

Université de Montréal

**La synthèse de NETs par les angiopoïétines -1 et -2
contribue à des activités pro-inflammatoires et
pro-angiogéniques**

par

Simon Lavoie

Département de pharmacologie et physiologie,
Université de Montréal, Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en pharmacologie,
Option pharmacologie intégrative cardiovasculaire

Août 2017

© Simon Lavoie, 2017

RÉSUMÉ

Les angiopoïétines (Ang1 et Ang2) sont des protéines reconnues pour leur implication dans le processus angiogénique. La découverte de leur récepteur (Tie2) à la surface des neutrophiles a permis d'étudier leur rôle dans certaines activités pro-inflammatoires des neutrophiles comme leur adhésion aux cellules endothéliales (CE), l'augmentation de leur viabilité et la synthèse et relâche de diverses cytokines. Récemment, il a été démontré que les neutrophiles peuvent relâcher des *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), des filaments d'ADN sous forme de toile en réponse à une infection ou à l'inflammation. Puisque les angiopoïétines ont la capacité d'activer les neutrophiles, nous avons voulu déterminer leur effet sur la relâche de NETs, et le rôle de ceux-ci dans des situations pro-inflammatoires et pro-angiogéniques *in vitro*. Des neutrophiles humains ont été isolés à partir de sang de donneurs sains en accord avec le comité d'éthique de l'Institut de cardiologie de Montréal. Nous avons observé que l'Ang1 et l'Ang2, seules ou combinées (10 nM; 3 heures) augmentent la relâche de NETs ($\approx 2,5$ fois) comparativement aux neutrophiles stimulés au PBS. Cette NETose est dépendante du récepteur Tie2, et requiert la participation des voies de signalisation PI3K, p38 et p42/44 MAPK, de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de la relâche du calcium intracellulaire, et de l'activation de la protéine arginine déiminase 4 (PAD4). Ces NETs isolés induisent l'activation des neutrophiles et des CE, menant à l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire humaine (hECM) et à des CE provenant des veines de cordons ombilicaux humains (HUVEC). Ces NETs induisent aussi la formation *in vitro* de tubules de type capillaire chez les HUVEC. Cette étude est la première à rapporter la capacité des deux angiopoïétines à induire la production de NETs et leur contribution dans les activités pro-inflammatoires et pro-angiogéniques des angiopoïétines.

Mots-clés : Neutrophiles, *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), Angiopoïétines, Ang1, Ang2, Cellules endothéliales, Cytokines, Molécules d'adhésion, Activation cellulaire, Chimiotaxie, Inflammation, Angiogenèse, Humain

ABSTRACT

Angiopoietins (Ang1 and Ang2) are proteins known for their implication in angiogenesis. The discovery of their receptor (Tie2) on neutrophil surface led to numerous studies about their role in pro-inflammatory activities of neutrophils, like neutrophil adhesion onto endothelial cells (EC), pro-survival activity and synthesis and release of various cytokines. Recently, it has been reported that neutrophils have the capacity to release Neutrophil Extracellular Traps (NETs), nuclear DNA extruded in a web-like structure in response to infection or inflammation. Since angiopoietins can activate neutrophils, we address if they can induce NETs release, and if these NETs have an *in vitro* effect in pro-inflammatory and pro-angiogenic activities. Neutrophils were isolated from blood of healthy volunteers in accordance with the guidelines of the Montreal Heart Institute's ethical committee. We observed that Ang1 and Ang2, alone or combined (10 nM; 3 hours) increase NETs release (≈ 2.5 -fold) as compared to PBS-treated neutrophils. This NETosis is Tie2-dependent, and requires intracellular participation of PI3K, p38 and p42/44 MAPK pathways, ROS production, intracellular calcium release, and protein arginine deiminase 4 (PAD4) activation. These isolated NETs induced neutrophils and endothelial cells activation, leading to neutrophil adhesion onto human extracellular matrix (hECM) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and *in vitro* HUVEC capillary-like tube formation. This study is the first one to report the capacity of both angiopoietins to promote the release of NETs and to demonstrate that angiopoietins-mediated NETs contribute to pro-inflammatory and pro-angiogenic activities.

Keywords : Neutrophils, Neutrophil Extracellular Traps (NETs), Angiopoietins, Ang1, Ang2, Endothelial Cells, Cytokines, Adhesion Molecules, Cell Activation, Chemotaxis, Inflammation, Angiogenesis, Human

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	VII
ABSTRACT.....	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XVII
REMERCIEMENTS.....	XXI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 L'angiogenèse.....	3
1.1.1 L'angiogenèse physiologique.....	7
1.1.2 L'angiogenèse pathologique.....	8
1.2 Les angiopoïétines.....	11
1.2.1 Structure et localisation de l'Ang1 et l'Ang2.....	11
1.2.2 Le récepteur Tie2.....	12
1.2.3 Rôle des angiopoïétines dans l'angiogenèse.....	13
1.2.4 Rôle des angiopoïétines dans l'inflammation.....	14
1.2.5 Mécanismes intracellulaires des angiopoïétines.....	17
1.2.6 Implications pathologiques.....	19
1.3 Le neutrophile.....	21
1.3.1 La diapédèse des neutrophiles.....	21
1.3.2 Rôle des neutrophiles dans la réponse immunitaire.....	23
1.3.3 Effets pro-inflammatoires des neutrophiles.....	25
1.3.4 Les pathologies associées aux neutrophiles.....	29
1.4 Les <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (NETs).....	31
1.4.1 Structure et composantes des NETs.....	31
1.4.2 Mécanismes de formation.....	34
1.4.3 Rôle des NETs dans l'infection.....	37
1.4.4 Rôle des NETs dans les maladies non-infectieuses.....	38
1.4.5 <i>Extracellular Traps</i> non-neutrophiliques.....	39
1.5 Objectifs de recherche.....	43

CHAPITRE 2 : ARTICLE.....	45
2.1 Abstract.....	49
2.2 Introduction.....	51
2.3 Material and Methods	55
2.4 Results	61
2.5 Discussion.....	69
2.6 References	77
2.7 Acknowledgments	89
2.8 Conflict of interest disclosure	91
2.10 Footnotes	93
2.11 Figure Legends	95
2.12 Figures.....	101
2.14 Supplemental Data.....	115
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	117
3.1 Les angiopoïétines induisent la NETose.....	119
3.2 Mécanismes d’actions de la NETose induite par l’Ang1 et l’Ang2	121
3.3 Activités biologiques liées aux NETs	125
3.3.1 Rôle des NETs dans les activités pro-inflammatoires	125
3.3.2 Rôle des NETs dans les activités pro-angiogéniques	126
CHAPITRE 4 : CONCLUSION	129
4.1 Conclusions et retour sur les objectifs	131
4.2 Perspectives futures	133
BIBLIOGRAPHIE.....	135
ANNEXE.....	153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Mécanismes d'actions des principaux facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques.....	6
Tableau II. Protéines colocalisées avec les NETs.....	33

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Le bourgeonnement angiogénique.....	4
Figure 1.2. Représentations des deux différents types d'angiogenèse.....	5
Figure 1.3. L'angiogenèse des tumeurs solides.	9
Figure 1.4. La famille des angiopoïétines.	11
Figure 1.5. Mécanismes intracellulaires impliqués dans la signalisation des angiopoïétines avec Tie2 exprimé sur des cellules endothéliales.	18
Figure 1.6. Les étapes de la diapédèse des neutrophiles.	23
Figure 1.7. La production de NETs par les neutrophiles : observation par microscopie confocale.	31
Figure 1.8. Formation et structures des NETs : observation par microscopie électronique.	32
Figure 1.9. Représentations des différents types de NETose.....	36

ARTICLE

Figure 1. <i>Angiopoietins induce NETosis in human neutrophils.</i>	101
Figure 2. <i>Intracellular mechanisms involved in angiopoietins-mediated NETosis.</i> ...	103
Figure 3. <i>Angiopoietins-mediated NETosis is dependent on ROS production.</i>	105
Figure 4. <i>NETs-mediated neutrophil adhesion onto hECM.</i>	107
Figure 5. <i>NETs-mediated neutrophil adhesion onto HUVEC.</i>	109
Figure 6. <i>Pro-angiogenic effects of angiopoietins-mediated NETs.</i>	111
Figure 7. <i>Proposed schematic illustration of mechanisms associated to angiopoietins-mediated NETosis: role of NETs onto neutrophil and endothelial cell activation.</i>	113
Figure S1. <i>Detection of NETs by confocal immunofluorescence microscopy.</i>	115

ANNEXE

Figure A1. Implication des neutrophiles dans les activités inflammatoires et angiogéniques des angiopoïétines chez la souris 153

