

Université de Montréal

Activités Proinflammatoires des Angiopoïétines

Par

Caroline Lemieux

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître es Science (M.Sc.)

En pharmacologie

Août 2004

© Caroline Lemieux



W

4

U58

2005

v. 048

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :
Activités Proinflammatoires des Angiopoïétines

Présenté par
Caroline Lemieux

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Dr Martin G. Sirois

Directeur de recherche

Dr Lucie Germain

Membre du jury

REMERCIEMENTS

Merci au Docteur Martin Sirois pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Les deux années passées auprès de votre équipe m'ont permis, certes, de progresser scientifiquement, mais également de m'accomplir humainement.

Merci au Docteur Jean-François Gauchat et au Docteur Lucie Germain de prendre sur leur temps pour corriger ce mémoire.

Merci aux Docteurs Yahye Merhi, Bruce Allen, Danielle Libersan, et à Simon Rollin, François Tremblay, Jean-François Théorêt, Louis Villeneuve, Dominique Lauzier et Pedro Geraldès, pour les collaborations, le soutien technique et les précieux conseils qui ont grandement contribué au succès de mes projets.

Merci à la gente masculine de mon laboratoire; Alexandre, Ricardo et Paul-Éduard, pour un humour qui leur est propre...

Merci à Catherine pour sa naïveté et sa joie de vivre qui font d'elle une personne si adorable.

Merci à Stéphanie pour le bout en train qu'elle est tout simplement.

Un merci tout particulier au Docteur Judith Favier, pour tout l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce projet. Judith est la preuve vivante que le métier de chercheur est le plus beau métier du monde.

Finalement, je remercie mes parents et mes sœurs pour leur soutien et leur encouragement. Enfin je remercie surtout Emanuel pour son amour et sa compréhension.

*Pour n'importe quel gagnant,
le conditionnel est un temps qui aurait pu exister.*

Pour le perdant, il existe vraiment.

Joseph Messinger

RÉSUMÉ

Les angiopoïétines sont des facteurs de croissance qui jouent un rôle majeur dans le remodelage vasculaire au cours de l'angiogenèse. Les angiopoïétines se lient au récepteur Tie2 exprimé à la surface des cellules endothéliales, et il est classiquement admis que l'angiopoïétine-1 agit comme agoniste alors que l'angiopoïétine-2 aurait une activité antagoniste sur ce récepteur. Ainsi, l'angiopoïétine-1, en activant Tie2, participerait à la stabilisation et à la maturation des néovaisseaux en renforçant les interactions entre l'endothélium et les cellules péri-endothéliales. L'angiopoïétine-2 aurait une action inverse et induirait une déstabilisation vasculaire.

Il est bien établi que la réponse inflammatoire et la réponse angiogénique participent mutuellement aux processus de l'une et de l'autre. Au cours de cette étude, nous avons démontré, pour la première fois, un potentiel inflammatoire chez les angiopoïétines. Nous avons établi que l'angiopoïétine-1 et l'angiopoïétine-2 sont toutes deux capable d'induire la translocation endothéliale de la P-sélectine, une étape essentielle au recrutement des neutrophiles. De façon surprenante, alors que la combinaison des deux angiopoïétines n'amplifie pas la translocation de la P-sélectine, elle conduit à un effet additif sur l'adhésion des neutrophiles. Dans le but de clarifier ce phénomène, nous avons démontré l'expression inattendue du récepteur Tie2 à la surface des neutrophiles. Nos études confirment que les angiopoïétines ont la capacité d'activer directement les neutrophiles et d'induire une synthèse de PAF qui, lorsque suffisante, permet l'activation des $\beta 2$ intégrines à la surface des neutrophiles. À la lumière de ces résultats, nous proposons un rôle des angiopoïétines dans l'induction des processus inflammatoires, un phénomène connu pour faciliter le remodelage vasculaire au cours de l'angiogenèse.

ABSTRACT

Angiopoietin-1 and -2 are endothelial growth factors, which bind to the tyrosine kinase receptor Tie2 and contribute to orchestrate blood vessel formation during angiogenesis. Angiopoietin-1 mediates vessel maturation and integrity by the recruitment of pericytes. In contrast, angiopoietin-2 is classically considered as a Tie2 antagonist, counteracting the stabilizing action of angiopoietin-1. Inflammation exists in a mutually-dependent association with angiogenesis and we have therefore studied the capacity of angiopoietins to modulate proinflammatory activities namely P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto endothelial cells. We observed that both angiopoietin-1 and -2 increased these biological activities. Furthermore, combination of both angiopoietins induced an additive effect on neutrophil adhesion but not on P-selectin translocation. In an attempt to clarify this phenomenon, we found that angiopoietins can directly activate neutrophils through Tie2 signaling as well as modulate PAF synthesis and β 2 integrins functional upregulation. Together, our data demonstrate that angiopoietins could promote acute recruitment of leukocytes, which might contribute to facilitate vascular remodeling and angiogenesis.

Avant-propos

L'angiogenèse est essentielle à la croissance et la différenciation embryonnaire. Chez l'adulte, elle est nécessaire à plusieurs processus physiologiques (cicatrisation et cycle de reproduction chez la femme). Cependant, il arrive que les processus de vascularisation soient délétères et que l'angiogenèse soit impliquée dans différentes pathologies vasculaires (croissance tumorale, polyarthrite rhumatoïde, rétinopathie du diabétique et autres). Qu'elle soit physiologique ou pathologique, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins se caractérise par des phénomènes précis: une réaction inflammatoire, présence de monocytes/macrophages, neutrophiles, relâche de protéases enzymatiques, dégradation de la matrice péri-vasculaire et relâche de facteurs de croissance qui induisent la migration et la prolifération de cellules endothéliales impliquées dans la néovascularisation.

Un avancement considérable a été réalisé au cours des 15 dernières années sur la compréhension des mécanismes régulant les processus de vascularisation, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques. Les angiopoïétines sont maintenant considérées comme des facteurs de croissance jouant un rôle prédominant dans l'angiogenèse.

Ce travail de recherche s'est donc centré sur l'étude du rôle potentiel des angiopoïétines dans la réponse inflammatoire associée à l'angiogenèse. Une meilleure compréhension du rôle des angiopoïétines dans l'induction de tels processus pourrait contribuer au développement de meilleures approches thérapeutiques.

ACCORD DES COAUTEURS

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Lemieux, Caroline
M.Sc. Pharmacologie (2-520-1-0)

2. Description de l'article

Ordre des auteurs : Lemieux, C., *Maliba, R., *Favier J., Théorêt JF., Merhi, Y., et Sirois MG. (* Contribution équivalente)

Titre de l'article : Angiopietins can directly activate endothelial cell and neutrophils to promote proinflammatory responses

Revue de soumission proposé: *Blood*

État actuel de l'article : Accepté pour publication dans la revue *Blood* le 14 octobre 2004.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Caroline Lemieux inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *Activités Proinflammatoires des Angiopoïétines*.

Ricardo Maliba

le 1er novembre 04

Dr Judith Favier

00 - 2004

Jean-François Théorêt

1-NOV-2004

Dr Yahye Merhi

NOV. 2004

Dr Martin G. Sirois

-NOV. 2004

1.0	INTRODUCTION.....	3
1.1	L'angiogenèse : présentation générale	4
1.1.1	Définition.....	4
1.1.2	Angiogenèse physiologique chez l'adulte.....	5
1.1.2.1	Exercice physique	5
1.1.2.2	Cycle de reproduction chez la femme	6
1.1.2.3	Cicatrisation	7
1.2	Régulateurs de l'angiogenèse.....	7
1.2.1	Le VEGF	7
1.2.1.1	Régulation de l'expression du VEGF-A ₁₆₅	8
1.2.1.2	Activités biologiques du VEGF-A ₁₆₅	8
1.2.1.3	Récepteurs du VEGF-A ₁₆₅	9
1.2.2	Les angiopoïétines.....	13
1.2.2.1	Rôle général des angiopoïétines et des récepteurs Tie dans l'angiogenèse.....	17
1.2.2.2	Régulation de l'expression des angiopoïétines	22
1.2.2.3	Activités signalitiques et biologiques des angiopoïétines	24
1.2.2.4	Implication des angiopoïétines dans l'angiogenèse pathologique	30
1.3	La réponse inflammatoire	38
1.3.1	Inflammation et angiogenèse	38
1.3.2	La cascade d'adhésion leucocytaire.....	39
1.3.2.1	Les sélectines	40
1.3.2.2	Les intégrines.....	43
1.3.2.3	La superfamille de molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines	44
1.4	But du travail de recherche	46

2.0	ARTICLE SCIENTIFIQUE	47
2.1	Abstract	49
2.2	Introduction.....	50
2.3	Material & Methods	53
2.4	Results	57
2.5	Discussion.....	64
2.6	Acknowledgements	68
2.7	References.....	69
2.8	Tables	75
2.9	Legends	76
2.10	Figures	79
3.0	DISCUSSION	86
3.1	Potentiel inflammatoire des angiopoïétines.....	87
3.2	Présence du récepteur Tie2 au niveau des neutrophiles	90
3.3	Activation des neutrophiles par les angiopoïétines.....	92
4.0	CONCLUSION.....	94
5.0	BIBLIOGRAPHIE.....	96

1.0 INTRODUCTION

1.1 L'angiogenèse : présentation générale

1.1.1 Définition

Le phénomène d'angiogenèse fut décrit il y a plus d'un siècle, soit en 1886, par von Kölliker ¹. L'angiogenèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle a pour but d'apporter aux tissus en développement l'oxygène et les nutriments nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Les étapes de l'angiogenèse classique, soit l'angiogenèse par bourgeonnement, ont été bien détaillées par le Dr Folkman en 1985 ². Le processus d'initiation s'accompagne d'une vasodilatation et d'une augmentation de la perméabilité endothéliale induites par la formation de fenestrations et d'organelles vesiculo-vacuolaires. Les liens inter-endothéliaux sont relâchés et les cellules endothéliales se libèrent de leur support (détachement des péricytes ou des cellules musculaires lisses et dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire). Ainsi libérées, les cellules endothéliales en prolifération peuvent migrer vers le site de néovascularisation et s'organiser en une structure tubulaire. Une fois assemblées, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et peuvent survivre plusieurs années. Elles se différencient et se spécialisent en fonction du type de leur tissu hôte. Finalement, le néo-vaisseau sera mûré par remodelage (Figure 1).

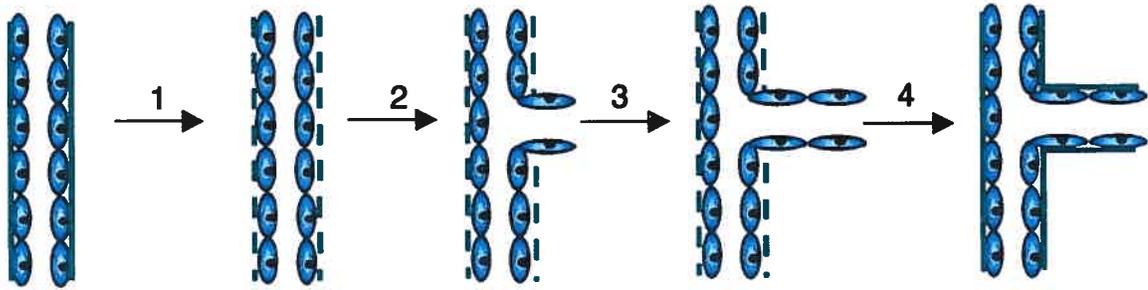


Figure 1 : Les étapes de l'angiogenèse bourgeonnante : la dégradation de la membrane basale (1) permet la migration (2) et la prolifération des cellules endothéliales (3) qui se différencient et s'organisent en une structure tubulaire (4) (adaptée d'après ³).

1.1.2 Angiogenèse physiologique chez l'adulte

L'angiogenèse est une fonction physiologique nécessaire au développement embryonnaire. Cependant, une fois le réseau vasculaire consolidé, il cesse d'évoluer et les processus angiogéniques sont généralement éteints. Chez l'adulte, l'endothélium qui borde la lumière des vaisseaux sanguins est quiescent et l'on estime à 0.01% la proportion de cellules endothéliales de l'organisme qui se divisent. Seules quelques conditions particulières nécessiteront la réactivation des phénomènes permettant une néovascularisation.

1.1.2.1 Exercice physique

Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus malléables de l'organisme. Il est bien connu que lors d'un effort physique prolongé, l'augmentation de la consommation d'oxygène au niveau musculaire provoque une hypoxie locale, compensée par la formation de capillaires qui permettent ainsi de rétablir l'oxygénation adéquate du muscle ⁴.

1.1.2.2 Cycle de reproduction chez la femme

Les organes du système reproductif féminin (ovaire, utérus) forment les seuls tissus adultes présentant une croissance et une régression périodique. Ces événements s'accompagnent de changements équivalents dans le flux sanguin et ces tissus sont donc le siège d'une angiogenèse particulièrement active.

Après l'ovulation et la rupture du follicule primordial, les cellules restantes forment une glande endocrine transitoire, le corps jaune, source de progestérone et d'estradiol. La croissance et la maturation du corps jaune s'accompagnent d'une invasion vasculaire intense, depuis la thèque interne vers la granulosa, permettant ainsi le développement rapide et le maintien de la fonction lutéale pendant la durée de vie du corps jaune. Inversement, à la fin du cycle menstruel, la lutéolyse ou dégénérescence du corps jaune, s'accompagne de la régression de ce réseau vasculaire.

Parallèlement, la muqueuse utérine est également le siège d'une angiogenèse importante durant les phases prolifératives (folliculaire) et sécrétoires (lutéale) du cycle menstruel. Cette néovascularisation de l'endomètre prépare l'implantation de l'embryon et permettra, après formation du placenta, les échanges physiologiques entre le système maternel et le système fœtal. En absence de fécondation, la muqueuse s'amincit et les vaisseaux régressent.

Tout au long de la gestation, le placenta présentera ensuite lui-même une angiogenèse importante du fœtus en développement.

1.1.2.3 Cicatrisation

Une angiogenèse soutenue est également observée à la suite d'une blessure. Le bourgeonnement des anses capillaires à partir du réseau vasculaire sain avoisinant participe activement à la réparation tissulaire. Il permet l'apport de nutriments aux tissus en cours de cicatrisation et contribue à la réparation structurale. Au stade du bourgeon charnu inflammatoire, la formation de tissu conjonctif s'accompagne d'une hypervascularisation qui se poursuit jusqu'à atteindre près de deux fois la densité capillaire normale. La fin du processus de cicatrisation s'accompagne ensuite de la régression de la majorité de ces néovaisseaux. La vascularisation résiduelle est alors équivalente à celle d'un tissu normal.

1.2 Régulateurs de l'angiogenèse

L'ensemble des processus angiogéniques décrits précédemment est soumis à un contrôle moléculaire rigoureux qui conduit, selon les conditions, à l'induction, la stabilisation ou la régression de l'arbre vasculaire. Il est classiquement établi que ces régulations sont le résultat d'une balance dynamique entre agents angiogéniques et agents angiostatiques. C'est le déséquilibre de cette balance, dans un sens ou dans l'autre, qui favorise l'activation ou la répression de l'angiogenèse. Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est considéré comme un facteur de croissance essentiel et prédominant dans la régulation de l'angiogenèse.

1.2.1 Le VEGF

Au cours des années 80, le VEGF (VEGF-A) fut identifié indépendamment comme un facteur de perméabilité vasculaire et un facteur de croissance pour les cellules endothéliales vasculaires^{5,6}. L'analyse du gène codant pour le

VEGF-A permis de déterminer qu'il est composé de 8 exons séparés par 7 introns. L'épissage alternatif du gène donne lieu à 6 différents isoformes de 206, 189, 183, 165, 145 et 121 acides aminés⁷⁻⁹. La famille du VEGF-A comporte aussi différentes protéines apparentées : le *placental growth factor* (isoforme : PIGF-1 et PIGF-2), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et son homologue viral le VEGF-E. Jusqu'à ce jour, le VEGF-A₁₆₅ demeure le membre de la famille le plus caractérisé.

1.2.1.1 Régulation de l'expression du VEGF-A₁₆₅

Le VEGF-A₁₆₅ est principalement régulé par le niveau d'oxygène ambiant. En conditions hypoxiques, et sous l'influence du facteur de transcription *Hypoxia-inducible factor 1* (HIF1), le niveau d'ARNm du VEGF-A₁₆₅, sa synthèse protéique et sa relâche sont augmentés afin de permettre l'induction des processus angiogéniques et éventuellement pallier au manque d'oxygène¹⁰. La régulation de l'expression du VEGF-A₁₆₅ par le niveau d'oxygène peut aussi se faire en collaboration avec certains facteurs de croissance (*epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor* (TGF- α et TGF- β), *fibroblast growth factor* (FGF) et *platelet-derived growth factor* (PDGF)) et certaines cytokines inflammatoires (interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6) exprimés au niveau local^{9,11}.

1.2.1.2 Activités biologiques du VEGF-A₁₆₅

Le VEGF-A₁₆₅ possède un large éventail de fonctions biologiques. Il est la cytokine clé du processus qui influence directement ou indirectement chacune des étapes de l'angiogenèse.

La relâche de VEGF-A₁₆₅ induit une vasodilatation locale via la production de monoxyde d'azote (NO), de prostacycline (PGI₂) et du facteur d'activation

plaquettaire (PAF), ce dernier augmentant aussi la perméabilité des cellules endothéliales ^{12,13}. La relaxation du lit vasculaire permet l'induction de changements morphologiques nécessaires afin de rendre les cellules endothéliales susceptibles aux effets prolifératifs et mitogéniques du VEGF-A₁₆₅ ^{11,14}. Le VEGF-A₁₆₅ induit aussi l'expression de protéases, comme la collagénase et les activateurs du plasminogène (tPA et uPA), qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire ¹⁵. La dégradation de la membrane basale, nécessaire afin que les cellules endothéliales puissent infiltrer de nouvelles régions du tissu hypoxique, se fait par l'action des métalloprotéases (MMP) sécrétées au niveau local par les cellules épithéliales, les fibroblastes et certaines cellules du système immunitaire. Le VEGF-A₁₆₅ participe aussi à cette étape en induisant la relâche de MMP par les cellules endothéliales ¹⁶. Une fois la membrane basale dégradée et sous l'influence du VEGF-A₁₆₅, les cellules endothéliales sont libres de proliférer, de migrer et de s'organiser en une structure tubulaire ^{6,17,18}.

Comme le suggère sa capacité d'augmenter la perméabilité vasculaire, le VEGF-A₁₆₅ est aussi un facteur inflammatoire ^{19,20}. Le VEGF-A₁₆₅ induit la translocation et l'expression endothéliales de plusieurs molécules d'adhérence (P-sélectine, E-sélectine, intercellulaire adhesion molecule (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule (VCAM-1)) ce qui favorise l'adhésion des cellules inflammatoires aux cellules endothéliales (neutrophiles, monocytes) ^{21,22}.

1.2.1.3 Récepteurs du VEGF-A₁₆₅

Le VEGF-A₁₆₅ lie deux différents récepteurs à activité tyrosine kinase, le VEGFR-1 et le VEGFR-2. Les deux récepteurs sont constitués de 7 domaines de type immunoglobuline, d'une seule région transmembranaire et d'une région intracellulaire à activité kinase ^{23,24}. Le VEGFR-3 fait aussi partie de la famille des récepteurs du VEGF, cependant, il ne lie pas le

VEGF-A₁₆₅ et est principalement exprimé dans le système lymphatique²⁵. En plus d'interagir avec le VEGFR-1 et le VEGFR-2, le VEGF-A₁₆₅ peut, dans certaines circonstances, recruter la présence d'une protéine membranaire de 140 kDa, la neuropiline-1 (NRP-1), afin de moduler son activité²⁶.

Le VEGFR-1 fut le premier récepteur identifié du VEGF-A₁₆₅. Il est exprimé au niveau des cellules endothéliales et des monocytes. Le site de liaison du VEGF-A₁₆₅ se situe principalement dans le 2^{ème} domaine immunoglobuline du récepteur²⁷. Tout comme le VEGF-A₁₆₅, son expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1 et donc augmentée en conditions hypoxiques²⁸. Le VEGFR-1, en plus d'interagir avec le VEGF-A₁₆₅, peut lier de façon spécifique le PlGF et le VEGF-B, ces derniers ne pouvant lier le VEGFR-2^{29,30}. Le VEGFR-1 démontre une très faible autophosphorylation suite à une stimulation au VEGF-A₁₆₅ et sa fonction précise dans la réponse de ce dernier demeure un sujet de débat^{31,32}. Il fut d'abord proposé que la fonction du VEGFR-1 soit d'agir en tant que récepteur de clairance, capable de réguler négativement les effets mitogéniques du VEGF-A₁₆₅ en prévenant la liaison de ce dernier au VEGFR-2²⁹. Cette suggestion fut supportée par des études d'inactivation génique du domaine kinase du VEGFR-1 chez l'embryon de souris. Les souris exprimant cette forme mutante du récepteur VEGFR-1, capable de lier le VEGF-A₁₆₅, se développent normalement et ne possèdent aucune défaillance du réseau vasculaire³³. Toutefois, dans certaines circonstances, l'activité kinase du VEGFR-1 est essentielle afin d'induire les effets du VEGF-A₁₆₅. La signalisation du VEGFR-1 est nécessaire à la migration des monocytes et à la relâche endothéliale d'activateurs du plasminogène (tPA et uPA) et de la MMP9 en réponse au VEGF-A₁₆₅^{34,35}. À la lumière de ces études, il peut être proposé que le VEGFR-1 soit un médiateur indirect des effets angiogéniques du VEGF-A₁₆₅.

Même si l'affinité du VEGF-A₁₆₅ est nettement supérieure pour le VEGFR-1 que pour le VEGFR-2 (environ 10 fois supérieure), ce dernier est le médiateur

principal des activités biologiques du VEGF-A₁₆₅. La liaison du VEGF-A₁₆₅ au VEGFR-2 active plusieurs voies intracellulaires. La voie des p42/44 *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) est directement liée à la phosphorylation de facteurs de transcription nucléaires impliqués dans la prolifération cellulaire^{36,37}. Les propriétés chimiotactiques du VEGF-A₁₆₅ envers l'endothélium sont dépendantes de la voie p38 MAPK, une enzyme intracellulaire impliquée au niveau du réarrangement du cytosquelette³⁷. Finalement, l'activation du VEGFR-2 par le VEGF-A₁₆₅ recrute aussi la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) responsable de l'activité de la protéine Akt³⁸. L'activation de cette dernière est garante des effets anti-apoptotiques du VEGF-A₁₆₅. Elle permet aussi de recruter la synthase du NO (eNOS), responsable de la synthèse de NO induite par le VEGF-A₁₆₅^{39,40}.

La NRP-1 fut d'abord identifiée et reconnue pour sa participation dans le développement neuronal. Elle lie les sémaphorines, des molécules possédant une activité chimiorépulsive envers les axones. La NRP-1 est aussi fortement exprimée dans les cellules endothéliales et dans les cellules mésenchymateuses du système vasculaire⁴¹. En tant que corécepteur, elle joue un rôle important dans la modulation des effets induits par le VEGF-A₁₆₅. La liaison du VEGF-A₁₆₅ au VEGFR-2 et à la NRP-1 permet d'augmenter la phosphorylation et l'activation du VEGFR-2 comparativement à une stimulation en absence de NRP-1²⁶. Récemment, notre laboratoire a démontré que la NRP-1 augmente la migration des cellules endothéliales, leur prolifération ainsi que la synthèse de PAF induites par le VEGF-A₁₆₅⁴². Nous avons aussi décelé un effet amplificateur sur la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales induites par le VEGF-A₁₆₅²¹. La NRP-1 permet donc d'amplifier les effets biologiques du VEGF-A₁₆₅ suite à l'activation du VEGFR-2 (Figure 2 et 3).

