its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.* **298**: 585-591
- Altschuler, D.L., Peterson, S.N., Ostrowski, M.C. and Lapetina, E.G. 1995. Cyclic AMP-dependent Activation of Rap1b. *J. Biol. Chem.* **270**:10373-10376
- Annes, J. P., Munger, J. S. and Rifkin, D. B. 2003. Making sense of latent TGF-β activation. *J. Cell Sci.* **116**:217-224
- Arai, A., Nosaka, Y. Kanda, E., Yamamoto, K., Miyasaka, N. and Miura, O. 2001. Rap1 is Activated by Erythropoietin or Interleukine-3 and Is Involved in Regulation of β<sub>1</sub> Integrin-mediated Hematopoietic Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **276**:10453-10462
- Arthur, W.T., Quilliam, L.A. and Cooper, J.A. 2004. Rap1 promotes cell spreading by localizing Rac guanine nucleotide exchange factors. *J. Cell. Biol.* **167**: 111-122
- Ashcroft, G. S. 1999. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-β. *Microbes and Infection* 1275-1282
- Assoian, R. K., Fleurdelys, B. E., Stevenson, H. C., Miller, P. J., Madtes, D. K., Raines, E. W., Ross, R. and Sporn, M. B. 1987. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**:6020-6024
- Bakin, A. V., Rinehart, C., Tomlinson, A. K. and Arteaga, C. 2002. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFβ-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J. Cell Sci.* **115**:3193-3206.
- Baron, W., Decker, L., Colognato, H. and ffrench-Constant, C. 2003. Regulation of Integrin Growth Factor Interactions in Oligodendrocytes by Lipid Raft Microdomains. *Curr. Biol.* **13**:151-155
- Batard, P., Monier, M. N., Fortunel, N., Ducos, K., Sansilvestri-Morel, P., Phan, T., Hatzfeld, A. and Hatzfeld J. A. 2000. TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *J. Cell Sci.* **113**: 383-390
- Belkin, A.M and Retta, S.F. 1998. β<sub>1D</sub> Integrin Inhibits Cell Cycle Progression in Normal Myoblasts and Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **273**: 15234-15240
- Bennett, J. M., Catovsky, D. and Daniel, M. T. 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-British-American Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.* **103**:620-625
- Bertoni, A. Tadokoro, S. Eto, K, Pampori, N., Parise, L.V. White, G.C. and Shattil, S.J. 2002. Relationships between Rap1b, affinity modulation of Integrin α<sub>11b</sub>β<sub>3</sub>, and the Actin Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **28**: 25715-25721
- Boettner, B., Govek, E.E., Cross, J. and Van Aelst, L. 2000. The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profiling. *PNAS.* **97**: 9064-9069
- Bos, J. L. 1989. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689
- Bos, J. L. 1997. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.*, **17**, 6776-6782.
- Bos, J. L., de Rooij, J. and Reedquist, K. A. 2001. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 369-377
- Boussiotis, V. A. , Freeman, G. J. , Berezovskaya, A. , Barber, D. L. and Nadler, L. M. 1997. Maintenance of human T cell anergy : blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1, *Science*, **278**, 124-128
- Brinkmann, T., Daumke, O., Herbrand, U., Kühlmann, D., Stege, P., Ahmadian, M.R. and Wittinghofer, A. 2002. Rap-specific GTPase Activating Protein follows an Alternative Mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**: 12525-12531

- Buensuceso, C.S. and O'Toole, T.E. 2000. The Association of CRKII with C3G Can be Regulated by Integrins and Defines a Novel Means to Regulate the Mitogen-activated Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **275**:13118-13125
- Camenisch, T. D., Spicer, A. P., Brehm-Gibson, T., Biesterfeldt, J., Augustine, M. L., Calabro, A., Kubalak, S., Klewer, S. E. and McDonald, J. A. 2000. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J. Clin. Invest.* **106**:349-360
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**:389-395
- Caron, E., Self, A. J. and Hall, A. 2000. The GTPase Rap1 Controls functional activation of macrophage integrin  $\alpha_M\beta_2$  by LPS and other inflammatory mediators. *Cur. Biol.* **10**: 974-978
- Cassatella, M. A., Hartman, L., Perussia, B. and Trinchieri, G. 1989. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically induce cytochrome b<sub>245</sub> heavy-chain gene expression and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate hydrogenase oxidase in human leukemic myeloid cells. *J. Clin. Invest.* **83**: 1570-1579
- Charrad, R. S., Gadhoun, Z., Qi, J., Glachant, A., Allouche, M., Jasmin, C., Chomienne, C. and Smadja-Joffe, F. 2002. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines. *Blood* **99**:290-299
- Charrad, R. S., Li, Y., Delpech, B., Balitrand, N., Clay, D., Jasmin, C., Chomienne, C; and Smadja-Joffe, F. 1999. Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukaemia; *Nat. Med.* **5**:669-676
- Chatpande, S., Chatpande, A., Sher, J., Zile, M. H. and Evans, T. 2002. Retinoid signalling regulates primitive (yolk sac) hematopoiesis. *Blood* **99**:2379-2386
- Chen, L.M., Bailey, D. and Fernandez-Valle, C. 2000. Association of  $\beta$ 1 Integrin with Focal Adhesion Kinase and Paxillin in Differentiating Schwann Cells. *J. Neuroscience.* **20**:3776-3784
- Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L. and Reiss, M. 1998. Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* **58**: 4805-4810.
- Chen, X., Rubock, M.J., and Whitman, M. 1996. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* **383**:691-696
- Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X. and Weissman, I. L. 1999. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:3120-3125
- Chung, N. S. and Wasan, K. M. 2004. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv. Drug Deliv.* **56**:1315-1334
- Cipollone, F., Fazia, M., Mincione, G., Iezzi, A., Pini, B., Cucurullo, C., Uchino, S., Spigonardo, F., Di Nisio, M., Cucurullo, F., Mezzetti, A. and Porreca, E. 2004. Increased Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 as a Stabilizing Factor in Human Atherosclerotic Plaques. *Stroke* **35**:2253-2257
- Class, C. K. and Witztum, J. L. 2001. Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* **104**:503-516
- Cobbs, C. S., Malech, H. L., Leto, T. L., Freeman, S. M., Blaese, R. M., Gallin, J. I. and Lomax, K. J. 1992. Retroviral expression of recombinant p47phox protein by Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes from a patient with autosomal chronic granulomatous disease. *Blood* **79**:1829-35
- Collo, G. and Pepper, M.S. 1999. Endothelial cell integrin  $\alpha_5\beta_1$  expression is modulated by cytokines and during migration in vitro. *J. Cell Sc.* **112**:569-578
- Coppolino, M.G., Woodside, M.J., Demarex, N., Grinstein, S., St-Arnaud, R. and Dedhar, S. 1997. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature.* **386**:843-847
- Crittenden, J.R., Bergmeier, W., Zhang, Y., Piffath, C.L., Liang, Y., Wagner, D.W.,

- Housman, D.E. and Graybiel, A.M. 2004. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nat. Med.* **10**: 982 – 986
- Cuff, C. A. et al. 2001. The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation. *J. Clin. Invest.* **108**: 1031-1040
- Cui, W., Fowles, D. J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A. and Akhurst, R. J. 1996. TGFβ1 Inhibits the Formation of Benign Skin Tumors, but Enhances Progression to Invasive Spindle Carcinomas in Transgenic Mice. *Cell* **86**:531-542
- Daumke, O., Weyand, M., Chakrabarti, P.P., Vetter, I.R. and Wittinghofer, A. 2004. The GTPase-activating protein Rap1GAP uses a catalytic asparagine. *Nature.* **429**: 197-201
- Davies P. F. 1997. Mechanisms involved in endothelial responses to hemodynamic forces. *Atherosclerosis.* **131**: S15-S17
- Davies, M. J., Richardson, P. D. and Woolf, N. 1993. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* **69**:377–381
- de Bruyn, K. M., Rangarajan, S., Reedquist, K. A., Figdor, C. G. and Bos, J. L. 2002. The small GTPase Rap1 is required for MN(2+)- and antibody-induced LFA-1 and VLA-4-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **277**: 29468-29476
- de Rooij, J., Boenink, N.M., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. and Bos, J. 1999. PDZ-GEF1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor Specific for Rap1 and Rap2. *J. Biol. Chem.* **274**: 38125-38130
- de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. and Bos, J.L.2000. Mechanism of Regulation of the Epac Family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* **275**: 20829-20836
- de Rooij, J., Zwartkuis, F.J.T., Verheijen, M.H.G., Cool, R.H., Nijman, S.M.B., Wittinghofer, A. and Bos, J.L. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* **396**: 474-477
- DeCoteau, J. F., Knaus, P. I., Yankelev, H., Reis, M. D., Lowsky, R., Lodish, H. F. and Kadin, M. E. 1997. Loss of functional cell surface transforming growth factorβ (TGF-β) type I receptor correlates with insensitivity to TGF-β in chronic lymphocytic leukaemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**:5877-5881.
- Dinauer, M. C., Orkin, S. H., Brown, R. , Jesaitis, A. J. and Parkos, C. A. 1987. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. *Nature* **327**: 717-720
- DiPersio, C.M., Hodivala-Dilke, K.M., Jaenisch, R., Kreidberg, J.A. and Hynes, R.O. 1997. α<sub>3</sub>β<sub>1</sub> Integrin Is Required for Normal Development of the Epidermal Basement Membrane. *J. Cell. Biol.* **137**: 729-742
- Dubois, C. M., Laprise, M. H., Blanchette, F., Gentry, L. E. and Leduc R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem.* **270**:10618-10624
- Dybedal, I., Guan, F., Borge, O. J., Veiby, O. P., Ramsfjell, V., Nagata, S and Jacobsen, S. E. 1997. Transforming growth factor-beta1 abrogates Fas-induced growth suppression and apoptosis of murine bone marrow progenitor cells. *Blood* **90**: 3395-3403
- Ebner, R., Chen, R. H., Shum, L., Lawler, S., Zioncheck, T. F., Lee, A., Lopez, A. R. and Derynck, R. 1993. Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor. *Science* **260**: 1344-1348
- Eglitis, M. A. and Mezey, E. 1997. Hematopoietic cells differentiate into both microglia in the brains of adult mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **94**:4080-4085
- Ellenrieder, V., Hendler, S. F., Boeck, W., Seufferlein, T., Menke, A., Ruhland, C., Adler, G. and Thomas M. Gress, T. M. 2001. Transforming Growth Factor 1 Treatment Leads to an

- Epithelial-Mesenchymal transdifferentiation of Pancreatic Cancer Cells Requiring Extracellular Signal-regulated Kinase2 Activation. *Cancer Res.* **61**:4222-4228
- Ellingsworth, L. R., Brennan, J. E., Fok, K., Rosen, D. M., Bentz, H., Piez, K. A. and Seyedin, S. M. 1986. Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor beta. Immunohistochemical localization and association with differentiating cells. *J. Biol. Chem.* **261**:12362-12367
- Etienne-Manneville S. and Hall, A. 2001. Integrin-Mediated Activation of Cdc42 Controls Cell Polarity in Migrating Astrocytes through PKCζ. *Cell.* **106**: 489-498
- Fischer, T. H. , Gatling, M. N. , McCormick, F. , Duffy, C. M. ,and White II, G. C. 1994. Incorporation of Rap1b into the Platelet Cytoskeleton Is Dependent on Thrombin Activation and Extracellular Calcium, *J. Biol. Chem.* , **269** , 17257-17261
- Franke, B. , Akkerman, J. W. and Bos, J. L. 1997. Rapid Ca<sup>++</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets, *EMBO J.* , **16**, 252-259
- Fujita, H., Kukulhara, S. Sakurai, A., Yamagishi, A. Kamioka, Y. Nakaoka, Y., Masuda, M. and Mochizuli, N. 2005. Local Activation of Rap1 Contributes to Directional Vascular Endothelial Cell Migration Accompanied by Extension of Microtubules onWich RAPL, a Rap1-associating Molecule, Localizes. *J. Biol. Chem.* **280**: 5022-5031
- Funaba, M., Zimmerman, C. M. and Mathews, L. S. 2002. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* **277**:41361-41368.
- Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. and Libby, P. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **94**:2493-2503
- Gamble, J. R., Xia, P. and Vadas, M. A. 2001. The transforming growth factor family and the endothelium. *TGF-β and related cytokines in inflammation*, edited by Samuel N. Breit and Sharon M. Wahl
- Ghaffari, S., Dougherty, G. J., Lansdorp, P. M., Eaves, A. C. and Eaves, C. J. 1995. Differentiation-associated changes in CD44 isoform expressing during normal hematopoiesis and their alteration in chronic myeloid leukemia. *Blood* **86**: 2976-2985
- Goey, H., Keller, J. R., Back, T., Longo, D. L., Ruscetti, F. W. and Wiltrout, R. H. 1989. Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor-beta 1. *J. Immunol.* **143**: 877-880
- Glogauer, M., Arora, P., Chou, D., Janmey, P.A., Downey, G.P. and McCulloch, C.A. 1998. The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection. *J. Biol. Chem.* **273**:1689-1698
- Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C. J., Hruban, R. H. and Kern, S. E. 1998. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* **58**: 5329-5332.
- Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O., Takahashi, H., Kurata, T. and Matsuda, M. 1995. Identification of Rap1 as a Target for the Crk SH3 Domain-Binding Guanine Nucleotide-Releasing Factor C3G. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6746-6753
- Grainger, D. J., Kemp, P. R., Metcalfe, J. C., Liu, A. C., Lawn, R. M., William, N. R., Grace, A. A., Schofield, P. M. and Chauhan, A. 1995. The serum concentration of active transforming growth factor-β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat. Med.* **1**:74-79
- Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C. and Bottinger, E. P. 2000. Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J. Cell Sci.* **113**:2355-2361

- Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C., Weissberg, P. L. and Kemp, P. R. 1995. Active and acid-activatable TGF-beta in human sera, platelets and plasma. *Clin. Chim. Acta* **235**:11-31
- Grande, A., Montanari, M., Tagliafico, E., Manfredini, R., Marani, T. Z., Siena, M., Tenedini, E., Gallinelli, A. and Ferrari, S. 2002. Physiological levels of 1,α, 25 dihydroxyvitamin D3 induce the monocytic commitment of CD34+ hematopoietic progenitors. *Leukoc. Biol.* **71**:641-651
- Grotendorst, G. R., Smale, G. and Pincev, D. 1989. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J. Cell Physiol.* **140**:396-402
- Gudi, S., Nolan, J. P. and Frangos, J. 1998. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **95**: 2515-2519
- Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C. and Dedhar, S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new b1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* **379**:91-96
- Hans, S. A, Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. and Kern, S. E. 1996. *DPC4*, A Candidate Tumor Suppressor Gene at Human Chromosome 18q21.1. *Science* **271**:350-353
- Hato, T., Pampori, N. and Shattil, S.J. 1998. Complementary Roles for Receptor Clustering and Conformational Change in the Adhesive and Signaling Functions of Integrin α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>. *J. Cell. Biol.* **141**:1685-1695
- Hatzfeld, J., Li, M. L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J. P., O'Toole, T. et al. 1991. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor beta 1 or Rb oligonucleotides. *J. Exp. Med.* **174**:925-929
- Heldin, C. H., Miyazono, K. and ten Dijke, P. 1997. TGF-β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**: 465-471
- Heldin, C. H., Moustakas A., Souchelnytskyi S., Itoh S. and ten Dijke P. 2001. Signal transduction mechanisms for members of the TGF-β family. *TGF-β and related cytokines in inflammation*, edited by Samuel N. Breit and Sharon M. Wahl
- Hiltunen, T. P., Luoma, J. S., Nikkari, T. and Ylä-Herttuala, S. 1998. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lesions: marked induction of scavenger receptor and VLDL receptor expression during lesion development. *Circulation*, **97**:1079-1086
- Hiltunen, T. P. and Ylä-Herttuala, S. 1998. Expression of lipoprotein receptors in atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **137**: S81-S88
- Hobbs, H. H., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Russell, D. W. 1986. Deletion of exon encoding cysteine-rich repeat of low density lipoprotein receptor alters its binding specificity in a subject with familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **261**:13114-20.
- Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M.M., Birchmeier, W. and Fujita, Y. 2004. Rap1 Regulates the Formation of E-Cadherin-Based Cell-Cell Contacts. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 6690-6700
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C.A., Beckerle, M.C. and Burridge, K. 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. *Nature.* **320**: 531-533
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell.* **69**:11-25
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell.* **110**: 673-687

- Iannus, A., Holz, G. G., Theise, N. D. and Hussain, M. A. 2003. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* **111**:843-850
- Iavarone, A. and Massague, J. 1997. Repression of the CDK activator Cdc25A and cell cycle arrest by cytokine TGF-β in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* **387**:417-422
- Ichiba, T., Hashimoto, Y., Nakaya, M., Kuraiishi, Y., Tanaka, S., Kurata, T., Mochizuki, N. and Matsuda, M. 1999. Activation of C3G Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rap1 by Phosphorylation of Tyrosine 504. *J. Biol. Chem.* **274**: 14376-14381
- Imhof, B. A. and Aurrand-Lions, M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Im.* **4**:432-444
- Ingber, D. 1998. In search of cellular control: Signal transduction in context. *Journal of cellular biochemistry, Supplement.* **31**: 232-237
- Inoue, Y., Yagisawa, M., Saeki, K., Imajoh-Ohmi, S., Kanegasaki, S and Yuo, A. 2001. Induction of phagocyte oxidase components during human myeloid differentiation: independent protein expression and discrepancy with the function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 2581-2584.
- Ishida, D., Kometani, K., Yang, H., Kakugawa, K., Masuda, K., Iwai, K., Suzuki, M., Itohara, S., Nakahata, T., Hiai, H., *et al.* 2003. Myeloproliferative stem cell disorders by deregulated Rap1 activation in *SPA-1*-deficient mice. *Cancer Cell.* **4**: 55-65
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., and Kimata, K. 1999. Three Isoforms of Mammalian Hyaluronan Synthases Have Distinct Enzymatic Properties. *J. Biol. Chem.* **274**: 25085-25092
- Ito, T., Williams, J. D. and Fraser, D. 2004. Hyaluronan Attenuates Transforming Growth Factor-β-1-Mediated Signaling in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells. *Am. J. Path.* **164**: 1979-1988
- Jonasson L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G. and Hansson, G. K. 1986. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis.* **6**:131-8
- Jones, K.A., Jiang, X. Yamamoto, Y. and Yeung, R.S. Tuberin is a component of lipid rafts and mediates caveolin-1 localization: role of TSC2 in post-Golgi Transport. 2004. *Exp. Cell Res.* **295**: 512-524
- Kakkar, A. K. and Lefer, D. J. 2004. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr. Op. Pharmacol.* **4**:154-158
- Karpusas, M., Ferrant, J., Weinreb, P.H., Carmillo, A., Taylor, F.R. and Garber, E.A. 2003. Crystal Structure of the α<sub>1</sub>β<sub>1</sub> Integrin I Domain in Complex with an Antibody Fab Fragment. *J. Mol. Biol.* **327**: 1031-1041
- Katagiri, K., Hattori, M., Minato, N. and Kinashi, T. 2002. Rap1 Function as a Key Regulator of T-Cell and Antigen-Presenting Cell Interactions and Modulates T-Cell Responses. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1001-1015
- Katagiri, K. Maeda, A., Shimonaka, M. and Kinashi, T. 2003. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Im.* **4**: 741-748
- Katagiri, K., Ohnishi, N., Kabashima, K., Iyoda, T., Takeda, N., Shinkai, Y. Inaba, K. and Kinashi, T. 2004. Crucial functions of the Rap1 effector molecule RAPL in lymphocyte and dendritic cell trafficking. *Nature Immunology.* **10**: 1045-1051
- Kawasaki, H., Springett, G.M., Toki, S., Canales, J.J., Harlan, P., Blumenstiel, J.P., Chen, E.J., Bany, I.A., Mochizuki, N., Ashbacher, A., Matsuda, M., Housman, D.E. and Graybiel, A.M. 1998. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 13278-13283

- Kieffer, J.D., Plopper, G., Ingber, D.E., Hartwig, J.H. and Kupper, T.S. 1995. Direct binding of F actin to the cytoplasmic domain of the  $\alpha 2$  integrin chain in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **217**: 466-474
- Kim, I. Y., Ahn, H. J., Zelner, D. J., Shaw, J. W., Sensibar, J. A., Kim, J. H., Kato, M. and Lee, C. 1996. Genetic change in transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor type I gene correlates with insensitivity to TGF-beta 1 in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **56**:44-48.
- Kingsley, D.M. 1994. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* **8**: 133-146
- Kitagawa, K., Murata, A. Matsuura, N., Tohya, K. Takaichi, S., Monde, M. and Inoue, M. 1996. Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor-beta1. *Int. J. Cancer* **66**:91-97
- Kitayama, H. , Sugimoto, Y. , Matsuzaki, T. , Ikawa, Y. and Noda, M. 1989 A ras-related gene with transformation suppressor activity, *Cell*, **56**, 77-84
- Kiyokawa, E., Mochizuki, N., Kurata, T. and Matsuda, M. 1997. Role of Crk oncogene product in physiologic signaling. *Crit Rev Oncog.* **8**:329-42
- Knox, A.L. and Brown, N.H. 2002. Rap1 GTPase Regulation of Adherens junction Positioning and Cell Adhesion. *Science.* **295**: 1285-1288
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H. *et al.* 1996.  $\alpha L\beta 2$  integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell.* **86**: 233-242
- Krieger, M. 1994. Structures and Functions of Multiligand Lipoprotein Receptors: Macrophage Scavenger Receptors and LDL Receptor-Related Protein (LRP). *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 601-637
- Kuiperij, H.B., de Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Wittinghofer, A., Bos, J.L. and Zwartkuis, F.J.T. 2003. Characterisation of PDZ-GEFs, a family of guanine nucleotide exchange factors specific for Rap1 and Rap2. *Biochimica. Biophysica. Acta.* **1593**:141-149
- Kurachi, H., Wada, Y., Tsukamoto, N., Maeda, M., Kubota, H., Hattori, M., Iwai, K. and Nagahiro Minato, N. 1997. Human SPA-1 Gene Product Selectively Expressed in Lymphoid Tissues Is a Specific GTPase-activating Protein for Rap1 and Rap2. *J. Biol. Chem.* **272**: 28081-28088
- Larsson, J., Goumans, M. J., Sjostrand, L. J., van Rooijen, M. A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C. L. and Karlsson, S. 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF- $\beta$  type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* **20**: 1663-1673
- Larsson, J. and Karlsson, S. 2005. The role of Smad signalling in hematopoiesis. *Oncogene.* **24**: 5676-5692
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and ten Dijke, P. 2005. TGF- $\beta$  receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research* **65**:599-608
- Lee, R. T. and Libby, P. 1997. The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17** :1859-1867
- Leto, T. L., Lomax, K. J., Volpp, B. D., Nunoi, H., Sechler, J. M., Nauseef, W. M., Clark, R. A., Gallin, J. I. and Malech, H. L. 1990. Cloning of a 67-kD neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. *Science* **248**: 727-730
- Lewis, J.M. and Schwartz, M.A. 1995. Mapping in vivo associations of cytoplasmic proteins with integrin beta 1 cytoplasmic domain mutants. *Mol Biol Cell.* **6**: 151-160.
- Ley, K. 1996. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc. Res.* **32**:733-742
- Ley, K. and Tedder, T.F. 1995. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol.* **155**: 525-528
- Liu, S., Calderwood, D.A. and Ginsberg, M.H. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding

proteins. *Jour. Cell. Sci.* **113**:3563-3571

- Liu, S., Thomas, S.M., Woodside, D.G., Rose, D.M., Kiosses, W.B., Pfaff, M. and Ginsberg, M.H. 1999. Binding of paxillin to α4 integrins modifies integrin-dependent biological responses. *Nature*. **402**: 676-681
- Lu, C., Takagi, J. and Springer, T.A. 2001. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the active state. *J. Biol. Chem.* **276**:14642-14648
- Luama, J., Hiltunen, T. Särkioja, T., Moestrup, S. K., Gliemann, J., Kodama, T., Nikkari, T. and Ylä-Herttuala, S. 1994. Expression of α2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **93**:2014-2021
- Lutgens, E., Gijbels, M., Smmok, M., Heeringa, P., Gotwals, P., Koteliansky, V. E. and Daemen, J. A. 2002. Transforming Growth Factor-β Mediates Balance Between Inflammation and Fibrosis During Plaque Progression. *Thromb. Vasc. Biol.* **22**:975-982
- M'Rabet, L., Coffey, P., Zwartkruis, F., Franke, B., Koenderman, L. and Bos, J. L. (1998) Activation of Rap1 in human neutrophils, *Blood*, **92**, 2133-2140
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamaté, C., Merval, R., Fradelizi, D. and Tedgui, A. 2001. Inhibition of Transforming Growth Factor-β Signaling Accelerates Atherosclerosis and Induces an Unstable Plaque Phenotype in Mice. *Circulation Research*. **89**:930-934
- Mandai, K., Nakanishi, H., Satoh, A., Obaishi, H., Wada, M., Nishioka, H., Itoh, M., Mizoguchi, A., Aoki, T., Fujimoto, T., Matsuda, Y., Tsukita, S. and Takai, Y. 1997. Afadin: A Novel Actin Filament-binding Protein with One PDZ Domain Localized at Cadherin-based Cell-to-Cell Adherens Junction. *Cell Biol.* **139**: 517-528
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **12**: 677-686
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R. S., Zbowska, E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. et al. 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* **68**:1336-1338
- Massague, J. 1998. TGF-β Signal Transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 753-791
- Massague, J. 2000. How cells read TGF-β signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:169-178
- Masuya, M., Drake, C. J., Fleming, P. A., Reilly, C.M., Zeng, H., Hill, W. D., Martin-Studdard, A. Hess, D. C. and Ogawa, M. 2003. Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells. *Blood* **101**:2215-2218
- McLeod, D. L., Shreeve, M. M. and Axelrad, A.A. 1974. Improved plasma culture system for production of erythrocytic colonies in vitro: quantitative assay method for CFU-E. *Blood*. **44**:517-534
- McLeod, S.J., Ingham, R.J, Bos, J.L., Kuroski, T. and Gold, M.R. 1998. Activation of Rap1 GTPase by the B Cell Antigen Receptor. *J. Biol. Chem.* **273**:29218-29223
- Mehra, A. and Wrana, J. L. 2002. TGF-β and the Smad signal transduction pathway. *Biochem. Cell Biol.* **80**: 605-622
- Meng, J., Glick, J.L., Polakis, P. and Casey, P.J. 1999. Functional Interaction between Gα<sub>z</sub> and Rap1GAP Suggests a Novel Form of Cellular Cross-talk. *J. Biol. Chem.* **274**:36663-36669
- Mikkola, H. K. and Orkin, S. H. 2002. The search for the hemangioblast. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **11**: 9-17
- Miyake, K., Underhill, C. B., Lesley, J. and Kincade, P. W. 1990. Hyaluronate can function as a cell adhesion molecule and CD44 participates in hyaluronate recognition. *J. Exp. Med.* **172**:69-75



- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T, Ozaki, T, Kitabatake, A., Nagashima, K. and Matsuda, M. 1999. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with Gα<sub>i</sub>. *Nature*. **400**: 891-894
- Multhaupt, H. A., Gafvels, M. E., Kariko, K., Jin, H., Arenas-Elliot, C., Goldman, B. I., Strauss, J. F. 3rd, Angelin, B., Warhol, M. J. and McCrae, K.R. 1996. Expression of very low density lipoprotein receptor in the vascular wall. Analysis of human tissues by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Am. J. Pathol.* **148**:1985-1997
- Munger, J. S., Harpel, J. G., Gleizes, P. E., Mazziere, R, Nunes, I and Rifkin, D. B. 1997. Latent transforming growth factor- β: Structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* **51**:1376-1382
- Naik, U.P., Patel, P.M. and Parise, L.V. 1997. Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin αIIb cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **272**:4651-4654
- Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L. and Ross, R. 1998. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **18**:842-851
- Nice, E. C., Fabri, L., Hammacher, A., Holden, J., Simpson, R. J., and Burgess, A. W. 1992. The purification of a Rap1 GTPase-activating protein from bovine brain cytosol. *J. Biol. Chem.* **267**, 1546-1553
- Noda, M. 1993. Structures and function of the Krev-1 transformation suppressor gene and its relatives. *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 97-109.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S. and Thomson, J. A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* **19**:193-204
- Ohba, Y., Ikuta, K., Ogura, A., Matsuda, J., Mochizuki, N., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mayer, B.J., Maki, K., Miyazaki, J.I. and Matsuda, M. 2001. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *EMBO J.* **20**: 3333-3341
- Ohno, M., Cooke, J. P., Dzau, V. J. and Gibbons, G. H. 1995. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J. Clin. Invest.* **95**:1363-1369
- Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. 1999. The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *PNAS.* **96**: 2122-2128
- Ohtsuka, T., Shimizu, K., Yamamori, B., Kuroda, S. and Takai, Y. 1996. Activation of Brain B-Raf Protein Kinase by Rap1B Small GTP-binding Protein.. *J. Biol. Chem.* **271**: 1258-1261
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B. Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. and Anversa, P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**:701-705
- Park, C., Afrikanova, I., Chung, Y. S., Zhang, W. J., Arentson, E., Fong, G. G, Rosendhal, A. and Choi, K. 2004. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development* **131**: 2749-2762
- Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Walker, L. E., Allen, A. J. and Orkin, S. H. 1988. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3319-3323
- Pavalko, F.M., Chen, N.X., Turner, C.H., Burr, D.B., Atkinson, S., Hsieh, Y.F., Qiu, J. and Duncan, R.L. 1998. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am. J. Physiol.* **275**: 1591-1601
- Pepper, M. S. 1997. Transforming growth factor-B: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**:21-43
- Persad, S. and Dedhar, S. 2003. The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* **22**:375-384