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABIN	<i>A20-binding inhibitor of NF-κB activation</i>
ADNdb	ADN double brin
ADNmt	ADN mitochondrial
Ang1	angiopoïétine 1
Ang2	angiopoïétine 2
ARNm	acide ribonucléique messenger
BPI	<i>bactericidal/permeability-increasing protein</i>
CCL2	<i>chemokine ligand 2</i>
CE	cellule endothéliale
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CML	cellule musculaire lisse
DNAse I	désoxyribunocléase I
DOKR	<i>tyrosine kinase-related protein</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
ETs	<i>Extracellular Traps</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GGT	glutamyl-transpeptidases
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HbA1c	hémoglobine glyquée
hECM	<i>Human extracellular matrix</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interféron
Ig	immunoglobuline
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
ME	matrice extracellulaire
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>

MNDA	<i>myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>
MPO	myéloperoxydase
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NE	<i>neutrophil elastase</i>
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	oxide nitrique
PAD4	protéine arginine déiminase 4
PAF	facteur d'agrégation plaquettaire
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial-cell adhesion molecules-1</i>
PF-4	<i>platelet factor 4</i>
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate
PIP3	phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	polymorphonucléaire
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
ROS	dérivé réactif de l'oxygène
TEM	<i>Tie2-expressing monocytes</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor</i>
Tie	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains</i>
TLR	<i>toll-like receptors</i>
TNFR	<i>tumor necrosing factor receptor</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
TSP	Thrombospondine
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>

À mes grands-parents, qui sont très fiers de moi

REMERCIEMENTS

Un travail de si longue haleine ne pourrait s'effectuer sans l'aide et le support de précieux collègues, famille et amis. Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, le docteur Martin Sirois, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour ton temps, tes conseils et d'avoir partagé tes nombreuses anecdotes avec le « Dividu toujours très douteux ». Merci aussi à mon codirecteur, le docteur Michel White, pour son constant intérêt et sa grande curiosité à chacun des résultats que je lui ai présentés. J'aimerais ensuite remercier les docteurs Audrey Claing et Daniel Gagnon pour le temps qu'ils consacreront à corriger cet ouvrage. Merci également à la Fondation de l'Institut de cardiologie de Montréal pour leur soutien financier.

Ensuite, je tiens à remercier les nombreux collègues avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler tout au long de ma maîtrise. Plus particulièrement, merci au docteur Paul-Eduard Neagoe qui a su m'intégrer tant au travail en laboratoire qu'à la vie sociale de l'ICM. Nos nombreuses discussions et aventures qui dépassaient bien souvent le cadre professionnel sont, pour moi, des moments inoubliables. Merci au docteur Branka Vulesevic qui est rapidement devenue un apport essentiel à ce travail. Malgré nos différences linguistiques et générationnelles, tes conseils professionnels m'auront toujours amené plus loin alors que nos échanges personnels auront su égayer les moments plus difficiles. Merci à Élisabeth Dumas pour la mise en place de ce projet. Ta bonne humeur, ta rigueur et ton intérêt scientifique ont été des modèles dès mon arrivée. Merci à Louis Villeneuve pour son aide technique et ses blagues qui ont permis de rendre le temps passé en microscopie confocale si agréable. Mes remerciements vont ensuite aux stagiaires Guillaume Dagher, David Bélisle et Marina Boucher pour leur confiance et leur précieuse aide. Finalement, un énorme merci à mon ami Alexandre «Bergy» «'tit-boutte» Bergeron. Ton soutien, ta complicité et ton humour nous auront donné une réputation de vieux couple au sein de l'ICM. Il ne fait nul doute que nos diplômes prouvent que nous serons « toujours un pas en avant des autres! »

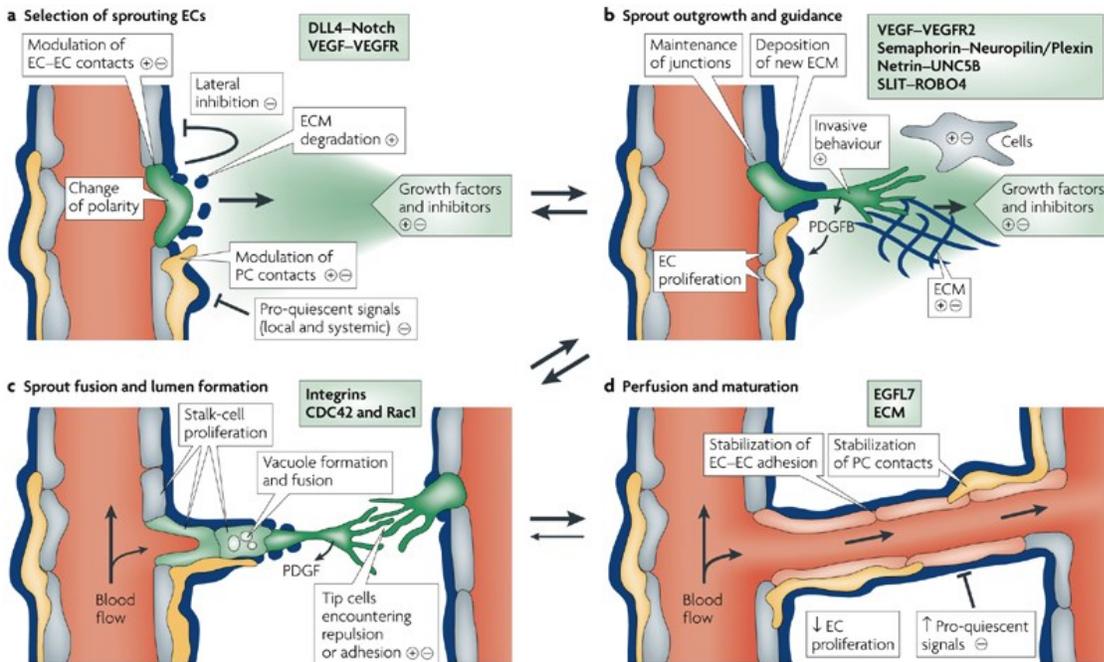
Je voudrais remercier tout spécialement mes parents, Johanne et Michel. Merci pour votre soutien, votre écoute, vos encouragements dans tout ce que j'entreprends, et d'être des modèles dans de nombreuses sphères de ma vie. Merci aussi à mon frère et à tous les autres membres de ma famille qui ont bien souvent dû endurer mes charabias scientifiques. Finalement, je remercie Marie-Florence pour son support, son écoute, son humour et son amour. Merci d'être toujours présente à mes côtés et de rendre chaque jour avec toi aussi merveilleux.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation des nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants [1] dans le but de transporter l'oxygène et les nutriments vers les cellules et d'éliminer leurs déchets [2]. L'angiogenèse est un phénomène complexe, finement régulé, de façon précise durant de courtes périodes avant d'être ensuite complètement inhibé [3]. Bien qu'essentielle dans de nombreux processus physiologiques (développement fœtal, reproduction et cicatrisation), l'angiogenèse est aussi impliquée dans plusieurs pathologies comme les cancers à tumeurs solides, la rétinopathie diabétique, l'athérosclérose ou encore l'arthrite rhumatoïde [4, 5].

Il existe deux types d'angiogenèse : le bourgeonnement et l'intussusception. Le premier type se caractérise par la sélection d'un « bourgeon », c'est-à-dire où une cellule endothéliale (CE) guide le réarrangement des CE environnantes. D'abord, lorsqu'un vaisseau en processus de quiescence détecte un environnement pro-angiogénique (environnement hypoxique, blessure, tumeur, etc.), les CE et les autres cellules environnantes relâchent des facteurs tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et l'angiopoiétine-2 (Ang2) dans le but de relâcher les jonctions serrées endothéliales, de détacher la membrane basale du vaisseau et d'augmenter la perméabilité vasculaire. Des protéases viennent ensuite dégrader la matrice extracellulaire (ME) et une CE particulière, la cellule en pointe (*tip cell*), est choisie parmi toutes les autres CE par un mécanisme complexe de signaux pro-angiogéniques pour guider la formation du bourgeon (Figure 1.1). Les autres CE prolifèrent et s'alignent pour former un tube et rejoindre un autre bourgeon provenant d'un autre vaisseau sanguin. De nouvelles cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses; CML) sont recrutées et des facteurs stabilisateurs sont sécrétés pour resserrer les nouvelles jonctions endothéliales et favoriser le recrutement et la migration des péricytes et permettre la maturation du nouveau vaisseau sanguin [6-9].