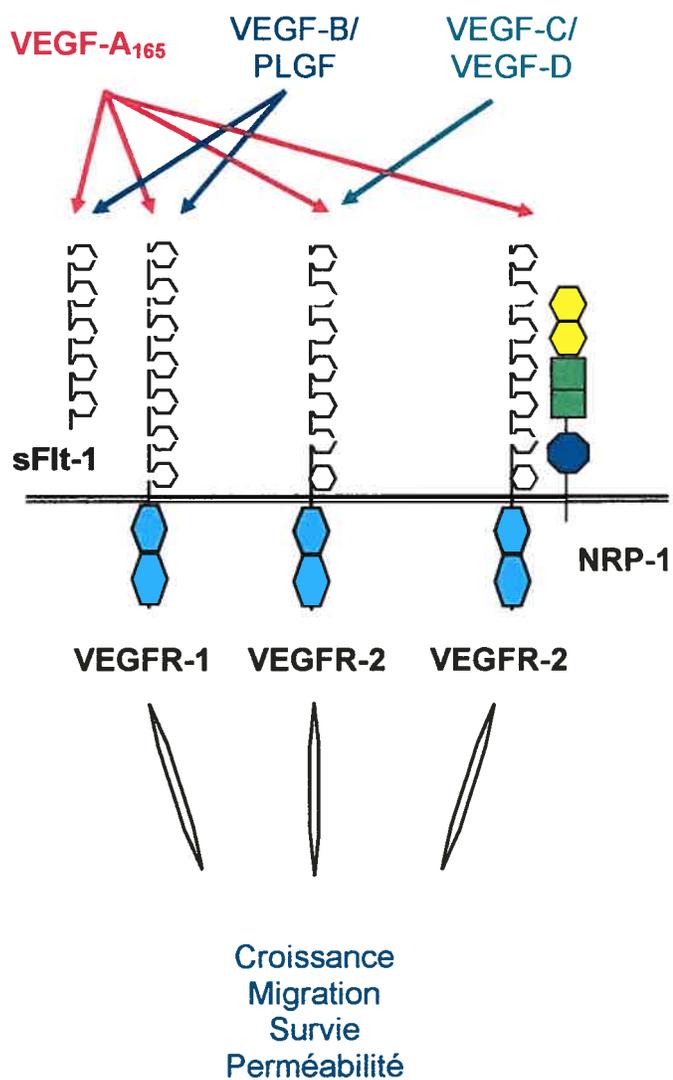


Figure 2 : Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs : le VEGF-A₁₆₅ est le seul membre de la famille à pouvoir interagir avec les trois types de récepteurs soit le VEGFR-1, le VEGFR-2 et la NRP-1. Le VEGF-B ainsi que le PLGF lient le VEGFR-1 alors que le VEGF-C et le VEGF-D interagissent avec le VEGFR-2.

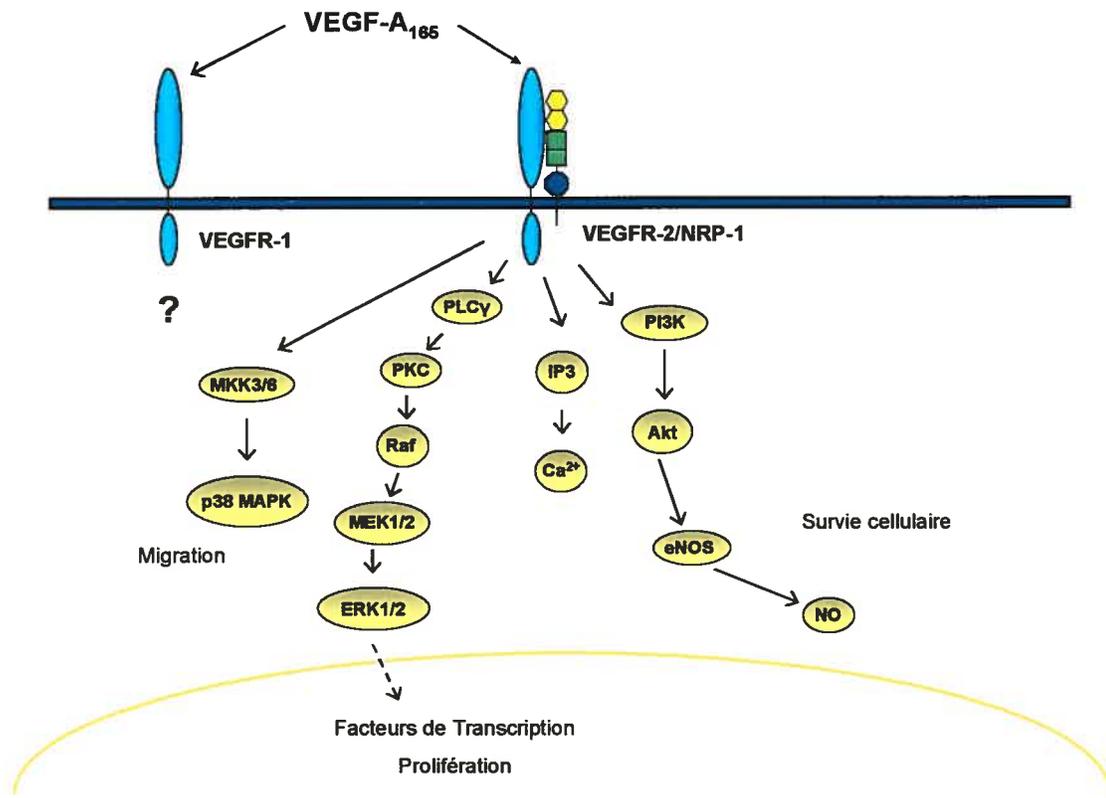


Figure 3 : Représentation schématique des principales voies de signalisation du VEGF-A₁₆₅ : Une stimulation du VEGFR-2 par le VEGF-A₁₆₅ induit l'activation des p42/44 MAPK qui médient son effet mitogénique. La voie PI3 kinase/Akt favorise la survie cellulaire tandis que la voie p38 MAPK participe au potentiel chimiotactique du VEGF-A₁₆₅.

1.2.2 Les angiopoïétines

Les quinze dernières années de recherche dans le domaine de l'angiogenèse ont été riches en découvertes. Plusieurs molécules ont été identifiées (ex : adrénomédulline, erythropoïétine et le facteur de coagulation V) comme participant activement à la régulation de ces processus⁴³⁻⁴⁵. Elles viennent compléter l'action angiogénique du VEGF-A₁₆₅ en induisant ou inhibant l'activation des cellules endothéliales, leur prolifération, leur migration, ou leur organisation en structure tubulaire. D'autres sont impliquées dans la maturation des néovaisseaux (via le recrutement de cellules murales), dans leur remodelage et leur stabilisation. Parmi ces dernières, une nouvelle

famille de facteurs de croissance vasculaire, la famille des angiopoïétines, ainsi que leur récepteur, le récepteur Tie2, a fait l'objet de nombreuses études.

Le récepteur des angiopoïétines fait partie de la famille *tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains* (Tie). Les récepteurs de cette famille sont des récepteurs endothéliaux à activité tyrosine kinase possédant un grand degré d'homologie. C'est au début des années 1990 que leur présence fut remarquée, d'abord au niveau des cellules endothéliales pour le récepteur Tie1^{46,47} et ensuite au niveau du tissu cardiaque pour le récepteur Tie2⁴⁸. La région extracellulaire de ces récepteurs comprend deux boucles immunoglobulines entrecoupées de trois domaines *epidermal growth factor-like* (EGF) et trois séquences fibronectines de type III. La région cytoplasmique de ces récepteurs comprend le domaine kinase et le domaine inter-kinase permettant aux récepteurs de s'activer et d'interagir avec différents effecteurs (Figure 4).

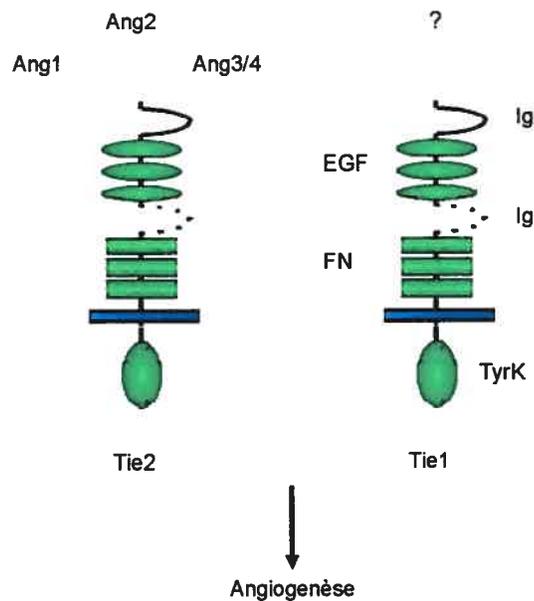


Figure 4 : Les récepteurs endothéliaux Tie1 et Tie2 : La région extracellulaire comprend deux boucles immunoglobulines entrecoupées de trois domaines EGF et trois séquences fibronectines de type III. La région intracellulaire comprend deux domaines kinases interrompus par un insert kinase (adaptée d'après ⁴⁹).

Jusqu'à ce jour, le récepteur Tie1 demeure un récepteur orphelin alors que toute une famille de facteurs de croissance, la famille des angiopoïétines, pouvant lier le récepteur Tie2 a été découverte. La famille des angiopoïétines comprend 4 membres, nommés angiopoïétine-1 à 4 (l'angiopoïétine-3 chez la souris étant l'homologue de l'angiopoïétine-4 chez l'humain), dont les deux premiers ont été particulièrement caractérisés. Les angiopoïétines possèdent un domaine de type fibrinogène qui permet la liaison au récepteur Tie2, un domaine *coiled-coil* nécessaire à la dimérisation des monomères d'angiopoïétines et un domaine N-terminal qui favorise la formation d'oligomères et de structures tridimensionnelles complexes qui, dans le cas de l'angiopoïétine-1, sont essentielles à l'activation du récepteur Tie2 ⁵⁰⁻⁵² (Figure 5).

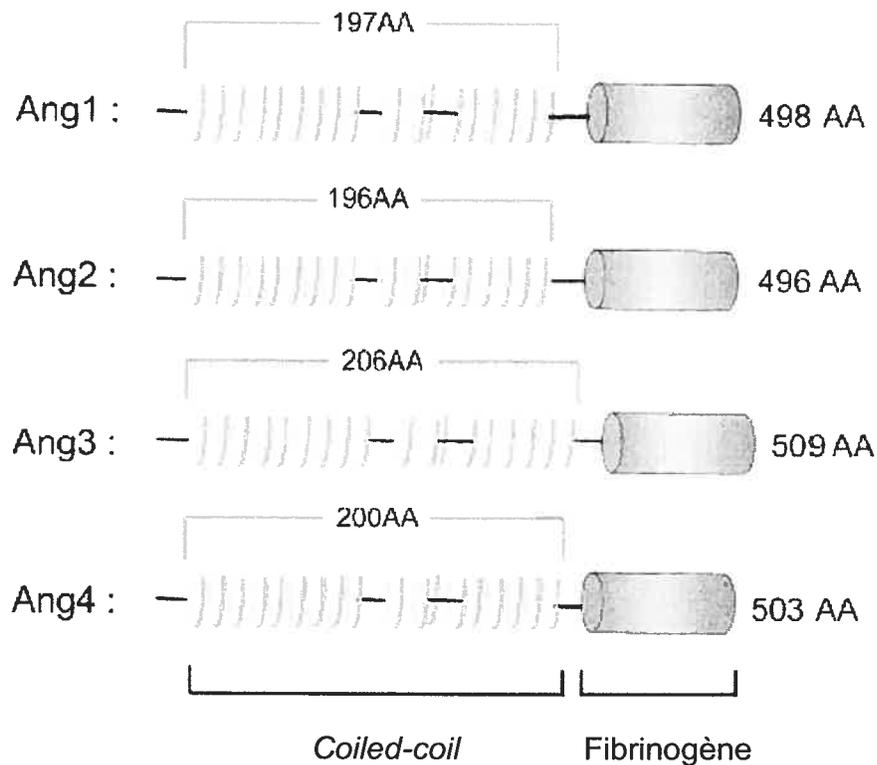


Figure 5 : La famille des angiopoïétines : Les angiopoïétines sont similaires du point de vue structural, elle sont composées d'un domaine *coiled-coil* et d'un domaine fibrinogène (adaptée d'après ⁴⁹).

La caractéristique la plus frappante des angiopoïétines est l'effet opposé qu'elles exercent sur leur récepteur. Bien qu'elles lient le récepteur Tie2 avec la même spécificité et affinité ⁵³⁻⁵⁵, il fut d'abord classiquement admis que l'angiopoïétine-1 et l'angiopoïétine-4 élicitent une activation du récepteur Tie2 alors que l'angiopoïétine-2 et l'angiopoïétine-3 agissent comme des antagonistes de ce dernier ^{52,54}. Cependant, des études récentes ont démontré qu'en fonction des conditions utilisées (concentration, stimulation autocrine ou paracrine, durée de l'exposition et type de cellules endothéliales), l'angiopoïétine-2 peut induire la phosphorylation du récepteur Tie2 ⁵⁶⁻⁶⁰. Des activités agonistes de l'angiopoïétine-3, pour le récepteur Tie2 présent au niveau de cellules endothéliales de souris, ont aussi été récemment décelées ⁵⁵. À nouveau, il semble que le type de cellules endothéliales utilisées soit déterminant car l'angiopoïétine-3 n'élicite peu ou

pas d'effet sur le récepteur Tie2 présent au niveau des cellules endothéliales d'origine humaine. Dans chacun des cas, le domaine fibrinogène semble être le seul responsable de l'activité agoniste ou antagoniste des angiopoïétines sur le récepteur Tie2 ⁵¹.

1.2.2.1 Rôle général des angiopoïétines et des récepteurs Tie dans l'angiogenèse

Les premières évidences du rôle des angiopoïétines et des récepteurs Tie1 et Tie2 dans les phénomènes d'angiogenèse, aussi bien embryonnaire qu'adulte, viennent en grande partie d'études d'inactivation ou de surexpression génique chez la souris.

L'inactivation du gène Tie2 entraîne une létalité embryonnaire au 10^{ième} jour (E10.5). L'analyse du système vasculaire de ces embryons au jour E9.5 démontre que le phénotype léthal résulte d'une malformation cardiaque et d'un réseau vasculaire défaillant qu'il est possible de détecter dans l'ensemble des tissus de l'embryon ^{61,62}. Le bourgeonnement et le remodelage du plexus capillaire primitif des embryons Tie2 ^{-/-} sont défaillants, ce qui entraîne un développement incomplet du cœur (endocarde) et de la tête. Le réseau vasculaire de ces embryons est simplifié, la survie des cellules endothéliales diminuée et le recrutement des cellules péri-endothéliales minimisé. Suite à l'analyse de phénotype, il peut être suggéré que le récepteur Tie2 et la signalisation intracellulaire qu'il élicite sont absolument essentiels au fonctionnement normal des cellules endothéliales et au développement adéquat du réseau vasculaire du cœur. Il est tentant de comparer le phénotype des embryons Tie2 ^{-/-} à ceux des embryons VEGFR-2 ^{-/-}. L'inactivation du gène VEGFR-2 entraîne une létalité embryonnaire plus tôt que celle du gène Tie2 (entre le jour E8.5 et E9.5), peu de temps après la nécessité absolue du fonctionnement initial du système cardiovasculaire. Les embryons VEGFR-2 ^{-/-} sont caractérisés par une absence complète de

formation d'îlots sanguins et de plexus capillaires primitifs, illustrant le rôle crucial de la signalisation du VEGFR-2 au stade précoce du développement vasculaire ⁶³.

Chez l'adulte, le récepteur Tie2 est exprimé dans l'endothélium quiescent de l'ensemble des tissus. Plusieurs histoires familiales de malformations veineuses sont conséquentes d'une mutation du domaine kinase du récepteur Tie2 ^{64,65}. Cette mutation active de façon constitutive le récepteur Tie2 et empêche une régulation normale de sa signalisation. Le système veineux des personnes souffrant de cette malformation se caractérise par une paroi amincie des vaisseaux, une dilatation anormale et, dans certaines régions, une diminution du recrutement de cellules péri-endothéliales.

Tout comme le récepteur Tie2, le récepteur Tie1 semble essentiel au développement du réseau vasculaire de l'embryon de souris. La perte du gène Tie1 entraîne une létalité embryonnaire entre le jour E13.5 et 18.5 (selon la souche de souris utilisée) ⁶⁶. Les défauts du développement vasculaire semblent apparaître après le jour E13.0. Les embryons Tie1 -/- souffrent d'oedème et présentent plusieurs régions hémorragiques causées par une rupture des microvaisseaux. Cependant, il est intéressant de noter que les vaisseaux majeurs de l'embryon se développent normalement.

La perte du gène de l'angiopoïétine-1 conduit à une létalité embryonnaire au 12^{ième} jour (E12.5) associée à un réseau vasculaire immature. Le phénotype est très proche de celui observé chez les souris Tie-2 -/- ⁶⁷. Le cœur des embryons angiopoïétine-1 -/- est caractérisé par une faible association de l'endocarde avec la matrice sous-jacente. Ces embryons ont un système vasculaire sous-développé, un arbre vasculaire peu complexe et une désorganisation des vaisseaux. Les cellules endothéliales des embryons angiopoïétine-1 -/- sont faiblement associées avec la membrane basale et les cellules péri-endothéliales. L'étude de ce phénotype a permis de présenter

l'angiopoïétine-1 comme un facteur impliqué dans la maturation du système vasculaire, favorisant l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules péri-vasculaires. Encore ici, il est intéressant de comparer le phénotype des embryons angiopoïétine-1 $-/-$ à ceux déficients pour le VEGF- A_{165} . La délétion complète du VEGF- A_{165} est impossible à produire par les méthodes conventionnelles. Toutefois, il peut être supposé que la perte de ce gène entraînerait un phénotype semblable à celui perçu chez les embryons VEGFR-2 $-/-$. La perte d'un seul allèle du VEGF- A_{165} est létale au jour E11.5^{68,69}. Ces embryons présentent une défaillance sévère dans le développement d'îlots sanguins et par conséquent du système vasculaire.

Des expériences de transgénèse où l'angiopoïétine-1, sous contrôle du promoteur de la kératine humaine (K14) a été surexprimée chez la souris, ont aussi été effectuées afin de mieux comprendre le rôle de cette angiopoïétine dans l'angiogenèse^{70,71}. Les animaux K14-angiopoïétine-1 (K14-Ang1) présentent une hypervascularisation cutanée très importante perceptible par une rougeur anormale de la peau. Les vaisseaux du derme sont de plus gros calibre que la normale, faiblement associés aux cellules péri-endothéliales et légèrement plus nombreux. Ces vaisseaux présentent aussi un nombre plus élevé de cellules endothéliales que la normale révélant un rôle potentiel de l'angiopoïétine-1 dans la survie des cellules endothéliales. Suite à l'analyse du phénotype des souris K14-Ang1, il peut être suggéré que l'angiopoïétine-1 joue un rôle important dans le remodelage vasculaire.

Le phénotype des souris K14-VEGF- A_{164} (le VEGF- A_{164} chez la souris est l'homologue du VEGF- A_{165} chez l'humain) s'approche de celui des souris K14-Ang1. Tout comme ces dernières, les souris K14-VEGF- A_{164} semblent normales en apparence et présentent certaines rougeurs au niveau de la peau, des oreilles et du museau. Cependant, l'analyse de ce phénotype révèle un épaissement du derme caractérisé par une densité accrue de capillaires. Le derme contient aussi plusieurs infiltrations leucocytaires⁷¹.

Ce phénotype souligne donc le rôle prédominant du VEGF-A_{164/165} dans l'initiation de la croissance vasculaire.

Les souris doubles transgéniques pour l'angiopoïétine-1 et le VEGF-A₁₆₄ ont à leur tour permis de mieux comparer les effets de chacun de ces facteurs et de mieux comprendre le rôle de l'angiopoïétine-1 dans l'angiogenèse. Les souris K14-Ang1/VEGF-A₁₆₄ présentent une hypervascularisation marquée de la peau. La rougeur est plus importante que celle retrouvée chez les souris K14-Ang1 ou K14-VEGF-A₁₆₄. Les vaisseaux du derme sont plus nombreux et semblent posséder les caractéristiques des deux phénotypes. Certains sont de plus gros calibre alors que d'autres semblent de calibre normal. L'épiderme des souris K14-Ang1/VEGF-A₁₆₄ est d'épaisseur normale et le derme ne contient pas d'infiltration leucocytaire⁷¹. Face à l'analyse de ce phénotype, il peut donc être suggéré que l'angiopoïétine-1 inhibe certaines actions inflammatoires du VEGF-A₁₆₅ et que l'angiopoïétine-1 et le VEGF-A₁₆₅ agissent sur des voies différentes dans le développement vasculaire. Le VEGF-A₁₆₅ induit le bourgeonnement des nouveaux vaisseaux alors que l'angiopoïétine-1 procède au remodelage de ces derniers⁷¹.

L'inactivation du gène de l'angiopoïétine-2 chez la souris entraîne un phénotype complexe. Les nourrissons naissent en apparence normale mais dès qu'ils tentent de s'alimenter, ils développent des ascites chyleuses et souffrent d'œdème. Plusieurs ne survivent pas jusqu'au 14^{ième} jour post-natal (P14). Ces souris présentent un remodelage vasculaire de la rétine inadapté et un système lymphatique défaillant caractérisé par une mauvaise organisation générale des vaisseaux et une lacune au niveau de l'association des cellules endothéliales lymphatiques aux cellules musculaires lisses⁵⁶. Ces résultats illustrent l'implication de l'angiopoïétine-2 dans la phase de remodelage des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Il est intéressant de noter que le phénotype des souris transgéniques pour l'angiopoïétine-2 est comparable à celui des souris angiopoïétine-1-/- . En effet, la surexpression de l'angiopoïétine-2 conduit à une létalité embryonnaire entre le 9^{ième} et 10^{ième} jour (E9.5 et E10.5) consécutive d'un réseau vasculaire discontinu, d'une absence de branchement capillaire dans la tête et d'un endocarde décollé du myocarde. Ce phénotype est donc à l'origine du rôle antagoniste de l'angiopoïétine-2 dans le système angiopoïétine-1/Tie2 ⁵⁴.

Jusqu'à ce jour, aucune étude d'inactivation ou de surexpression génique de l'angiopoïétine-3 et -4 chez la souris n'a été effectuée ce qui limite grandement nos connaissances sur leurs implications possibles dans l'angiogenèse. Néanmoins, la combinaison des informations obtenues par les études effectuées sur l'angiopoïétine-1 et -2 nous permet de dresser un portrait global du rôle de ces angiopoïétines dans les processus angiogéniques. Chez l'adulte, l'angiopoïétine-1 est exprimée dans un large éventail de tissus. Elle agit comme un facteur de maturation et de stabilisation du réseau vasculaire en favorisant le recrutement des cellules péri-endothéliales. L'angiopoïétine-2 est exprimée aux sites actifs de remodelage vasculaire, comme les organes du système reproductif féminin, aussi bien pendant les phases prolifératives que de régressions des vaisseaux. Elle est spécifiquement détectée au site de bourgeonnement, sa présence diminuant avec la maturation du vaisseau. Dans ce contexte, l'angiopoïétine-2 peut être vue comme un facteur de plasticité vasculaire permettant de déstabiliser l'endothélium quiescent. La surexpression de l'angiopoïétine-2 aux sites de remodelage vasculaire chez l'adulte vient contrebalancer l'effet stabilisateur de l'angiopoïétine-1 et permettre l'induction des processus angiogéniques, en présence d'autres facteurs de croissance comme le VEGF, ou la régression vasculaire en leur absence. L'angiopoïétine-1 serait donc un facteur favorisant la stabilité tandis que

l'angiopoïétine-2 serait impliquée dans la plasticité du réseau vasculaire (Figure 6).