- Pessah, M., Marais, J., Prunier, C., Ferrand, N., Lallemand, F., Mauviel, A. and Atfi, A. 2002. c-Jun Associates with the Oncoprotein Ski and Suppresses Smad2 Transcriptional Activity. *J. Biol. Chem.* **277**:29094-29100
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D.J. and Ginsberg, M.H. 1998. Integrin b cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.* **273**: 6104-6109
- Pfeilschifter, J., Erdmann, J. Storch, S., Ziegler, R. and Weinreb, M. 1999. Changes in the concentration of insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta1 in rat femoral bone during growth. *Calcif. Tissue Int.* **64**:78-82
- Plath, T., Detjen, K., Welzel, M., von Marschall, Z., Murphy, D., Schirner, M., Wiedenmann, B. and Rosewicz, S. 2000. A Novel Function for the Tumor Suppressor p16<sup>INK4a</sup>: Induction of Anoikis via Upregulation of the α<sub>5</sub>β<sub>1</sub> Fibronectin Receptor. *J. Cell. Biol.* **150**: 1467-1477
- Polakis, P.G., Rubinfeld, B., Evans, T. and McCormick, F. 1991. Purification of a Plasma Membrane-Associated GTPase-Activating Protein Specific for Rap1/Krev-1 from HL60 Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 239-243
- Ponta, H., Sherman, L. and Herrlich, P. A. 2003. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 33-45
- Price, L.S., Hajdo-Milasinovic, A., Zhao, J. Zwartkruis, F.J.T., Collard, J.G. and Bos, J.L. 2004. Rap1 Regulates E-cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion. *J. Biol. Chem.* **279**: 35127-35132
- Protin, U., Schweighoffer, T., Jochum, W. and Hilberg, F. 1999. CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J. Immunol.* **163**: 4917-4923
- Qu, A. and Leahy, D.J. 1995. Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, α<sub>L</sub>β<sub>2</sub>) integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 10277-10281
- Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K. and Gelbart, W. M. 1995. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signalling pathway in Drosophila. *Genetics* **139**: 241-254
- Rajavashisth, T. B., Andalibi, A., Territo, M. C., Berliner, A, Navab, M., Fogelman, A. M. and Lusis, A. J. 1990. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* **344**:254-257
- Reedquist, K. A., Ross, E., Koop, E. A., Wolthuis, R. M. F., Zwartkruis, F. J. T., van Kooyk, Y., Salmon, M., Buckley, C.D. and Bos, J. L. 2000. The Small GTPase, Rap1, Mediates CD31-induced Integrin Adhesion. *J. Cell Biol.* **148**:1151-1158
- Riggins, G. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Thiagalingam, S. 1997. Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res.* **57**: 2578-2580
- Rizzo, V., McIntosh, D. P., Oh, P. and Schnitzer, J. E. 1998. In-situ flow activates ec-NOS in luminal caveolae of endothelial cells with rapid dissociation and calmodulin association. *J. Biol. Chem.* **273**: 34724-34729
- Ross R.N. 1999. Mechanisms of Disease: Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. *N. Engl. J. Med.* **340**:115-126
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. and Wittinghofer, A. 1997. The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science.* **277**: 333-338
- Schmidt, A., Caron, E. and Hall, A. 2001. Lipopolysaccharide-Induced Activation of β<sub>2</sub>-Integrin Function in Macrophages Requires Irak Kinase Activity, p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, and the Rap1 GTPase. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 438-448
- Schmits, R. *et al.* 1997. CD44 Regulates Hematopoietic Progenitor Distribution, Granuloma Formation, and Tumorigenicity. *Blood* **90**: 2217-2233
- Screaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. and Bell, J. I. 1992. Genomic Structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least

- 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 12160-12164
- Sebзда, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N. and Cantrell, D.A. 2002. Rap1A positively regulates T cells *via* integrin activation rather than inhibiting lymphocytes signalling. *Nat. Imm.* **3**: 251-258
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H. and Gelbart, W. M. 1995. Genetic Characterization and Cloning of Mothers against dpp, a Gene Required for decapentaplegic Function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **139**: 1347-1358
- Shah, M., Foreman, D. M. and Ferguson, M. W. J. 1992. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β. *Lancet*, **339**: 213-214
- Shah, M., Foreman, D. M. and Ferguson, M. W. J. 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* **108**: 985-1002
- Sharon, S. Y., Williams, M. A., Newland, A. C. and Colson, K. W. 1999. leukaemia cell differentiation, cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D. *Gen. Pharmacol.* **32**:143-154
- Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N. P. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signalling. *Cell* **94**: 585-594
- Shimizu, T. and Takeda, K. 2000. Induction of retinoic acid receptor-alpha by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human myeloid leukaemia cell lines. *Cancer Res.* **60**:4544-4549
- Shimonaka, M. Katagiri, K. Nakayama, T. Fujita, N. Tsuruo, T. Yoshie, O. and Kinashi, T. 2003. Rap1 translates chemokines signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell. Biol.* **161**: 417-427
- Shull, M. M., Ormsby, I., Klier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidan, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N. and Doetschman, T. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**:693-699
- Sitnicka, E., Ruscetti, F. W., Priestley, G. V., Wolf, N. S. and Bartelmez, S. H. 1996. Transforming growth factor beta 1 directly and reversibly inhibits the initial cell divisions of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **88**: 82-88
- Smith, W. B., Noack, L., Khew-Goodall, Y., Isenmann, S., Vadas, M. A. and Gamble, J. R. 1996. Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J. Immunol.* **157**:360-368
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G. and Bussolino, F. 1999. Role of α<sub>v</sub>β<sub>3</sub> integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *The EMBO Journal.* **18** : 882-892
- Song, X. Y., Jin, W. W., Klinman, D. M. and Wahl, S. M. 1998. Plasmid DNA Encoding Transforming Growth Factorβ1 Suppresses Chronic Disease in a Streptococcal Cell Wall-induced Arthritis Model. *J. Clin. Invest.* **101**: 2615-2621
- Springer, T. A. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin α-subunits into a β-propeller domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 65-72
- Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* **76**:301-314
- Stern, R. 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **83**: 317-325
- Stuhlmeyer, K. M. and Pallaschek, C. 2004. Differential Effect of Transforming Growth Factor β (TGF-β) on the Genes Encoding Hyaluronan Synthases and Utilization of the p38 MAPK Pathway in TGF-β-induced Hyaluronan Synthase 1 Activation. *J. Biol. Chem.* **279**:

8753-8760

- Su, L., Hattori, M., Moriyama, M., Murata, N., Harazaki, M., Kaibuchi, K. and Minato, N. 2003. AF-6 Controls Integrin-mediated Cell Adhesion by Regulating Rap1 Activation through the Specific Recruitment of Rap1GTP and SPA-1. *J. Biol. Chem.* **17**: 15232-15238
- Szilvassy, S. 2004. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Arch. Med. Res.* **34**:446-460
- Szilvassy, S. and Cory, S. 1994. Efficient retroviral gene transfer to purified long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Blood* **84**:74-83
- Tahiliani, P.D., Singh, L., Auer, K.L. and LaFlamme, S.E. 1997. The Role of Conserved Amino Acid Motifs within the Integrin  $\beta_3$  Cytoplasmic Domain in Triggering Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**: 7892-7898
- Takagi, J., Erickson, H.P. and Springer, T.A. 2001. C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin  $\alpha_5\beta_1$ . *Nat. Struct. Biol.* **8**:412-416
- Tan, S.M., Robinson, M.K., Drbal, K., van Kooyk, Y., Shaw, J.M. and Law, S.K.A. 2001. The N-terminal Region and the Mid-Region Complex of the Integrin  $\beta_2$  Subunit. *J. Biol. Chem.* **276**: 36370-36376
- Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K. and Matsuda, M. 1994. C3G, a Guanine Nucleotide-Releasing Protein Expressed Ubiquitously, Binds to the Src Homology 3 Domains of CRK and GRB2/ASH Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 3443-3447
- Tanimoto, K., Suzuki, A., Ohno, S., Honda, K., Tanaka, N., Doi, T., Yoneno, K., Ohno-Nakahara, M., Nakatani, Y., Ueki, M., and Tanne, K. 2004. Effects of TGF- $\beta$  on Hyaluronan Anabolism in Fibroblasts Derived from the Synovial Membrane of the Rabbit Temporomandibular Joint. *J. Dent. Res.* **83**: 40-44
- Teder, P., Vandivier, R. W., Jiang, D., Liang, J., Cohn, L., Puré, E., Henson, P. M. and Noble, P. W. 2002. Resolution of Lung Inflammation by CD44. *Science* **296**:155-158
- Thorne, R. F., Leg, J. W. and Isacke, C. M. 2003. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J. Cell Sci.* **117** : 373-380
- Tian, B., Lessan, K., Kahm, J., Kleidon, J. and Henke, C. 2002.  $\beta_1$  Integrin Regulates Fibroblast Viability during Collagen Matrix Contraction through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Protein Kinase B Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **277**: 24667-24675
- Tohyama, Y., Katagiri, K., Pardi, R., Lu, C., Springer, T. A. and Kinashi, T. 2003. The Critical Cytoplasmic Regions of the  $\alpha_L\beta_2$  Integrin in Rap1-induced Adhesion and Migration. *Mol. Biol. Cell.* **14**:2570-2582
- Tsukazaki T., Chiang T. A., Davison A. F., Attisano L. and Wrana J. L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF $\beta$  receptor. *Cell* **95**: 779-91
- Turley, E. A., Noble, P. W. and Bourguignon, L. Y. 2002. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J. Biol. Chem.* **277**: 4589-4592
- Vassilopoulos, G., Wang, P. R. and Russell, D. W. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**:901-904
- Verrecchia, F., Chu, M. L. and Mauviel, A. 2002. Transforming growth factor-B signaling through the smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* **118**:211-215
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T.A., Plow, E.F. and Qin, J. 2002. A Structural Mechanism of Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  "Inside-Out" Activation as Regulated by Its Cytoplasmic Face. *Cell.* **110**:587-597
- Volpp, B. D., Nauseef, W. M., Donelson, J. E., Moser, D. R. and Clark, R.A. 1989. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7195-7199

- Vossler, M.R., Yao, H. York, R.D., Pan, M.G., Rim, C.S. and Stork, P.J.S. 1997. cAMP Activates MAP Kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-Dependent Pathway. *Cell*. **89**: 73-82
- Wary, K.K, Mariotti, A., Zurzolo, M. and Giancotti, F.G. 1998. A Requirement for Caveolin-1 and Associated Kinase Fyn in Integrin Signaling and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Cell*. **94**:625-634
- Weigel, P. H., Hascall, V. C. and Tammi, M. 1997. Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem.* **272**: 13997-40000
- Weisel, J.W., Nagaswami, C., Vilaire, G. and Bennett, J.S. 1992. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **267**:16637-16643
- Wienecke, R. König, A. and DeClue, E. 1995. Identification of Tuberin, the Tuberous Sclerosis-2 Product. *J. Biol. Chem.* **27**: 16409-16414
- Wilkes, M. C., Murphy, S. J., Garamszegi, N. and Leof, E.B. 2003. Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol Cell Biol.* **23**:8878-89
- Willnow, T. Nykjaer, A. and Herz, J. 1999. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat. Cell Biol.* **1**:E157-E162
- Wurthner, J. U., Frank, D. B., Felici, A., Green, H. M., Cao, Z., Schneider, M. D., McNally, J. G., Lechleider, R. J. and Roberts, A. B. 2001. TGF-beta receptor-associated protein1 is a Smad4 chaperone. *J. Biol. Chem.* **276**:19495-19502
- Yamashita, S., Mochizuki, N., Ohba, Y., Tobiume, M., Okada, Y., Sawa, H., Nagashima, K. and Michiyuki Matsuda, M. 2000. CalDAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *Biol. Chem.*, **275**: 25488-25493
- Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D. Leder, P. and Ornitz, D. M. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*, **64**: 841-848
- Ylä-Herttuala, S. Rosenfeld, M. E., Parthasarathy, S., Sigal, E. Särkioja, T., Witztum, J. L. and Steinberg, D. 1991. Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipoxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein adducts. *J. Clin. Invest.* **87**:1146-1152
- Yoder, M. C., Hiatt, K., Dutt, P., Mukherjee, P., Bodine, D. M. and Orlic, D. 1997. Characterization of Definitive Lymphohematopoietic Stem Cells in the Day 9 Murine Yolk Sac. *Immunity*, **7**: 335-344
- Yoon, W. K., Kim, H. J., Son, H. Y., Jeong, K. S., Park, S. J., Kim, T. H., An, M. Y, Kim, S. H., Kim, S. R. and Ryu, S.Y. 2005. Somatostatin down-regulates LFA-1 activation by modulating Rap1 expression in CD4+ and CD8+ T cells. *Regul. Pept.* **124**: 151-156
- Yu, Q. and Stamenkovic, I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* **14**:163-76
- Yuan, W. and Varga, J. 2001. Transforming growth factor-β repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J. Biol. Chem.* **276**:38502-38510
- Yue, J. and Mulder, K. M. 2000. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-b. *Methods Mol. Biol.* **142**:125-131.
- Zent, R., Fenczik, C.A, Calderwood, D.A., Liu, S., Dellos, M., and Ginsberg, M.H. 2000. Class- and Splice Variant-specific Association of CD98 with Integrin β Cytoplasmic domains' *J. Biol. Chem.* **275**: 5059-5064
- Zhadanov, A.B., Provance, D.W.Jr., Speer, C.A., Coffin, D., Goss, D., Blixt, J.A., Reichert, C.M., and Mercer, J. 1999. Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr. Biol.* **9**: 880-888