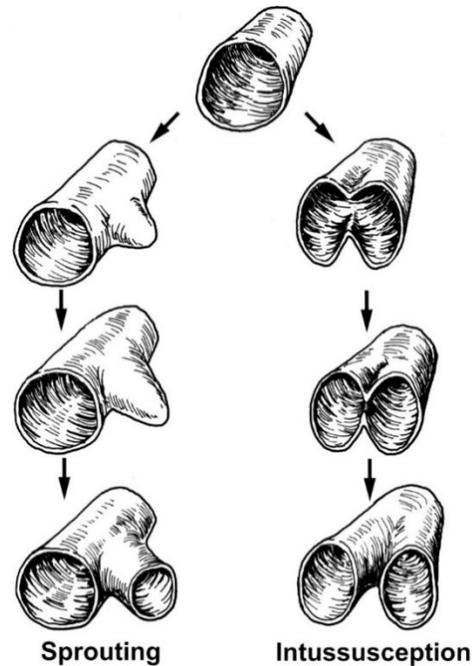


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 1.1. Le bourgeonnement angiogénique. À la suite du signal pro-angiogénique, les CE relâchent des facteurs déstabilisateurs pour le vaisseau et une CE particulière est choisie pour guider la formation du bourgeon (A). Les CE prolifèrent, s'alignent sous la forme de tube et rejoignent un autre bourgeon (B-C). Des facteurs stabilisateurs sont sécrétés et assurent le recrutement de cellules murales et la maturation du nouveau vaisseau (D). Reproduit avec la permission de *Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Copyright® 2007 [8].

Quant à l'intussusception, elle consiste en la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un vaisseau actuel qui se divise en deux. Contrairement au bourgeonnement, elle nécessite seulement un réarrangement des CE et survient majoritairement lorsqu'une action rapide avec des ressources limitées est nécessaire (ex : développement embryonnaire). D'abord, deux parois opposées d'un capillaire s'affaissent pour se rejoindre en un point de contact. Les jonctions endothéliales sont ensuite réorganisées afin de laisser entrer les facteurs de croissance et les cellules murales. Finalement, ces dernières libèrent des fibres de collagène et forment une nouvelle ME, finalisant le processus en séparant le vaisseau initial en deux tubes matures [10].

Figure 1.2. Représentations des deux différents types d'angiogenèse. À gauche, un vaisseau sanguin répond à des niveaux bas en oxygène dans des tissus peu perfusés par la formation de bourgeons qui, une fois matures, formeront de nouvelles connexions vasculaires. À droite, un vaisseau mature se sépare en deux vaisseaux indépendants (intussusception) afin de réorganiser rapidement le système capillaire déjà existant. Reproduit de [6].



L'angiogenèse est finement régulée par de nombreux facteurs de croissance pro- ou anti-angiogéniques. L'un des mieux caractérisés à ce jour est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Découvert en 1983, le VEGF est en fait une famille comportant plusieurs analogues, soit le *placental growth factor* (PlGF), le VEGF-A, VEGF-B, le VEGF-C et le VEGF-D et la plupart de ces analogues sont sous-catégorisés en plusieurs isoformes tels que le VEGF-A₁₆₅ (en référence à son nombre d'acides aminés), l'isoforme le plus abondant et le plus puissant chez l'humain [11, 12]. Par sa liaison au récepteur VEGFR-2 sur les CE, le VEGF-A₁₆₅ induit des activités pro-angiogéniques, soit la prolifération, la migration et la survie des CE, tout en augmentant la perméabilité endothéliale [13, 14]. Le récepteur VEGFR-1 est retrouvé à la surface des monocytes, macrophages, neutrophiles, cellules musculaires et CE, mais aussi sous forme soluble. Il lie aussi le VEGF-A₁₆₅ avec une affinité dix fois plus élevée que le VEGFR-2, mais cette liaison induit par contre une très faible activité angiogénique. Ainsi, la formation du complexe VEGFR-1/VEGF-A₁₆₅ réduit la liaison VEGFR-2/VEGF-A₁₆₅ et inhibe indirectement les effets décrits précédemment [15, 16].

Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) est une famille comportant 22 analogues, mais les plus étudiés demeurent les FGF-1 et FGF-2. Par sa liaison possible

aux sept différents récepteurs des FGF, le FGF-1 est un facteur pro-angiogénique possédant un champ d'action très large. Il peut donc stimuler la prolifération et la différenciation de tous les types cellulaires nécessaires à la formation de capillaires, mais aussi de vaisseaux artériels, ce que le VEGF est incapable de faire à lui seul [17-19]. Le FGF-2 est un peu moins puissant que le FGF-1, car il agit seulement au niveau des CE pour leur prolifération et leur organisation, selon un mécanisme très semblable au VEGF. De plus, certaines études rapportent un effet autocrine sur la production de VEGF par le FGF-2 pour amplifier l'angiogenèse [17, 20, 21].

Pro-angio.	Mécanismes	Anti-angio.	Mécanismes
VEGF	↑ migration, prolifération, survie cellulaire. ↑ perméabilité vasc.	VEGFR-1	Récepteur leurre pour VEGF, inhibe indirectement les effets du VEGF
FGF	Prolifération & différenciation	TSP-1, -2	↓ migration/prolifération, ↑ apoptose
Ang1	Stabilisation vasculaire	Endostatine	↑ apoptose des CE
PDGF	Recrutement CML	IFN-α, -β	↓ prolifération, ↓ production
TGF-β	Formation ME	Angiostatine	↓ migration/prolifération, ↑ apoptose
TNF-α	Activation cellulaire	PF-4	↓ effets du FGF et VEGF
CCL2	Recrutement lymphocytes		

Tableau I. Mécanismes d'actions des principaux facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques. Liste non exhaustive des principaux inducteurs et inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse. Certains facteurs pourraient avoir des effets à la fois pro- et anti-angiogéniques selon le contexte particulier. [22, 23].

De nombreux autres facteurs participent à la formation des nouveaux vaisseaux. Le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) joue principalement un rôle dans la production d'une nouvelle ME et dans l'activation des récepteurs aux intégrines. Le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) est quant à lui une cytokine inflammatoire promouvant la différenciation des CE et stimulant la production d'autres facteurs pro-angiogéniques par les autres types cellulaires [22]. Les angiopoïétines, joueurs tout aussi importants, seront abordées dans la section 1.2 de cet ouvrage. D'autres participants ont un rôle inversé : l'endostatine bloque l'action du FGF-2 alors que l'angiostatine inhibe

la migration des CE [23]. Évidemment, les études portant sur les facteurs endogènes sont nombreuses et bien que le **Tableau I** résume les rôles des acteurs principaux, les facteurs, leurs interactions et leurs rôles respectifs ne cesseront d'être mieux définis tant que l'angiogenèse restera impliquée dans de nombreuses situations physiologiques et pathologiques.

1.1.1 L'angiogenèse physiologique

C'est au cours de l'embryogenèse que l'angiogenèse permet la formation du système vasculaire complet à partir d'un réseau sanguin primitif. La formation de ce réseau primitif, la vasculogenèse, s'effectue à partir des cellules endothéliales progénitrices [24]. Par la suite, la vaste majorité des vaisseaux sanguins entre dans un état de quiescence, à l'exception de ceux contribuant à l'engorgement vasculaire de l'endomètre lors du cycle menstruel ou à la formation du placenta lors de la grossesse. En fait, l'utérus est le seul tissu chez le mammifère adulte qui subit un cycle régulier de croissance et de régression des vaisseaux sanguins. Durant la transition entre la phase folliculaire et lutéale du cycle menstruel, l'angiogenèse est un processus excessivement présent dans l'endomètre et le *corpus luteum* (corps jaune). En absence de fécondation, ces nouveaux vaisseaux sanguins seront rejetés de l'endomètre. Toutefois, lors de la fécondation, l'angiogenèse s'intensifie pour supporter la croissance de l'embryon et du placenta [25, 26].

Les CE conservent tout de même leur capacité de division cellulaire afin de permettre la réparation des tissus en réponse à une blessure ou lors de la croissance musculaire. Lors d'une blessure, l'environnement hypoxique, la présence d'acide lactique et l'activation des facteurs de coagulation amènent une prolifération endothéliale ainsi qu'un recrutement des leucocytes et des plaquettes afin de produire des facteurs pro-angiogéniques. Lorsque la cicatrisation est complétée, l'environnement est davantage perfusé et oxygéné, réduisant ainsi la prolifération cellulaire et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. Certains vaisseaux sanguins non nécessaires seront détruits par apoptose [27, 28]. Lors de la croissance cellulaire suivant un exercice physique prolongé, la demande croissante en oxygène par les muscles squelettiques crée un environnement hypoxique détecté par les CE et compensé à long terme par la

formation de nouveaux vaisseaux sanguins [29, 30]. Finalement, le mécanisme est similaire lors d'un séjour prolongé en haute altitude où la faible pression atmosphérique rend plus difficile la diffusion de l'oxygène au niveau alvéolo-capillaire créant ainsi un environnement hypoxique [31].