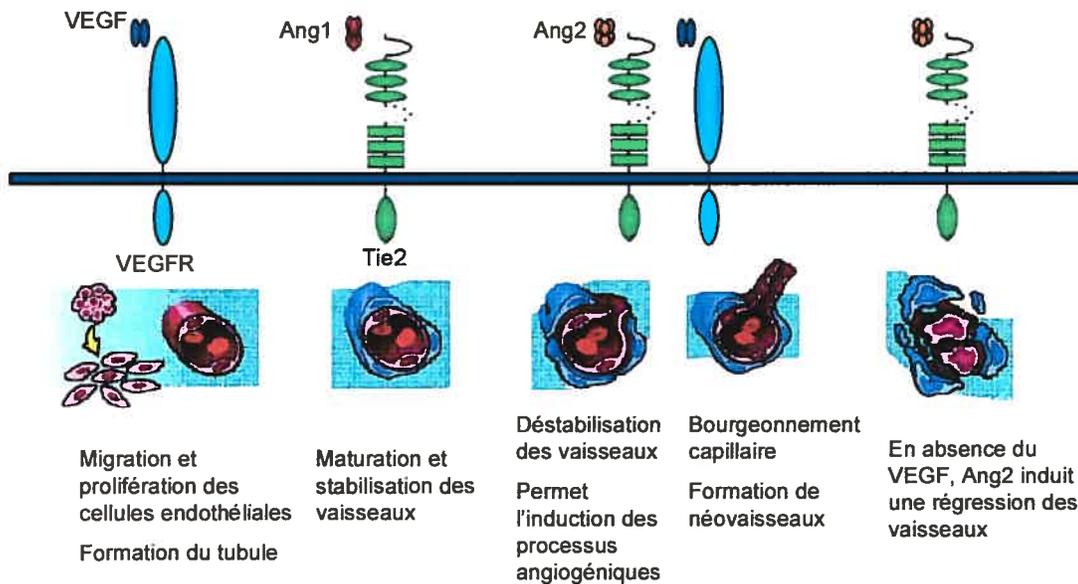


Figure 6 : Rôle des angiopoïétines dans l'angiogenèse : Les fonctions angiogéniques des angiopoïétines se font en collaboration avec d'autres facteurs de croissance. L'angiopoïétine-1 participe à la maturation et à la stabilisation des néovaisseaux tandis que l'angiopoïétine-2 contribue à leur déstabilisation. En présence de VEGF, l'angiopoïétine-2 permet l'induction des processus angiogéniques. En son absence, elle induit une régression des vaisseaux (adaptée de ⁷²).

1.2.2.2 Régulation de l'expression des angiopoïétines

Les mécanismes de régulation génique des angiopoïétines sont peu caractérisés. Les informations disponibles sur l'augmentation ou la diminution de l'expression des angiopoïétines nous viennent surtout d'observation *in vitro* suivant certains traitements spécifiques.

Chez l'adulte, l'angiopoïétine-1 est exprimée dans de nombreux tissus (système nerveux central, intestins, muscles striés, organes génitaux et, en faible quantité, dans le cœur et le foie). L'ARNm de cette protéine est

principalement détecté au niveau des cellules péri-endothéliales (péricytes et cellules musculaires lisses)⁷³. Tout comme le VEGF, son expression semble être modulée par le niveau d'oxygène. En effet, une étude récente démontre qu'en conditions hypoxiques, son niveau d'expression est augmenté dans les cellules péri-endothéliales et demeure inchangé dans les cellules endothéliales⁷⁴. La présence d'*hypoxia-responsive element* au niveau du promoteur de l'angiopoïétine-1 reste toutefois à déterminer. L'augmentation de l'expression de l'angiopoïétine-1 en conditions hypoxiques semble pouvoir se faire en collaboration avec certains facteurs de croissance et cytokines inflammatoires exprimés au niveau local. Cependant, les données disponibles à cet égard sont peu nombreuses et parfois conflictuelles. Le VEGF-A₁₆₅ permet d'augmenter de 2 fois l'expression de l'ARNm de l'angiopoïétine-1 au niveau des péricytes⁷⁴ alors que le TNF- α , selon l'étude et le type cellulaire, peut soit augmenter ou diminuer son niveau d'expression^{75,76}.

Chez l'adulte, l'angiopoïétine-2 n'est que très peu exprimée dans la plupart des tissus. Son expression est augmentée dans les sites actifs de remodelage vasculaire comme les organes du système reproductif féminin (ovaires, utérus et placenta). Contrairement à l'angiopoïétine-1, l'ARNm de l'angiopoïétine-2 est principalement détecté au niveau des cellules endothéliales⁷⁷. Il est modulé à la hausse en conditions hypoxiques aussi bien dans les cellules endothéliales de microvaisseaux que de macrovaisseaux⁷⁸⁻⁸⁰. Il existe un peu plus d'informations sur la modulation de l'expression de l'angiopoïétine-2 par certains facteurs de croissance et certaines cytokines inflammatoires que celles disponibles pour l'angiopoïétine-1. Le VEGF-A₁₆₅, le bFGF et le TNF- α augmentent l'expression de l'angiopoïétine-2 dans les cellules endothéliales de microvaisseaux^{76,78,79}. La leptine (une cytokine sécrétée dans les tissus adipeux) et l'angiotensine II (connue pour être impliquée dans le remodelage des vaisseaux cardiaques suite à un infarctus du myocarde) en font

respectivement de même dans les adipocytes et les cellules endothéliales du tissu cardiaque⁸¹⁻⁸³. Cependant, aucune étude exhaustive des mécanismes impliqués dans ces processus n'a été effectuée ce qui laisse place à tout un volet de recherche.

Contrairement aux angiopoïétines-1 et -2, la localisation *in situ* des angiopoïétine-3 et -4 n'a pas encore été déterminée. De plus, il n'existe que quelques études qui traitent de la modulation de leur expression. L'expression de l'angiopoïétine-4 est augmentée en conditions hypoxiques et suite à un traitement au VEGF-A₁₆₅ ou au *hepatocyte growth factor* (HGF) dans les cellules de glioblastomes et les cellules endothéliales⁸⁴⁻⁸⁶. De même pour l'angiopoïétine-3, il a été démontré qu'en conditions hypoxiques son expression est augmentée au niveau des poumons, du foie, du cerveau et du cœur de rat⁸⁷. La caractérisation des promoteurs des gènes codant pour les angiopoïétines devrait permettre de mieux définir leur mode de régulation.

1.2.2.3 Activités signalitiques et biologiques des angiopoïétines

L'endothélium fut longtemps considéré comme une barrière inerte. Or, il est maintenant bien établi qu'il exerce plusieurs fonctions homéostatiques vitales. L'endothélium contribue au tonus vasomoteur. Il agit également comme barrière sélective en contrôlant la perméabilité et le transport des solutés et des macromolécules, ceci afin de pallier au métabolisme de plusieurs facteurs circulants dans le sang ou générés au niveau local. L'endothélium participe au contrôle de la prolifération des cellules musculaires lisses et est responsable du maintien d'une surface non thrombogénique. Il permet aussi le recrutement de leucocytes aux sites inflammatoires. Plusieurs des fonctions attribuées aux angiopoïétines peuvent contribuer à l'homéostasie de l'endothélium. Certaines ont été bien

définies au niveau moléculaire alors que d'autres n'en sont encore à ce jour qu'au stade d'observation.

L'angiopoïétine-1 agit comme un facteur de survie cellulaire^{88,89}. Son action est principalement médiée par la voie de survie PI3 kinase/Akt^{73,90}. Cependant de récentes études démontrent que l'activation de la voie des p42/44 MAPK par l'angiopoïétine-1 contribue aussi à cette fonction en régulant l'apoptose des cellules endothéliales. Cette voie est directement liée à la phosphorylation de facteurs de transcription nucléaires qui favorisent l'action inhibitrice de l'angiopoïétine-1 sur différentes caspases (caspase-3, -7 et -9)⁹¹. En contribuant à la survie cellulaire, l'angiopoïétine-1 promouvoit la quiescence vasculaire et le faible degré de division des cellules endothéliales.

L'angiopoïétine-1 patronne l'intégrité globale des vaisseaux sanguins. Elle favorise le recrutement des cellules péri-endothéliales, une action dépendante de la voie p38 MAPK⁹². L'angiopoïétine-1 est aussi impliquée dans le maintien de la barrière endothéliale des vaisseaux en favorisant la localisation de la *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) aux jonctions inter-endothéliales^{67,93,94}. Concomitant avec ce rôle, les études de transgénèse décrites ci-dessus ont démontré que l'angiopoïétine-1 est un facteur de résistance à la perméabilité vasculaire. En effet, bien que les deux modèles de souris (K14-Ang1 et K14-VEGF-A₁₆₄) présentent une hypervascularisation marquée de la peau, seules les souris K14-Ang1 sont résistantes à une augmentation de la perméabilité induite par le VEGF-A₁₆₅ ou différents agents inflammatoires⁷¹.

L'angiopoïétine-1 peut aussi supporter l'adhésion des cellules endothéliales⁹⁵. Elle interagit directement avec les intégrines α_v situées à la surface des cellules endothéliales pour permettre leur adhésion et éventuellement, en conditions angiogéniques, leur migration sous l'influence de ses effets

chémotactiques⁹⁶. Comme le suggérait son action sur la perméabilité vasculaire, l'angiopoïétine-1 réduit aussi l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) induite par le VEGF-A₁₆₅ et supprime, à long terme, l'effet inflammatoire du VEGF-A₁₆₅ sur l'adhésion des neutrophiles⁹⁷. L'angiopoïétine-1, tout comme le VEGF-A₁₆₅ est contenue dans les plaquettes. Elle est relâchée suite à une stimulation des plaquettes à la thrombine^{98,99}. Sa sécrétion pourrait donc contribuer à la régulation de la coagulation en participant à l'agrégation des plaquettes.

L'angiopoïétine-2 est aussi un facteur de survie cellulaire. Tout comme l'angiopoïétine-1, elle active la voie de survie de la protéine Akt⁵⁷. Cette action est certainement bénéfique pour les cellules endothéliales en bourgeonnement aux sites de remodelage vasculaire. L'angiopoïétine-2 supporte aussi directement l'adhésion des cellules endothéliales via, entre autre, les intégrine α_v présentes à leur surface⁹⁵ et, par son action sur le récepteur Tie2, permet d'induire leur migration et leur formation en structures tubulaires⁵⁸. Comme le révèle l'analyse du phénotype des souris angiopoïétine-2^{-/-}, l'angiopoïétine-2 joue un rôle important au niveau du système lymphatique. Contre toute attente, il a été démontré que dans ce système, l'angiopoïétine-2 occupe le rôle de l'angiopoïétine-1 et recrute la présence de péricytes⁵⁶.

L'angiopoïétine-2 a récemment été identifiée comme une des molécules contenues dans les corps de Weibel-Palade, de petites organelles cytosoliques présentes au niveau des cellules endothéliales et contenant diverses molécules telles que la P-sélectine, une molécule d'adhésion, le facteur de Von Willebrand, impliqué dans la cascade de coagulation sanguine, l'interleukine-8, une molécule proinflammatoire et l'endothéline, un facteur vasoconstricteur¹⁰⁰⁻¹⁰³. L'angiopoïétine-2 est présente dans une classe d'organelles différentes de celle contenant la P-sélectine ce qui suggère qu'une redistribution sélective des corps de Weibel-Palade vers la membrane cytoplasmique suite à un

stimulus inflammatoire (histamine, thrombine) permet une réponse ciblée de l'endothélium ¹⁰⁴. Il fut également démontré que l'angiopoïétine-2 co-localise avec le facteur de Von Willebrand et que la mobilisation d'une de ces deux molécules, à la surface des cellules endothéliales, entraîne parallèlement la mobilisation de l'autre. Ceci permet donc de croire que ces deux molécules sont fonctionnellement reliées et que la mobilisation de l'angiopoïétine-2, au cours d'une réponse impliquant le facteur de Von Willebrand, occupe une place fonctionnelle dans le maintien de l'homéostasie générale de l'endothélium, une voie de recherche encore à découvrir ¹⁰⁴.

Les activités signalitiques et biologiques des angiopoïétines-3 et -4, et par conséquent leur rôle possible dans l'homéostasie de l'endothélium, n'ont été que très peu étudiées. Par contre, une étude récente démontre que ces deux angiopoïétines agissent comme facteurs de survie cellulaire. L'angiopoïétine-3 étant capable d'activer la voie Akt dans des cellules endothéliales d'origine de souris alors que l'angiopoïétine-4 en fait de même dans des cellules endothéliales d'origine humaine ⁵⁵. Cette étude démontre aussi que ces deux angiopoïétines sont capable d'induire une angiogenèse marquée dans un modèle d'angiogenèse chez la souris (Figure 7).

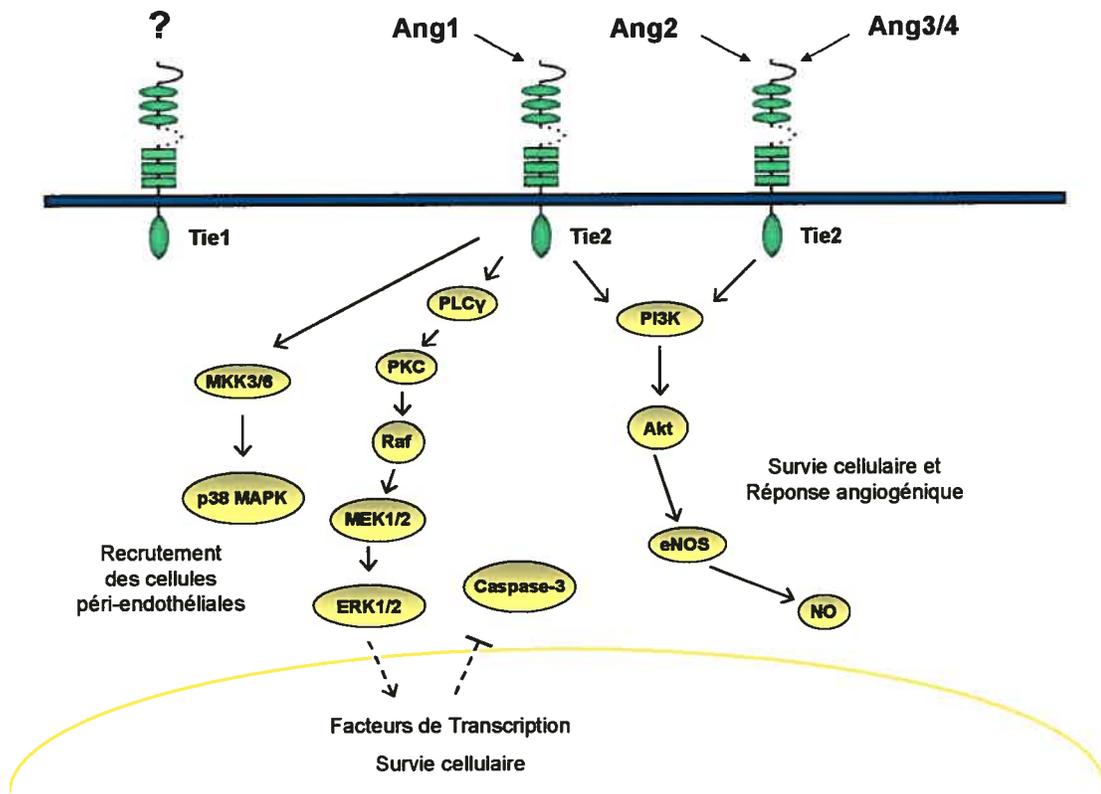


Figure 7 : Représentation schématique des voies de signalisation connues des angiopoïétines : Une stimulation du récepteur Tie2 par chacune des angiopoïétines induit l'activation de la voie PI3 kinase/Akt qui favorise la survie cellulaire et la réponse angiogénique. L'angiopoïétine-1 active également la voie des p42/44 MAPK, aussi impliquée dans la promotion de la survie cellulaire, et la voie de la p38 MAPK qui favorise le recrutement des cellules péri-endothéliales.

Par souci de simplicité et d'originalité, un résumé des fonctions biologiques des angiopoïétines vous est présenté sous la forme d'un tableau dans lequel sont décrites leurs activités dans le maintien de l'homéostasie de l'endothélium (tableau I).

Tableau I. Contributions des angiopoïétines dans la régulation des fonctions homéostasiques de l'endothélium.

Fonctions Homéostasiques	Angiopoïétines	Contributions
Survie des cellules endothéliales	Angiopoïétine-1	Facteur de survie cellulaire ^{88,89} : active la voie de survie Akt ^{73,90}
	Angiopoïétine-2	Facteur de survie cellulaire à forte concentration : active la voie de survie Akt ⁵⁷
	Angiopoïétine-3	Facteur de survie cellulaire : active la voie de survie Akt dans les cellules endothéliales d'origine de souris ⁵⁶
	Angiopoïétine-4	Facteur de survie cellulaire : active la voie de survie Akt dans les cellules endothéliales d'origine humaine ⁵⁵
Stabilisation des jonctions endothéliales	Angiopoïétine-1	Facteur de stabilisation intercellulaire ^{67,93} : favorise la localisation de la PECAM-1 aux jonctions endothéliales ⁹⁴
Perméabilité vasculaire	Angiopoïétine-1	Facteur de résistance à la perméabilité : Diminue la perméabilité associée au VEGF-A ₁₆₅ ⁷¹
Adhésion cellulaire aux composantes de la membrane basale	Angiopoïétine-1	Facteur d'adhésion : supporte la migration cellulaire dépendante de l'intégrine α_v ^{95,96}
	Angiopoïétine-2	Facteur d'adhésion : supporte la migration cellulaire partiellement dépendante de l'intégrine α_v ^{58,95}
Adhésion Leucocytaire	Angiopoïétine-1	Facteur anti-adhésif à long terme et à forte concentration : réduit l'adhésion des leucocytes dans un modèle de rétinopathie ¹⁰⁵
Développement et différenciation des cellules endothéliales	Système Angiopoïétines/Tie2	Système impliqué dans le développement des cellules endothéliales et hématopoïétiques ¹⁰⁶ / souris Tie2-/- ne peuvent entreprendre une vasculogénèse et une hématopoïèse normale ^{63,107}
Régulation de la coagulation	Angiopoïétine-1	Facteur de coagulation : relâchée par les plaquettes en réponse à la thrombine, peut contribuer à l'agrégation des plaquettes par ses actions de stabilisation intercellulaire ^{98,99}

1.2.2.4 Implication des angiopoïétines dans l'angiogenèse pathologique

L'angiogenèse exerce un rôle particulé dans l'évolution de certaines pathologies. Les processus de vascularisation peuvent échapper au contrôle physiologique normal et induire l'apparition ou le développement de la pathologie. Face à cette réalité, plusieurs ont tenté d'identifier l'implication éventuelle des angiopoïétines-1 et -2 dans certains des processus de vascularisation pathologique, les angiopoïétines-3 et -4 n'ont cependant fait l'objet d'aucune investigation.

Rétinopathie

La rétinopathie est une complication majeure chez l'adulte diabétique. Dans sa forme la plus sévère, on observe une éclosion de nouveaux vaisseaux. La perte de la vision provient de cette prolifération vasculaire, responsable d'hémorragies entre la rétine et l'humeur vitrée. La rétraction secondaire du tissu fibreux péri-vasculaire provoque une traction sur la rétine conduisant à son décollement et à la cécité partielle ou totale. Il semble que même si l'angiopoïétine-1 est capable de moduler les processus de néovascularisation, elle exerce un rôle protecteur dans cette pathologie. Lors du développement de la rétinopathie, une augmentation marquée du recrutement leucocytaire à l'endothélium vasculaire de la rétine se produit suite à une augmentation de l'expression de l'ICAM-1. Or, il a été démontré qu'une injection locale d'angiopoïétine-1 permet de réduire l'adhésion leucocytaire et l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui s'en suit^{105,108}. À l'opposé du rôle protecteur de l'angiopoïétine-1, l'augmentation de l'expression de l'angiopoïétine-2 semble plutôt dévastateur puisqu'elle favorise les processus de néovascularisation. L'angiopoïétine-2 est responsable de la dissociation des cellules endothéliales des péricytes au niveau des capillaires de la rétine¹⁰⁹, elle induit une augmentation de l'expression de la MMP9 qui participe à la dégradation de la membrane

basale ¹¹⁰, elle favorise directement l'organisation des cellules endothéliales en une structure tubulaire ¹¹¹ et augmente la sensibilité de ces dernières au VEGF-A₁₆₅ ¹¹².

Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie chronique auto-immune qui touche les articulations mobiles. Cette maladie inflammatoire est caractérisée par une invasion leucocytaire dans la cavité articulaire via l'endothélium vasculaire. L'inflammation induit une néoangiogenèse dans le tissu synovial, favorisant ainsi l'extravasation de leucocytes inflammatoires et donc la progression de la maladie. Cette néovascularisation intensive participe ainsi à la destruction du cartilage et semble corrélée au tableau clinique, au niveau de l'inflammation, et à l'hyperplasie synoviale. L'augmentation de l'expression de l'angiopoïétine-1 semble être reliée avec la progression de la pathologie. Elle participe à l'hyperplasie synoviale en agissant comme agent chimiotactique pour les synoviocytes de type fibroblaste ¹¹³. L'angiopoïétine-1 induit aussi la migration des cellules endothéliales aux sites inflammatoires et stabilise les néovaisseaux au stade avancé de la pathologie ^{75,114}. L'action de l'angiopoïétine-2 est aussi délétère. L'augmentation de son expression dans le tissu synovial des patients se perçoit davantage au stade précoce de la pathologie ¹¹³. Son action favorise un état de plasticité vasculaire et donc influence la progression de la néovascularisation et de la maladie ^{114,115}.

Psoriasis

Le psoriasis est une dermatose chronique qui atteint 3% de la population mondiale et se définit par des plaques érythémato-squameuses bien limitées. Cette affection inflammatoire courante de la peau est caractérisée par la croissance excessive des kératinocytes de l'épiderme, l'accumulation de cellules inflammatoires et la dilatation précoce des capillaires. Les lésions psoriasiques plus évoluées sont marquées par une prolifération de vaisseaux

sanguins et l'élaboration de néovaisseaux. Alors que l'augmentation de l'expression de l'angiopoïétine-1 dans les cellules stromales du derme papillaire favorise la prolifération du réseau vasculaire, il semble que ce soit l'augmentation de l'expression de l'angiopoïétine-2 dans les cellules du derme papillaire qui joue un rôle prépondérant dans la progression de cette pathologie. L'angiopoïétine-2 est responsable de l'état de plasticité vasculaire que l'on retrouve chez les patients souffrant de psoriasis et le succès du traitement de cette pathologie dépend grandement d'une réduction de son niveau d'expression ¹¹⁶.