- Zhang, Y. and Derynck, R. 1999. Regulation of Smad signalling by protein associations and signalling crosstalk. *Trends in Cell Biology* **9**: 274-279
- Zhang, Y., feng, X. H., and Derynck, R. 1998. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- $\beta$ -induced transcription. *Nature* **394**: 909-913
- Zoltan-Jones, A., Huang, L., Ghatak, S. and Toole, B. P. 2003. Elevated Hyaluronan Production Induces Mesenchymal and Transformed Properties in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 45801–45810
- Zwartkuis, F.J.T., Wolthuis, R.M.F., Nabben, N.M.J.M., Franke, B. and Bos, J.L. 1998. Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling. *The EMBO Journal.* **17**:5905-5912

# *ANNEXE*

# RhoGTPases and p53 Are Involved in the Morphological Appearance and Interferon- $\alpha$ Response of Hairy Cells

Benjamin Chaigne-Delalande,\* Lynda Deuve,\* Edith Reuzeau,\* Caroline Basoni,\* David Lafarge,\* Christine Varon,\* Florence Tatin,\* Gueric Anies,\* Richard Garand,<sup>†</sup> Ijsbrand Kramer,\* and Elisabeth Génot\*

From Unité 441,\* Institut National de la Recherche Médicale, University Victor Segalen Bordeaux, Bordeaux, and the European Institute of Chemistry and Biology, University of Bordeaux I, Talence; and the Laboratoire d'Hématologie,<sup>†</sup> Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France

**Hairy cell leukemia is an uncommon B-cell lymphoproliferative disease of unknown etiology in which tumor cells display characteristic microfilamentous membrane projections. Another striking feature of the disease is its exquisite sensitivity to interferon (IFN)- $\alpha$ . So far, none of the known IFN- $\alpha$  regulatory properties have explained IFN- $\alpha$  responsiveness nor have they taken into account the morphological characteristics of hairy cells. IFN- $\alpha$  profoundly alters cytoskeletal organization of hairy cells and causes reversion of the hairy appearance into a rounded morphology. Because cytoskeletal rearrangements are controlled by the Rho family of GTPases, we investigated the GTPase activation status in hairy cells and their regulation by IFN- $\alpha$ . Using immunolocalization techniques and biochemical assays, we demonstrate that hairy cells display high levels of active Cdc42 and Rac1 and that IFN- $\alpha$  down-regulates these activities. In sharp contrast, RhoA activity was low in hairy cells but was increased by IFN- $\alpha$  treatment. Finally, IFN- $\alpha$ -mediated morphological changes also implicated a p53-induced response. These observations shed light on the mechanism of action of IFN- $\alpha$  in hairy cell leukemia and are of potential relevance for the therapeutical applications of this cytokine. (*Am J Pathol* 2006, 168:000–000)**

HCL have focused on the profile of cell surface markers for classification purposes and to attempt to understand the unique sensitivity of hairy cells to IFN- $\alpha$ . However, alterations in the expression pattern of hairy cell surface molecules do not correlate with IFN- $\alpha$  sensitivity. In addition, none of the multiple known IFN- $\alpha$  regulatory properties can account for IFN- $\alpha$  responsiveness. Lastly, the proposed mechanisms of action of IFN- $\alpha$  in the disease do not take into account the phenotypic characteristics of hairy cells. These data suggest that IFN- $\alpha$  may target a specific defect in hairy cells and implies that the function and regulation of intracellular signaling molecules must be explored in these cells.

The immense progress in the understanding of cytoskeletal organization accomplished in the last decade has led us to consider the effects of IFN- $\alpha$  on hairy cell morphology. In various models, cytoskeletal dynamics have been shown to be driven by small G-protein members of the Rho family, a subclass of the Ras superfamily of which RhoA, Rac1, and Cdc42 are the best characterized members.<sup>2</sup> RhoGTPases cycle between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound form.<sup>3</sup> GTP-bound GTPases have the ability to interact with and thereby activate downstream targets, so called effectors.<sup>4</sup> Guanine exchange factors (GEFs) catalyze the exchange of GDP for GTP and hence activate the GTPases whereas GTPase-activating proteins (GAPs) enhance the intrinsic GTPase activity, returning the GTPases under their basal GDP-bound state.<sup>3</sup> Alternatively, specific alterations of the GTPases such as point mutations on key residues or

Supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; University of Bordeaux 1 and 2; GEFLUC; the Fondation pour la Leucémie; and fellowships from the Délégation Générale pour l'Armement (to B.C., C.B., C.V., and G.C.); the Fondation pour la Recherche Médicale (to B.C., C.B., C.V., and G.C.); and the French Ministry of Education, Research, and Technologies (to B.C., C.B., C.V., and G.C.).

Accepted for publication September 27, 2005.

Present address of L.D.: Stellenbosch University, Department of Zoology, Private Bag X1, Matieland 7602, South Africa.

Present address of D.L.: Laboratoire de Biogénèse Membranaire, CNRS, Université Bordeaux 2, Bordeaux, France.

Address reprint requests to Elisabeth Génot, Unité INSERM 441, European Institute of Chemistry and Biology, 2, rue Robert Escarpit, 33 600 Pessac, France. E-mail: e.genot@iecb.u-bordeaux.fr.

Hairy cell leukemia (HCL) is a B-cell tumor affecting the preplasma stage of B-cell differentiation.<sup>1</sup> Although HCL is rare, this disease has been the subject of intense investigation because of its remarkable responsiveness to low-dose interferon (IFN)- $\alpha$  therapy. Most studies on

AQ: F

Fnt



covalent modifications by bacterial toxins, prevent nucleotide exchange or GTP hydrolysis and thereby lock the GTPase in one conformation or the other. Dominant-negative mutants act by sequestering GEFs, making them unavailable to endogenous GTPases when a stimulus is provided.

The actin cytoskeleton is composed of polymerized actin monomers (filamentous actin: F-actin) that can be rearranged into discrete configurations. Most studies have been performed in adherent cells, which undergo striking morphological changes and actin remodeling on RhoGTPase activation.<sup>5</sup> Thus, RhoA regulates the formation of stress fibers, Rac1 regulates the formation of lamellipodia, a fine protrusive meshwork of actin filament at the leading edge of migrating cells, whereas Cdc42 regulates the formation of filopodia, finger-like protrusions, as well as cell polarity.<sup>5</sup> Recent work revealed the role of RhoGTPases in hematopoietic cells.<sup>6,7</sup> There is a great deal of interest in these proteins because in addition to their effects on the cytoskeleton, they control gene transcription and cell-cycle progression.<sup>8,9</sup> RhoA, Cdc42, and Rac1 control the activity of the serum response element<sup>10</sup> whereas elevated levels of monomeric actin decreases serum response factor activities.<sup>11</sup> Cell survival is also regulated by RhoGTPases. In this respect, Rac1 has recently received much attention when it was shown that constitutively active Rac1 could protect from cell death induced by various apoptosis inducers.<sup>12-14</sup>

The tumor suppressor p53 is functionally connected to the RhoGTPase pathways.<sup>15</sup> Moreover, p53 has recently been shown to be a regulator of cell morphology when it was shown that p53-null fibroblasts exhibit constitutive Cdc42-dependent membrane cytoplasmic extensions and that ectopic overexpression of p53 could antagonize their formation.<sup>16</sup> IFN- $\alpha$  has recently been shown to suppress oncogene-induced transformation through p53,<sup>17</sup> prompting us to examine the role of p53 in hairy cell morphology.

The coupling of cytoskeletal organization to cell-cycle regulation suggests that cytoskeletal integrity is determinant in the proper control of cell-cycle progression and survival.<sup>18</sup> Because hairy cells present defects in the regulation of their cell cycle as well as alterations in their cytoskeleton, we hypothesized that RhoGTPases may play a role in the phenotypic aspect of hairy cells and could be involved in the response to IFN- $\alpha$ . We have explored the activity of RhoGTPases in hairy cells and examined the effect of IFN- $\alpha$  on this parameter. Because of the limited availability of fresh hairy cells and to their poor growth *in vitro*, such studies cannot be performed with primary hairy cells but can be achieved with suitable cell lines. In this study, two hairy cell lines derived from patients with HCL responsive to IFN- $\alpha$  were used, HCLL-7876<sup>19</sup> and Eskol.<sup>20</sup> Two experiments were performed on primary cells from one patient to confirm our observations. Our results demonstrate that RhoGTPases contribute to their cytoskeletal defects. In addition, IFN- $\alpha$  targets p53 and RhoGTPases to induce cellular responses that could be of prime importance in the therapeutic benefits of IFN- $\alpha$  in HCL.

## Materials and Methods

AQ: C

### Cells and Culture Conditions

The HCL cell lines HCLL-7876 was obtained from Dr. Christel Uittenbogaart (University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA) and Eskol from Dr. Milton Taylor (Indiana University, Bloomington, IN). Their characterization has been reported in the context of other studies.<sup>19,20</sup> Fresh hairy cells were collected after written informed consent was given, in accordance with the rules and tenets of the revised Helsinki protocol, and cells were isolated as previously described.<sup>21,22</sup> All cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with glutamine, antibiotics (Gibco), and 10% fetal calf serum (Gibco).

### Plasmids and Cell Transfection

p53 and various GTPase mutants were expressed as GFP fusion proteins encoded by eukaryotic expression vectors provided by Drs. P. Roux (pEGFP-p53 and pEGFP-p53H175R) and P. Fort (pEGFP-GTPase mutants). All plasmids were purified by equilibrium centrifugation in CsCl-ethidium bromide gradients using standard procedures. Cells were transfected by electroporation (Bio-Rad). Briefly, 10 million cells/0.5 ml were pulsed in complete medium at 960  $\mu$ F and 310 V with 30  $\mu$ g of plasmid and cultured for 24 hours to allow plasmid expression. For *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme intoxication, hairy cells were treated with 50  $\mu$ g/ml Tat-C3 for 18 hours.<sup>23</sup> Plasmids encoding GST-Rho-binding domain (RBD)-rhotekin and GST-Cdc42/Rac-interactive binding domain (CRIB)-PAK have been described elsewhere.<sup>24</sup>

AQ: D

### Reagents and Antibodies

Human recombinant IFN- $\alpha$ 2b (IntronA, Schering Plough) was reconstituted in phosphate-buffered saline and used at a final concentration of 1000 UI/ml for HCLL-7876 and 6000 UI/ml for Eskol.<sup>20,21</sup> Mowiol 4-88 was from Calbiochem. Etoposide was from American Pharmaceutical Partner Inc. (USA) and used at a concentration of 20  $\mu$ mol/L unless otherwise indicated. Glutathione-Sepharose beads and various chemicals were from Sigma. Tat-C3 was kindly supplied by Dr. J. Bertoglio (U461-INSERM, Chatenay-Malabry, France). Rhodamine-labeled phalloidin and fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibodies were purchased from Molecular Probes, Eugene, OR. Anti-RhoA and anti-p53 were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anti-Rac1 from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), anti-CD20 from Serotec, anti-Cdc42 and anti-phospho-p53 antibodies from Transduction Laboratories, Lexington, KY. Peroxidase-labeled antibodies and chemiluminescence reagents were from Amersham International (Amersham).

### Immunofluorescence Microscopy

Studies were performed on suspended cells that were fixed with 3% paraformaldehyde prepared in cytoskeletal buffer (10 mmol/L morpholine ethanesulfonic acid, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EGTA, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, and 5 mmol/L glucose, pH 6.1) for 10 minutes at room temperature, sedimented on poly-L-lysine-coated glass coverslips, and processed for immunofluorescence as previously described.<sup>24</sup> The coverslips were mounted on microscope slides with Mowiol 4-88 mounting medium. The hairy phenotype was considered suppressed only when F-actin-stained cells displayed no residual protrusion. Analysis of cytoskeletal alterations was assessed in three independent experiments in which at least 100 cells were counted. Confocal images were obtained by means of a confocal laser microscope system EclipseE800, equipped with a  $\times 60$  objective and driven by EZ2000 software. Each image was acquired sequentially using the appropriate filter sets and processed for publication using Photoshop CS Software.

### Separation of Membrane and Cytosol Fractions

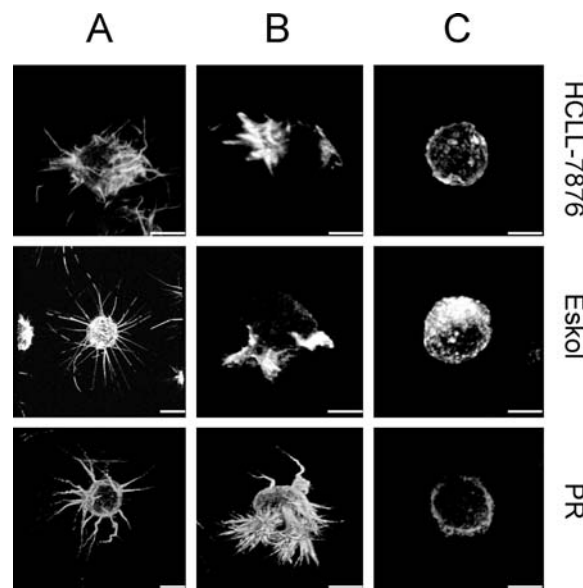
The peculiar hairy cell membranes have led us to adapt a conventional fractionation protocol to optimize the preparation of membrane fractions. Cells were treated with IFN- $\alpha$  for 18 hours or left untreated, washed, and resuspended in hypotonic buffer containing 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 5 mmol/L KCl, supplemented with 1 mmol/L dithiothreitol, 0.2 mmol/L orthovanadate, 1 mmol/L 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin. The suspension was homogenized with 30 strokes in a Dounce homogenizer and gently centrifuged to remove unbroken cells and nuclei. The remaining supernatant was centrifuged at 14,000  $\times g$  for 30 minutes at 4°C, and the supernatant was collected as the cytosol fraction whereas pellets were resuspended in hypotonic buffer and collected as the membrane fraction. Protein concentrations were measured and equal quantities were loaded on gels and analyzed by Western blot using standard protocols. The amount of proteins detected by Western blotting was determined by scanning the autoradiogram followed by processing of the data with the NIH image software.

### Rho, Rac, and Cdc42 Activity Assays

The RhoA, Rac1, and Cdc42 activity assays are based on the Rap1 activity assays<sup>25</sup> and were performed essentially as described in published protocols.<sup>26,27</sup>

### Effect of Etoposide on Hairy Cell Viability

Cell viability was determined using trypan blue exclusion assay. A total of 25  $\times 10^4$  cells were seeded in 48-well plates and exposed to etoposide at the concentration specified or vehicle concentration alone. After 18 hours, cells were stained with trypan blue, and those excluding



**Figure 1.** Cytoskeleton of hairy cells and alterations by IFN- $\alpha$ . HCLL-7876 and Eskol cells were either left untreated or incubated in the presence of IFN- $\alpha$  for 18 hours. Cells were harvested, fixed, and sedimented on poly-L-lysine-coated coverslips to be analyzed for F-actin with rhodamine-phalloidin staining. For both cell lines HCLL-7876 and Eskol and primary cells (PR), most untreated cells exhibited thin and curved microspikes made up of long bundles of F-actin on the entire surface of the cell (**A**) whereas other cells displayed extreme polarization of their surface projections (**B**). **C**: Treatment of hairy cells with IFN- $\alpha$  smoothed cell surface outlines. Images are three-dimensional reconstructions of stacks of confocal images. Scale bar, 4  $\mu$ m.

or including the dye were scored as alive or dead cells, respectively. Each point was performed in triplicate and 100 cells were scored for each condition.