1.1.2 L'angiogenèse pathologique

Comme dans plusieurs mécanismes physiologiques, l'angiogenèse requiert une homéostasie permettant de garder un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Évidemment, un déséquilibre de cette homéostasie engendre un état pathologique. Par exemple, une surproduction du récepteur VEGFR-1 soluble se liera au VEGF circulant et inhibera les effets du VEGF, tel que sa capacité à induire la production de monoxyde d'azote (NO), engendrant ainsi une augmentation de la pression artérielle et une augmentation des risques de prééclampsie [32]. Au contraire, une diminution de VEGF est observée dans les troubles d'ischémie-reperfusions [33]. Un environnement hypoxique et une surproduction de facteurs pro-angiogéniques peuvent induire une angiogenèse pathologique menant à de nombreuses maladies telles que la rétinopathie, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et la formation de tumeurs solides dans certains cancers [34]. À cet effet, le rôle de l'angiogenèse est primordial puisqu'une tumeur sans apport en oxygène et nutriments via une vascularisation développée est incapable de croître au-delà de 2 mm³. La croissance tumorale est donc dépendante de l'angiogenèse effectuée à partir des vaisseaux sanguins situés dans les tissus environnants grâce, entre autres, à l'apport en facteurs de croissance produits par les cellules tumorales en réponse à l'hypoxie [35, 36]. Ainsi, l'angiogenèse tumorale est une cible de choix dans le traitement du cancer. Des exemples de traitements déjà approuvés incluent le bevacizumab (Avastin®) qui cible le VEGF-A, ou le sorafenib (Nexavar®) et le sunitinib (Sutent®) qui ciblent les récepteurs au VEGF et au PDGF. Ces traitements sont administrés en combinaison avec la chimiothérapie [37, 38].

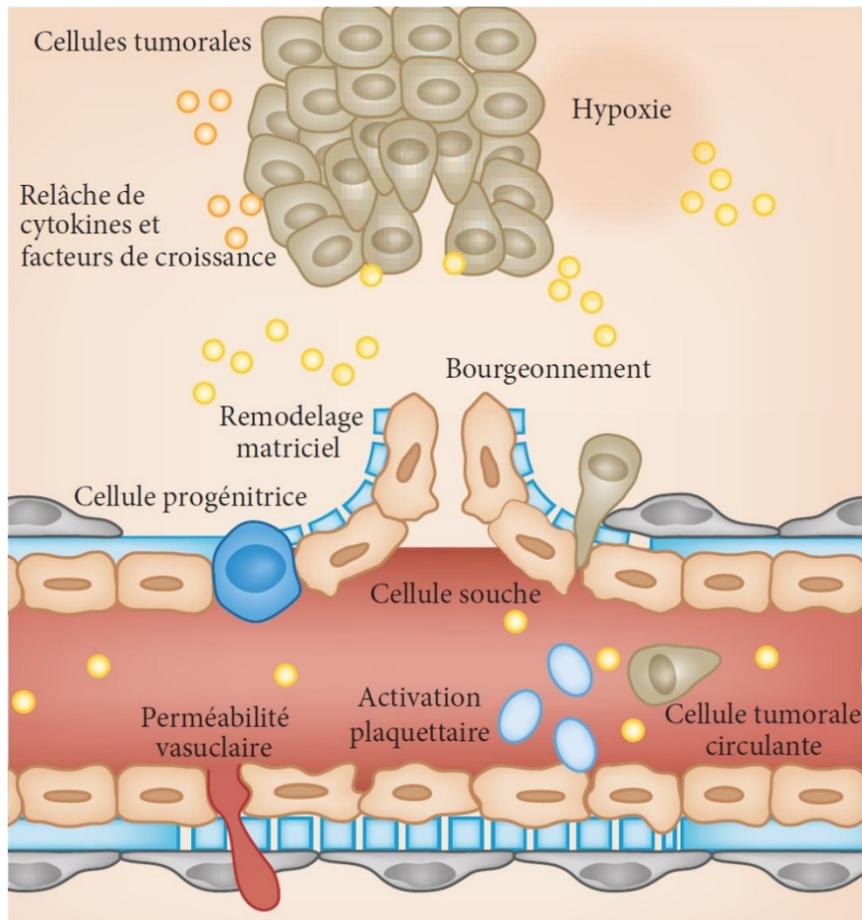


Figure 1.3. L'angiogenèse des tumeurs solides. À la suite de la croissance tumorale, un environnement hypoxique est créé et les cellules tumorales sécrètent des cytokines et facteurs de croissance pro-angiogéniques. Des cellules périvasculaires se détachent du vaisseau mature et compromettent son intégrité. Des cellules souches cancéreuses peuvent se différencier et participer à la formation de nouveaux vaisseaux. Cet environnement permet aussi de faciliter la migration de cellules tumorales dans la circulation sanguine, menant à la formation de métastases. Reproduit et traduit de l'anglais avec la permission de *Macmillan Publishers Ltd: Nature Medicine*, Copyright® 2011 [37].

Il est aussi possible de traiter l'angiogenèse pathologique par des traitements non médicamenteux. Par exemple, chez les patients atteints de maladies coronariennes où les traitements conventionnels (angioplastie, endoprothèse et pontage aorto-coronarien) ont démontré peu de succès, il est possible d'appliquer une approche plus innovante telle que la revascularisation transmyocardique au laser. Cette technique permet de créer de petits canaux qui se refermeront presque immédiatement sur eux-mêmes. Toutefois, les

plaquettes, myocytes et autres cellules inflammatoires sanguines se lient au niveau des sites traités et seront activées pour produire des facteurs pro-angiogéniques et stimuler l'angiogenèse. Pour traiter les plaies de surface, il est possible de placer le patient dans une chambre hyperbare, c.-à-d. où la pression en oxygène est augmentée graduellement à un niveau beaucoup plus haut que le niveau physiologique. Dans cet environnement, le plasma sanguin transporte davantage d'oxygène, stimulant la prolifération des CE et l'angiogenèse dans les tissus ischémiques [39-41]. Finalement, dans les cas de plaies importantes avec pertes de peau telles que les brûlures, des matériaux biocompatibles contenant des matrices et des facteurs angiogéniques peuvent être utilisés pour favoriser la guérison [39, 42].

1.2 Les angiopoïétines

Les angiopoïétines sont une famille de facteurs de croissance vasculaire découverte durant les années 1990 et jouant un rôle essentiel dans l'angiogénèse pré- et postnatale [44-46]. Elles sont particulièrement impliquées dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'état de quiescence des vaisseaux sanguins. De plus, elles poursuivent le processus angiogénique de concert avec les effets du VEGF [47].

1.2.1 Structure et localisation de l'Ang1 et l'Ang2

La famille des angiopoïétines est composée de quatre membres, soit l'Ang1, Ang2, Ang3 et Ang4, toutes comportant environ 500 acides aminés. Elles partagent une structure similaire composée d'un domaine *coiled-coil* situé dans la partie N-terminale, suivie d'un domaine semblable au fibrinogène situé dans la partie C-terminale (Figure 1.4). Alors que la partie C-terminale permet la liaison des angiopoïétines à leur récepteur Tie2 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology domains*), c'est la partie N-terminale qui permet l'oligomérisation des angiopoïétines (sous forme de trimères, tétramères et pentamères), essentiel pour l'activation de leur

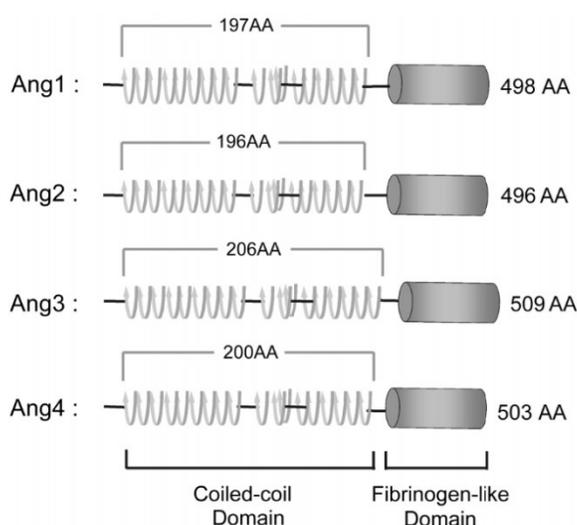


Figure 1.4. La famille des angiopoïétines. Les quatre angiopoïétines sont similaires par leur taille (≈ 500 acides aminés), leur domaine *coiled-coil* et leur domaine de type fibrinogène. Reproduit de [43].

récepteur. Ang1 et Ang2 sont les angiopoïétines les mieux caractérisées. Elles sont respectivement localisées sur le chromosome 8q22 et 8q23 et leurs séquences sont homologues à 60% [45-49]. Ang3 et Ang4 sont orthologues interespèces : Ang3 est exprimée seulement chez la souris alors qu'Ang4 n'est présente que chez l'humain. Elles agissent aussi via le récepteur Tie2 et induisent certains effets angiogéniques sur les CE [48, 50].