Croissance tumorale

L'importance de l'angiogenèse dans la croissance tumorale a été proposée il y a plus de trente ans par le Dr Folkman ¹¹⁷. Il est aujourd'hui bien établi qu'une tumeur ne peut croître au-delà d'un volume limité de quelques millimètres de diamètre si elle ne peut induire sa propre vascularisation. Bien que les cellules tumorales aient une capacité proliférative extrême, un défaut en oxygénation et en apport de nutriments conduit à un fort taux apoptotique de ces cellules. La tumeur demeure donc dormante, maintenue dans une balance entre prolifération et régression. Seule l'induction de sa propre irrigation sanguine permettra son expansion. De plus, l'angiogenèse permet aux cellules tumorales malignes de se disséminer à travers les systèmes vasculaires et lymphatiques, un processus essentiel à la dispersion métastatique des néoplasmes invasifs. En produisant un excès de molécules angiogéniques, une tumeur est donc capable d'activer l'endothélium quiescent des vaisseaux adjacents selon le phénomène qualifié de « switch angiogénique » ¹¹⁸. Il se produit alors l'induction des processus angiogéniques. Du fait de sa croissance permanente, la vascularisation d'une tumeur ne se stabilise jamais et demeure dans un état dynamique avec des variations d'architectures fréquentes. L'angiopoïétine-1, l'angiopoïétine-2 ainsi que le récepteur Tie2 participent activement à l'angiogenèse tumorale. Leur implication est complexe et semble dépendre du type tumoral. À titre

d'exemple, le niveau d'expression des angiopoïétines-1 et -2 est très variable d'une tumeur à l'autre et peut être modulé à la hausse ou à la baisse ¹¹⁹. Dans certaines tumeurs, l'angiopoïétine-1 favorise l'expansion de la masse tumorale en induisant une vascularisation marquée de cette dernière alors que dans certains cas elle incite à la régression en stabilisant le réseau vasculaire tumoral ¹²⁰⁻¹²². De son côté, l'angiopoïétine-2 peut aussi influencer, dans un sens ou dans l'autre, la balance entre la prolifération et la régression tumorale. Elle favorise l'état de plasticité et le bourgeonnement vasculaire en présence de VEGF-A₁₆₅ alors qu'en son absence, elle peut permettre la régression de la masse vasculaire ^{77,123}. Une revue récente sur le rôle des angiopoïétines dans la croissance tumorale indique que le ratio d'expression des angiopoïétines-1 et-2 est très important; une balance en faveur de l'angiopoïétine-2 semble corrélée davantage avec l'angiogenèse tumorale que l'inverse ¹²⁴. L'analyse de ces données suggère que l'angiopoïétine-2 soit grandement impliquée dans le phénomène de « switch angiogénique » et qu'elle est donc une cible privilégiée pour la recherche de nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses.

Encore ici, par soucis de synthèse, l'implication des angiopoïétines dans chacune des différentes conditions pathologiques décrites ci-haut, ainsi que dans certaines autres vous est présentée sous la forme d'un tableau (tableau II).

Tableau II. Implications des angiopoïétines dans certaines pathologies.

Pathologies	Caractéristiques	Angiopoïétines	Implications
Histoire familiale de malformation veineuse	Vaisseaux sanguins aberrants / Peu de cellule musculaire lisse	Système angiopoïétines/Tie2	Mutation activatrice du domaine kinase du récepteur Tie2 ^{64,65}
Rétinopathie diabétique	Perte de vision associée à une prolifération vasculaire / Hémorragies entre la rétine et le vitré / décollement de la rétine / Cécité	Angiopoïétine-1	Son expression demeure constante / Elle promeut l'organisation en structure tubulaire des cellules endothéliales ¹¹¹ / Sa livraison intraoculaire réduit l'expression de la ICAM-1 et l'adhésion leucocytaire dans un modèle de rétinopathie chez le rat diabétique ¹⁰⁵ / Sa livraison intraoculaire supprime le phénomène de néovascularisation chez un modèle de souris ¹⁰⁸
		Angiopoïétine-2	Son expression est augmentée / Elle augmente la sensibilité des vaisseaux au VEGF-A ₁₆₅ ¹¹² / Elle est responsable de la perte des péricytes recouvrant les vaisseaux de la rétine ¹⁰⁹ / Elle promeut l'organisation en structure tubulaire des cellules endothéliales ¹¹¹ / Elle est responsable d'une augmentation de l'expression de la MMP-9 ¹¹⁰
Hypertension pulmonaire	Architecture de la paroi vasculaire altérée / Composition musculaire excessive des artérioles et capillaires pulmonaires	Angiopoïétine-1	Son expression est augmentée dans les cellules musculaires des petites artérioles / Elle est un marqueur de la sévérité de la condition / Elle induit l'augmentation de la sécrétion de sérotonine (agent mitogénique des cellules musculaires lisses) ¹²⁵ / Elle est responsable d'une diminution de l'expression de BMPR1A ¹²⁶
Polyarthrite rhumatoïde	Invasion leucocytaire de la cavité articulaire via l'endothélium	Angiopoïétine-1	Son expression demeure constante au stade précoce de la pathologie / Elle agit comme un agent chémostatique pour les synoviocytes de type fibroblaste ¹¹³ / Son expression est augmentée dans le tissu synovial des patients au stade avancé

	<p>vasculaire / Néovascularisation dans le tissu synovial /Destruction du cartilage</p>		<p>de la pathologie / Elle agit comme un facteur de stabilisation des néovaisseaux ^{75,114}</p>
	<p>Plaques érythémato- squameuses / Croissance excessive des kératinocytes de l'épiderme / Accumulation de cellules inflammatoires / Dilatation précoce des capillaires / prolifération vasculaire / Élaboration de néovaisseaux</p>	<p>Angiopoïétine-2</p>	<p>Son expression est augmentée dans le tissu synovial des patients au stade précoce de la pathologie / Elle agit comme un agent chémoattractif pour les synoviocytes de type fibroblaste ¹¹³ / Elle favorise un état angiogénique ^{114,115}</p>
<p>Psoriasis</p>		<p>Angiopoïétine-1</p>	<p>Son expression est augmentée dans les cellules stromales du derme papillaire / Elle favorise la prolifération vasculaire et le recrutement des cellules péri-endothéliales ¹¹⁶</p>
		<p>Angiopoïétine-2</p>	<p>Son expression est augmentée dans les cellules endothéliales du derme papillaire / Elle favorise la prolifération vasculaire / Le succès du traitement du psoriasis est associé à une réduction dramatique de son niveau d'expression ¹¹⁶</p>

<p>Croissance tumorale</p>	<p>Dépendante de sa propre vascularisation / Vascularisation désorganisée constituée d'un endothélium discontinu sans recouvrement péricytaire et hyper- perméable / Irrigation de mauvaise qualité / Vascularisation spécifique à chaque type tumoral</p>	<p>Angiopoïétine-1</p>	<p>La régulation de son niveau d'expression est complexe et dépendante du type tumoral (absente, constante, augmentée ou diminuée)¹¹⁹ / Elle joue un rôle paradoxal dépendant du type tumoral : elle favorise l'induction de la vascularisation tumorale^{120,121} ou permet la régression de la masse tumorale par son action stabilisatrice des vaisseaux¹²²</p>
<p>Insuffisance cardiaque congestive</p>	<p>Incapacité du cœur à assurer son travail de pompe / Diminution de la vascularisation sanguine (en aval du cœur) / Encombrement du sang dans le système de retour veineux (en amont du cœur)</p>	<p>Angiopoïétine-2</p>	<p>La régulation de son niveau d'expression est complexe et dépendante du type tumoral (absente, normale, augmentée ou diminuée)¹¹⁹ / Elle joue un rôle paradoxal dépendant de l'environnement tumoral : elle favorise la plasticité et le bourgeonnement vasculaire en présence de VEGF-A₁₆₅ ou la régression vasculaire en absence de VEGF-A₁₆₅^{77,123}</p> <p>Son expression plasmatique est augmentée chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque^{127,128} / Sa fonction précise dans l'insuffisance cardiaque reste à déterminer</p>

Athérosclérose	<p>Formation de plaque d'athérome sur la paroi interne des artères / Néovascularisation contribue au développement des lésions athérosclérotiques</p>	<p>Angiopoïétine-1</p> <p>Angiopoïétine-2</p> <p>Récepteur Tie2</p>	<p>Son expression demeure constante tout au long de la progression de la lésion / En présence de VEGF-A₁₆₅, elle garantit une néoangiogenèse stable qui promeut la croissance de la lésion ¹²⁹</p> <p>Son expression augmente tout au long de la progression de la lésion / Elle joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire des cellules endothéliales et dans le remodelage vasculaire observé dans les lésions avancées ¹²⁹</p> <p>L'expression plasmatique de sa forme soluble est augmentée chez les patients souffrant d'athérosclérose / Il est un marqueur potentiel de l'état de néovascularisation des lésions ¹³⁰</p>
-----------------------	--	---	--

1.3 La réponse inflammatoire

1.3.1 Inflammation et angiogenèse

Une des caractéristiques qui ressort du tableau précédant est l'étroite association des angiopoïétines avec plusieurs conditions pathologiques dites inflammatoires. En effet que ce soit la rétinopathie du diabétique, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou encore la croissance tumorale, ces pathologies ont toutes une composante inflammatoire qui peut induire ou favoriser leur apparition ou leur développement. Or, il est bien établi que la réponse inflammatoire et la réponse angiogénique participent mutuellement aux processus de l'une et de l'autre ^{131,132}. Pendant l'induction de la réponse inflammatoire, les nouveaux vaisseaux apportent aux tissus inflammés l'oxygène ainsi que les nutriments essentiels et permettent le transport des cellules inflammatoires au site de remodelage vasculaire. À leur tour, les cellules inflammatoires (monocytes/macrophages, neutrophiles) peuvent sécréter des cytokines, des facteurs de croissance ou des protéases pouvant réguler la réponse angiogénique. À titre d'exemple, plusieurs études ont démontré que les neutrophiles sont une source de VEGF-A₁₆₅ et de métalloprotéases utiles aux processus de vascularisation associés à la cicatrisation ¹³³⁻¹³⁵. À l'inverse, les neutrophiles sont aussi connus pour générer de l'angiostatine, un puissant facteur capable d'engendrer la régression du nid vasculaire ¹³⁶ qui dans un contexte d'infection microbienne, peut aider à ralentir l'infection en diminuant l'apport en nutriments du tissu infecté.

1.3.2 La cascade d'adhésion leucocytaire

Au cours de la réaction inflammatoire, le roulement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales augmente de façon marquée. Cet attachement transitoire des leucocytes à l'endothélium favorise un état d'amorçage (*priming*) qui facilite leur arrêt et leur adhésion ferme à la surface des veinules post-capillaires. L'adhésion ferme est alors suivie de la diapédèse et de la migration des leucocytes dans le tissu extravasculaire vers le foyer inflammatoire ou angiogénique. Le recrutement des leucocytes est soutenu par différentes molécules d'adhésion. Ces dernières sont d'abord impliquées dans les interactions homophiliques (contact leucocyte-leucocyte) et hétérophiliques (contact leucocyte-cellule endothéliale). Elles assurent ensuite le contact entre les cellules inflammatoires et les différentes protéines de la matrice extracellulaire.

Il existe trois familles majeures de molécules d'adhérence impliquées dans la cascade d'adhésion leucocytaire : les sélectines, les intégrines et la super famille des molécules d'adhérence apparentées aux immunoglobulines (superfamille Ig). Chacune d'entre elles participe à une étape bien précise de la cascade d'adhésion des leucocytes. Elles sont soit impliquées dans l'attachement initial, l'adhésion ferme, la diapédèse ou la migration extravasculaire (Figure 8). Il est important de noter que, bien qu'elles soient différentes du point de vue moléculaire, les étapes d'adhésion se chevauchent dans la séquence temporelle de la cascade.

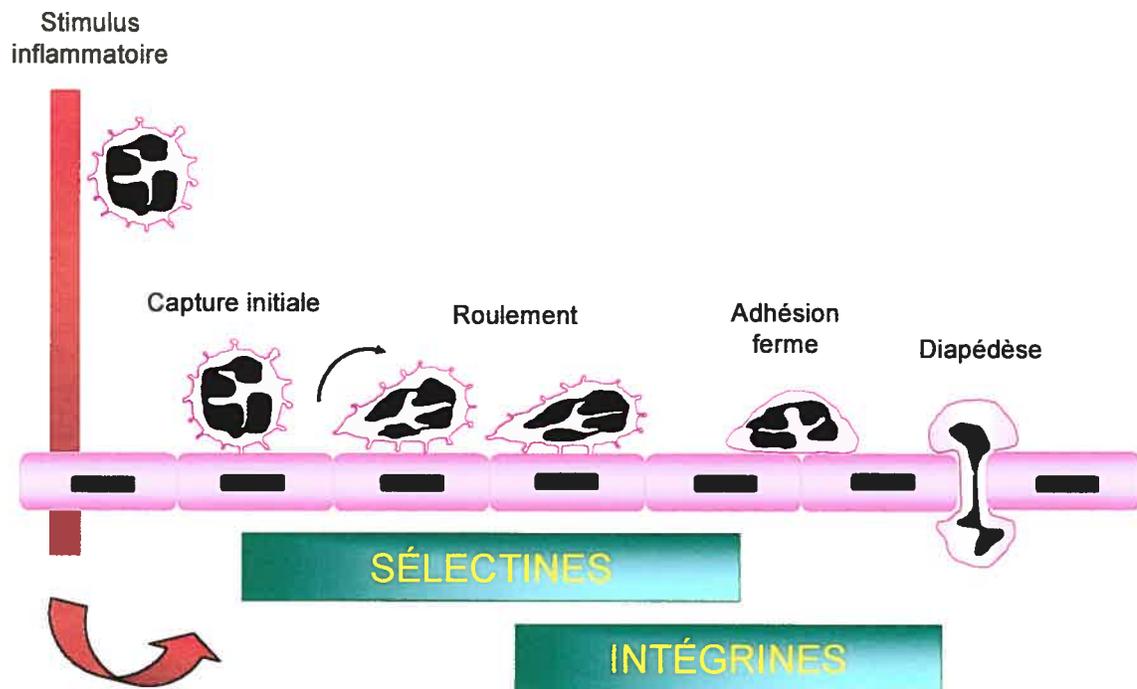


Figure 8 : La cascade d'adhésion leucocytaire : À l'entrée des veinules post-capillaires, les leucocytes sont capturés hors de la circulation sanguine par la P-sélectine et la L-sélectine. Le roulement prend place afin de permettre aux leucocytes de répondre aux différents médiateurs inflammatoires présents. L'activation des leucocytes augmente l'affinité des intégrines envers leur ligand ce qui permet l'adhésion ferme et ensuite la transmigration.

1.3.2.1 Les sélectines

Les sélectines sont impliquées dans la margination leucocytaire, qui consiste en l'attachement initial des leucocytes à l'endothélium vasculaire. Concrètement, cette étape se perçoit par une augmentation du roulement des leucocytes sur la paroi endothéliale, un phénomène préparatoire et nécessaire à une future adhésion ferme. La famille des sélectines compte trois membres, la L-sélectine exprimée de façon constitutive à la surface des leucocytes, la E-sélectine exprimée de façon inductible au niveau des cellules endothéliales activées et la P-sélectine emmagasinée de façon constitutive dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade au

niveau des cellules endothéliales. La P-sélectine est larguée à la surface des membranes de cellules activées.

Les sélectines sont des glycoprotéines transmembranaires de type 1. Leur domaine extracellulaire comprend un domaine lectine, un domaine *epidermal growth factor-like* (EGF) et un domaine *short consensus repeats* (SCR). Les deux premiers domaines sont impliqués dans la reconnaissance du ligand. Le domaine lectine est le principal responsable de la liaison du ligand alors que le domaine EGF stabilise la conformation du domaine lectine. Le rôle du domaine SCR serait essentiellement de stabiliser et d'éloigner la partie fonctionnelle des sélectines de la surface membranaire afin de faciliter le phénomène d'adhésion. Le nombre de motifs SCR varie d'un membre à l'autre, la L-sélectine en possède 2, la E-sélectine 6 et la P-sélectine 9. Les sélectines possèdent un seul passage transmembranaire et une courte extrémité C-terminale cytoplasmique ^{137,138}.

La L-sélectine est exprimée de façon constitutive à la surface des leucocytes. Elle se retrouve en grande partie dans les microvilli, structures riches en actine et autres éléments du cytosquelette ¹³⁹. La L-sélectine participe activement au roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium. Elle ralentit de façon importante la vitesse de roulement engendrée par la P-sélectine pour permettre aux leucocytes d'être activés par différents médiateurs endothéliaux (IL-8, PAF) ¹⁴⁰. Certaines études suggèrent que la signalisation intracellulaire engendrée par la liaison de la L-sélectine à son ligand, exprimé à la surface des cellules endothéliales, augmente l'adhésion induite par les $\beta 2$ intégrines ¹⁴¹⁻¹⁴³. Lorsque les leucocytes sont activés, la partie extracellulaire de la L-sélectine est clivée par une métalloprotéinase ^{144,145}. De ce fait, la L-sélectine est surtout reconnue pour être un marqueur de l'activation des leucocytes.

En condition de quiescence vasculaire, la P-sélectine n'est pas exprimée à la surface des cellules endothéliales. Elle est emmagasinée dans les corps de Weibel-Palade, de petites organelles contenues dans le cytosol des cellules endothéliales ¹⁰⁰. Une redistribution sélective de ces organelles vers la membrane cytoplasmique suite à un stimulus permet une réponse ciblée de l'endothélium. La translocation de la P-sélectine est rapide et transitoire et atteint un maximum dans les 10 premières minutes de stimulation. La P-sélectine est par la suite clivée ou réinternalisée par endocytose ^{101,146}. La P-sélectine lie le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) présent au niveau des microvilli des leucocytes ¹⁴⁷. Cette liaison est critique à la fonction de la P-sélectine car la perte du gène du PSGL-1 chez la souris empêche le roulement des leucocytes normalement soutenu par cette sélectine ¹⁴⁸. L'engagement du PSGL-1 est associé à plusieurs activités signalétiques au niveau des leucocytes; il augmente la phosphorylation en tyrosine, active les différentes kinases mitogéniques (p42/44 MAPK) et stimule la sécrétion d'IL-8 ¹⁴⁹. Une fois le leucocyte activé, le PSGL-1 est alors redistribué au niveau des uropodes leucocytaires.

La E-sélectine est exprimée à la surface des cellules endothéliales activées seulement. La régulation de son expression se fait par l'induction d'une augmentation de sa transcription par différents médiateurs proinflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β et les lipopolysaccharides bactériens (LPS) ^{150,151}. De façon générale, le niveau d'expression maximal est atteint 4 à 6 heures post-stimulation. Tout comme ses confrères, la E-sélectine permet le roulement des leucocytes à l'endothélium. Toutefois, elle est davantage impliquée dans la transition entre l'attachement lâche des leucocytes et leur attachement ferme ¹⁵².

1.3.2.2 Les intégrines

Les étapes suivant le roulement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales sont capitales à l'accumulation des leucocytes au foyer inflammatoire. Elles impliquent l'adhésion ferme des leucocytes, leur diapédèse entre les jonctions inter-endothéliales et leur migration dans le tissu. Toutes ces étapes sont dépendantes des intégrines présentes à la surface des leucocytes.

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires de type-1 composées d'une chaîne α et d'une chaîne β associées entre elles par une liaison non covalente. De façon générale, une sous unité α ne peut lier qu'un seul type de sous unité β . Les intégrines sont donc nommées et classifiées selon la sous-famille de sous unité β qu'elles portent. Jusqu'à présent 8 chaînes β , 19 chaînes α et 25 hétérodimères distincts ont été identifiés ¹⁵³. Le site de liaison du ligand est situé dans la tête globulaire formée par les sous unités α et β . (^{154,155}, pour revue).

Les $\beta 2$ intégrines ($\alpha L\beta 2$, $\alpha M\beta 2$) jouent un rôle très important dans l'adhésion ferme des leucocytes à la surface des cellules endothéliales. Lorsqu'activées, elles lient de façon spécifique certains membres de la superfamille Ig présents à la surface des cellules endothéliales et certaines protéines de la matrice extracellulaire. Plusieurs médiateurs lipidiques (PAF, LTB_4) et agents chimiotactiques (IL-8) sont connus pour activer les intégrines. Ces molécules stimulent leurs récepteurs respectifs (récepteurs couplés aux protéines G) à la surface des leucocytes et induisent une signalisation qui communique avec la queue cytoplasmique des $\beta 2$ intégrines et entraîne leur activation ^{156,157}. L'activation des $\beta 2$ intégrines est associée à un changement de conformation qui augmente leur affinité envers leur ligand ¹⁵⁸. Le changement d'affinité est souvent associé avec un regroupement des $\beta 2$ intégrines à la surface des

leucocytes ce qui permet aussi d'augmenter leur avidité envers leur ligand. En fait, les changements d'affinité et d'avidité ont un effet synergique sur l'augmentation de la liaison des $\beta 2$ intégrines avec leur ligand.

1.3.2.3 La superfamille de molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines

La super famille des molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines (superfamille Ig) est caractérisée par un domaine Ig présent dans la partie extracellulaire. Ce domaine est analogue à ceux constituant les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Certains membres de cette famille (ICAM-1 et ICAM-2), exprimés à la surface des cellules endothéliales, sont les contre récepteurs des intégrines présentes au niveau des leucocytes.

L'ICAM-1 possède 5 domaines immunoglobulines (Ig) ¹⁵⁹. En condition physiologique, elle est faiblement exprimée à la surface des cellules endothéliales ¹⁶⁰. En conditions inflammatoires, sa fonction est principalement régularisée par une augmentation de son expression sous l'action de certaines molécules (IL-1 β , TNF- α , IFN γ et LPS) ¹⁶¹⁻¹⁶³. L'ICAM-2 ne possède que 2 domaines immunoglobulines ¹⁶⁴. Contrairement à l'ICAM-1, elle est exprimée de façon constitutive au niveau de l'endothélium et son niveau d'expression n'est pas affecté par aucune cytokine ¹⁶⁵. L'ICAM-1 et l'ICAM-2 sont toutes deux impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires dont l'adhésion ferme et la migration des leucocytes. La diapédèse implique aussi l'action de la PECAM-1 exprimée au niveau des bordures des cellules endothéliales (¹⁶⁶, pour revue).

Par soucis de synthèse, les interactions entre chacune des molécules d'adhésion, impliquées dans la cascade d'adhésion leucocytaire décrite ci-haut, vous sont présentées sous la forme d'un tableau (tableau III).

Tableau III : Représentation des interactions ligands-récepteurs des différentes molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion de leucocytes.

Les sélectines

Sélectines		Ligand	
Nom	Localisation	Nom	Localisation
P-sélectine	Cellules endothéliales Plaquettes	PSGL-1	Leucocytes
L-sélectine	Leucocytes	GlyCAM MadCAM	Cellules endothéliales Cellules endothéliales
E-sélectine	Cellules endothéliales	L-sélectine PSGL-1 ESL-1	Leucocytes Leucocytes Leucocytes

Les intégrines

Intégrines		Ligand	
Nom	Localisation	Nom	Localisation
$\alpha_L\beta_2$	Leucocytes	ICAM-1 ICAM-2	Cellules endothéliales Monocytes Cellules endothéliales
$\alpha_M\beta_2$	Leucocytes	ICAM-1	Cellules endothéliales Monocytes

La superfamille Ig

Superfamille Ig		Ligand	
Nom	Localisation	Nom	Localisation
ICAM-1	Cellules endothéliales Monocytes	$\alpha_L\beta_2$ $\alpha_M\beta_2$	Leucocytes Leucocytes
ICAM-2	Cellules endothéliales	$\alpha_L\beta_2$	Leucocytes
PECAM-1	Cellules endothéliales Monocytes Plaquettes	PECAM-1	Cellules endothéliales Monocytes Plaquettes
GlyCAM	Cellules endothéliales	L-sélectine	Leucocytes
MAdCAM	Cellules endothéliales	L-sélectine	Leucocytes

1.4 But du travail de recherche

Au cours des dernières années, notre laboratoire a décrit et largement étudié le rôle inflammatoire du VEGF-A₁₆₅ dans les processus angiogéniques. Ainsi, nous avons notamment démontré que le VEGF-A₁₆₅ induit la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales et que la synthèse endogène de PAF par ces dernières est essentielle à ces mécanismes. Ces observations ont fait l'œuvre d'une publication récente dans la revue *Blood* dont je partage le titre de premier auteur avec mon collègue Simon Rollin²¹.