### Statistics

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD of at least three independent triplicate experiments. Significance was determined using the Student's *t*-test.

### Results

#### F-Actin Phenotype of Hairy Cells and Alterations by IFN- $\alpha$

To explore the overall cytoskeletal organization of hairy cells and the ability of IFN- $\alpha$  to alter this phenotype, polymerized actin was stained with rhodamine-labeled phalloidin and observed by confocal microscopy. Cells from HCLL-7876 and Eskol cell lines showed the same surface features as those isolated from malignant B cells from patients with HCL (primary cells, PR) (Figure 1). F1 Most cultured hairy cells displayed an irregular profile, with a mixed phenotype made of both extended polymerized actin filaments organized in long protrusions and broader lamellipodium-like structures made up of a dense and compact mass of F-actin. Some cells exhibited thin and curved microspikes made up of long bundles of F-actin on the entire surface of the cell (Figure 1A). Other cells displayed shorter, finger-like protrusions highly reminiscent of filopodia (data not shown). In some

instances (~20% of the cells), cultured hairy cells displayed extreme polarization of their surface projections (Figure 1B). These structures correspond to the cytoplasmic projections and broad-based ruffles described previously by means of scanning electron microscopy.<sup>28</sup> This apparent heterogeneity is likely to reflect cytoskeletal dynamics.<sup>29</sup> Treatment of hairy cells with IFN- $\alpha$  smoothed cell surface outlines. A complete disappearance of these cytoplasmic hair-like projections was observed in ~80% of HCLL-7876 or Eskol cells after 4 days of treatment, in accordance with previous findings.<sup>29</sup> However, blunting of surface projections was already evident in ~40% of HCLL-7876 or Eskol cells after 18 hours of treatment or in primary hairy cells from a patient (Figure 1C), when other major effects of IFN- $\alpha$  are already detectable.<sup>30,31</sup> These morphological alterations obviously reflect IFN- $\alpha$ -induced changes in the cytoskeletal proteins.

### *Changes in RhoGTPase Activities Correlate with Changes in Hairy Cell Appearance*

To explore the possibility that alteration in RhoGTPases activities may underlie the abnormal cytoskeleton configuration of hairy cells, experiments were designed to inhibit these activities individually. In most cell types, expression of dominant active form of Cdc42 (V12Cdc42 or L61Cdc42) induces the formation of cytoplasmic extensions and is associated with cell polarization,<sup>5</sup> suggesting that Cdc42 could be involved in the formation of cellular protrusions in hairy cells. Endogenous Cdc42 activity can be inhibited by overexpressing the dominant-negative form of Cdc42, N17Cdc42, which traps Cdc42's guanine nucleotide exchange factor (GEF) and renders them unavailable for signaling functions. Another way to inhibit Cdc42-driven pathways is to block Cdc42 signaling to effectors. The formation of filopodia is dependent on the interaction of Cdc42 with the structural protein WASP<sup>27,32</sup> (a protein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome). Overexpressing only the CRIB domain of WASP prevents functional interaction of endogenous WASP with Cdc42 and thereby WASP-dependent filopodia formation.<sup>15</sup>

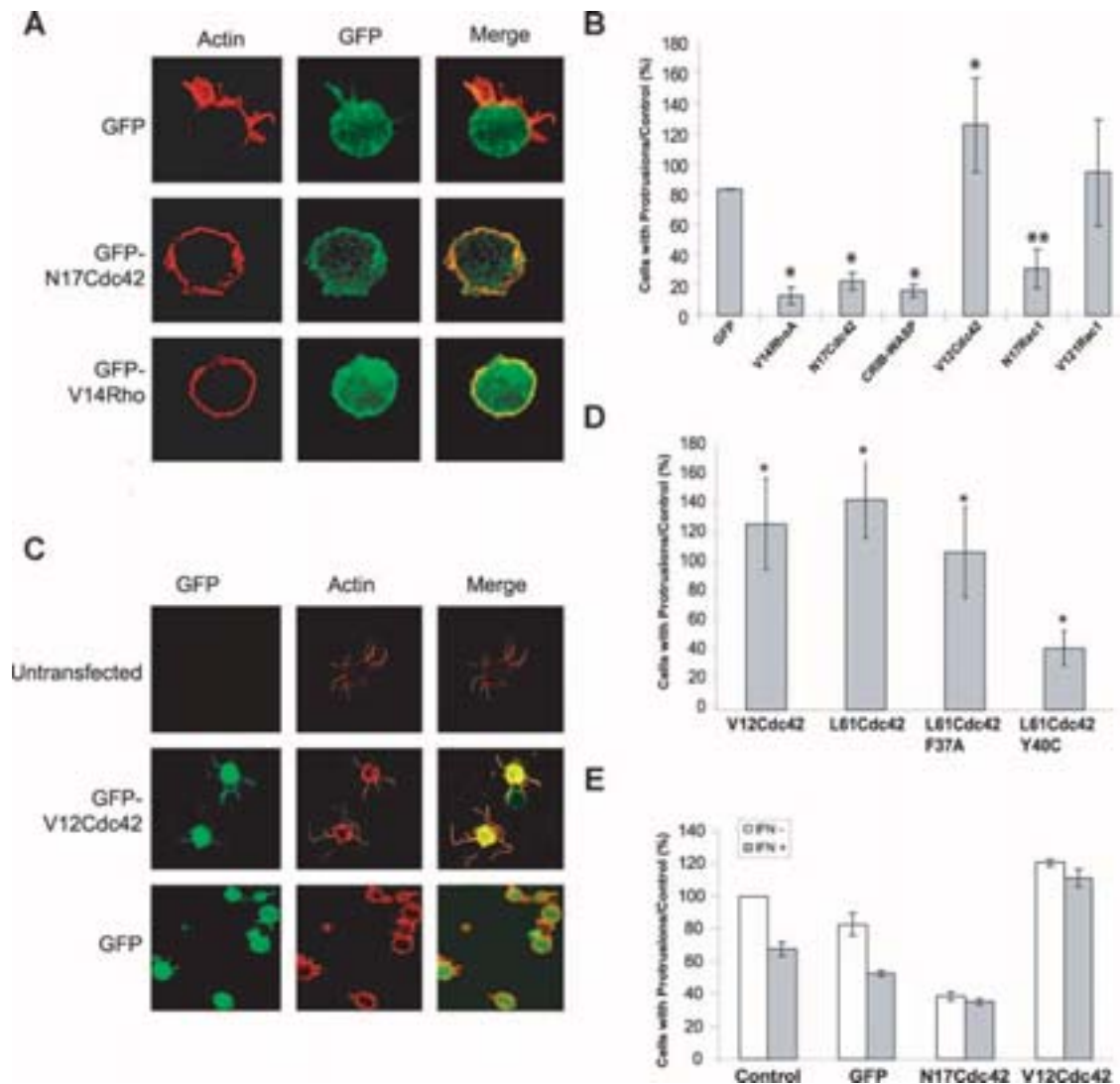
Once a transient transfection procedure was successfully established for HCLL-7876 cells (Eskol cells were found completely refractory to transfection), we proceeded to determine how hairy cells respond to inhibition of Cdc42. A GFP-tagged version of dominant-negative Cdc42 (GFP-N17Cdc42) was used to selectively examine cells that express the plasmid. Cytoskeletal alterations were visualized by rhodamine-phalloidin staining after cells had been sedimented on poly-L-lysine matrix-coated glass coverslips, 24 hours after transfection. After control transfection of a GFP-encoding vector, hairy cells were sometimes slightly more rounded than their control untransfected counterpart, with shorter microspikes and lamellipodia (see bottom of Figure 2C). We routinely observed 33% ( $\pm 5\%$ ) transfected cells with 6% ( $\pm 3\%$ ) smooth cells among the transfected cells. This low un-specific cell smoothing effect appeared in response to

the electroporation method and not to the empty plasmid because electroporation in the absence of vector produced the same effect. To ease the analysis, this baseline ratio was arbitrarily counted as one. Inhibition of Cdc42 resulted in a decrease in both the size and density of microspikes in most of the transfected cells (Figure 2A). Quantitative analysis of N17-Cdc42-transfected cells showed 4.4 times more cells with a rounded morphology than the control (Figure 2B). The WASP-CRIB protein appeared as an even better inhibitor with six times more round cells among the transfected cells (Figure 2B). By contrast, transfection of a constitutively active mutant of Cdc42 (GFP-V12Cdc42 or GFP-L61Cdc42) accentuated the phenotype in all of the transfected cells. These cells exhibited longer and stronger spikes, together with a more intense actin staining (Figure 2C). Taken together, these results indicate that a Cdc42-WASP pathway (or a closely related GTPase, able to interact with WASP) is highly active in these cells and that inhibition of its activity corrects the aberrant cytoskeletal organization of the cells.

Because hairy cells also exhibit lamellipodia-like protrusions characteristic of cells harboring active Rac1 proteins, similar experiments were performed with Rac1 mutants. Expression of dominant-negative Rac1 (GFP-N17Rac1) significantly altered the hairy appearance with suppression of lamellipodia, decreased cortical actin staining, and reduced microspike length and density (data not shown), leading to a phenotype somewhat resembling Cdc42 inhibition. It is likely that inhibition of Rac1 interferes with the pathways involved in the aberrant cytoskeletal organization. Expression of dominant active Rac1 (V12Rac) did not induce any significant change in the overall cell morphology (Figure 2B), suggesting that Rac1 activity was already elevated in these cells.

A balance between Cdc42 and RhoA activities has been evidenced in several models<sup>24</sup> and therefore RhoA activity was also investigated. To inhibit Rho, a slightly different approach was used: cells were transfected with a plasmid encoding C3, a well-characterized bacterial toxin that specifically ADP-ribosylates Rho proteins, thereby inactivating them.<sup>33</sup> Several attempts to express C3 resulted in hairy cell death, suggesting that hairy cells could not survive inhibition of Rho proteins. An alternative milder treatment, consisting of the addition of recombinant fusion protein Tat-C3, was tested. Such treatment also led to hairy cell death (data not shown). In contrast, when dominant-active V14RhoA was expressed, a profound effect was observed with almost complete disappearance of actin spikes (Figure 2, A and B). Interestingly, this phenotype was indistinguishable from the one observed under Cdc42 inhibition (Figure 2A).

To gain further insights into Cdc42 signaling in hairy cells, similar experiments were performed with a second generation of Cdc42 mutants. Cdc42 is able to induce diverse cellular responses via WASP, the PAK family, or ACK effectors through a region named effector-loop.<sup>34</sup> We used previously characterized Cdc42 effector-loop mutants as tools to dissect the molecular pathways involved in cytoplasmic protrusion induction. In a constitu-

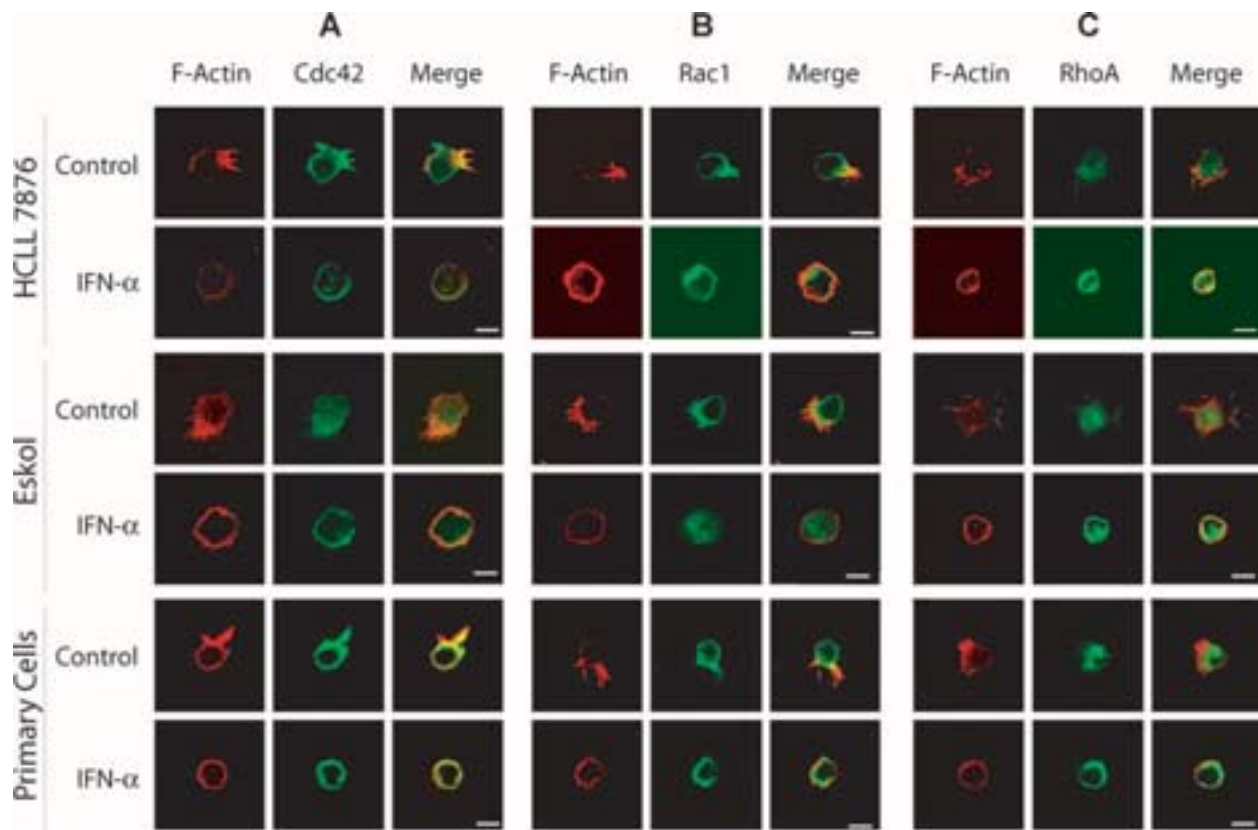


**Figure 2.** Effects of RhoGTPase mutants on hairy cell morphology. HCLL-7876 cells were transiently transfected with a plasmid encoding either control GFP or GFP-tagged versions of RhoGTPase mutants. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested, fixed, and analyzed for F-actin with rhodamine-phalloidin staining and examined for morphological alterations by confocal microscopy. Transfection efficiency was found very similar for all plasmids (data not shown). **A:** Expression of N17Cdc42 or V14RhoA inhibited cell protrusions (each image represents one confocal section of a cell). **B:** A quantitative analysis of the morphological alterations induced by RhoGTPase mutants is shown. The hairy phenotype was considered suppressed only when F-actin-stained cells displayed no residual protrusions. Loss of cellular protrusions was calculated on the basis of the control response obtained on transfection of the GFP encoding vector (\*statistical significance of the loss of protrusions versus control,  $P < 0.01$ , \*\*significant difference versus N17Cdc42,  $P < 0.05$ ). Inhibition of Cdc42 or Rac, or expression of active RhoA, suppressed the hairy phenotype. **C:** In contrast, expression of dominant-active Cdc42 exaggerated the hairy phenotype by inducing the formation of longer and stronger actin spikes (three-dimensional reconstructions of stacks of confocal images). **D:** The same experiment performed with plasmids encoding Cdc42 effector-loop mutants revealed that signaling through WASP, and not through Rac1, accentuated the hairy phenotype. Results are normalized based on the control response (\*significant difference versus control,  $P < 0.01$ ). Cells transfected with either dominant-negative mutant or constitutively active Cdc42 became insensitive or refractory to IFN- $\alpha$  action. Scale bars, 4  $\mu$ m.

tively active background (provided by the L61 mutation), an additional mutation in this sequence restricts the interaction with some but not all effectors. Accordingly, the L61Cdc42F37A mutant retains its ability to activate WASP but is deficient for Rac1 activation, whereas the L61Cdc42Y40C still signals to Rac1 but is unable to stimulate WASP.<sup>34</sup> Transient transfection of GFP-L61Cdc42 accentuated the hairy phenotype similar to that of GFP-V12Cdc42 (Figure 2D). Cells expressing the GFP-L61Cdc42F37A mutant displayed a morphology not significantly different from those expressing GFP-L61Cdc42 (data not shown), indicating that signaling to WASP was sufficient to exacerbate the hairy phenotype.