Chez l'adulte, on retrouve Ang1 de manière constitutive dans les péricytes, les CML, les fibroblastes ainsi que dans différents tissus tels que l'utérus, le système nerveux central, le pancréas et les intestins [45]. Durant le développement embryogénique, Ang1 est présent d'abord dans les cellules du myocarde puis dans les cellules du mésenchyme autour des vaisseaux en formation [46, 51]. De plus, notre laboratoire a démontré la présence d'Ang1 dans le cytosol des neutrophiles [52]. Lors des situations permettant l'angiogenèse physiologique (réparation d'un vaisseau, cycle menstruel, etc.), l'environnement hypoxique ainsi que les cytokines et facteurs de croissance stimulent l'expression et la relâche d'Ang1 [53].

Contrairement à Ang1, Ang2 est peu exprimée constitutivement. L'Ang2 est exprimée principalement dans les CE, où elle est contenue dans les corps de Weibel-Palade et relâchée rapidement suite à différents stimuli. En conditions physiologiques, l'expression de l'Ang2 est stimulée lorsque le remodelage vasculaire est nécessaire, par exemple lors de la vascularisation de la rétine ou lors de la régression du *corpus luteum* chez la femme lors du cycle ovarien [46, 54, 55]. L'expression est aussi augmentée dans les cellules tumorales et dans les vaisseaux sanguins tumoraux [56, 57].

1.2.2 Le récepteur Tie2

Le récepteur Tie2 est d'abord un membre de la famille des récepteurs Tie (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology domains*), des récepteurs de type tyrosine kinase. Cette famille se compose de Tie1 et Tie2, deux récepteurs aux structures semblables et possédant un poids moléculaire de 135 et 150 kDa respectivement. Définis comme récepteurs orphelins lors de leur découverte en 1992, il a été démontré qu'ils sont localisés à la surface des CE vasculaires et lymphatiques. Bien que les deux récepteurs soient très similaires dans leur domaine cytoplasmique (plus de 75% homologue), leur domaine extracellulaire est cependant très différent (seul 33% de leur séquence est homologue). De ce fait, les angiopoïétines lient seulement le récepteur Tie2, et non Tie1. Les deux récepteurs ont des structures extracellulaires incluant trois domaines de type immunoglobuline (Ig), suivies de trois domaines de type *epidermal growth factor* (EGF), de trois répétitions de fibronectine de type 3 et de deux domaines intracellulaires de type tyrosine kinase. Ce dernier domaine

de type tyrosine kinase à la particularité de pouvoir se lier à différentes molécules suite à son autophosphorylation [44, 58-61].

Le récepteur Tie2 est exprimé chez l'adulte et chez l'embryon dans l'endothélium, les cellules hématopoïétiques, les cellules précurseurs des CE et les cellules épithéliales du cristallin [62-64]. On le retrouve aussi dans les cellules tumorales de plusieurs types de cancers différents [65-67]. De plus, Tie2 est localisé sur les éosinophiles, sur environ 20% des monocytes (*Tie2-expressing monocytes*; TEM) et sur les neutrophiles [68-71]. Notons que l'expression de Tie2 peut être induite par un environnement hypoxique et par l'action de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ou de facteurs de coagulation (thrombine) [72, 73]. Pour faire suite à la liaison d'Ang1 à Tie2, le récepteur subit une dimérisation suivie d'une activation très rapide du domaine cytoplasmique par l'autophosphorylation des résidus kinases, ce qui amène une activation des voies de signalisation intracellulaires [63] (voir 1.2.5 Mécanismes intracellulaires des angiopoïétines). Quant au récepteur Tie1, malgré de nombreuses études, il demeure un récepteur orphelin présent à la surface des CE [74]. Cependant, un modèle de souris transgénique Tie1^{-/-} démontre que Tie1 est essentiel pour la viabilité de l'embryon, plus spécifiquement pour l'intégrité des capillaires sanguins et lymphatiques [75]. Il a été démontré que Tie1 a des interactions avec Tie2 et l'hypothèse actuelle serait que Tie1 agirait à titre de corécepteur de Tie2 et régulerait son expression et son activation. Seul, Tie1 n'active cependant pas de voie de signalisation intracellulaire [76, 77].

1.2.3 Rôle des angiopoïétines dans l'angiogenèse

Durant l'angiogenèse par bourgeonnement, l'interaction entre les deux angiopoïétines et le récepteur Tie2 régule la transition des CE quiescentes vers leur phase activée. Ainsi, Ang1 agit d'abord dans le bourgeonnement vasculaire comme un agent chimiotactique des CE en stimulant la migration de ceux-ci [78-80]. Ang1 induit aussi la maturation des nouveaux vaisseaux par la stabilisation des jonctions CE-CE, par le recrutement des péricytes et des CML, ou encore par l'augmentation de la survie des CE. De ce fait, une surexpression d'Ang1 chez un modèle murin cause une augmentation de la densité et de l'embranchement des vaisseaux sanguins, alors qu'un modèle transgénique Ang1^{-/-} ne

permet pas l'interaction entre les cellules de support et les CE, empêchant le remodelage du système vasculaire et rendant l'embryon non viable après 11 jours [51, 81].

À l'opposé d'Ang1, Ang2 a été originellement identifiée en tant qu'antagoniste de Tie2 induisant l'apoptose des CE et la perméabilité endothéliale. Sa participation est toutefois essentielle à l'initiation du processus angiogénique puisqu'elle induit la déstabilisation de l'endothélium quiescent par le détachement des CE avec les cellules murales [46]. Conséquemment, l'endothélium maintenant instable permet l'infiltration de protéases, cytokines et cellules progénitrices qui, grâce à l'effet subséquent du VEGF, permettront une forte réponse pro-angiogénique [82]. Le ratio Ang1/Ang2 détermine donc l'état angiogénique vasculaire : à l'état quiescent, la prédominance d'Ang1 fait pencher le ratio en sa faveur alors que suite à l'activation des CE, l'Ang2 est relâchée des corps de Weibel-Palade et amène un changement du ratio en faveur de l'Ang2. Par contre, la présence du VEGF est essentielle pour que le bourgeonnement de capillaires succède à la déstabilisation vasculaire induite par l'Ang2. Dans le cas d'une absence de VEGF, l'action d'Ang2 provoque une régression vasculaire et la mort des CE [83].

Plus récemment, des études ont démontré qu'Ang2 possède aussi la capacité d'agir à titre d'agoniste du récepteur Tie2 et entraîne sa phosphorylation [84-86]. Cette activation du récepteur lui permet d'induire la migration des CE, la formation de tubules capillaires et l'augmentation de la viabilité des CE, mais de manière moins importante que l'Ang1 [87, 88]. Il a aussi été démontré que l'Ang2 joue le rôle d'agoniste dans le recrutement des cellules endothéliales progénitrices et qu'elle promeuve l'adhésion de ces cellules aux CE [89].

1.2.4 Rôle des angiopoïétines dans l'inflammation

La réponse inflammatoire est un moyen de défense naturelle en réponse à un dommage tissulaire causé par des agents physiques (une brûlure, un trauma, etc.) ou chimiques (des toxines), une infection, ou encore par des tissus nécrotiques. Ceci amène la sécrétion de molécules telles que les lipopolysaccharides (LPS) par les bactéries ou des interleukines (IL) par les cellules endommagées, apoptotiques ou nécrotiques [90]. Le rôle de ces molécules est d'induire les premières manifestations caractéristiques de l'inflammation, soient la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. Les molécules d'adhésion

responsable de favoriser la migration des cellules inflammatoires seront transloquées à la surface des CE. Le processus d'angiogenèse est dépendant de la réponse inflammatoire puisque la vasodilatation et la perméabilité vasculaire sont les premières étapes communes lors de ces deux processus [91]. Ainsi, plusieurs médiateurs pro-angiogéniques comme le VEGF et les angiopoïétines ont aussi un rôle important dans la réponse inflammatoire [92-95].