Lorsque nous avons débuté cette étude, de nombreux arguments supportaient l'existence d'une synergie entre le VEGF-A₁₆₅ et les angiopoïétines dans la régulation des processus angiogéniques aussi bien physiologiques que pathologiques. Nous avons donc voulu déterminer si les angiopoïétines pouvaient également jouer un rôle dans la réponse inflammatoire. Mon projet avait donc pour but de vérifier la capacité des angiopoïétines à réguler l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales.

2.0 ARTICLE SCIENTIFIQUE



[REDACTED]
[REDACTED]
cc :
Objet : Blood MS 2004-09-3531.R1 accepted for publication in
Blood

14/10/04 13:46

NOTE TO AUTHOR: This is a long message. If it is truncated (cut off) when you receive it, please log into Blood Manuscript Central at <http://blood.manuscriptcentral.com>, go to your Author Center, find your manuscript under "Submitted Manuscripts," and click on the "View Decision" button. There you will see the entirety of the message below.

Re: MS #2004-09-3531.R1

Title: "Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses"

Dear Dr. Sirois:

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Blood, the Journal of the American Society of Hematology.

Your thorough and well-detailed response to the reviewers' comments was most helpful in facilitating the final decision.

Read this message thoroughly and carefully. Do not skim lightly over any of it as there is useful information here without which your manuscript will not be processed quickly or properly toward printing.

PLEASE CHECK YOUR MANUSCRIPT TO ENABLE EARLY ONLINE POSTING AS FIRST EDITION PAPER.

Blood Journal now "pre-publishes" all accepted papers online in the First Edition section of the journal's web site <http://www.bloodjournal.org/papbyrecent.shtml>. Your manuscript will be posted there in the exact form you provide to us without any copyediting, typesetting, or proofing of pages -- that will occur later for the final printing of the journal.

This puts extra responsibility on your shoulders in terms of checking the submitted manuscript one more time thoroughly for accuracy and completeness -- including the abstract, all figures, tables, and references -- before re-uploading it for First Edition.

Figures and tables should be INSERTED into the document, and particular attention should be paid to the CORRECTNESS OF ALL AUTHOR NAMES: if names are incorrect, Medline searches will not work. Adding the correct institutional affiliations is important as well.

Angiotensin II can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses

Caroline Lemieux^{1,2}, Ricardo Maliba^{1,2,§}, Judith Favier^{1,§},
Jean-François Théorêt¹, Yahye Merhi¹ and Martin G. Sirois^{1,2*}

¹Research Center, Montreal Heart Institute, ²Department of Pharmacology,
Université de Montréal, Montreal (QC), Canada

[§]These authors contributed equally. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-43919) and from the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr. Sirois. Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the CIHR.

Running title: Angiotensin II induce proinflammatory activities

Category: Hemostasis, Thrombosis and Vascular biology

Word count: Including title to discussion: 4778; Abstract: 160

*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, PhD
Research Center
Montreal Heart Institute
5000, Belanger Street
Montreal (QC), Canada, H1T 1C8
Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)
FAX: (514) 376-1355


2.1 Abstract

Angiopoietin-1 (Ang1) and -2 (Ang2) are endothelial growth factors, which bind to the tyrosine kinase receptor Tie2 and contribute to orchestrate blood vessel formation during angiogenesis. Ang1 mediates vessel maturation and integrity by the recruitment of pericytes. In contrast, Ang2 is classically considered as a Tie2 antagonist, counteracting the stabilizing action of Ang1. Inflammation exists in a mutually-dependent association with angiogenesis and we have therefore studied the capacity of angiopoietins to modulate proinflammatory activities namely P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto endothelial cells. We observed that both Ang1 and Ang2 increased these biological activities. Furthermore, combination of Ang1/Ang2 induced an additive effect on neutrophil adhesion but not on P-selectin translocation. In an attempt to clarify this phenomenon, we found that angiopoietins can directly activate neutrophils through Tie2 signaling as well as modulate PAF synthesis and β 2 integrin functional upregulation. Together, our data demonstrate that angiopoietins could promote acute recruitment of leukocytes, which might contribute to facilitate vascular remodeling and angiogenesis.

2.2 Introduction

Angiogenesis is characterized by the formation of new microvessels from preexisting vasculature. This process is tightly regulated by the action of different families of growth factors. Along with the well characterized vascular endothelial growth factor (VEGF) family, the angiopoietins have been shown to be critical in orchestrating blood vessel formation (¹ for review).

Angiopoietin-1 (Ang1) and -2 (Ang2) are structurally related endothelial growth factors. They bind with similar specificity and affinity to the tyrosine kinase receptor Tie2 expressed on EC and hematopoietic cells ²⁻⁴. Studies with knockout mice showed that the Ang1/Tie2 system plays an essential role in embryonic vascular remodeling ^{2,5}. The current model suggests that under physiological conditions, Ang1, through Tie2 signaling, mediates vessel maturation and maintains vessel integrity by the recruitment of periendothelial cells. In contrast, Ang2 is classically considered as a Tie2 antagonist and it is accepted that at sites of vascular remodeling, Ang2 counteracts the stabilizing action of Ang1 by exposing the endothelium to proangiogenic factors such as VEGF. This antagonistic role of Ang2 was first suggested when its overexpression resulted in the impairment of blood vessel formation in transgenic mice, a phenotype similar to the one obtained in Ang1 and Tie2 knockout mice ⁴. However, studies with Ang2 knockout mice suggest that its role would not be restricted to counteracting Ang1 activities. Ang2 may also act as a Tie2 agonist, being involved in postnatal remodeling events ⁶. Recently, this hypothesis was supported by the abilities of Ang2 to activate Tie2, stimulate EC migration, and EC capillary-like tube formation *in vitro* ^{7,8}. Hence, the role of Ang2 is still unclear since it appears to possess both agonist and antagonist functions.

Postnatal angiogenesis is associated with numerous inflammatory conditions such as atherosclerosis, arthritis, retinopathy and tumor growth⁹. Recent investigations provided evidence that inflammation exists in a mutually dependent association with angiogenesis^{10,11}. During inflammatory processes, newly formed vessels supply the inflamed tissues with nutrients and oxygen allowing the transport of inflammatory cells. Among these, neutrophils are the first cells recruited in the angiogenic bed and provide cytokines, growth factors, and proteolytic enzymes, which together, contribute to regulate angiogenesis^{12,13}. The recruitment of neutrophils implies a distinct but overlapping succession of adhesive events implying neutrophil tethering, rolling and firm adhesion to ECs. These processes require the interaction of different adhesion molecules between ECs and neutrophils. Stimulation of ECs with inflammatory mediators including thrombin, histamine and VEGF, can promote a rapid and transient P-selectin translocation at their surface. P-selectin is then able to interact with its high affinity counterreceptor, P-selectin-glycoprotein-ligand-1 (PSGL-1) expressed on neutrophils and promote their rolling and transient adhesion¹⁴⁻¹⁶. Inflammatory mediators may also lead to an equivalent rapid and transient synthesis of platelet-activating factor (PAF) by ECs and/or neutrophils. Newly synthesized PAF can then bind to its receptor expressed on neutrophils, and induce a rapid functional upregulation of the β_2 -integrin complex (CD11/CD18) and favor the binding to its endothelial counterreceptor, intracellular adhesion molecules -1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). This latter interaction increases the adhesion of neutrophils onto activated ECs, which is critical in the initiation of the inflammatory process at injury sites^{14,17,18} (¹⁹ for review).

Many proangiogenic factors have been proposed to play a role in the setting of inflammatory angiogenesis. Our laboratory demonstrated that VEGF-A₁₆₅ inflammatory effects are mediated through the synthesis of PAF by ECs²⁰. We showed that the acute induction of PAF synthesis by VEGF-A₁₆₅ is driven

by the activation of VEGF receptor-2/neuropilin- complex ^{21,22}, and that PAF contributes to the induction of endothelial P-selectin translocation and subsequent neutrophil adhesion onto activated ECs ¹⁶.

Since angiopoietins act in concert with VEGF to modulate vascular plasticity during postnatal neovascularisation ²³, we sought to assess the proinflammatory potential of Ang1 and Ang2 by investigating their capacity to modulate P-selectin translocation and neutrophil recruitment onto endothelial cells.

2.3 Material & Methods

Cell culture

Human umbilical vein ECs (HUVEC) were isolated by collagenase treatment from fresh umbilical cords, seeded on gelatin-coated (0.25%) plates and cultured in EBM-2 medium (Clonetics) containing 10% fetal bovine serum (Hyclone), EGM-2 singlequot (Clonetics) and 2% antibiotics; penicillin and streptomycin (Sigma). HUVEC were used at passage 1 or 2.

Cell surface ELISA

Endothelial P-selectin translocation was measured by cell surface cell surface enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously¹⁶, following stimulation of HUVEC with angiopoietins -1 and -2 (R&D Systems) alone or combined.

Neutrophil purification

Venous blood was obtained from healthy donors, free from medication for at least 10 days prior to the experiments. Neutrophils were isolated using Ficoll-Hypaque gradient, as described previously^{16,24}. Ninety-five percent of the isolated cells were neutrophils as determined by a Coulter counter and Wright-Giemsa staining, and viability was found to be over 98% as assessed by trypan blue dye exclusion assay.

Neutrophil adhesion assay

Neutrophil adhesion onto HUVEC or human extracellular matrix (hECM, BD Bioscience) was measured under static conditions as described previously¹⁶. HUVEC were pretreated or not with 1) recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand immunoglobulin molecule (rPSGL-Ig, kindly provided by Dr A. Kumar, Genetics Institute), 2) blocking goat polyclonal anti-human Tie2 (anti-hTie2) IgG (R&D Systems). In some experiments, neutrophils were

pretreated with either 1) anti-hTie2 IgG, 2) CV-3988 (Biomol Research Laboratories) or 3) blocking mouse monoclonal anti-human CD18 IgG (BD Biosciences). Due to slight variations of basal adhesion between experiments, we then reported our data as relative neutrophil adhesion (%).

RT-PCR analyses

Total RNAs were obtained from freshly isolated human neutrophils (2×10^7) and cultured HUVEC (5×10^6 at passage 2) by using the RNeasy extraction kit (Qiagen). One μg of total RNAs was reverse transcribed using random hexamers and the MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) as described by the manufacturer. The PCR reactions were performed as follows: cDNAs were denatured (94°C for 5 min), submitted to 30 cycles of amplification for Tie2 and 33 cycles for Tie1 (94°C for 1 min, 62°C for 1 min and 72°C for 1 min) and to a final elongation (72°C for 10 min). Primers were used to amplify a 943 bp fragment of Tie2 cDNA (Genbank #BC035514; forward: 5'-GGAAGTGTGGAAGGTGCC-3' and reverse: 5'-GCGATCACACATCTCCCC-3') or a 588 bp of Tie1 cDNA (Genbank #BC038239; forward: 5'-CCTGCGTGTCTGGTGAGGCC-3' and reverse: 5'-GCCATAGGGATCCGGGAGGC-3'). Upon purification on a QIAquick PCR Purification column (Qiagen), the Tie2 PCR products were subcloned into the pCRII vector using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen) and sequenced using m13 reverse and forward primers.

Immunocytochemistry

Freshly isolated human neutrophils (1×10^8) were centrifuged in a 15 ml tube for 10 min at 1700 rpm. The pellet was fixed in 10% formalin for 1h, dehydrated in a graded series of ethanol solutions and xylene, and embedded in paraffin. Six μm thick sections were submitted to immunohistochemistry by using rabbit polyclonal anti-human Tie2 IgG (1:200 dilution; Santa Cruz) as described previously²⁵.

Confocal microscopy

Neutrophils were isolated as described above and led to adhere on glass coverslips precoated with 1% poly-L-Lysine for 1 h, fixed with a 2% paraformaldehyde solution. Non-specific binding of primary antibodies was prevented by preincubating fixed neutrophils with 10% serum from the species used to raise the secondary antibodies. Neutrophils were submitted to confocal microscopy using rabbit polyclonal anti-human Tie2 IgG and Cy3 dye as a fluorochrome. Glass coverslips were mounted using 1,4-diazabicyclo-2-2-2-octane (DABCO)/glycerol (1:1) solution. Neutrophils were observed on a Zeiss Axiovert 100 M microscope adapted with an LSM 510 confocal system. Images were recorded with the LSM 510 software.

Western blot analysis of Tie2

HUVEC stimulated with angiopoietins were lysed with Laemmli buffer. Immunoprecipitation of Tie2 proteins was performed with rabbit polyclonal anti-human Tie2 IgG prior to Western blot analysis. Membranes were probed with mouse monoclonal anti-phosphotyrosine IgG (Clone 4G10; 1:1 000; Upstate Biotechnology) to detect Tie2 phosphorylation. PDGF membranes were subsequently stripped in 0.2 M NaOH and Tie2 protein expression was determined with rabbit polyclonal anti-hTie2 IgG antibodies (1:1 000). Neutrophils (2.5×10^7 /ml) were stimulated with or without angiopoietins. Cells were lysed in 2X Laemmli buffer. One hundred twenty-five (125) μ g of whole cell extract were used for Western blot analysis. Membranes were probed with rabbit polyclonal antiphospho-specific Tie2 IgG (1:1 000) (Oncogene). Membranes were subsequently stripped in NaOH and Tie2 protein expression was determined with rabbit polyclonal anti-hTie2 IgG (1:1 000). Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence, digitized using a 2-dimensional gel scanner, and quantified using Quantity One software (Bio-Rad).

Measurement of PAF synthesis

PAF synthesis was measured by determining the incorporation of ^3H -acetate into lyso-PAF as described previously^{20,26}. Briefly, HUVEC or neutrophils ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were stimulated with angiopoietins or VEGF- A_{165} (PeproTech). Reactions were stopped and synthesized ^3H -PAF was extracted, purified by high-performance liquid chromatography (HPLC), and quantified by β -counting²⁶.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Statistical comparisons were made by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni test for multiple comparisons. Differences were considered significant at P values ≤ 0.05 .

2.4 Results

Ang1 and Ang2 induce endothelial P-selectin translocation and neutrophils adhesion onto endothelial cells

We first assessed the capacity of angiopoietins to modulate the translocation of endothelial P-selectin by ELISA on HUVEC. Treatment of HUVEC with Ang1 induced P-selectin translocation in a concentration- (10^{-12} to 10^{-8} M) and time- (5 to 15 min) dependent manner. Maximal increase was achieved at 10^{-9} M (159% increase as compared to PBS-treated cells) and within 7.5 minutes of stimulation (Figure 1, upper panels). The same conditions were used to characterize P-selectin translocation induced by Ang2. Again, maximal effect was obtained at 10^{-9} M (232% increase) and within 7.5 minutes (Figure 1, lower panels).

Since both angiopoietins were able to promote P-selectin translocation, we then assessed their capacity to induce neutrophil adhesion onto activated ECs. Cell adhesion assays were performed under static conditions and stimulations were also performed in a concentration- and time-dependent manner. Treatment with Ang1 increased neutrophil adhesion up to 343% at 10^{-9} M, and within 7.5 minutes (Figure 2, upper panels). Treatment with Ang2 had similar effect, within 7.5 minutes, and at 10^{-9} M it increased neutrophil adhesion by 368% as compared to PBS-treated cells (Figure 2, lower panels). As positive control, HUVEC were treated with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) for 7.5 min which increased endothelial P-selectin by 220% and neutrophil adhesion onto activated HUVEC by 367% (data not shown).

We then assessed whether the combination of Ang1 and Ang2 would affect those biological activities. We selected the most effective concentrations (10^{-10} and 10^{-9} M) and the optimal time (7.5 min) to determine the effect of Ang1 plus Ang2 (Ang1/Ang2) on P-selectin translocation and neutrophil adhesion. The combination of Ang1/Ang2 either at 10^{-10} or 10^{-9} M did not further

increase P-selectin translocation compared to Ang1 or Ang2 alone (Figure 3A). However, the combination of both angiopoietins elicited an additive effect on neutrophil adhesion at both 10^{-10} and 10^{-9} M (421% and 781% increase, respectively) as compared to Ang1 (10^{-10} M; 194% and 10^{-9} M; 332% increase) or Ang2 alone (10^{-10} M; 203% and 10^{-9} M; 368% increase) (Figure 3B).

We then assessed the contribution of endothelial P-selectin to neutrophil adhesion induced by angiopoietins. HUVEC were pretreated with a P-selectin antagonist, rPSGL-Ig which prevents the interaction of the neutrophil receptor PSGL-1 with its endothelial P-selectin ligand^{16,24}. Pretreatment of HUVEC with increasing concentrations of rPSGL-Ig (0.01 to 1 μ g/ml), 15 minutes prior to the addition of neutrophils and stimulation of HUVEC with either Ang1 or Ang2 alone provided a concentration-dependent and complete inhibition of neutrophil adhesion. Pretreatment with rPSGL-Ig up to 1 μ g/ml reduced by 66% the adhesion of neutrophils mediated by Ang1/Ang2 combination (Figure 3C).

Expression and regulation of Tie2 in HUVEC and neutrophils

Since the combination of Ang1/Ang2 induced an additive effect on neutrophil adhesion without increasing P-selectin translocation, we postulated that neutrophils might be activated by angiopoietins. As the presence of Tie1 and/or Tie2 on neutrophils or any other leukocytes has never been described, we performed a series of experiments to determine their expression on neutrophils. By RT-PCR, we detected the expression of Tie2 but not Tie1 in neutrophils mRNAs, with HUVEC mRNA used as positive control (Figure 4A). The specificity of the PCR reaction was validated by sequencing the Tie2 product amplified in neutrophils. By immunocytochemistry and confocal microscopy, we then confirmed the presence of Tie2 receptor and its localization on neutrophil cytoplasmic membrane (Figure 4B and C). In both experiments, normal rabbit IgG was used as negative control. We also

investigated by Western blot analyses the expression and the activation of Tie2 in HUVEC and neutrophils. HUVEC were treated with PBS solution, Ang1 and Ang2 alone or combined (10^{-9} M; 7.5 min) and Tie2 proteins were immunoprecipitated with anti-hTie2 IgG. Phosphorylation of Tie2 was confirmed by using anti-phosphotyrosine IgG. Treatment of HUVEC with PBS provided marginal phosphorylation of Tie2 as compared to Ang1 and Ang2 alone or combined (10^{-9} M; 7.5 min), which induced a marked increase (131-, 31- and 99-fold respectively) of Tie2 phosphorylation. The equivalent loading was confirmed by reblotting the membranes with anti-Tie2 IgG (Figure 4D).

Upon treatment of neutrophils with angiopoietins alone or combined (10^{-9} M; 7.5 min), cells were lysed and Tie2 proteins were immunoprecipitated as detailed above. However, Tie2 protein levels in neutrophils appear insufficient to be detected by Western blot analysis (Figure 4E). Nevertheless, by using anti-phospho-hTie2 IgG on total proteins, we detected a marked increase of Tie2 phosphorylation in neutrophils mediated by Ang1, Ang2 and Ang1/Ang2 combination (47-, 113- and 166-fold respectively) as compared to PBS-treated neutrophils (Figure 4E).

Direct activation of Tie2 in neutrophils by angiopoietins is necessary to further increase neutrophil adhesion

Since our data suggest that angiopoietins are able to activate Tie2 in neutrophils, we investigated how its activation might contribute to neutrophil recruitment. First, we used a blocking anti-hTie2 IgG selected for its property to prevent angiopoietins/Tie2 interaction²⁷. In each adhesion assay, either HUVEC or neutrophils were pretreated (15 min) with different concentrations of anti-hTie2 (0.05 to 1 μ g/ml) prior to stimulation with angiopoietins. Pretreatment of HUVEC with 1 μ g/ml of anti-hTie2 abrogated the adhesion of neutrophils induced by Ang1, Ang2 and Ang1/Ang2 combination (10^{-9} M; 7.5 min) (Figure 5A-C; left histograms). Pretreatment of neutrophils with increasing concentrations of anti-hTie2 up to 1 μ g/ml prior to their addition to

HUVEC had no inhibitory effect on neutrophil recruitment induced by Ang1 or Ang2 alone (10^{-9} M; 7.5 min) (Figure 5A and B; right histograms) but reduced by 63% their adhesion induced by Ang1/Ang2 (10^{-9} M; 7.5 min) which corresponds to the additive effect produced by the angiopoietins combination (Figure 5C; right histogram). Pretreatments of HUVEC or neutrophils with anti-hTie2 IgG prior to PBS treatment (1 μ g/ml) or with with normal IgG (1 μ g/ml) prior to stimulation with angiopoietins had no effect on neutrophil adhesion (data not shown).

Mechanism of neutrophil activation by angiopoietins

VEGF secretion: Since the combination of Ang1 and Ang2 provides maximal adhesion of neutrophils onto ECs, we wished to establish the contribution of neutrophil activation to this additive effect. Neutrophils, upon their stimulation with various mediators including phorbol-12-myristate (PMA), fMET-Leu-Phe (fMLP) and tumour necrosis factor- α (TNF- α), can rapidly release their intracellular pool of VEGF ²⁸. Recently, our laboratory studied the mechanisms underlying VEGF-A₁₆₅-induction of neutrophil adhesion onto HUVEC ¹⁶. In order to verify the possibility that VEGF secretion following neutrophil activation by Ang1/Ang2 combination might contribute to the increase of neutrophil adhesion, we pretreated HUVEC with a selective inhibitor of VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) (VTK; 10^{-5} M; IC₅₀ = 2×10^{-6} M and 1×10^{-7} M for VEGFR-1 and VEGFR-2 respectively) ²⁹ and with a selective VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 5×10^{-6} M; IC₅₀ = 7×10^{-7} M) ³⁰, these concentrations being selected for their capacity to abrogate VEGF-A₁₆₅-mediated biological activities ¹⁶. Treatment with these inhibitors did not significantly reduce the adhesion of neutrophils induced by the combination of angiopoietins (10^{-9} M; 7.5 min) (data not shown).

PAF synthesis: We recently showed that endothelial PAF synthesis was necessary for VEGF-A₁₆₅-mediated P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto HUVEC ¹⁶. Consequently, we raised the hypothesis that

angiopoietins might also induce PAF synthesis. Treatment of HUVEC with angiopoietins alone or combined (10^{-9} M; 7.5 min) did not provide a significant increase of endothelial PAF synthesis (Table I). Treatment of HUVEC with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M; 7.5 min) was performed as positive control, resulting in a 167% increase in endothelial PAF synthesis. Treatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 alone (10^{-9} M; 7.5 min) enhanced PAF synthesis by 456% and 675% respectively as compared to PBS-treated cells. The combination of Ang1/Ang2 was even more potent and increased the level of PAF synthesis in neutrophils by 1894% (Table II). As negative control, neutrophils, which do not bear VEGF receptors were stimulated with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M; 7.5 min), that failed to mediate PAF synthesis (Table II).