In accordance with these data, expression of the GFP-L61Cdc42Y40C mutant impaired in WASP signaling did not mimic the effect of GFP-L61Cdc42 (Figure 2D). These results are congruent with the observation that transfection of a constitutively active form of Rac1 did not alter the hairy cell appearance.

Because both IFN- $\alpha$  treatment and overexpression of N17Cdc42 reduced the hairy-like phenotype, we next asked whether altering Cdc42 activity would change cytoskeletal responsiveness to IFN- $\alpha$  treatment in these cells. Cells were transfected as above and were subsequently either left untreated or treated with IFN- $\alpha$  for 18 hours. Data presented in Figure 2E revealed that plasma



**Figure 3.** Immunolocalization of endogenous RhoGTPases in hairy cells and relocalization on IFN- $\alpha$  treatment. HCLL-7876, Eskol, or primary cells were either left untreated or treated with IFN- $\alpha$  for 18 hours. Cells were harvested, fixed, and stained for F-actin (rhodamine-phalloidin) and RhoGTPases (primary antibodies recognizing the RhoGTPases were revealed with FITC-labeled secondary antibody) and observed by confocal microscopy. RhoGTPases (green) co-localizing with F-actin (red) at the cell cortex or within cellular protrusions appeared in yellow (merge). IFN- $\alpha$  induced the relocalization of Cdc42 (A), Rac1 (B), and RhoA (C). Each image is a confocal section. Scale bar, 4  $\mu$ m.

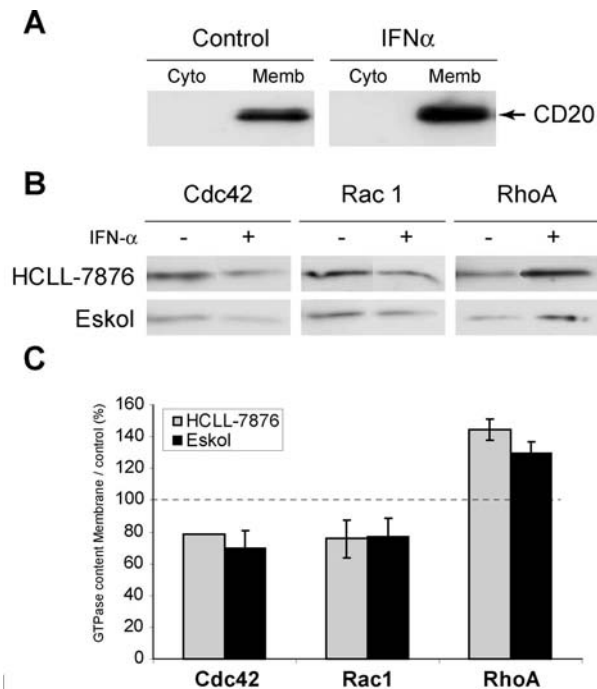
membrane smoothing was obtained in all cells overexpressing N17Cdc42, and IFN- $\alpha$  did not alter this effect. Cells transfected with active Cdc42 were refractory to IFN- $\alpha$  action. These data suggest that IFN- $\alpha$  receptor signaling acts either upstream or at the level of Cdc42 to regulate cytoskeletal organization.

### IFN- $\alpha$ Alters GTPase Activities in Hairy Cells

#### Analysis of RhoGTPase Localization by Immunofluorescence Experiments

The results described above revealed that RhoGTPases could be involved in the defective cytoskeletal organization of hairy cells and that GTPases are potential targets of IFN- $\alpha$  treatment. Whether IFN- $\alpha$  affects the expression and activation states of RhoGTPases was next investigated. Inactive GTPases (ie, GDP-bound forms) reside in the cytoplasm, bound to the regulatory RhoGDI protein. On activation, RhoGDI is displaced and an aliphatic sequence is unmasked, allowing GTPases to anchor into membranes where they interact with effectors.<sup>35</sup> Consequently, active GTPases (GTP-bound) are found associated with membranes and this localization reflects their activation state. We therefore used immunofluorescence techniques to localize endogenous RhoGTPases in untreated hairy cells and explored the effects

of IFN- $\alpha$  on their spatial distribution. Phalloidin staining revealed a thick ring of cortical polymerized actin underlining the contours of the plasma membrane and a loose network of F-actin inside the cell. Immunofluorescence studies performed with primary antibodies recognizing the RhoGTPases, followed by fluorescein isothiocyanate-labeled secondary antibody, were used to localize endogenous GTPases within the cells by confocal microscopy (Figure 3). Close association of GTPases with the plasma membrane was revealed by superposition of the two fluorochromes. In these experiments, Cdc42 was detected both at the plasma membrane (including that of villousities) and in the cytosol of both cell lines. When cells were treated with IFN- $\alpha$ , the reduction of membrane villousities forced Cdc42 relocalization. However, most of Cdc42 remained at the cell periphery and did not translocate to the cytosol (Figure 3A). By contrast, Rac1 was easily detected at the plasma membrane of Eskol cells and was found to redistribute, at least in part, into the cytosol after IFN- $\alpha$  treatment (Figure 3B). Finally, RhoA was mainly cytosolic in untreated hairy cells. IFN- $\alpha$  treatment resulted in a clear relocalization of RhoA at the cortical actin ring, beneath the plasma membrane in both cell lines (Figure 3C). Similar subcellular localization of Cdc42, Rac, and RhoA were seen in fresh primary hairy cells (PR) (Figure 3, A-C).



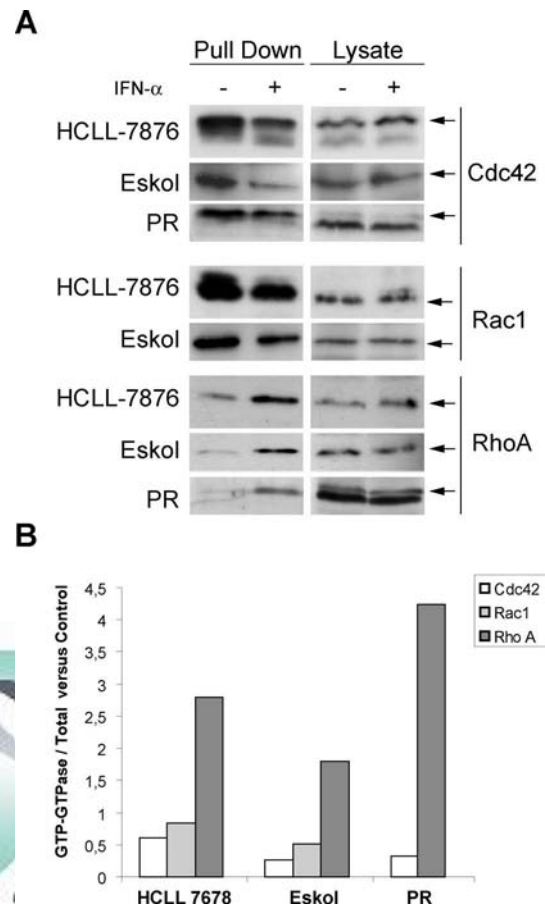
**Figure 4.** Distribution of RhoGTPases in cell fractionation experiments. HCLL-7876 and Eskol cells were either left untreated or treated with IFN- $\alpha$  for 18 hours. **A:** Proteins were fractionated into membrane and cytosolic fractions, and the CD20 protein was taken as a membrane marker. **B:** Equal amounts of membrane proteins were loaded on the gel and separated by electrophoresis followed by Western blotting using RhoGTPase-specific antibodies (one representative experiment). **C:** The amount of GTPases found in the membrane fraction was quantified in three experiments and is presented as percentage of the control response obtained in untreated cells. IFN- $\alpha$  induced a depletion of Cdc42 and Rac1 from the membrane fraction and the translocation of RhoA to the membrane fraction.

**Analysis of RhoGTPase Localization Using Cell Fractionation Experiments**

Membrane-bound GTPases were also detected by cell fractionation experiments combined with Western blot analysis. Membrane and cytosolic fractions were prepared with cells that had been either left untreated or treated with IFN- $\alpha$  and the amount of each RhoGTPase present in both fractions was determined by Western blot using specific antibodies. When cells were exposed to IFN- $\alpha$ , significant changes were observed in GTPase distribution. Cdc42 and Rac1 were found depleted from plasma membranes whereas, in parallel, RhoA became more associated with these fractions (Figure 4).

**Direct Analysis of RhoGTPase Activity by Selective Precipitation of GTP-Bound GTPases**

To measure alterations in the ratio of GTP-bound versus GDP-bound GTPases, hairy cells were treated as before, cell lysates were made and subjected to the pull-down experiment.<sup>25</sup> GST fusion proteins containing GTPase-binding domains of effectors, CRIB of PAK for Rac and Cdc42<sup>26</sup> and rhotekin for RhoA,<sup>27</sup> were coupled to agarose beads to selectively precipitate GTP-bound GTPases from hairy cells. Western blot analysis of affinity-purified proteins revealed that prolonged IFN- $\alpha$  exposure



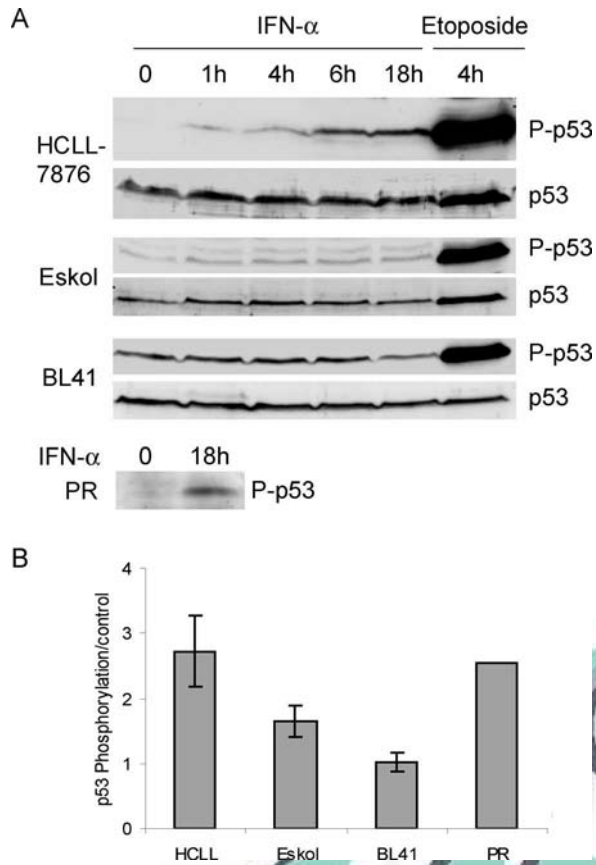
**Figure 5.** RhoGTPase activities analyzed by pull-down experiments. Hairy cells were either left untreated or incubated in the presence of IFN- $\alpha$  (18 hours). Cells were then lysed, and active GTPases were affinity precipitated with GST-RBD-rhotekin or GST-CRIB-PAK, eluted from the beads, and analyzed by Western blotting with the relevant antibodies. For each point, a fraction of the cell lysate harvested before precipitation was run to monitor GTPase content in each sample. **A:** IFN- $\alpha$  down-regulated Cdc42 and Rac1 activities and up-regulated that of RhoA in both cell lines as in primary cells. For each GTPase, quantification was made. The percentage of the GTPase under its GTP-bound form in the presence of IFN- $\alpha$  was divided by the one calculated in the absence of IFN- $\alpha$ . A graph showing these ratios is shown in **B.** IFN- $\alpha$  down-regulated Cdc42 and Rac1 activities and up-regulated that of RhoA.

induced a decrease in the GTP-Cdc42 content for both cell lines as well as for primary cells (Figure 5A). Similarly, under the same conditions, the amount of Rac1-GTP precipitated was also reduced. RhoA, again, displayed a distinct pattern, with a rise in the RhoA-GTP content in response to IFN- $\alpha$  treatment. Highly similar results were obtained with primary hairy cells treated *in vitro* with IFN- $\alpha$  (PR cells). The IFN- $\alpha$ -induced changes in the GTPase-GTP/total GTPase ratios were calculated for each GTPase (Figure 5B).