1.2.4.1 *Effets sur les cellules endothéliales*

Bien que dans les sections précédentes de cet ouvrage, les activités angiogéniques de l'Ang1 sont considérées comme anti-inflammatoires (stabilisation des jonctions endothéliales diminution de la perméabilité vasculaire), plusieurs groupes ont plus récemment démontré des propriétés pro-inflammatoires de l'Ang1 et l'Ang2 sur les CE. Par exemple, chez des CE aortiques bovines, les deux angiopoïétines induisent la production endothéliale du facteur d'agrégation plaquettaire (PAF), une molécule capable d'amplifier la réponse inflammatoire via la cascade de coagulation [96]. *In vitro*, Ang1 et Ang2 augmentent la translocation de la P-sélectine (permettant aux leucocytes d'adhérer à l'endothélium et d'y migrer) à la surface des CE [97]. Au niveau de la viabilité, les angiopoïétines peuvent prolonger la survie des CE, mais l'effet d'Ang2 à ce sujet dépend de certaines conditions expérimentales [78, 84, 88, 98, 99]. Certains groupes suggèrent que ce serait la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui régulerait la survie des CE en présence d'Ang2 [84, 88], alors que d'autres argumentent que ce serait via les activités pro-apoptotiques d'Ang2 [98]. Les deux angiopoïétines ont aussi l'habileté de potentialiser l'effet pro-inflammatoire des cytokines et facteurs de croissance. Dans un modèle murin, lorsque combiné au VEGF, l'Ang1 permet de former des vaisseaux sanguins plus large et plus nombreux alors que l'Ang2 permet d'en former des plus longs [100]. Aussi, en présence de TNF- α , l'Ang2 potentialise davantage l'adhésion des leucocytes aux CE [101].

1.2.4.2 *Effets sur les neutrophiles*

Puisque les angiopoïétines favorisent la translocation de la P-sélectine à la surface des CE, il est fort probable que l'Ang1 et l'Ang2 puissent moduler l'adhésion des

neutrophiles à l'endothélium. En effet, lorsque des neutrophiles humains fraîchement isolés et non stimulés sont ajoutés *in vitro* à une monocouche de CE stimulées avec Ang1 ou Ang2 à des concentrations aussi faibles que 10 pM, les neutrophiles adhèrent davantage qu'avec les CE non stimulées. De plus, lorsque les CE sont exposées aux deux angiopoïétines combinées (1 nM), un effet additif est observé quant à l'adhésion des neutrophiles aux CE, mais sans toutefois retrouver cette même additivité dans la translocation de la P-sélectine. Par cette observation, les angiopoïétines induisent soit l'activation d'une autre molécule d'adhésion endothéliale, ou bien sont en mesure d'activer directement les neutrophiles. Cette conclusion a mené à la découverte par notre laboratoire du récepteur aux angiopoïétines Tie2 à la surface des neutrophiles en 2005 [70], puis confirmée par la suite par d'autres groupes [102, 103]. Ainsi, les deux angiopoïétines peuvent induire des activités biologiques pro-inflammatoires chez les neutrophiles telles que la synthèse et la relâche de PAF et l'activation du complexe CD11b/CD18 (β_2 -intégrine), une molécule d'adhésion se liant à sa contrepartie endothéliale ICAM-1 et ICAM-2 (*Intercellular adhesion molecule*) pour permettre l'adhésion des neutrophiles aux CE [70]. Ang1 et Ang2 peuvent aussi stimuler la migration des neutrophiles et potentialiser les effets chimiotactiques de l'IL-8 [68, 71, 102].

Plus récemment, notre laboratoire a démontré que l'Ang1 et l'Ang2 possèdent des actions différentielles quant à certains de leurs effets pro-inflammatoires sur les neutrophiles. D'abord, l'Ang1 peut augmenter la viabilité des neutrophiles de manière Tie2-dépendant via la relâche d'IL-8 alors que l'Ang2 en est incapable [104, 105]. De plus, seule l'Ang1 a la capacité d'induire la synthèse d'ARN messager (ARNm) d'IL-1RA et sa relâche protéique, la synthèse d'ARNm d'IL-1 β et sa synthèse protéique, et la synthèse (ARNm et protéique) et relâche de *macrophage inflammatory protein-1 β* (MIP-1 β) et d'IL-8 [106, 107]. De manière intéressante, ces effets nécessitent tous des activités transcriptionnelles et traductionnelles et sont médiés seulement par l'Ang1, à des concentrations élevées de l'ordre de 10 nM. Ces observations suggèrent que l'Ang1 et l'Ang2 possèdent des capacités agonistiques équivalentes quant aux mécanismes intracellulaires menant à des activités biologiques non transcriptionnelles. Toutefois, seule l'Ang1, à la plus forte concentration (10 nM), est capable d'activer des mécanismes

intracellulaires menant à des activités transcriptionnelles et traductionnelles associées à la stimulation ou l'inhibition de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Il est aussi à noter que dans toutes ces conditions, l'ajout d'Ang2 à une dose équivalente d'Ang1 n'a pas eu d'effet antagonique, comme nous pourrions nous y attendre vu ses effets chez les CE. La signalisation des angiopoïétines au récepteur Tie2 semble donc être bien différente chez les neutrophiles par rapport aux CE.

1.2.5 Mécanismes intracellulaires des angiopoïétines

Il est généralement accepté que l'activation et la signalisation des récepteurs de type tyrosine kinase sont initiées par la liaison du ligand et la dimérisation du récepteur [108]. Tie2 est exprimé de manière polaire à la surface des CE activées, mais il est par la suite transloqué à la ME où il pourra lier l'Ang1 ou l'Ang2. Ces derniers induisent son activation via une autophosphorylation de chaque membre du dimère sur les résidus tyrosine kinase [109-111]. Suite à cette étape, la protéine *tyrosine kinase-related protein* (DOKR) est recrutée et phosphorylée afin d'interagir avec les protéines RasGAP, Nck et PAK dans la prolifération et migration endothéliale, ainsi que dans la régulation des filaments d'actine du cytosquelette [112-114].

L'activation de Tie2 induit également la phosphorylation de la *focal adhesion kinase* (FAK), suivie de la paxilline et de la p42/44 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (aussi nommée *extracellular signal-regulated kinases*; ERK), régulant aussi les activités migratoires [115, 116]. Tie2 peut aussi phosphoryler PI3K, induisant la transformation de PIP2 (phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate), puis permet de phosphoryler Akt. Cette voie du PI3K permet à la cellule de produire de l'oxyde nitrique (NO) via la phosphorylation de l'*endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) et d'augmenter la viabilité cellulaire via l'augmentation de la *survivin*, un inhibiteur de l'apoptose [78, 117]. Finalement, l'activation de Tie2 permet aussi le recrutement de l'*A20-binding inhibitor of NF-κB activation-2* (ABIN-2) inhibant le facteur de transcription NF-κB et augmentant aussi la viabilité cellulaire [118].