In light of these results, we postulated that newly synthesized PAF in neutrophils might contribute to the additive effect observed in neutrophil adhesion following activation by Ang1/Ang2. Consequently, we pretreated neutrophils with increasing concentrations of a selective PAF receptor antagonist CV-3988 (10^{-8} to 10^{-6} M) ($IC_{50} = 2.5 \times 10^{-7}$ M)^{31,32} 15 minutes prior to their addition to ECs. Such pretreatment did not reduce the adhesion of neutrophils induced by Ang1 or Ang2 alone (10^{-9} M; 7.5 min). However, pretreatment of neutrophils with CV-3988 at 10^{-7} and 10^{-6} M prior to stimulation with the combination of Ang1/Ang2 (10^{-9} M; 7.5 min) reduced by 33.1% and 33.4% respectively the adhesion of neutrophils (Figure 6A). It is worth noting that this 33% reduction represents a 67% reduction of the additive effect on neutrophil adhesion onto HUVEC induced by the combination of angiopoietins.

β_2 integrin implication: PAF induces a rapid functional upregulation of the CD11/CD18 β_2 -integrin complex in neutrophils and favors the binding of this complex to their endothelial counterreceptors, ICAM-1 and ICAM-2, promoting adhesion of neutrophils onto activated ECs¹⁸. Since the combination of angiopoietins induced a marked increase of PAF synthesis in

neutrophils and that a pretreatment with a selective PAF receptor antagonist provided a significant reduction of neutrophil adhesion onto HUVEC mediated by Ang1/Ang2 combination, we thus hypothesized that the additive effect might involve the functional upregulation of the CD11/CD18 β_2 -integrin complex. To assess this hypothesis, neutrophils were pretreated with increasing concentrations of blocking anti-human CD18 IgG (anti-CD18) (1 to 5 $\mu\text{g/ml}$)³³ 15 minutes prior to their addition to HUVEC. Pretreatment of neutrophils with blocking anti-CD18 IgG had no effect on neutrophil adhesion induced by Ang1 or Ang2 alone (10^{-9} M; 7.5 min). However, such pretreatment prevented the additive effect produced by the combination of Ang1/Ang2 (10^{-9} M; 7.5 min) on neutrophil adhesion (Figure 6B). In each case, pretreatment of neutrophils with CV-3988 (10^{-6} M) or blocking anti-CD18 IgG (5 $\mu\text{g/ml}$) did not significantly modulate the basal level of neutrophil adhesion onto ECs. In addition, pretreatment of neutrophils with normal IgG (5 $\mu\text{g/ml}$) did not decrease the adhesion induced by either Ang1, Ang2 or Ang1/Ang2 combination (data not shown).

Ang1/Ang2 combination induces a proadhesive state of neutrophils independently from HUVEC stimulation

To ascertain that the stimulation of neutrophils by Ang1/Ang2 combination was sufficient to induce an adhesive state, we performed an adhesion assay of neutrophils on human extracellular matrix³⁴. Stimulation of neutrophils with Ang1 or Ang2 alone (10^{-9} M; 7.5 min) did not increase their adhesion onto hECM as compared to PBS-treated cells (Figure 7; left histograms). In contrast, treatment of neutrophils with Ang1/Ang2 combination (10^{-9} M) for 7.5 min increased by 173% their adhesion onto hECM (Figure 7; middle histograms). Such adhesion was dependent on Tie2 activation since pretreatment of neutrophils with increasing concentrations of blocking anti-hTie2 IgG (up to 1 $\mu\text{g/ml}$) reduced their adherence by 83% (Figure 7; middle histograms). The implication of β_2 integrin in this adhesion assay was also verified by pretreating neutrophils with increasing concentrations of blocking

anti-CD18 IgG (1 to 5 $\mu\text{g/ml}$). Pretreatment with 2 $\mu\text{g/ml}$ of blocking anti-CD18 IgG was sufficient to abrogate the adhesion of neutrophils onto hECM induced by Ang1/Ang2 combination (10^{-9} M; 7.5 min) (Figure 7; right histograms).

Viability of HUVEC and neutrophils

To ensure that neutrophil adhesion onto ECs or hECM induced by angiopoietins or that the reduction of neutrophil recruitment by inhibitors or antagonists used in these studies were not due to cytotoxicity, the effect of angiopoietins and all inhibitors or antagonists on cell viability was assessed by trypan blue exclusion assay, at the highest concentrations used. In all cases, the reagents and conditions used did not increase cell mortality (data not shown).

2.5 Discussion

In the present study, we demonstrate for the first time, the proinflammatory activities of both angiopoietins to mediate endothelial P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto activated ECs. The combination of Ang1 and Ang2 provides an additive effect on neutrophil adhesion but not on P-selectin translocation. This phenomenon is related to the unexpected expression of Tie2 receptor on the cell surface of neutrophils. Angiopoietins appear to directly activate neutrophils and modulate PAF synthesis. The combination of Ang1 and Ang2, cooperatively with PAF signaling may promote a rapid functional upregulation of the β_2 -integrin complex (CD11/CD18), contributing to increase the adhesion of neutrophils onto activated ECs.

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

Previous studies reported that Ang1 has anti-inflammatory properties, thus contributing to the maturation of neovessels (³⁵ for review). *In vivo*, it prevents VEGF-mediated vascular permeability ^{36,37} and *in vitro*, it reduces the basal activation of vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and β -catenin, concomitantly with a reduction of VEGF-mediated EC permeability ^{38,39}. Sustained treatment of ECs with Ang1 reduces endothelial expression of ICAM-1, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin ⁴⁰, leading to a marked reduction of VEGF-mediated neutrophil adhesion ^{39,40}. On the other hand, Ang2 might display proinflammatory activities, since it negatively controls vascular maturation, stability and quiescence by antagonizing the effects of Ang1. It remains that there are no studies defining the capacity of Ang2 to regulate selective proinflammatory activities.

In this study, we observed that both angiopoietins possess a similar agonistic capacity to mediate an early and transient endothelial P-selectin translocation

as well as neutrophil adhesion onto activated HUVEC. The agonistic function of Ang2 herein described strengthens the current view, which tends to reconsider the purely antagonist role of this growth factor and suggests discrepant actions on its receptor Tie2, depending on the cell types or pathophysiological conditions.

The kinetic of neutrophil adhesion was in line with the level of endothelial P-selectin translocation: in both cases, the peaks were achieved within 7.5 minutes and nearly returned to the baseline levels after 15 minutes. Translocated P-selectin on EC surface is indeed rapidly reinternalized and/or cleaved, and can therefore no longer interact with its neutrophil counterreceptor to maintain their acute adhesion onto ECs^{14,16,41,42}. This might explain why other authors could not observe the capacity of angiopoietins to induce neutrophil adhesion, as their studies were performed for extended periods of time^{39,40}. Using a selective P-selectin antagonist, we showed that endothelial P-selectin translocation is essential for the adhesion of neutrophils. Although it did not further increase P-selectin translocation compared to Ang1 or Ang2 alone, the combination of both angiopoietins provided an additive effect on neutrophil adhesion. This led us to hypothesize that the Ang1/Ang2 combination may induce the synthesis and/or the activation of other molecule(s) either on HUVEC and/or on neutrophils, thus contributing to increase their adhesion on activated ECs.

Expression and activation of Tie2 receptor in neutrophils

Our study is the first to demonstrate the expression of Tie2 receptor in neutrophils. Moreover, we demonstrated the capacity of angiopoietins to activate Tie2 phosphorylation in neutrophils. Although Tie2 is generally considered as an endothelial-specific receptor, it is also expressed in EC precursors and hematopoietic stem cells⁴³. Its presence on neutrophils implicitly suggests that the expression of Tie2 is maintained during the commitment of hematopoietic progenitor cells to the neutrophil lineage. This

surprising observation opens up intriguing new perspectives in the understanding of the physiopathological role of the angiotensin receptor Tie2.

Activation of Tie2 receptor in neutrophils increases their adhesion onto HUVEC

The pretreatment of neutrophils with a blocking anti-hTie2 IgG demonstrated that activation of this receptor in neutrophils was necessary for the additive effect mediated by Ang1/Ang2 combination. Moreover, we performed an adhesion assay on human extracellular matrix which confirmed that stimulation with Ang1/Ang2 combination was able to promote a direct, Tie2-dependent, adhesive state in neutrophils, independently from the potential contribution of activated ECs. These effects were not observed with stimulation with Ang1 or Ang2 alone. In a recent study, Auterio et al. have shown that the stimulation of VEGFR-1 with different VEGF analogs resulted in a different profile of effector activation. Stimulation with VEGF-A₁₆₅ induced a strong phosphorylation of VEGFR-1 tyrosine (Tyr) residue Tyr1213 and to a lesser extent Tyr1242 and Tyr1333, whereas the stimulation with placental growth factor (PlGF) induced the phosphorylation of Tyr1309 but not Tyr1213⁴⁴. Such differences in the activation of VEGFR-1 by various agonists, termed 'agonist trafficking', may explain the distinct biological activities of VEGF-A₁₆₅ and its analogs. Consequently, it is conceivable that in neutrophils, the combination of Ang1 and Ang2 also provides a different effector activation profile upon their interaction with Tie2, which could be responsible for their additive effect on neutrophil adhesion. Hence, we have searched for a particular signaling pathway in neutrophils, which could explain the additive effect induced by the combination of angiotensins. Our results showed that the VEGF system is not involved in this process. However, stimulation of neutrophils with Ang1/Ang2 induced a synergistic effect on PAF synthesis compared to a treatment with Ang1 or Ang2 alone. The subsequent PAF signaling was critical in the additive effect observed with

the Ang1/Ang2 combination on neutrophil adhesion. The binding of PAF to its receptor on neutrophils induces a functional upregulation of the β_2 -integrin complex (CD11/CD18), which contributes to increase neutrophil adhesion^{14,17}. Using a blocking anti-human CD18 IgG prior to stimulation, we confirmed that the additive effect induced by Ang1/Ang2 combination was dependent on the β_2 -integrin complex. It is worth noting that interleukin-8 (IL-8) can also contribute to β_2 -integrin activation⁴⁵. In neutrophils, IL-8 transcripts are constitutively expressed but the release of this inflammatory mediator requires *de novo* synthesis of the protein. Consequently, the acute response in neutrophil adhesion described in this study (within 7.5 min) can not be dependent on IL-8, produced by neutrophils in response to the Ang1/Ang2 combination⁴⁶. However, under prolonged treatment, it would be interesting to assess if angiopoietins like other inflammatory mediators can induce protein expression of IL-8 both in HUVEC and neutrophils⁴⁷.

In conclusion, this study demonstrates that Ang1 and/or Ang2 induce a rapid and transient endothelial P-selectin translocation, which is essential for the adhesion of neutrophils onto activated ECs. In addition, we showed, also for the first time, that angiopoietins combined can activate Tie2 receptor expressed on neutrophils, thus leading to PAF synthesis, functional upregulation of β_2 -integrin complex and subsequent increase in neutrophil adhesion. Our data bring us to suggest that angiopoietins should be considered as acute proinflammatory mediators, which may contribute to initial steps of pathological angiogenesis.



2.6 Acknowledgements

We are grateful to Dr. Danielle Libersan, Louis R. Villeneuve and Dominique Lauzier for their technical assistance.

2.7 References

1. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med.* 2004;255:538-561
2. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376:70-74
3. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996;87:1161-1169
4. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277:55-60
5. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87:1171-1180
6. Gale N, Thurston G, Hackett S, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte M, Jackson D, Suri C, Campochiaro P, Wiegand S, Yancopoulos G. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell.* 2002;3:411
7. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res.* 2001;49:659-670

8. Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci.* 2002;115:175-183
9. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1:27-31
10. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039
11. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *Faseb J.* 1997;11:457-465
12. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg.* 1999;134:1325-1331; discussion 1331-1322
13. Shaw JP, Chuang N, Yee H, Shamamian P. Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res.* 2003;109:37-42
14. Lorant DE, Patel KD, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. *J Cell Biol.* 1991;115:223-234
15. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993;75:1179-1186
16. Rollin S, Lemieux C, Maliba R, Favier J, Villeneuve LR, Allen BG, Soker S, Bazan NG, Merhi Y, Sirois MG. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood.* 2004;103:3789-3797

17. Silvestro L, Ruikun C, Sommer F, Duc TM, Biancone L, Montrucchio G, Camussi G. Platelet-activating factor-induced endothelial cell expression of adhesion molecules and modulation of surface glycocalyx, evaluated by electron spectroscopy chemical analysis. *Semin Thromb Hemost.* 1994;20:214-222
18. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, McLntyre TM, Prescott SM, Topham MK, Weyrich AS, Whatley RE. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol.* 1996;416:297-304
19. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-2101
20. Sirois MG, Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol.* 1997;272:H2746-2756
21. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem.* 1999;274:31047-31054
22. Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, Sirois MG. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem.* 2002;85:629-639
23. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF- induced postnatal neovascularization. *Circ Res.* 1998;83:233-240
24. Theoret JF, Bienvenu JG, Kumar A, Merhi Y. P-selectin antagonism with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1 (rPSGL-Ig) inhibits circulating activated platelet binding to neutrophils induced by damaged arterial surfaces. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298:658-664
25. Marchand GS, Noiseux N, Tanguay JF, Sirois MG. Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H194-204

26. Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, Sirois MG. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br J Pharmacol.* 2001;134:197-205
27. Giuliani N, Colla S, Lazzaretti M, Sala R, Roti G, Mancini C, Bonomini S, Lunghi P, Hojden M, Genestreti G, Svaldi M, Coser P, Fattori PP, Sammarelli G, Gazzola GC, Bataille R, Almici C, Caramatti C, Mangoni L, Rizzoli V. Proangiogenic properties of human myeloma cells: production of angiopoietin-1 and its potential relationship to myeloma-induced angiogenesis. *Blood.* 2003;102:638-645
28. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood.* 1997;90:4153-4161
29. Hennequin LF, Thomas AP, Johnstone C, Stokes ES, PI inverted question marke PA, Lohmann JJ, Ogilvie DJ, Dukes M, Wedge SR, Curwen JO, Kendrew J, Lambert-van der Brempt C. Design and structure-activity relationship of a new class of potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem.* 1999;42:5369-5389
30. Strawn LM, McMahon G, App H, Schreck R, Kuchler WR, Longhi MP, Hui TH, Tang C, Levitzki A, Gazit A, Chen I, Keri G, Orfi L, Risau W, Flamme I, Ullrich A, Hirth KP, Shawver LK. Flk-1 as a target for tumor growth inhibition. *Cancer Res.* 1996;56:3540-3545
31. Marcheselli VL, Rossowska MJ, Domingo MT, Braquet P, Bazan NG. Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J Biol Chem.* 1990;265:9140-9145
32. Bazan NG, Squinto SP, Braquet P, Panetta T, Marcheselli VL. Platelet-activating factor and polyunsaturated fatty acids in cerebral ischemia or convulsions: intracellular PAF-binding sites and activation of a fos/jun/AP-1 transcriptional signaling system. *Lipids.* 1991;26:1236-1242

33. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:2643-2646
34. Hermann M, Jaconi ME, Dahlgren C, Waldvogel FA, Stendahl O, Lew DP. Neutrophil bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* adherent on biological surfaces. Surface-bound extracellular matrix proteins activate intracellular killing by oxygen-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest.* 1990;86:942-951
35. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003;314:61-68
36. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1999;286:2511-2514
37. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000;6:460-463
38. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas MA. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res.* 2000;87:603-607
39. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol.* 2003;139:329-336
40. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res.* 2001;89:477-479
41. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature.* 1990;343:757-760

42. Coughlan AF, Hau H, Dunlop LC, Berndt MC, Hancock WW. P-selectin and platelet-activating factor mediate initial endotoxin-induced neutropenia. *J Exp Med*. 1994;179:329-334
43. Shaw JP, Basch R, Shamamian P. Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:168-175
44. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med*. 2003;9:936-943
45. Ma YQ, Plow EF, Geng JG. P-selectin Binding to P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Induces an Intermediate State of α M β 2 Activation and Acts Cooperatively with Extracellular Stimuli to Support Maximal Adhesion of Human Neutrophils. *Blood*. 2004;104:2549-2556
46. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*. 1996;89:563-568
47. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1998;188:1751-1756

2.8 Tables

Table I. PAF synthesis induced by angiopoietins in HUVEC

Treatment	³ H-PAF synthesis (dpm)
PBS	311 ± 101
Ang1 (10 ⁻⁹ M)	215 ± 62
Ang2 (10 ⁻⁹ M)	388 ± 41
Ang1+Ang2 (10 ⁻⁹ M)	337 ± 56
VEGF (10 ⁻⁹ M)	829 ± 64*

Data are means ± SEM of at least 12 experiments;

* P ≤ 0.01 as compared to PBS

Table II. PAF synthesis induced by angiopoietins in neutrophils

Treatment	³ H-PAF synthesis (dpm)
PBS	16 ± 11
Ang1 (10 ⁻⁹ M)	89 ± 19*
Ang2 (10 ⁻⁹ M)	124 ± 17*
Ang1+Ang2 (10 ⁻⁹ M)	319 ± 50*
VEGF (10 ⁻⁹ M)	23 ± 14

Data are means ± SEM of at least 12 experiments;

* P ≤ 0.01 as compared to PBS

2.9 Legends

Figure 1: Ang1 and Ang2 induce endothelial P-selectin translocation in HUVEC. P-selectin translocation in HUVEC was quantified by cell surface ELISA. PBS was used as a control and the basal levels of cell surface P-selectin were normalized to 1. Translocation of P-selectin induced by Ang1 (A) and Ang2 (B), both at 7.5 min, was determined at different concentrations (10^{-12} to 10^{-8} M: left panels) and in function of time at 10^{-9} M (5 to 15 min: right panels). Data are means \pm SEM of at least 7 experiments; * $P \leq 0.01$ as compared to PBS.

Figure 2: Ang1 and Ang2 induce neutrophil adhesion to HUVEC. Neutrophil adhesion to HUVEC was determined by cell surface adhesion assay under static conditions. PBS was used as a control. Due to slight variations in basal neutrophil adhesion between different experiments, we reported our data as relative neutrophil adhesion (%). Neutrophil recruitment induced by Ang1 (A) and Ang2 (B), both at 7.5 min, was determined at different concentrations (10^{-12} to 10^{-8} M: left panels) and in function of time at 10^{-9} M (5 to 15 min: right panels). Data are means \pm SEM of at least 12 experiments; * $P \leq 0.01$ as compared to PBS.

Figure 3: Stimulation with Ang1 and Ang2 induces an additive effect on neutrophil adhesion but not on P-selectin translocation. Endothelial P-selectin translocation (A), and neutrophil adhesion onto HUVEC (B) were quantified upon stimulation with either Ang1, Ang2 or both Ang1 and Ang2 (10^{-10} M or 10^{-9} M; 7.5 min). The requirement of endothelial P-selectin translocation for neutrophil adhesion (C) was demonstrated after pretreating HUVEC with rPSGL-Ig (0.01 to 1 μ g/ml; 15 min) prior to stimulation with Ang1, Ang2 or both Ang1 and Ang2 (10^{-9} M; 7.5 min). Data are means \pm SEM

of at least 7 experiments; * $P \leq 0.01$ as compared to PBS, § $P \leq 0.01$ as compared to corresponding agonist.

Figure 4: Expression and activation of Tie2 receptors in HUVEC and neutrophils. Tie2 mRNA expression in neutrophil (N) was revealed by RT-PCR, HUVEC (EC) mRNA was used as a positive control. In contrast, Tie1 was present in HUVEC but not in neutrophils (A). Tie2 expression in neutrophils was confirmed at the protein level by immunocytochemistry, using anti-hTie2 IgG and normal IgG was used as negative control (B). Tie2 protein was located at the cytoplasmic membrane of neutrophils as demonstrated by confocal microscopy (C). HUVEC were treated with either Ang1, Ang2 or Ang1 and Ang2 (10^{-9} M; 7.5 min). Tie2 proteins were first immunoprecipitated with anti-hTie2 IgG and Tie2-phosphorylation was analyzed by immunoblotting using antiphosphotyrosine IgG (4G10 clone). Membranes were subsequently stripped and the detection of Tie2 protein was performed to confirm equal protein loading (D). Neutrophils were treated with either Ang1, Ang2 or Ang1 and Ang2 (10^{-9} M; 7.5 min). Cell lysates equivalent to 125 μ g of total proteins were loaded in each lane. Membranes were subsequently probed with anti-phospho-hTie2 IgG (E).

Figure 5: Neutrophil adhesion induced by angiopoietins: Implication of Tie2 receptors on HUVEC and neutrophils. HUVEC (left) or neutrophils (right) were pretreated for 15 min with blocking anti-hTie2 IgG (0.05 to 1 μ g/ml) prior to stimulation with Ang1 (A), Ang2 (B) or Ang1/Ang2 combination (10^{-9} M; 7.5 min) (C). Data are means \pm SEM of at least 8 experiments; * $P \leq 0.01$ as compared to PBS, § $P \leq 0.01$ as compared to corresponding agonist.

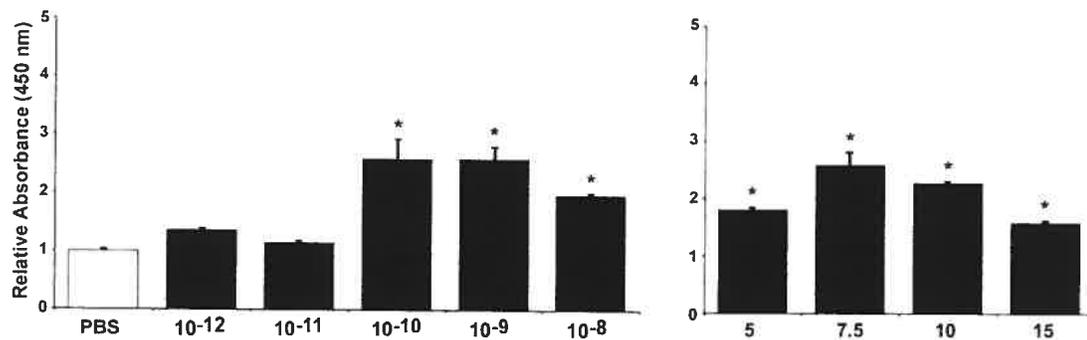
Figure 6: Contribution of PAF and β 2 integrin on angiopoietin-induced neutrophil adhesion onto HUVEC. Neutrophils were pretreated with increasing concentrations of CV-3988 (10^{-8} to 10^{-6} M) (A), and blocking anti-CD18 IgG (1 to 5 μ g/ml) (B) for 15 minutes prior to the adhesion assay. Neutrophils were added to HUVEC concomitantly to their stimulation with Ang1, Ang2 alone, or Ang1/Ang2 combination (10^{-9} M; 7.5 min). Data are means \pm SEM of at least 8 experiments; * $P \leq 0.01$ as compared to PBS, $\S P \leq 0.01$ as compared to corresponding agonist.

Figure 7: Combination of Ang1 and Ang2 promotes neutrophil adhesion on hECM: Implication of Tie2 and β 2 integrin. Neutrophils were pretreated with increasing concentrations of blocking anti-hTie2 IgG (0.05 to 1 μ g/ml) or blocking anti-CD18 IgG (1 to 5 μ g/ml) antibodies 15 minutes prior to the adhesion assay on hECM. Neutrophils were stimulated with either Ang1, Ang2 or Ang1/Ang2 combination (10^{-9} M; 7.5 min). Data are means \pm SEM of at least 8 experiments; * $P \leq 0.01$ as compared to PBS, $\S P \leq 0.01$ as compared to corresponding agonist.