**IFN- $\alpha$  Affects p53 Status in Hairy Cells**

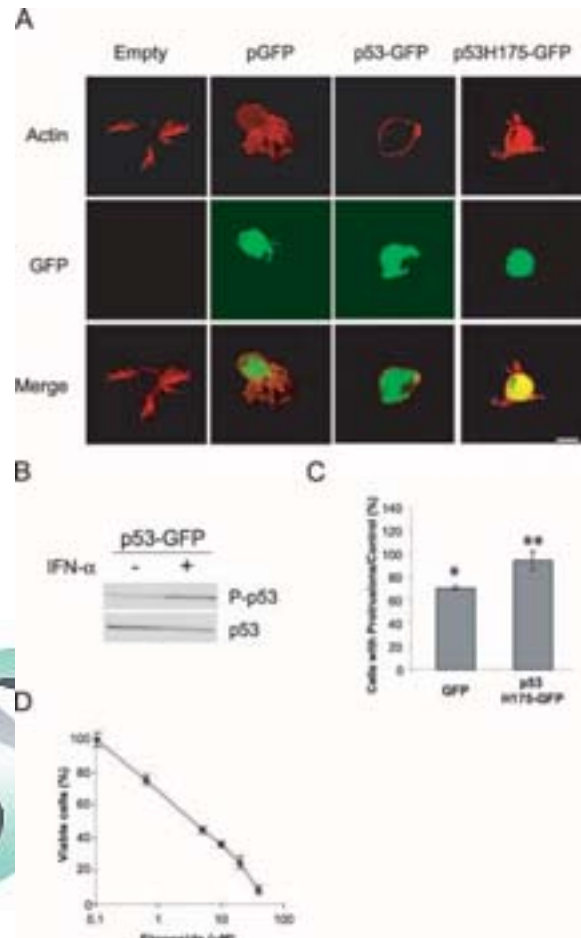
Taken together, the results presented above suggested to us that the IFN- $\alpha$  effect was mediated at the level of Cdc42, affecting Cdc42 activity and membrane localization. The tumor suppressor p53 is functionally connected to the RhoGTPase network and p53 is now known to

F4



**Figure 6.** Alteration of p53 status by IFN- $\alpha$  in hairy cells. HCLL-7876, Eskol, primary hairy, or BL41 cells were either left untreated or treated with IFN- $\alpha$  for various periods of time and cell lysates were prepared. Equal amounts of proteins (200  $\mu$ g per lane) were loaded on gels and separated by SDS-PAGE. **A:** p53 phosphorylation and expression were assessed by Western blot using relevant antibodies (shown is one representative experiment, HCLL-7876, Eskol, and PR blots were exposed for 10 minutes for autoradiography, BL41 was exposed for 18 hours after transfection and is presented as fold increase of the basal response obtained in untreated cells. IFN- $\alpha$  consistently induced a time-dependent increase in p53 phosphorylation on S15 in hairy cells but not in the Burkitt lymphoma cell line.

counteract Cdc42-induced filopodia formation.<sup>16</sup> Interestingly, hairy cells are often affected in their p53 status.<sup>36,37</sup> In Eskol and HCLL-7876 cell lines, p53 expression was barely detectable when compared to a Burkitt B-cell line (Figure 6A) (hairy cell blots were exposed to autoradiography for much longer periods and gave fainter bands). Because IFN- $\alpha$  has been shown to induce the expression and activation of p53 in tumor cells,<sup>17</sup> we hypothesized that induction/activation of p53 could be involved in the disappearance of hairy cell protrusions. The low expression of p53 in the two cell lines was not increased by IFN- $\alpha$ , but a marked stimulation was detected on treatment with the robust p53-inducer etoposide (Figure 6A). Thus, p53 expression is efficiently stabilized by etoposide but only weakly by IFN- $\alpha$ . However, p53 phosphorylation at S15 increased in a time-dependent manner in response to IFN- $\alpha$  in hairy cell lines. In these experiments, a p53-deficient and IFN- $\alpha$ -sensitive tumor cell line, not derived from HCL but from a Burkitt lymphoma, BL41 cells, were used as a control to examine



**Figure 7.** p53 regulates hairy cell morphology. HCLL-7876 cells were transfected with an empty vector or with a plasmid encoding GFP, GFP-p53, or GFP-p53H175. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested, fixed, stained for F-actin with rhodamine-phalloidin, and observed by confocal microscopy. **A:** Expression of GFP-p53 led to a complete disappearance of cell protrusions in all transfected cells whereas expression of p53H175-GFP did not affect the phenotype. **B:** Western blot analysis of these cells revealed basal phosphorylation of the fusion protein GFP-p53 on S15, which was further increased by IFN- $\alpha$ . HCLL-7876 cells were transfected with plasmids encoding either GFP or the dominant-negative mutant of p53, GFP-p53H175. Cells were allowed to express the plasmids for 24 hours and then treated or not with IFN- $\alpha$  for 18 hours. Cells were harvested, fixed, stained for F-actin with rhodamine-phalloidin, observed by confocal microscopy, and analyzed as described in Figure 2. Expression of dominant-negative p53 prevented morphological changes in response to IFN- $\alpha$ . **C:** Results are normalized based on the control response (\*significant difference versus control,  $P < 0.05$ ). To evaluate the effects of the p53 activator etoposide on cell viability, HCLL-7876 cells were treated with increasing concentrations of etoposide to stimulate p53 activity. After 18 hours, cell viability was determined, and results are presented as percentage of viable cells. **D:** Etoposide killed hairy cells in a dose-dependent manner within 18 hours of treatment). Scale bar, 4  $\mu$ m.

the specificity of the response. p53 phosphorylation was not increased in BL41 cells (Figure 6A). Primary hairy cells also responded to IFN- $\alpha$  by increasing S15 phosphorylation (Figure 6A), and p53 protein expression was below the threshold of detection by Western blot. When up-regulated on etoposide treatment, p53 accumulated under a form phosphorylated at S15 in HCLL-7876, Eskol, and BL41 cells. To determine whether p53 could be involved in the cytoskeletal response, cells were transfected with a p53-GFP fusion protein. Ectopic expression of p53 (GFP-p53; Figure 7A) led to a complete disap-

pearance of the cytoplasmic protrusions in all transfected cells. When analyzed by Western blot, the ectopic p53 protein was found phosphorylated at S15 (Figure 7B). To confirm the effects of IFN- $\alpha$  treatment on p53, a GFP-tagged version of a naturally occurring dominant-negative p53 mutant (p53R175H)<sup>38</sup> was transfected in hairy cells and the morphological changes induced on IFN- $\alpha$  were investigated. The cell membrane-smoothing effect of IFN- $\alpha$  was greatly reduced in cells expressing the dominant-negative p53 mutant (Figure 7C). These results indicate that p53 is integrated in the overall IFN- $\alpha$  response leading to the disappearance of actin spikes. Finally, activation of p53 by etoposide ablated cell protrusions and killed hairy cells in a dose-dependent manner within 18 hours of treatment (Figure 7D).

## Discussion

Hairy cells display an irregular profile, with numerous membrane extensions such as thin microspikes made up of long bundles of F-actin and broader lamellipodia-like structures. Cdc42 has been shown to control the formation of filopodia as well as other types of protrusions.<sup>39</sup> The various kinds of actin configuration observed in hairy cells are similar to those obtained when active forms of Cdc42 and Rac1 are overexpressed.

## RhoGTPase Activities Contribute to Hairy Cell Morphology

Experiments performed to inhibit Cdc42 activity using transient transfection protocols revealed that constitutive signaling through Cdc42, or a closely related GTPase also able to interact with WASP, contributes to the unusual phenotype of hairy cells. Cytoplasmic processes were lost or dramatically decreased by inhibition of either Cdc42 or WASP. This latter protein, by recruiting the actin polymerization machinery (Arp2/3 complex), allows filopodia extension. Although filopodia can also be formed in the absence of WASP,<sup>40,41</sup> our results obtained with the WASP-CRIB mutant indicate that cytoplasmic protrusions of hairy cells are WASP-dependent. Overexpression of a constitutively active form of Cdc42 exaggerated the phenotype by promoting the formation of longer spikes, strengthening our conclusions. Finally, expression of an active Cdc42 mutant that selectively stimulates WASP (L61Cdc42F37A) confirmed this result. Although the organization of the actin filament system is cell-type-dependent, other GTPases related to Cdc42 such as TC10, RhoD, RhoG, and Wrch1 can also stimulate the formation of membrane protrusions and some of them are known to interact with WASP.<sup>2,42</sup> Future studies will explore the role of these other RhoGTPase members in HCL.<sup>43</sup>

Expression of V12Rac in hairy cells did not significantly affect F-actin organization, suggesting that Rac was already activated. These findings are consistent with the high levels of Cdc42 activity found in these cells as Rac1 is positioned downstream of Cdc42 in signaling cascades controlling cytoskeletal remodeling.<sup>5</sup> Inhibiting

Rac1 also results in significant smoothing of the hairy cell phenotype, suggesting that the defect leading to aberrant cytoskeleton organization is located upstream of Rac1. One plausible explanation for the inhibitory effect observed on dominant-negative Rac1 expression could reside in the ability of this protein to bind GEF(s) also active on Cdc42 family members. Several attempts to inhibit Rho activity resulted in hairy cell death, suggesting that hairy cells cannot survive inhibition of Rho. In contrast, expression of a constitutively active form of RhoA resulted in a normalization of the cellular morphology. Overexpression of V14RhoA had the same effect on cell morphology changes of hairy cells as N17Cdc42 or N17Rac1. Whether IFN- $\alpha$ -induced activation of RhoA is responsible for Cdc42 and Rac1 inhibition remains to be determined.

## IFN- $\alpha$ Regulates Cdc42, Rac1, and RhoA Activities

Hairy cells incubated in the presence of IFN- $\alpha$  lose their characteristic villousities. Expression of mutants able to inhibit Cdc42 or expression of an active RhoA mutant mimics the effects of IFN- $\alpha$  in suppressing cytoplasmic processes. The striking resemblance of the resulting phenotypes suggested to us that activating RhoA could result in Cdc42 inhibition. To address this point, subcellular immunolocalization, membrane fractionation, and pull-down experiments allowed us to compare the relative levels of active endogenous GTPases in IFN- $\alpha$ -treated versus control cells. Direct measurements of RhoGTPase activities using the pull-down method showed that Cdc42 and Rac1 activities were reduced on prolonged (18 hours) exposure to IFN- $\alpha$ , whereas that of RhoA was clearly increased. The three approaches converged on the same conclusions for Rac1 and RhoA. Pull-down experiments demonstrated a reduction in the total pool of Cdc42 activity and depletion of Cdc42 from membrane fractions after IFN- $\alpha$  treatment. However, although Cdc42 did redistribute when cytoplasmic protrusions were reduced, Cdc42 immunostaining remained co-localized with cortical actin at the cell periphery. A plausible explanation for these contrasting findings is that a Cdc42 membrane-targeting signal exists in hairy cells and remains in IFN- $\alpha$ -treated cells as indicated by the co-localization of cortical actin and Cdc42 seen using the immunofluorescence approach. Pull-down experiments showed that Cdc42 cannot be activated in the presence of IFN- $\alpha$  or that GTP-bound Cdc42 is instantly hydrolyzed by a putative increase in GAP activity. The fact that hairy cells transfected with the GAP-deficient Cdc42 mutant were found refractory to IFN- $\alpha$  action supports this conclusion.

## RhoGTPases Are Likely to Contribute to the Tumorigenesis of HCL

Cdc42 is a Ras-related protein that has been implicated in the control of normal cell growth and, when improperly



regulated, in cellular transformation and invasiveness.<sup>44</sup> The presence of a transforming gene in hairy cells was documented by established methods,<sup>45</sup> but the oncogene involved has not been identified yet. Increased expression of cyclin D1 occurs in HCL.<sup>46</sup> Cyclin D1 is under the control of Rac1 to control cell-cycle progression, and high levels of active Rac1 could thereby contribute to tumorigenesis by disturbing the normal cell cycle. Hairy cells also exhibit abnormal constitutive expression of an AP1 complex containing junD.<sup>47</sup> Regulation of AP1 is dependent on Cdc42/Rac1 signaling, in agreement with our findings. Finally, inhibitory mutants of Cdc42 and Rac were shown to reduce cell growth in another hairy cell line.<sup>48</sup>

Cdc42 is unlikely to be oncogenic by itself because its activity could be down-regulated by IFN- $\alpha$  as measured by pull-down experiments. Dominant-negative mutants exert their inhibitory effects by titrating GEF, and the inhibition of cytoplasmic protrusions observed with both N17Cdc42 and N17Rac suggest that a common GEF might be involved in this process as already proposed above. The oncogenic potential involving RhoGTPase in tumors is often driven by alterations in GEF or GAP activities.<sup>43,49</sup> Future studies will explore the expression and regulation of these proteins in hairy cells.

Interestingly, a previous report from Zhang and colleagues<sup>48</sup> compared RhoGTPase expression and status in leukemic cells from HCL, B-cell lymphocytic leukemia, and B-cell acute leukemia and concluded that RhoGTPases are uniquely activated in HCL. However, in this study RhoA was found constitutively activated when compared to its status in non-HCL leukemic cells. In the present study we compared RhoA activity in the presence and absence of IFN- $\alpha$ . We did not assess the basal activation status of RhoA but demonstrate that RhoA activity is further increased by IFN- $\alpha$ . In the same study, it was reported that only dominant-negative Rac could reduce cell protrusions. However, the approach used by Zhang and colleagues<sup>48</sup> differs from ours in that dominant-negative mutants were expressed in stable cell lines whereas we used transient transfection protocols. More importantly, the BNBH-1 hairy cell line used in their study has been derived from a Japanese hairy cell variant type of HCL, which differs in many respects from typical HCL seen in western countries and from which HCLL-7876 and Eskol cells have been derived. The predominant role of Cdc42 in hairy cells could be another distinctive feature of typical HCL, not occurring in Japanese HCL disease.

Our data show that IFN- $\alpha$  increases RhoA activity. These findings are in agreement with those reported by Badr and colleagues<sup>23</sup> in mature normal B cells. This study reported a regulatory effect of IFN- $\alpha$  on RhoA in the context of ligand-induced chemokine receptor internalization in normal B cells.<sup>23</sup> The regulation of RhoA in B cells seems different from that described for fibroblasts and macrophages.<sup>23,50</sup> In adherent cells, activation of RhoA has often been linked with tumorigenicity, but recent work suggests that RhoA can also induce cell-cycle arrest via its effector ROCK.<sup>51</sup> In addition, prolonged inhibition of RhoA in lymphocytes *in vivo* has been shown

to induce development of lymphoma,<sup>52</sup> suggesting that elevating levels of RhoA may antagonize a positive signal for proliferation/tumorigenesis.