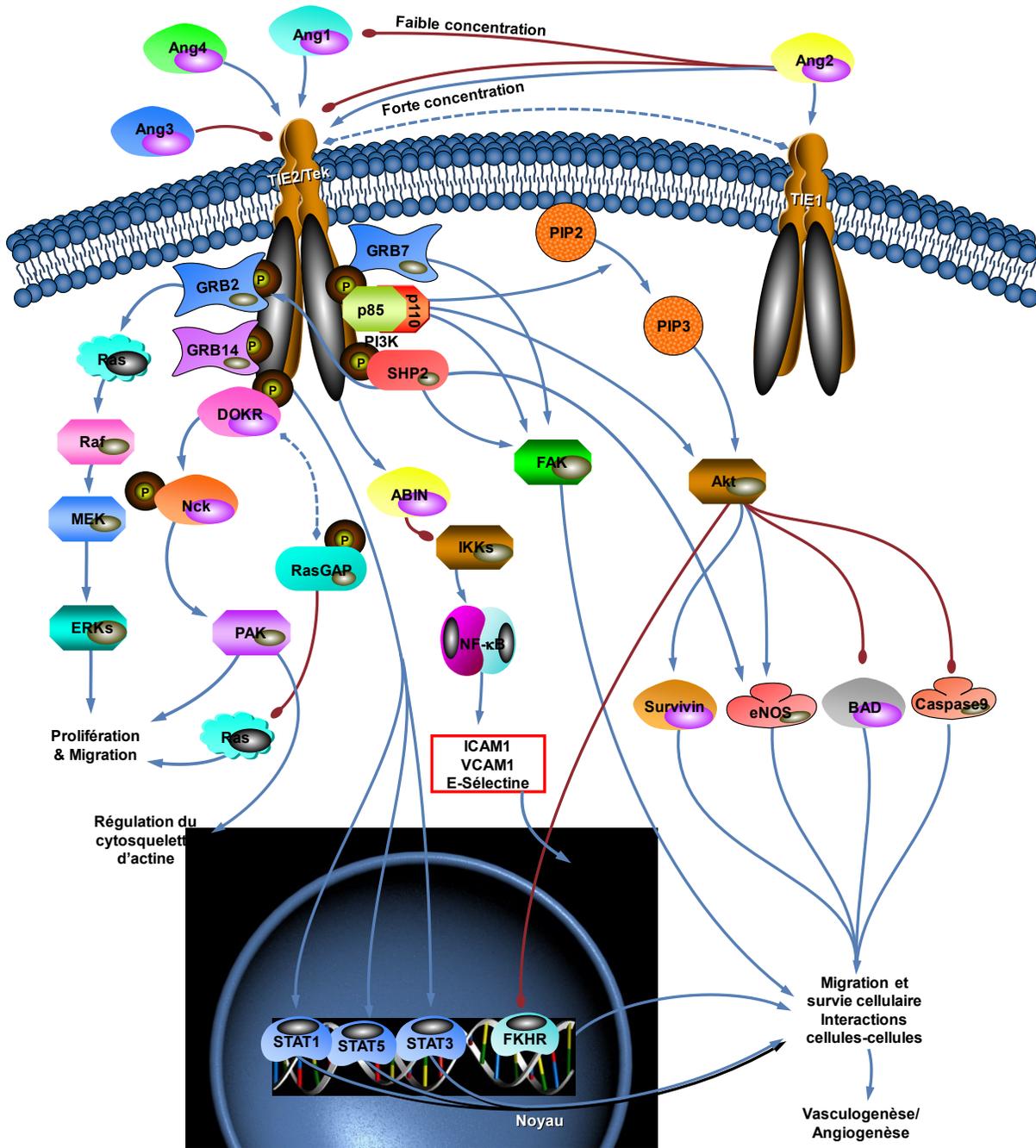


Figure 1.5. Mécanismes intracellulaires impliqués dans la signalisation des angiopoïétines avec Tie2 exprimé sur des cellules endothéliales. Le récepteur Tie2 est phosphorylé par les angiopoïétines, entraînant l'association de protéines d'arrimage au domaine tyrosine kinase du récepteur et à l'activation de plusieurs voies de signalisation. Ces voies mènent à leur façon à des activités biologiques impliquées dans la vasculogenèse et l'angiogenèse [119, 120]. Cette image est adaptée de l'image originale par QIAGEN, © Simon Lavoie 2017. L'image originale peut être consultée à l'adresse suivante : www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=32.

Des résultats de notre laboratoire ont démontré que la synthèse endothéliale du PAF induite par les angiopoïétines est dépendante des voies p42/44 et p38 MAPK, ainsi que de la voie PI3K/Akt [96]. La translocation de la P-sélectine endothéliale induite par l'Ang1 et l'Ang2 est quant à elle dépendante de l'activation de la phospholipase C- γ (PLC γ) et du calcium intracellulaire [97]. Pour l'augmentation de la viabilité des CE par les angiopoïétines, c'est essentiellement la voie PI3K/Akt qui est responsable [78, 84, 88, 121]. Au niveau des neutrophiles, les deux angiopoïétines induisent la migration cellulaire via la voie PI3K/Akt [71], alors que l'Ang1 stimule les activités de transcription et de traduction reliées à la synthèse d'IL-1 et d'IL-8 via la voie ERK [105, 106], et celles reliées au MIP-1 β via les voies p42/44 et p38 MAPK et PI3K/Akt [107].

1.2.6 Implications pathologiques

Les angiopoïétines jouant un rôle primordial dans l'angiogenèse, un dérèglement de l'homéostasie qui l'accompagne peut nécessairement engendrer plusieurs pathologies. Cependant, une meilleure compréhension du rôle des angiopoïétines dans ces pathologies peut mener à des cibles pharmacologiques stratégiques pour certains traitements [122]. Les angiopoïétines sont plus particulièrement associées aux cancers à tumeurs solides et aux maladies vasculaires et inflammatoires telles que l'athérosclérose, le diabète ou le lupus érythémateux [122-125].

Comme mentionné précédemment (**Section 1.1.2, L'angiogenèse pathologique**), les cancers à tumeurs solides dépendent de l'angiogenèse pour augmenter l'apport en nutriments et oxygène de la tumeur, et ainsi induire la prolifération de cellules tumorales et l'augmentation de la masse tumorale. Chez la souris, des études démontrent que des inhibiteurs contre l'Ang2 diminuent l'angiogenèse tumorale et la taille de la tumeur en réduisant la prolifération des cellules tumorales et leur bourgeonnement ainsi qu'en augmentant l'apoptose [126, 127]. Quant à l'Ang1, un inhibiteur de ce dernier ne permet pas de réduire la taille de la tumeur, mais permet néanmoins de diminuer l'intégrité des interactions entre CE. Des études cliniques de phase I à III mettant notamment à l'essai le trabananib (AMG386) sont actuellement effectuées [57, 128, 129]. Le trabananib possède des propriétés anti-angiogéniques par sa liaison à l'Ang1 et l'Ang2 de manière à prévenir leur interaction avec Tie2 [129].

Dans l'athérosclérose, l'Ang2 semble être impliquée dans la rupture de la plaque athéromateuse. De plus, les deux angiopoïétines via les monocytes et les neutrophiles permettent la libération de TNF- α et contribuent à l'inflammation dans les parois des vaisseaux [130, 131]. Ainsi, des études précliniques chez la souris démontrent que des antagonistes de l'Ang2 réduisent la formation de stries lipidiques, une phase précoce et réversible de l'athérosclérose, et diminuent les taux de triglycérides plasmatiques [130]. Chez les patients atteints de diabète de type 2, les taux circulants d'Ang2 sont augmentés et corréler avec les taux de glutamyl-transpeptidases (GGT), une enzyme permettant d'évaluer l'activité hépatique. On retrouve aussi davantage de Tie2 soluble de manière à corréler avec les taux d'insuline plasmatique et d'hémoglobine glyquée (HbA1c). Ainsi, l'implication des angiopoïétines dans le diabète pourrait être basée sur des mécanismes pathophysiologiques différents. Toutefois, les raisons expliquant ces observations ne font pas l'unanimité et des études plus complètes et longitudinales sont en cours [124, 132, 133]. Finalement, chez le lupus érythémateux, les récentes études concluent que l'Ang2 facilite l'inflammation endothéliale via son action à l'inverse de celle de l'Ang1. De ce fait, l'Ang2 est un biomarqueur de la maladie, mais des recherches futures sont nécessaires pour voir l'impact des antagonistes de l'Ang2 sur le traitement du lupus [125, 134, 135].

1.3 Le neutrophile

Les neutrophiles sont des cellules leucocytaires d'environ 7 à 10 μm appartenant à la famille des polymorphonucléaires (PMN) [136, 137]. Leur rôle principal est de contrer l'invasion et la multiplication des bactéries ou des virus dans notre organisme [138]. Les neutrophiles sont les PMN les plus abondants : ils constituent environ 85% de cette population contrairement à 10% et 5% pour les éosinophiles et les basophiles respectivement. Les concentrations normales de neutrophiles circulants varient entre 2 et 7×10^9 cellules par litre de sang et la production normale physiologique de neutrophiles générés chez un adulte sain est d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^{11}$ cellules par jour [137, 139]. La nécessité de cette production massive est causée par la demi-vie assez courte des neutrophiles ($t_{1/2} = 7\text{-}10$ heures chez l'humain), bien qu'une étude de Pillay et coll. ne faisant pas l'unanimité démontre qu'elle pourrait s'étendre jusqu'à 4 jours [140-142]. La production de neutrophiles dans la moelle osseuse est régulée par le *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) qui est lui-même stimulé dans la réponse inflammatoire par l'IL-17A et l'IL-23, des interleukines synthétisées par les cellules T, les macrophages et les cellules dendritiques [143, 144]. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées à un site infecté ou lésé et ses différentes activités fonctionnelles subséquentes en font un acteur principal dans la réponse immunitaire et inflammatoire.

1.3.1 La diapédèse des neutrophiles

La diapédèse est le processus par lequel les neutrophiles adhèrent et traversent l'endothélium vasculaire pour atteindre le site infecté ou lésé. Elle se produit en plusieurs étapes : la chimiotaxie, le roulement, l'adhésion ferme et la transmigration [145]. Par la reconnaissance des pathogènes, les macrophages déjà présents relâchent certaines cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-8 permettant aux neutrophiles d'être attirés au site inflammatoire et aux CE des vaisseaux sanguins situés près du site d'infection d'exprimer des molécules d'adhésion [146]. Ces molécules se sous-divisent en quatre grandes catégories : les intégrines, les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) ou vasculaire (VCAM), les sélectines (L-, E- ou P-sélectine) et les ligands des sélectines.

D'abord, la L-sélectine est exprimée constitutivement et exclusivement à la surface des leucocytes et elle se lie aux différentes protéines et protéoglycanes membranaires endothéliales, comme le CD34, le MadCAM-1 et le Gly-CAM-1. La E-sélectine est exprimée seulement chez les CE et la P-sélectine : elle est retrouvée dans les granules des plaquettes et des CE (corps de Weibel-Palade). Toutefois, les CE des vaisseaux sains et stables n'expriment pas, ou très peu, la E- et P-sélectine, ni les ligands nécessaires à la L-sélectine. Suite à l'activation des CE, la P-sélectine est très rapidement transloquée à la surface alors que la E-sélectine nécessite d'être transcrite. Par la suite, la P-sélectine peut se lier à son ligand sur le neutrophile, le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1). La E-sélectine lie le *E-selectin ligand-1* (ESL-1) du neutrophile, mais peut aussi lier le PSGL-1 ainsi que des glucides sialiques présents à la surface des leucocytes (Sialyl-Lewis^x). Ensemble, l'expression et la translocation des différentes sélectines et de leurs ligands contribuent au roulement des neutrophiles à l'endothélium et permet d'initier la phase d'adhésion ferme [147, 148].