2.10 Figures

FIGURE 1

A) Ang1



B) Ang2

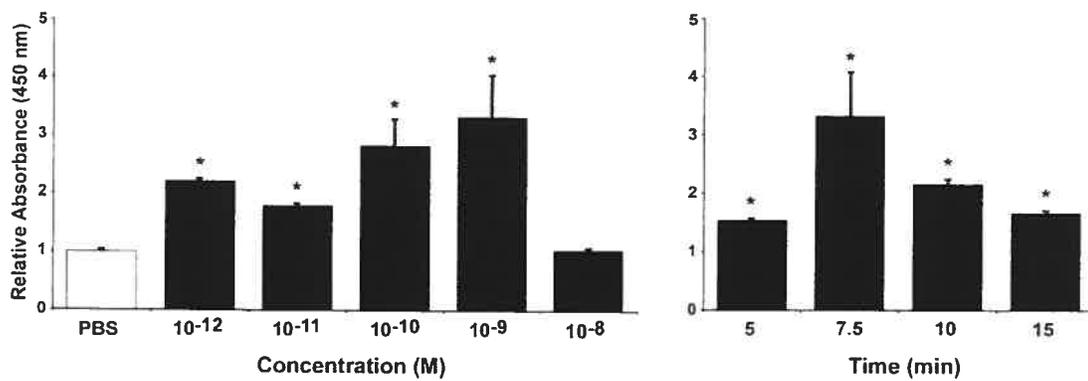
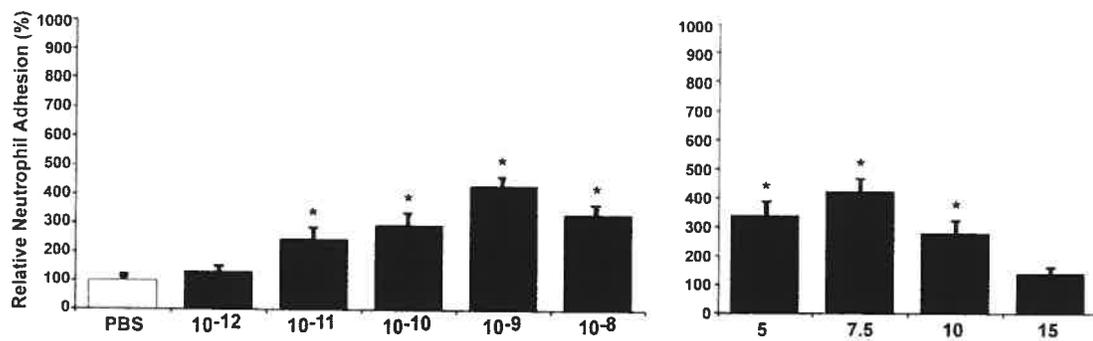


FIGURE 2

A) Ang1



B) Ang2

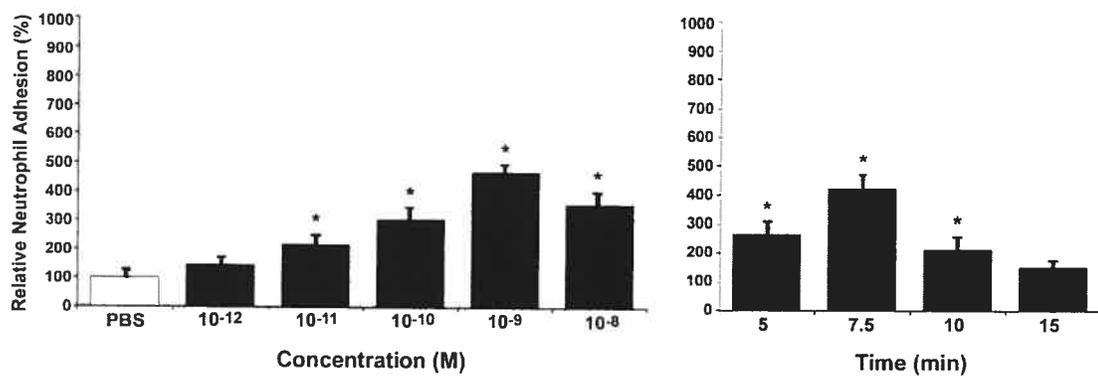
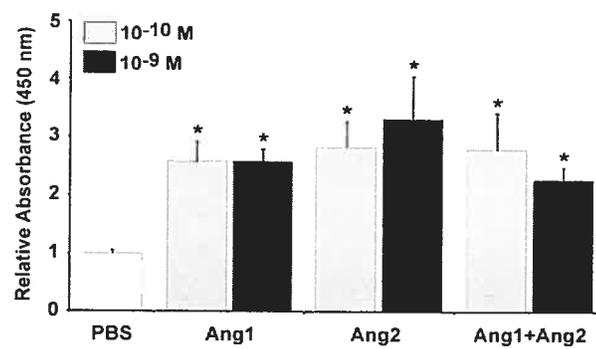
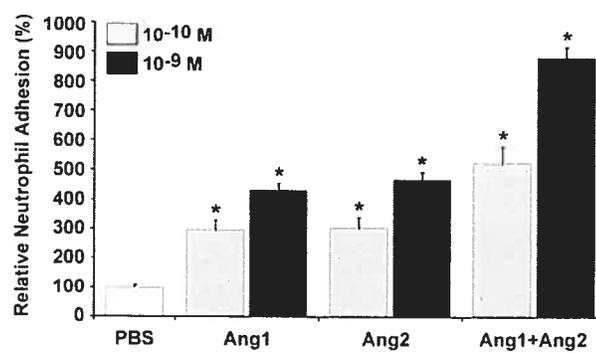


FIGURE 3

A)



B)



C)

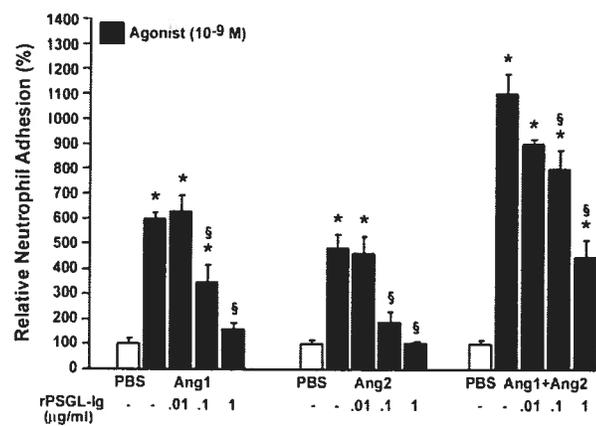


FIGURE 4

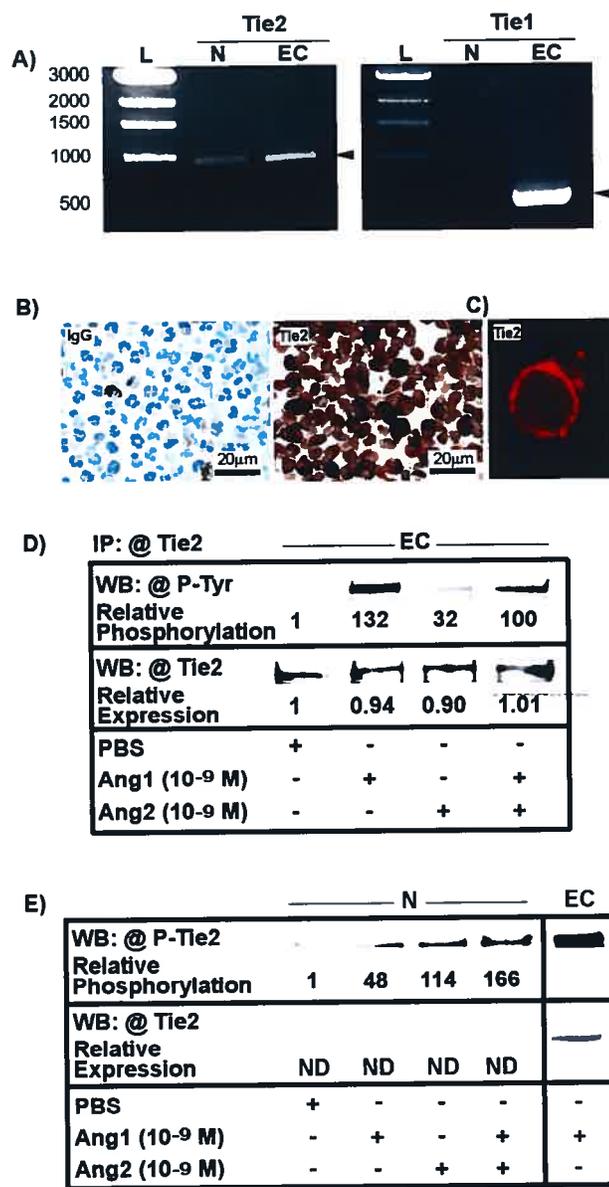


FIGURE 5

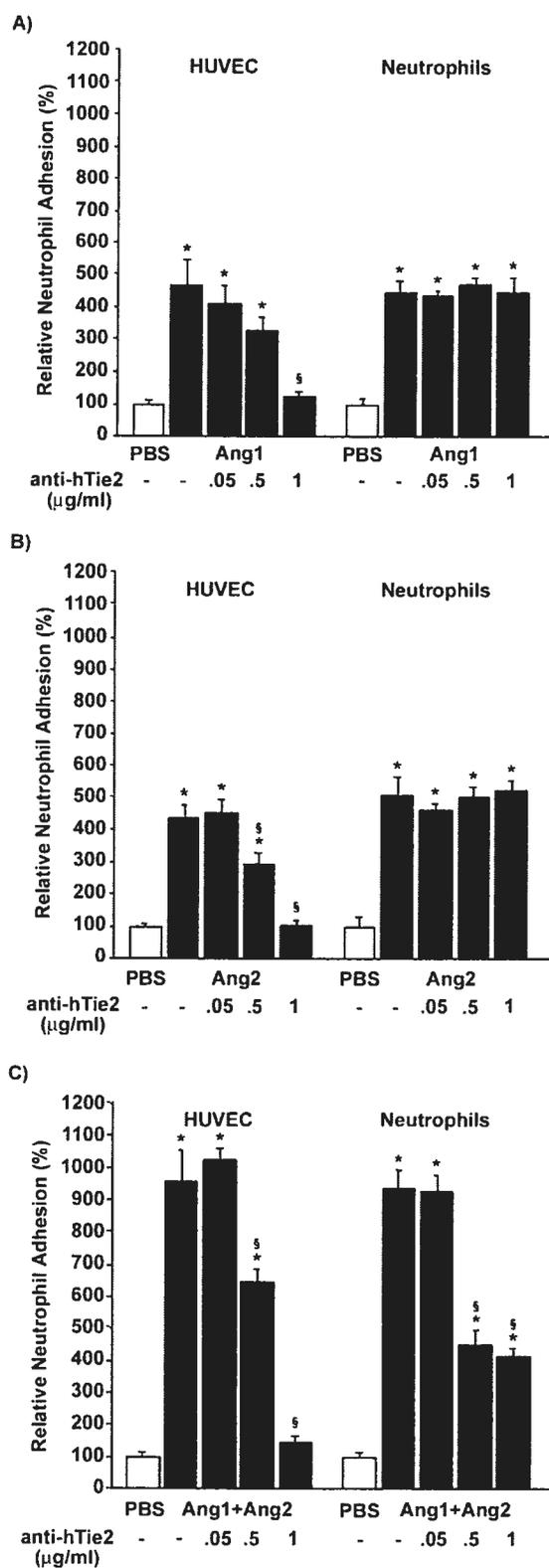


FIGURE 6

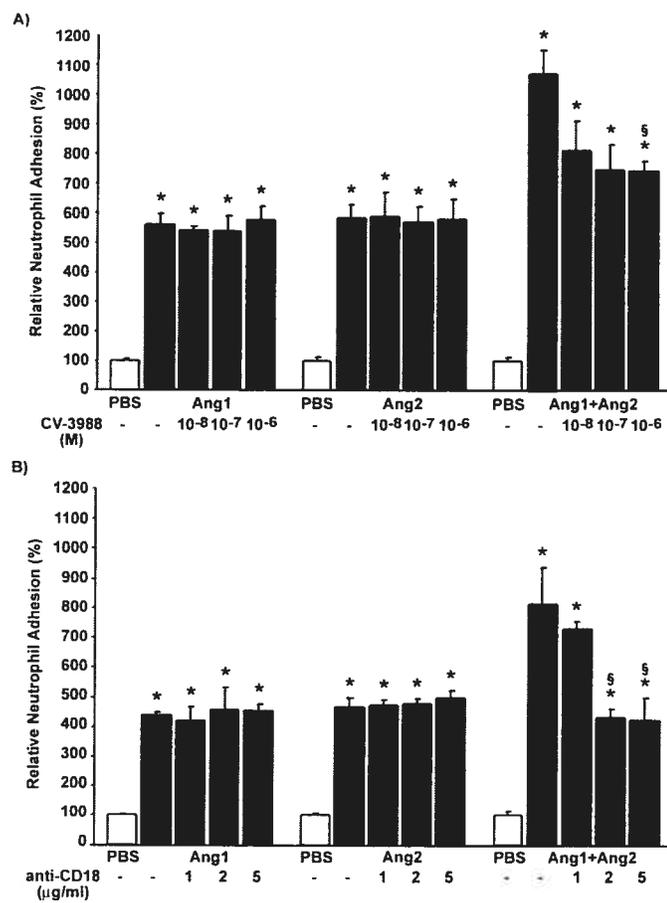
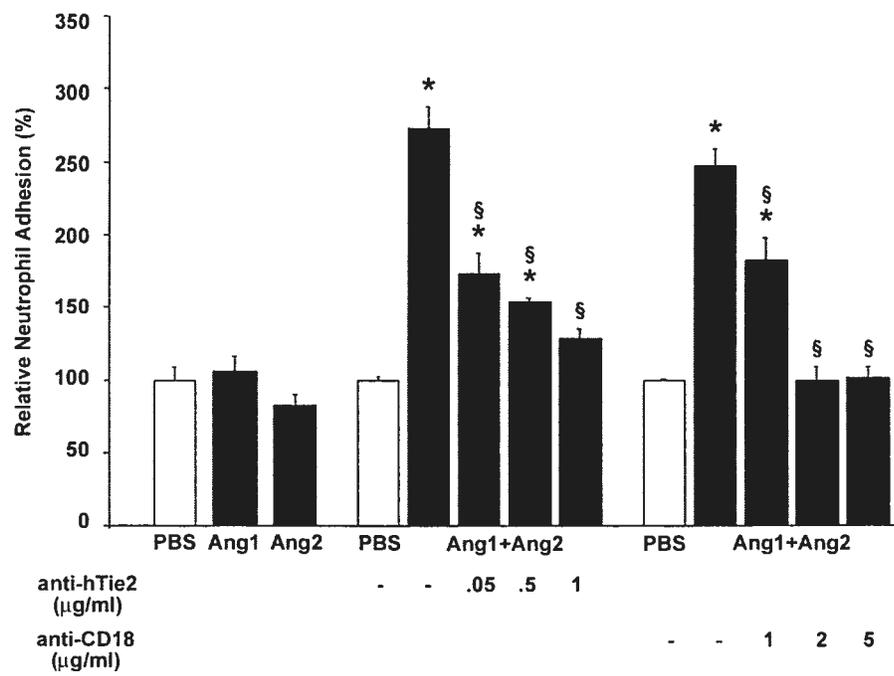


FIGURE 7



3.0 DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons démontré le potentiel proinflammatoire des angiopoïétines. Nous avons établi, pour la première fois, que l'angiopoïétine-1 et l'angiopoïétine-2 étaient toutes deux capables d'induire la translocation de la P-sélectine des cellules endothéliales veineuses de cordons ombilicaux humains, une étape essentielle au recrutement des neutrophiles. De façon surprenante, alors que la combinaison des deux angiopoïétines n'amplifie pas la translocation de la P-sélectine, elle conduit à un effet additif sur l'adhésion des neutrophiles. Dans le but de clarifier ce phénomène, nous avons démontré l'expression inattendue du récepteur Tie2 à la surface des neutrophiles. Nos études confirment que les angiopoïétines ont la capacité d'activer directement les neutrophiles et d'induire la synthèse de PAF. À la lumière de ces résultats, nous proposons un modèle de coopération entre l'angiopoïétine-1 et l'angiopoïétine-2 qui, en collaboration avec la signalisation intracellulaire induite par l'engagement de la P-sélectine et du PAF sur leur récepteur respectif à la surface des neutrophiles, permet l'activation des $\beta 2$ intégrines afin d'augmenter le recrutement induit par la P-sélectine et promouvoir l'adhésion ferme des neutrophiles aux cellules endothéliales.

3.1 Potentiel inflammatoire des angiopoïétines

Lorsque nous avons débuté ces études, le potentiel anti-inflammatoire de l'angiopoïétine-1 avait déjà suscité l'intérêt de certains groupes de recherche. Maintenir la quiescence vasculaire est davantage perçu comme étant un processus à long terme régulé au niveau de l'expression. De ce fait, les études citées ci-bas ont mesuré l'effet de l'angiopoïétine-1 sur différents processus inflammatoires à long terme. *In vivo*, l'angiopoïétine-1 protège des effets hyperperméabilisants du VEGF-A₁₆₅ en maintenant les interactions entre cellules endothéliales et cellules péri-endothéliales^{71,93}. *In vitro*, l'angiopoïétine-1 diminue aussi la perméabilité endothéliale induite par

différents facteurs inflammatoires tels l'histamine et la thrombine ^{94,167}. Davantage relié à notre étude, il a été démontré que l'angiopoïétine-1, à fortes concentrations, réduit l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine) induite par le VEGF-A₁₆₅ et supprime, à long terme, l'effet inflammatoire du VEGF-A₁₆₅ sur l'adhésion des neutrophiles ⁹⁷.

Ces résultats, à première vue, semblent conflictuels avec ceux de notre étude qui démontrent qu'à court terme et à plus faibles concentrations, l'angiopoïétine-1 induit la translocation de la P-sélectine et permet le recrutement des neutrophiles. Cependant, il est bien établi que la translocation de la P-sélectine est rapide et transitoire. Elle atteint un maximum dans les 10 premières minutes de stimulation et est par la suite clivée ou réinternalisée par endocytose de sorte qu'elle ne peut plus interagir avec le PSGL-1 présent au niveau des microvilli des neutrophiles ^{144,145}. Seule les études à court terme permettent de voir son impact sur l'adhésion des neutrophiles. Cette cinétique d'action pourrait expliquer pourquoi le groupe de Kim *et coll.* n'a pu observer l'effet proinflammatoire de l'angiopoïétine-1 décrit dans cette étude ^{101,146}. Nos résultats placent l'angiopoïétine-1 dans un contexte fonctionnel totalement différent du rôle de stabilisateur vasculaire qui lui est normalement conféré. Cependant, le potentiel inflammatoire de l'angiopoïétine-1 en conditions aiguës, suggéré par nos travaux, s'intègre bien aux effets angiogéniques connus de l'angiopoïétine-1. *In vitro*, l'angiopoïétine-1 stimule la migration cellulaire ⁹⁶, le bourgeonnement ¹⁶⁸ et l'organisation en structure tubulaire des cellules endothéliales ¹⁶⁹. D'un point de vue pathologique, les effets angiogéniques de l'angiopoïétine-1 sont non-négligeables. Comme il est possible que ces effets soient assistés par une implication directe de l'angiopoïétine-1 dans l'inflammation (ce qui est le cas pour le VEGF-A₁₆₅), le potentiel proinflammatoire de l'angiopoïétine-1 aurait davantage à être investigué. À titre d'exemple, Gravallesse *et coll.* ont démontré que l'ARNm et la protéine de l'angiopoïétine-1 sont exprimés dans le liquide synovial des

patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde et que leur niveau pouvait être régulé à la hausse par le TNF- α ⁷⁵. Ces auteurs ont proposé que l'angiopoïétine-1 puisse contribuer à cette pathologie en induisant la migration des cellules endothéliales aux sites inflammatoires. À la lumière de nos résultats, il peut être suggéré que ce processus soit facilité par le recrutement des neutrophiles.

L'angiopoïétine-2, connue pour réguler la plasticité vasculaire, est conceptuellement plus facile à concevoir comme étant un médiateur proinflammatoire. Toutefois, son rôle potentiel dans l'inflammation n'a jamais fait l'objet d'investigation. L'angiopoïétine-2 est fortement exprimée aux sites de remodelage vasculaire tant en conditions physiologiques que pathologiques ^{54,170}. Ce niveau d'expression élevé aurait pour rôle de contrecarrer le système stabilisateur angiopoïétine-1/Tie2 afin de permettre l'induction des processus angiogéniques par différents facteurs dont le VEGF-A₁₆₅. Cependant, des études récentes suggèrent que le rôle de l'angiopoïétine-2 pourrait aller au delà d'un rôle d'antagoniste et participer activement aux processus angiogéniques. En effet, l'angiopoïétine-2 est capable d'activer le récepteur Tie2 ⁵⁹ et d'induire la migration et la formation en structure tubulaire des cellules endothéliales ⁵⁸. Comme le suggèrent nos résultats, l'induction des processus angiogéniques par l'angiopoïétine-2 pourrait être facilitée par une action directe sur les processus inflammatoires soit la translocation de la P-sélectine et le recrutement des neutrophiles. Fait intéressant, l'angiopoïétine-2 a récemment été identifiée comme une des molécules contenues dans les corps de Weibel-Palade. Elle est contenue dans une classe d'organelles différente de celle contenant la P-sélectine et peut être rapidement mobilisée à la surface des cellules endothéliales par différents médiateurs inflammatoires tels l'histamine et la thrombine ¹⁰⁴. Cette étude démontre une fois de plus l'étroite collaboration entre les médiateurs inflammatoires et angiogéniques et supporte davantage le rôle proinflammatoire de l'angiopoïétine-2 suggéré par notre étude.

3.2 Présence du récepteur Tie2 au niveau des neutrophiles

Bien qu'il y ait une induction locale de l'expression de l'angiopoïétine-2 en réponse à l'hypoxie ou au VEGF-A₁₆₅ au site de remodelage vasculaire, l'expression de l'angiopoïétine-1 n'est pas modifiée^{79 74}. Ceci permet de changer le ratio d'expression et d'exposer l'endothélium vasculaire aux effets des deux angiopoïétines. En modifiant ce ratio, l'endothélium vasculaire, qui évolue normalement dans un environnement stable, est soumis à un cadre plus propice à l'induction d'une réponse angiogénique ou inflammatoire qui ne pourrait être induite autrement. Fait intéressant, la combinaison des angiopoïétines dans notre modèle d'adhésion cellulaire a permis de doubler l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales sans pour autant moduler davantage la translocation de la P-sélectine. Ces résultats suggéraient qu'utilisées de façon combinée, les angiopoïétines pourraient avoir une action directe de coopération sur l'activation des neutrophiles. Cette nouvelle hypothèse nous a permis de détecter la présence du récepteur Tie2 à la surface des neutrophiles.

Le récepteur Tie2 est généralement considéré comme un marqueur de cellules endothéliales. Toutefois, il est aussi exprimé chez les précurseurs endothéliaux et les cellules hématopoïétiques¹⁷¹. Sa présence au niveau des neutrophiles n'avait jamais été observée auparavant. Cependant, elle suggère implicitement que son expression soit maintenue pendant l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques vers la lignée des neutrophiles.