### *IFN- $\alpha$ Regulation of RhoGTPase Activities and Increased Activation of p53 May Have Anti-Tumoral Benefit*

Tumor expansion often results from the accumulation of cancer cells that are unable to apoptose. In HCL patients in which IFN- $\alpha$  therapy is successful, hairy cells are rapidly cleared from the blood, suggesting the occurrence of tumor cell apoptosis.<sup>53</sup> Extensive *in vitro* studies have established that IFN- $\alpha$  is not a direct inducer of programmed cell death for hairy cells but restores their sensitivity to apoptosis-inducing agents.<sup>53</sup> Interestingly, cells expressing active Rac1 have been demonstrated to be resistant to apoptotic inducers of various origins.<sup>12,14</sup> It is tempting to speculate that the high levels of active Rac1 found in hairy cells prevent effective killing by the immune system. We previously reported that hairy cells exhibit high levels of intracytoplasmic calcium  $[Ca^{2+}]_i$ ,<sup>31</sup> a phenomenon that could also protect hairy cells from programmed cell death.  $[Ca^{2+}]_i$  was found reduced on IFN- $\alpha$  treatment.<sup>54</sup> Because Rac1 has recently been shown to increase  $[Ca^{2+}]_i$ ,<sup>55</sup> the observed reduction in Rac1 activity could be involved in the normalization of  $[Ca^{2+}]_i$ . Tumor cells are prone to apoptose, but high  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>31</sup> or active Rac1 (this study) could protect hairy cells from programmed cell death. By decreasing Rac1 activity, IFN- $\alpha$  could down-regulate certain cellular processes to a threshold where cells become responsive to apoptosis inducers.

As stated above, the genetic mechanisms underlying the pathogenesis of HCL are unknown, although the tumor suppressor p53 is frequently deleted or mutated compared to other hematological malignancies.<sup>36</sup> In normal cells, Rac1 and Cdc42 extinction activates endogenous p53, and apoptosis induction in response to inhibition of Rac1 and Cdc42 requires p53.<sup>16</sup> In addition, p53 exerts a selective effect on Cdc42-mediated cell functions.<sup>15</sup> In p53-null mice, either overexpression of wild-type p53 or activation of endogenous p53 counteracts Cdc42-induced filopodia formation. Mechanistic studies indicate that p53 prevents the initiating steps of filopodia formation operating at the level of Cdc42 itself or immediately downstream of it.<sup>16</sup> In our models of hairy cells, p53 expression was low, suggesting mono-allelic deletion and/or protein instability. In these cells, overexpression of wild-type p53 or activation of endogenous p53 reduces cell protrusions, indicating that a similar mechanism could be involved. The p53 activator etoposide completely ablated cell protrusions and killed hairy cells in a dose-dependent manner.

Although the consequences of IFN- $\alpha$ -induced cytoskeletal reorganization on hairy cell behavior remains an open question, alterations of RhoGTPase status in hairy cells are likely to correlate with their distinctive profile of integrin receptors, activation status, and invasive behavior of the bone marrow and spleen.<sup>26,56,57</sup> The

normalization of RhoGTPase activities and the increased activation of p53 may have therapeutic anti-tumoral benefits by reducing tumor expansion, invasiveness, and/or increasing apoptosis. Our data illustrate the link between p53 and the cytoskeleton in a pathological situation in which p53 regulates RhoGTPase-dependent cell effects that control actin cytoskeletal dynamics. This novel function of p53 may contribute to anti-tumor activity.

### Acknowledgments

We thank Dr. J.P. Vial and Pr. J.F. Viillard (Haut-Levêque Hospital, Pessac, France) for phenotyping the cell lines and providing primary hairy cell samples; Dr. J. Bertoglio (INSERM-U461, Chatenay-Malabry, France) for providing the Tat-C3; Dr. J. Collard (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands) for GST-fusion proteins; Dr. A. Hall and Dr. S. Etienne-Manneville (University College of London, London, UK) for dominant-negative WASP; Dr. F. Ichas for the gift of etoposide; Dr. T. Taniguchi and Dr. A. Takaoka (University of Tokyo, Tokyo, Japan) for helpful discussions; Dr. P. Fort for GFP-GTPase fusion proteins encoding plasmids; and Dr. P. Roux (CRBM-CNRS-UPR-1086) for GFP-p53 fusion proteins encoding plasmids and critical reading of the manuscript.

### References

- Bouroncle BA: Leukemic reticuloendotheliosis (hairy cell leukemia). *Blood* 1979, 53:412-436
- Aspenstrom P, Fransson A, Saras J: Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* 2004, 377:327-337
- Van Aelst L, D'Souza-Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997, 11:2295-2322
- Aspenstrom P: Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 1999, 11:95-102
- Nobes CD, Hall A: Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995, 81:53-62
- Woodside DG, Wooten DK, Teague TK, Miyamoto YJ, Caudell EG, Udagawa T, Andruss BF, McIntyre BW: Control of T lymphocyte morphology by the GTPase Rho. *BMC Cell Biol (serial online)* 2003, 4:2
- Bird MM, Lopez-Lluch G, Ridley AJ, Segal AW: Effects of microinjected small GTPases on the actin cytoskeleton of human neutrophils. *J Anat* 2003, 203:379-389
- Blanchard JM: Small GTPases, adhesion, cell cycle control and proliferation. *Pathol Biol (Paris)* 2000, 48:318-327
- Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ: Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 1998, 394:295-299
- Hill CS, Wynne J, Treisman R: The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995, 81:1159-1170
- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R: Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 1999, 98:159-169
- Zhang B, Zhang Y, Shacter E: Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Mol Cell Biol* 2004, 24:6205-6214
- Genot EM, Arriemerlou C, Ku G, Burgering BM, Weiss A, Kramer IM: The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 2000, 20:5469-5478
- Murga C, Zohar M, Teramoto H, Gutkind JS: Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* 2002, 21:207-216
- Lassus P, Roux P, Zugasti O, Philips A, Fort P, Hibner U: Extinction of rac1 and Cdc42Hs signalling defines a novel p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2000, 19:2377-2385
- Gadea G, Lapasset L, Gauthier-Rouviere C, Roux P: Regulation of Cdc42-mediated morphological effects: a novel function for p53. *EMBO J* 2002, 21:2373-2382
- Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T: Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 2003, 424:516-523
- Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK: Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* 2001, 3:950-957
- Kanowitz-Klein S, Saxon A, Uittenbogaart CH: Constitutive production of B cell differentiation factor-like activity by human T and B cell lines. *Eur J Immunol* 1987, 17:593-598
- Harvey W, Srouf EF, Turner R, Carey R, Maze R, Starrett B, Kanagala R, Pereira D, Merchant P, Taylor M, Jansen J: Characterization of a new cell line (ESKOL) resembling hairy-cell leukemia: a model for oncogene regulation and late B-cell differentiation. *Leuk Res* 1991, 15:733-744
- Genot EM, Meier KE, Licciardi KA, Ahn NG, Uittenbogaart CH, Wietzerbin J, Clark EA, Valentine MA: Phosphorylation of CD20 in cells from a hairy cell leukemia cell line. Evidence for involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Immunol* 1993, 151:71-82
- Genot E, Mathiot C, Kolb JP: Modulation of the response to B-cell growth factor (BCGF) of hairy cells from a patient under IFN-alpha therapy. *Blut* 1987, 55:65-67
- Badr G, Borhis G, Treton D, Richard Y: IFN(alpha) enhances human B-cell chemotaxis by modulating ligand-induced chemokine receptor signaling and internalization. *Int Immunol* 2005, 17:459-467
- Moreau V, Tatin F, Varon C, Genot E: Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol* 2003, 23:6809-6822
- Franke B, Akkerman JW, Bos JL: Rapid Ca2+-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J* 1997, 16:252-259
- Sander EE, Collard JG: Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 1999, 35:1302-1308
- Castellano F, Montcourrier P, Guillemot JC, Gouin E, Machesky L, Cossart P, Chavrier P: Inducible recruitment of Cdc42 or WASP to a cell-surface receptor triggers actin polymerization and filopodium formation. *Curr Biol* 1999, 9:351-360
- Gamlieh H, Hiraoka A, Golomb HM: The effect of cultivation and interferon treatment on the surface morphology of hairy cell leukemia cells. *Cancer Invest* 1987, 5:389-399
- Miyoshi EK, Stewart PL, Kincade PW, Lee MB, Thompson AA, Wall R: Aberrant expression and localization of the cytoskeleton-binding p52 (LSP1) protein in hairy cell leukemia. *Leuk Res* 2001, 25:57-67
- Genot E, Valentine MA, Degos L, Sigaux F, Kolb JP: Hyperphosphorylation of CD20 in hairy cells. Alteration by low molecular weight B cell growth factor and IFN-alpha. *J Immunol* 1991, 146:870-878
- Genot E, Bismuth G, Degos L, Sigaux F, Wietzerbin J: Interferon-alpha downregulates the abnormal intracytoplasmic free calcium concentration of tumor cells in hairy cell leukemia. *Blood* 1992, 80:2060-2065
- Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L: Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol* 1998, 18:130-140
- Paterson HF, Self AJ, Garrett MD, Just I, Aktories K, Hall A: Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol* 1990, 111:1001-1007
- Lamarche N, Tapon N, Stowers L, Burbelo PD, Aspenstrom P, Bridges T, Chant J, Hall A: Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* 1996, 87:519-529
- Del Pozo MA, Kioussis WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM, Schwartz MA: Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 2002, 4:232-239
- Konig EA, Kusser WC, Day C, Porzolt F, Glickman BW, Messer G,

- Schmid M, de Chatel R, Marcsek ZL, Demeter J: p53 mutations in hairy cell leukemia. *Leukemia* 2000, 14:706–711
37. Vallianatou K, Brito-Babapulle V, Matutes E, Atkinson S, Catovsky D: p53 gene deletion and trisomy 12 in hairy cell leukemia and its variant. *Leuk Res* 1999, 23:1041–1045
  38. Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T: Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 1994, 13:3496–3504
  39. Adams JC, Schwartz MA: Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. *J Cell Biol* 2000, 150:807–822
  40. Snapper SB, Takeshima F, Anton I, Liu CH, Thomas SM, Nguyen D, Dudley D, Fraser H, Purich D, Lopez-Illasaca M, Klein C, Davidson L, Bronson R, Mulligan RC, Southwick F, Geha R, Goldberg MB, Rosen FS, Hartwig JH, Alt FW: N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat Cell Biol* 2001, 3:897–904
  41. Pellegrin S, Mellor H: The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr Biol* 2005, 15:129–133
  42. Aronheim A, Broder YC, Cohen A, Fritsch A, Belisle B, Abo A: Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 1998, 8:1125–1128
  43. Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ: Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat* 2004, 84:61–71
  44. Keely PJ, Westwick JK, Whitehead JP, Der CJ, Parise LV: Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997, 390:632–636
  45. Lane MA, Sauten A, Cooper GM: Stage-specific transforming genes of human and mouse B- and T-lymphocyte neoplasms. *Cell* 1982, 28:873–880
  46. Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Pons MA, Villamor N, Tassies D, Jaffe ES, Montserrat E, Rozman C, Cardesa A: PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994, 84:2726–2732
  47. Nicolaou F, Teodoridis JM, Park H, Georgakis A, Farokhzad OC, Bottinger EP, Da Silva N, Rousselot P, Chomienne C, Ferenczi K, Arnaout MA, Shelley CS: CD11c gene expression in hairy cell leukemia is dependent upon activation of the proto-oncogenes ras and junD. *Blood* 2003, 101:4033–4041
  48. Zhang X, Machii T, Matsumura I, Ezoe S, Kawasaki A, Tanaka H, Ueda S, Sugahara H, Shibayama H, Mizuki M, Kanakura Y: Constitutively activated Rho guanosine triphosphatases regulate the growth and morphology of hairy cell leukemia cells. *Int J Hematol* 2003, 77:263–273
  49. Boettner B, Van Aelst L: The role of Rho GTPases in disease development. *Gene* 2002, 286:155–174
  50. Saci A, Carpenter CL: RhoA GTPase regulates B cell receptor signaling. *Mol Cell* 2005, 17:205–214
  51. Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL: TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:15548–15553
  52. Cleverley S, Henning S, Cantrell D: Inhibition of Rho at different stages of thymocyte development gives different perspectives on Rho function. *Curr Biol* 1999, 9:657–660
  53. Baker PK, Pettitt AR, Slupsky JR, Chen HJ, Glenn MA, Zuzel M, Cawley JC: Response of hairy cells to IFN-alpha involves induction of apoptosis through autocrine TNF-alpha and protection by adhesion. *Blood* 2002, 100:647–653
  54. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR: Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 1998, 396:584–587
  55. Rice LS, Langeslag M, ten Klooster JP, Hordijk PL, Jalink K, Collard JG: Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem* 2003, 278:39413–39421
  56. Sahai E, Marshall CJ: RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002, 2:133–142
  57. Burthem J, Cawley JC: Specific tissue invasion, localisation and matrix modification in hairy-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 1994, 14(Suppl 1):19–22

### Résumé :

L'objectif principal de ce travail est la mise en évidence du rôle du TGF $\beta$ 1 dans la différenciation myélo-monocytaire. Nous avons montré que le TGF $\beta$ 1 agit sur l'activation de Rap1 et de l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  chez une lignée pro-monocytaire humaine et chez les monocytes : le TGF $\beta$ 1 réduit considérablement l'activation de Rap1 et des intégrines  $\beta_2$ , ainsi que la migration transendothéliale. Dans le contexte de la pathologie athéroscléreuse, le TGF $\beta$ 1 posséderait ainsi la caractéristique de réduire les premières étapes du processus inflammatoire à savoir le recrutement des monocytes, l'adhérence à l'endothélium et la migration transendothéliale, et pourrait ainsi exercer un rôle protecteur dans la pathologie de l'athérosclérose. Nous avons également montré que le TGF $\beta$ 1 en synergie avec CD44 était impliqué dans le processus de différenciation myélo-monocytaire. Ainsi en présence de CD44, le TGF $\beta$ 1 induit l'expression de p47<sup>phox</sup>, un composant de la NAPH oxydase fonctionnelle.

### Mots clés :

monocytes, endothélium, intégrines, Rap1, EPAC, athérosclérose, différenciation cellulaire, hyaluronan, CD44, hématopoïèse, TGF $\beta$ 1.

### Abstract :

The principal objective of this work is the elucidation of the role of TGF $\beta$ 1 in monocyte differentiation. We showed that TGF $\beta$ 1 is essential in the activation of Rap1 and integrin  $\beta_2$  in human monocytes: TGF $\beta$ 1 reduces considerably the activation of Rap1 and integrin  $\beta_2$ , as well as monocyte transendothelial migration. In the context of atherosclerosis, TGF $\beta$ 1 may exert a reducing effect in the first stages of the inflammatory process, the recruitment of monocytes, adhesion to endothelium and transendothelial migration and could thus exert a protective role in atherosclerosis. We next show that TGF $\beta$ 1 cooperatively with CD44 is implicated in monocyte differentiation. In the presence of CD44, TGF $\beta$ 1 strongly induces p47<sup>phox</sup> expression, a component of NADPH-oxidase.

### Key words :

monocytes, endothelium, integrins, Epac, atherosclerosis, CD44, hyaluronan, cell differentiation, hematopoiesis, TGF $\beta$ 1.