L'effet additif sur l'adhésion des neutrophiles et non sur la translocation de la P-sélectine est intéressant d'un point de vue pharmacologique. Premièrement, le récepteur Tie2 est toujours co-exprimé avec le récepteur Tie1 dans les cellules endothéliales mais, comme le démontre notre étude, sa présence n'a pas été détectée dans les neutrophiles. Il a déjà été

démontré que les monomères respectifs de ces deux récepteurs sont capable de former des hétérodimères. Toutefois, aucune phosphorylation du monomère de Tie1 ne survient suite à une stimulation aux angiopoïétines¹⁷². La présence de l'hétérodimère Tie1/Tie2 permettrait donc d'autoréguler la réponse induite par les angiopoïétines. La présence du récepteur Tie1 dans les cellules endothéliales pourrait donc masquer l'effet additif que l'on perçoit chez les neutrophiles.

Deuxièmement, il est aussi possible qu'entre elles, les angiopoïétines forment des hétérodimères ou encore des multimères fonctionnels. De cette hypothèse, nous pouvons suggérer que ce type de multimères pourrait recruter un co-récepteur à la surface des neutrophiles qui n'est pas présent au niveau des cellules endothéliales. Le recrutement du co-récepteur pourrait, tout comme le fait le recrutement de la NRP-1 par le VEGF-A₁₆₅²⁶, amplifier les effets des multimères et ainsi permettre une réponse différente entre les neutrophiles et les cellules endothéliales. Lorsque nous regardons l'effet opposé que l'angiopoïétine-2 élicite dans le système vasculaire (facteur de plasticité) et le système lymphatique (facteur de stabilisation)⁵⁶, nous pouvons imaginer, encore plus simplement, que les angiopoïétines activent le récepteur Tie2 des neutrophiles de façon fondamentalement différente de celui des cellules endothéliales. Ce phénomène nommé *agonist trafficking* a déjà été observé dans le système VEGF-A₁₆₅/PIGF/VEGFR-1¹⁷³. En effet, une stimulation du VEGFR-1 par le VEGF-A₁₆₅ induit une forte phosphorylation du résidu tyrosine Tyr1213 alors que celle induite par le PIGF implique la tyrosine Tyr1309. Cette différence de phosphorylation permet à chacun des facteurs d'induire une signalisation intracellulaire ciblée qui lui est propre. Cette unicité de réponse s'étant même d'un type cellulaire à l'autre. En effet, alors que le VEGF-A₁₆₅ n'induit peu ou pas de signalisation intracellulaire par le VEGFR-1 dans les cellules endothéliales, il induit, via le même récepteur, un signal intracellulaire important dans les monocytes. Sous l'influence du VEGF-A₁₆₅, cette signalisation permet la

migration des monocytes de la circulation périphérique aux tissus¹⁷⁴. Il est donc possible que les angiopoïétines-1 et -2 induisent une signalisation intracellulaire, via le récepteur Tie2, qui leur est propre et qui est dépendante du type cellulaire concerné. Une différence entre les voies de signalisation induites par chacune des angiopoïétines au niveau des neutrophiles pourrait donc expliquer la coopération des angiopoïétines à promouvoir leur adhésion.

3.3 Activation des neutrophiles par les angiopoïétines

En faveur de ce principe, nos résultats démontrent que la combinaison des angiopoïétines induit, chez les neutrophiles, une synthèse de PAF qui est plus importante que celle issue d'une stimulation avec l'angiopoïétine-1 ou l'angiopoïétine-2 seule. Le PAF, en liant son récepteur à la surface des neutrophiles, induit une signalisation intracellulaire qui contribue à l'activation des $\beta 2$ intégrines¹⁵⁷ et donc ouvre la porte vers l'implication des molécules d'adhésion davantage engagées dans l'adhésion ferme des neutrophiles. De façon intéressante, nous avons constaté que seul la combinaison des angiopoïétines permet d'augmenter l'adhésion des neutrophiles à une matrice composée exclusivement de protéines de la matrice extracellulaire. Comme l'adhésion des neutrophiles à une matrice extracellulaire est exclusivement dépendante des $\beta 2$ intégrines, il peut être suggéré que la synthèse de PAF induite par les angiopoïétines seules soit insuffisante pour contribuer à l'activation des $\beta 2$ intégrines et donc supporter l'adhésion des neutrophiles sur ce type de matrice.

L'augmentation de l'adhésion des neutrophiles induite par la combinaison des angiopoïétines est moins importante que celle que perçue sur une monocouche de cellules endothéliales. À la lumière de ces résultats, il est possible que la signalisation induite par le complexe P-sélectine/PSGL-1, en plus de celle induite par le PAF, soit nécessaire pour obtenir une pleine

activation des $\beta 2$ intégrines et favoriser une adhésion maximale. Les $\beta 2$ intégrines, au niveau moléculaire, existent sous au moins trois conformations différentes : 1) une conformation active de haute affinité pour leur ligand dite ouverte; 2) une conformation transitoire de basse affinité dite intermédiaire; et 3) une conformation de repos de très basse affinité dite fermée ^{155,175}. Les conformations intermédiaires et ouvertes sont capables de supporter l'adhésion des neutrophiles, la conformation ouverte étant cependant beaucoup plus efficace. Une étude récente a démontré que la liaison de la P-sélectine au PSGL-1 des neutrophiles permet d'induire la conformation intermédiaire des $\beta 2$ intégrines ce qui facilite et favorise l'activation finale, soit l'adoption de la conformation ouverte induite par d'autres médiateurs inflammatoires comme le PAF et l'IL-8 ¹⁷⁶. Ce modèle de coopération entre le complexe P-sélectine/PSGL-1 et le PAF pourrait expliquer l'effet marqué de l'adhésion induite par la combinaison des angiopoïétines sur les cellules endothéliales. De cette façon, nous pouvons proposer que, en induisant la translocation de la P-sélectine endothéliale et la synthèse de PAF, la combinaison des angiopoïétines induit un état pro-adhésif chez les neutrophiles qui permet le recrutement fonctionnel des $\beta 2$ intégrines et donc un support important pour l'adhésion.

4.0 CONCLUSION

En conclusion, nous avons démontré que les angiopoïétines, seule ou en combinaison, permettent l'induction de processus proinflammatoires dont la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles. Ces effets sont supportés par la présence du récepteur Tie2 à la surface des neutrophiles. Cette étude place les angiopoïétines dans un contexte fonctionnel différent de celui qui leur est normalement conféré. Nous proposons un rôle actif des angiopoïétines dans l'association de dépendance mutuelle entre l'angiogenèse et l'inflammation. Dans cette lancée, il serait intéressant de vérifier si l'adhésion des neutrophiles induite par la combinaison des angiopoïétines est maintenue à long terme. Il est aussi possible qu'à faible concentration, les angiopoïétines, seule ou en combinaison, puissent induire l'expression d'autres molécules d'adhésion comme la E-sélectine et la ICAM-1. Au niveau des neutrophiles, il serait tout aussi captivant de vérifier si les angiopoïétines peuvent induire la synthèse d'autres cytokines proinflammatoires ou encore la relâche de métalloprotéases pouvant contribuer à la réponse angiogénique. Des études de cytométrie en flux pourraient aussi permettre d'en apprendre davantage sur l'activation des β 2 intégrines par les angiopoïétines.

De ces différentes possibilités découle la nécessité de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'activation des cellules endothéliales et des neutrophiles par les angiopoïétines. Tel que mentionné dans la discussion, l'activation des neutrophiles par la combinaison des angiopoïétines amène aussi plusieurs possibilités d'un point de vue pharmacologique et moléculaire qui seraient intéressantes à vérifier. De toute évidence une meilleure compréhension du rôle des angiopoïétines dans l'induction des processus inflammatoires est essentielle. L'étroite association des angiopoïétines avec certaines conditions inflammatoires est certainement une motivation valable à ce nouvel angle de recherche qui pourrait contribuer au développement de meilleures approches thérapeutiques dans plusieurs pathologies dites inflammatoires.

5.0 BIBLIOGRAPHIE

1. Wilting J, Brand-Saberi B, Kurz H, Christ B. Development of the embryonic vascular system. *Cell Mol Biol Res*. 1995;41:219-232
2. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43:175-203
3. Savona C, Javerzat S, Perollet C, Bikfalvi A. Angiogenesis and neoangiogenesis. *Rev Prat*. 1997;47:2239-2243
4. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev*. 1991;71:541-585.
5. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
6. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306-1309.
7. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*. 1991;5:1806-1814
8. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991;266:11947-11954
9. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999;13:9-22
10. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4604-4613
11. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18:4-25

12. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99:2625-2634
13. Sirois MG, Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol.* 1997;272:H2746-2756
14. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *Exs.* 1997;79:1-8
15. Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *Exs.* 1997;79:209-232
16. Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer.* 1998;75:780-786
17. Favard C, Moukadir H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell.* 1991;73:1-6.
18. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189:824-831.
19. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med.* 1996;2:992-997
20. Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol.* 1998;111:1-6

21. Rollin S, Lemieux C, Maliba R, Favier J, Villeneuve LR, Allen BG, Soker S, Bazan NG, Merhi Y, Sirois MG. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood*. 2004;103:3789-3797
22. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:7614-7620
23. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 1990;5:519-524
24. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991;6:1677-1683
25. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122:3829-3837
26. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92:735-745
27. Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *Embo J*. 1996;15:4919-4927
28. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*. 1997;272:23659-23667

29. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 1994;269:25646-25654
30. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:11709-11714
31. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* 1992;255:989-991
32. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1994;269:26988-26995
33. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9349-9354
34. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 1996;87:3336-3343
35. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer Cell.* 2002;2:289-300
36. Kroll J, Waltenberger J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272:32521-32527

37. Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/FIk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1997;14:2079-2089
38. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR, King GL. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*. 1996;98:2018-2026
39. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol*. 1996;270:H411-415
40. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399:597-601
41. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development*. 1995;121:4309-4318
42. Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, Sirois MG. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem*. 2002;85:629-639
43. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H. Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation*. 2001;104:1964-1971.
44. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 1999;126:3597-3605.

45. Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL, Ginsburg D. Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. *Nature*. 1996;384:66-68.
46. Korhonen J, Partanen J, Armstrong E, Vaahtokari A, Elenius K, Jalkanen M, Alitalo K. Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. *Blood*. 1992;80:2548-2555
47. Partanen J, Armstrong E, Makela TP, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol*. 1992;12:1698-1707
48. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*. 1992;7:1471-1480
49. Koh GY, Kim I, Kwak HJ, Yun MJ, Leem JC. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Exp Mol Med*. 2002;34:1-11
50. Procopio WN, Pelavin PI, Lee WM, Yeilding NM. Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *J Biol Chem*. 1999;274:30196-30201
51. Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Huang T, Kovac L, Xu A, Leidich R, Radziejewska E, Rafique A, Goldberg J, Jain V, Bailey K, Karow M, Fandl J, Samuelsson SJ, Ioffe E, Rudge JS, Daly TJ, Radziejewski C, Yancopoulos GD. Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol*. 2003;10:38-44

52. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonpierre PC, Davis S, Yancopoulos GD. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:1904-1909

53. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996;87:1161-1169

54. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277:55-60

55. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, Kim JH, Oh JL, Lee GM, Koh GY. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *Faseb J*. 2004;18:1200-1208

56. Gale N, Thurston G, Hackett S, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte M, Jackson D, Suri C, Campochiaro P, Wiegand S, Yancopoulos G. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell*. 2002;3:411

57. Kim I, Kim JH, Moon SO, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene*. 2000;19:4549-4552.

58. Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci*. 2002;115:175-183

59. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res.* 2001;49:659-670
60. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407:242-248.
61. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* 1994;8:1897-1909
62. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376:70-74
63. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376:62-66
64. Calvert JT, Riney TJ, Kontos CD, Cha EH, Prieto VG, Shea CR, Berg JN, Nevin NC, Simpson SA, Pasyk KA, Speer MC, Peters KG, Marchuk DA. Allelic and locus heterogeneity in inherited venous malformations. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1279-1289
65. Vikkula M, Boon LM, Carraway KLr, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell.* 1996;87:1181-1190
66. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *Embo J.* 1995;14:5884-5891

67. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87:1171-1180
68. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380:435-439
69. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439-442
70. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1998;282:468-471
71. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1999;286:2511-2514
72. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation*. 2003;108:2613-2618
73. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*. 2000;86:24-29
74. Park YS, Kim NH, Jo I. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc Res*. 2003;65:125-131
75. Gravallesse EM, Pettit AR, Lee R, Madore R, Manning C, Tsay A, Gaspar J, Goldring MB, Goldring SR, Oettgen P. Angiopoietin-1 is expressed in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and is induced by tumour necrosis factor alpha. *Ann Rheum Dis*. 2003;62:100-107

76. Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. Tumor necrosis factor- α upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:361-365
77. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science.* 1999;284:1994-1998
78. Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res.* 1998;83:852-859
79. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1999;274:15732-15739
80. Mandriota SJ, Pyke C, Di Sanza C, Quinodoz P, Pittet B, Pepper MS. Hypoxia-inducible angiopoietin-2 expression is mimicked by iodonium compounds and occurs in the rat brain and skin in response to systemic hypoxia and tissue ischemia. *Am J Pathol.* 2000;156:2077-2089
81. Cohen B, Barkan D, Levy Y, Goldberg I, Fridman E, Kopolovic J, Rubinstein M. Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissues. *J Biol Chem.* 2001;276:7697-7700
82. Fujiyama S, Matsubara H, Nozawa Y, Maruyama K, Mori Y, Tsutsumi Y, Masaki H, Uchiyama Y, Koyama Y, Nose A, Iba O, Tateishi E, Ogata N, Jyo N, Higashiyama S, Iwasaka T. Angiotensin AT(1) and AT(2) receptors differentially regulate angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis by modulating heparin binding-epidermal growth factor (EGF)-mediated EGF receptor transactivation. *Circ Res.* 2001;88:22-29
83. Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y. Angiotensin II induces expression of the Tie2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes.* 2001;50:867-875

84. Lund EL, Hog A, Olsen MW, Hansen LT, Engelholm SA, Kristjansen PE. Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. *Int J Cancer*. 2004;108:833-838
85. Gerritsen ME, Tomlinson JE, Zlot C, Ziman M, Hwang S. Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 2003;140:595-610
86. Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res*. 2003;93:664-673
87. Abdulmalek K, Ashur F, Ezer N, Ye F, Magder S, Hussain SN. Differential expression of Tie-2 receptors and angiopoietins in response to in vivo hypoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:L582-590
88. Kwak HJ, So JN, Lee SJ, Kim I, Koh GY. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett*. 1999;448:249-253.
89. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest*. 1999;79:213-223
90. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa WC. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem*. 2000;275:9102-9105
91. Harfouche R, Gratton JP, Yancopoulos GD, Nosedá M, Karsan A, Hussain SN. Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *Faseb J*. 2003;17:1523-1525
92. Zhu WH, Han J, Nicosia RF. Requisite role of p38 MAPK in mural cell recruitment during angiogenesis in the rat aorta model. *J Vasc Res*. 2003;40:140-148

93. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000;6:460-463
94. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas MA. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res.* 2000;87:603-607
95. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, Morla AO. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem.* 2001;276:26516-26525
96. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem.* 1998;273:18514-18521
97. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res.* 2001;89:477-479
98. Li JJ, Huang YQ, Basch R, Karpatkin S. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost.* 2001;85:204-206
99. Bauer KA. New markers for in vivo coagulation. *Curr Opin Hematol.* 1994;1:341-346
100. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* 1989;84:92-99
101. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem.* 1989;264:7768-7771

102. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med.* 1998;188:1751-1756
103. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;31:424-430
104. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004;103:4150-4156
105. Jousen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, Qin W, Qaum T, Xu Q, Moromizato Y, Bursell SE, Wiegand SJ, Rudge J, Ioffe E, Yancopoulos GD, Adamis AP. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol.* 2002;160:1683-1693
106. Puri MC, Bernstein A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12753-12758
107. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995;376:66-70
108. Nambu H, Nambu R, Oshima Y, Hackett SF, Okoye G, Wiegand S, Yancopoulos G, Zack DJ, Campochiaro PA. Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier. *Gene Ther.* 2004;11:865-873
109. Hammes HP, Lin J, Wagner P, Feng Y, Vom Hagen F, Krzizok T, Renner O, Breier G, Brownlee M, Deutsch U. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2004;53:1104-1110

110. Das A, Fanslow W, Cerretti D, Warren E, Talarico N, McGuire P. Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization. *Lab Invest.* 2003;83:1637-1645
111. Takagi H, Koyama S, Seike H, Oh H, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Potential role of the angiopoietin/tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:393-402
112. Oshima Y, Deering T, Oshima S, Nambu H, Reddy PS, Kaleko M, Connelly S, Hackett SF, Campochiaro PA. Angiopoietin-2 enhances retinal vessel sensitivity to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol.* 2004;199:412-417
113. Takahara K, Iioka T, Furukawa K, Uchida T, Nakashima M, Tsukazaki T, Shindo H. Autocrine/paracrine role of the angiopoietin-1 and -2/Tie2 system in cell proliferation and chemotaxis of cultured fibroblastic synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Hum Pathol.* 2004;35:150-158
114. Scott BB, Zaratini PF, Colombo A, Hansbury MJ, Winkler JD, Jackson JR. Constitutive expression of angiopoietin-1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 2002;29:230-239
115. Fearon U, Griosios K, Fraser A, Reece R, Emery P, Jones PF, Veale DJ. Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol.* 2003;30:260-268
116. Kuroda K, Sapadin A, Shoji T, Fleischmajer R, Lebwohl M. Altered expression of angiopoietins and Tie2 endothelium receptor in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2001;116:713-720
117. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-1186.
118. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res.* 1996;69:135-174
119. Metheny-Barlow LJ, Li LY. The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. *Cell Res.* 2003;13:309-317

120. Nagata J, Kijima H, Hatanaka H, Tokunaga T, Kamochi J, Abe Y, Takagi A, Mine T, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y. Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor expression in human esophageal cancer. *Int J Mol Med*. 2002;10:423-426
121. Shim WS, Teh M, Bapna A, Kim I, Koh GY, Mack PO, Ge R. Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice. *Exp Cell Res*. 2002;279:299-309
122. Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Kern FG, Lippman ME, McLeskey SW, Li LY. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer*. 2000;83:1154-1160
123. Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, Heidenreich R, Erber R, Wunder A, Tonn JC, Menger MD, Breier G. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Invest*. 2002;109:777-785
124. Tait CR, Jones PF. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol*. 2004;204:1-10
125. Sullivan CC, Du L, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12331-12336
126. Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Yuan JX, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 2003;348:500-509
127. Chong AY, Caine GJ, Freestone B, Blann AD, Lip GY. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:423-428
128. Chong AY, Caine GJ, Lip GY. Angiopoietin/tie-2 as mediators of angiogenesis: a role in congestive heart failure? *Eur J Clin Invest*. 2004;34:9-13

129. Calvi C, Dentelli P, Pagano M, Rosso A, Pegoraro M, Giunti S, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. Angiopoietin 2 induces cell cycle arrest in endothelial cells: a possible mechanism involved in advanced plaque neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:511-518

130. Chung NA, Makin AJ, Lip GY. Measurement of the soluble angiopoietin receptor tie-2 in patients with coronary artery disease: development and application of an immunoassay. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:529-535

131. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039

132. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *Faseb J.* 1997;11:457-465

133. Webb NJ, Myers CR, Watson CJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF). *Cytokine.* 1998;10:254-257

134. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2001;189:197-206

135. Lee S, Zheng M, Kim B, Rouse BT. Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. *J Clin Invest.* 2002;110:1105-1111

136. Scapini P, Nesi L, Morini M, Tanghetti E, Belleri M, Noonan D, Presta M, Albini A, Cassatella MA. Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. *J Immunol.* 2002;168:5798-5804

137. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84:9238-9242

138. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999;79:181-213

139. Griffin JD, Spertini O, Ernst TJ, Belvin MP, Levine HB, Kanakura Y, Tedder TF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, and their precursors. *J Immunol.* 1990;145:576-584

140. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest.* 1998;102:1526-1533

141. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, Gopalan PK, Lynam EB, Sklar LA, Smith CW. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via the Mac-1 (CD11b/CD18) beta 2-integrin. *J Immunol.* 1995;155:1502-1514

142. Gopalan PK, Smith CW, Lu H, Berg EL, McIntire LV, Simon SI. Neutrophil CD18-dependent arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow can be activated through L-selectin. *J Immunol.* 1997;158:367-375

143. Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol.* 1997;159:952-963

144. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science.* 1989;245:1238-1241

145. Diaz-Gonzalez F, Gonzalez-Alvaro I, Campanero MR, Mollinedo F, del Pozo MA, Munoz C, Pivel JP, Sanchez-Madrid F. Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest.* 1995;95:1756-1765

146. Hartwell DW, Mayadas TN, Berger G, Frenette PS, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J Cell Biol.* 1998;143:1129-1141
147. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol.* 1992;118:445-456
148. Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skoloff G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft R, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med.* 1999;190:1769-1782
149. Hidari KI, Weyrich AS, Zimmerman GA, McEver RP. Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Biol Chem.* 1997;272:28750-28756
150. Pober JS, Lapierre LA, Stolpen AH, Brock TA, Springer TA, Fiers W, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Gimbrone MA, Jr. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol.* 1987;138:3319-3324
151. Min W, Pober JS. TNF initiates E-selectin transcription in human endothelial cells through parallel TRAF-NF-kappa B and TRAF-RAC/CDC42-JNK-c-Jun/ATF2 pathways. *J Immunol.* 1997;159:3508-3518
152. Forlow SB, White EJ, Barlow SC, Feldman SH, Lu H, Bagby GJ, Beaudet AL, Bullard DC, Ley K. Severe inflammatory defect and reduced viability in CD18 and E-selectin double-mutant mice. *J Clin Invest.* 2000;106:1457-1466
153. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000;28:311-339

154. Humphries MJ, McEwan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Paul Mould A. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci.* 2003;28:313-320
155. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2002;31:485-516
156. Gerard C, Gerard NP. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:775-808
157. Alon R, Grabovsky V, Feigelson S. Chemokine induction of integrin adhesiveness on rolling and arrested leukocytes local signaling events or global stepwise activation? *Microcirculation.* 2003;10:297-311
158. Binnerts ME, van Kooyk Y, Simmons DL, Figdor CG. Distinct binding of T lymphocytes to ICAM-1, -2 or -3 upon activation of LFA-1. *Eur J Immunol.* 1994;24:2155-2160
159. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell.* 1988;52:925-933
160. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol.* 1986;137:1270-1274
161. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol.* 1986;137:245-254
162. Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA, Jr. Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol.* 1986;136:1680-1687

163. Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol.* 1986;137:1893-1896
164. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature.* 1989;339:61-64
165. de Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med.* 1991;174:253-267
166. Hubbard AK, Rothlein R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:1379-1386
167. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol.* 2003;139:329-336
168. Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res.* 2000;86:952-959
169. Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res.* 1999;58:224-237
170. Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 1999;18:5356-5362
171. Shaw JP, Basch R, Shamamian P. Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;32:168-175

172. Marron MB, Hughes DP, Edge MD, Forder CL, Brindle NP. Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2. *J Biol Chem.* 2000;275:39741-39746
173. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med.* 2003;9:936-943
174. Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:409-420
175. Takagi J, Springer TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev.* 2002;186:141-163
176. Ma YQ, Plow EF, Geng JG. P-selectin Binding to P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Induces an Intermediate State of $\alpha M\beta 2$ Activation and Acts Cooperatively with Extracellular Stimuli to Support Maximal Adhesion of Human Neutrophils. *Blood.* 2004