Lors de la phase du roulement, les molécules inflammatoires sécrétées entre autres par les CE (PAF, IL-8, TNF- α) permettent d'activer les complexes β_2 -intégrines (CD11b/CD18) à la surface des neutrophiles. Lors de cette activation, le complexe β_2 -intégrine change de conformation, augmentant alors son affinité envers ses ligands endothéliaux, ICAM-1 et ICAM-2. ICAM-1 et -2, qui sont exprimés constitutivement à la surface des CE, mais les stimuli pro-inflammatoires (LPS, TNF- α et IL-1 β), permettent une expression accrue d'ICAM-1 [147, 149]. Les liaisons de β_2 -intégrine aux ICAM-1 et ICAM-2 sont responsables de l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium et du début de la phase de transmigration. Cette dernière phase s'effectue avec la participation des *platelet endothelial-cell adhesion molecules-1* (PECAM-1), exprimées à la fois sur les surfaces des neutrophiles et des CE, permettant ainsi une interaction homophile qui tire le neutrophile à travers l'endothélium. À ce moment, le cytosquelette des neutrophiles est réorganisé de manière à être complètement étendu sur les CE et le neutrophile a atteint un point de non-retour dans le processus de diapédèse. La transmigration se complète par le passage des neutrophiles à travers l'endothélium et la membrane basale pour ensuite se diriger au foyer inflammatoire [150].

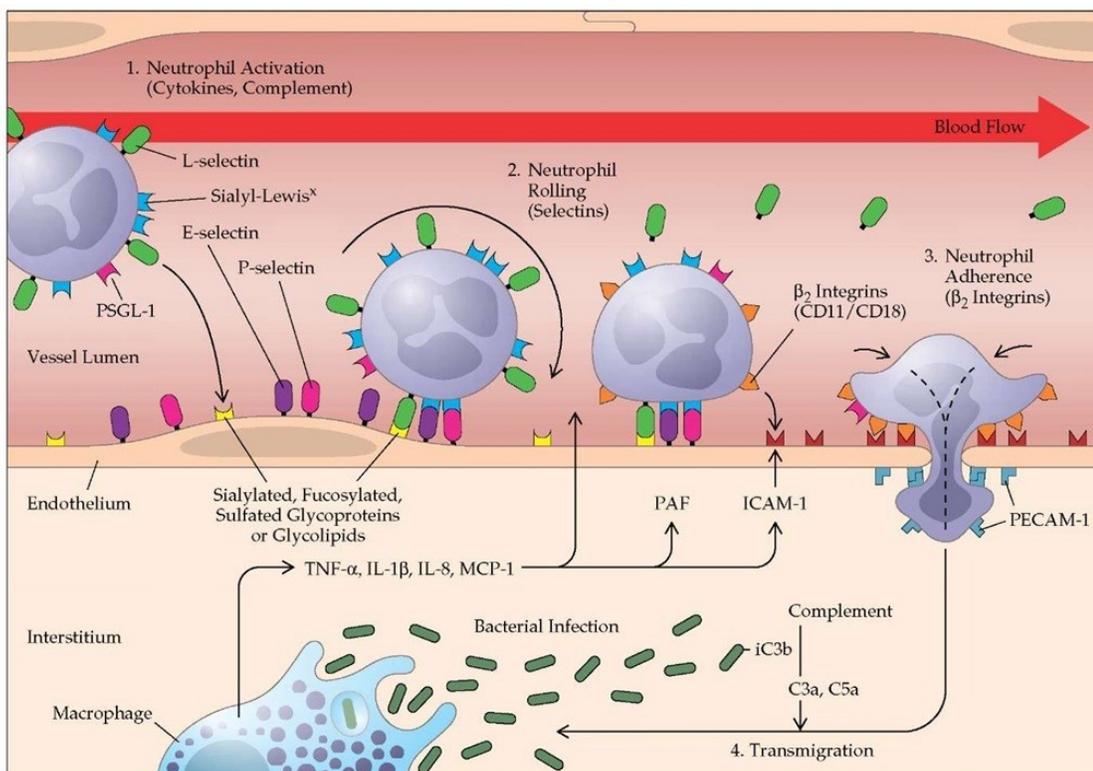


Figure 1.6. Les étapes de la diapédèse des neutrophiles. Des stimuli pro-inflammatoires activent la translocation endothéliale de la P-sélectine, permettant une adhésion légère des neutrophiles à l'endothélium par le PSGL-1 et la L-sélectine. Le roulement permet ensuite l'activation et l'adhésion ferme des neutrophiles à l'aide des interactions entre les β₂-intégrines (neutrophiliques) et ICAM-1 et -2 (endothéliales). Finalement, PECAM-1 complète la transmigration des neutrophiles et ceux-ci peuvent se diriger au foyer inflammatoire. Reproduit avec la permission de Springer: Surgery, Copyright® 2008 [151].

1.3.2 Rôle des neutrophiles dans la réponse immunitaire

Afin de défendre l'organisme contre les intrus exogènes, les neutrophiles assurent une réponse chimiotactique plus rapide et plus importante que tout autre type cellulaire. Par contre, une fois passé l'endothélium, les neutrophiles font appel à divers types de récepteurs présents à leur surface pour enclencher le processus d'immunité innée et capturer les pathogènes. Des récepteurs membranaires pour certains fragments du complément ou pour des fragments Fc des immunoglobulines reconnaissent des motifs spécifiques, notamment des membranes de micro-organismes, et mettent en place une défense adaptée pour lutter contre l'infection. Une fois ces fragments reconnus, l'activation du neutrophile permet l'utilisation de ces différentes activités fonctionnelles

pro-inflammatoires telles que la synthèse et relâche de cytokines, la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et la production de *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (**Section 1.3.3 Effets pro-inflammatoires des neutrophiles**). De plus, à la suite des premiers signaux reconnus, les neutrophiles retardent la survenue de leur mort programmée [152, 153].

En plus de leurs fonctions principales et bien connues dans l'immunité innée, les neutrophiles peuvent aussi jouer un rôle important dans la réponse immunitaire acquise, et ce, de deux façons : soit en interagissant avec les cellules présentatrices d'antigène, soit en présentant eux-mêmes les antigènes aux autres cellules inflammatoires. En effet, les neutrophiles expriment presque tous les membres de la famille des récepteurs *toll-like receptors* (TLR) à l'exception des TLR3 et TLR7 intracellulaires. Les TLR représentent certainement une des voies de reconnaissance les plus importantes et les plus sophistiquées dans la réponse immunitaire. Le LPS, par sa liaison avec le TLR4 à la surface du neutrophile, permet de les activer et d'augmenter leur survie surtout dans la phase précoce de l'inflammation. Une activation dans la phase plus tardive augmenterait de manière pathologique la présence de neutrophiles et le recrutement de monocytes/macrophages, menant ainsi à une inflammation chronique [154]. Pour faire suite à la phagocytose, les bactéries peuvent aussi activer les TLR intracellulaires (TLR9) menant à la production de TNF- α , d'IL-8 et de ROS [155]. Les neutrophiles peuvent aussi interagir avec les cellules dendritiques par l'intermédiaire de leurs récepteurs CD11b/CD18. Ceci active la cellule dendritique qui libère l'IL-12 et du TNF- α , permettant d'orienter la prolifération des lymphocytes T en lymphocytes T auxiliaires [156, 157]. Ces lymphocytes T peuvent à leur tour stimuler et activer les neutrophiles [158].

Lors de la phagocytose d'un micro-organisme par les neutrophiles, le métabolisme cellulaire s'active et déclenche divers événements intracellulaires aboutissant à la digestion complète du micro-organisme grâce aux lysosomes. Ces actions permettent aussi de préparer un peptide antigénique spécifique grâce au système endosomal du neutrophile [159]. Ainsi, le peptide apprêté passe des endosomes précoces aux endosomes tardifs, est transporté jusqu'à la membrane cellulaire par les vésicules de type II et s'associe aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de

classe II. [160]. Au repos, seul le CMH de classe I est exprimé, mais en présence d'IFN- γ , de *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), de TNF- α , ou d'IL-4, le CMH de classe II est rapidement transloqué et le neutrophile devient une cellule capable de présenter un antigène et d'activer les lymphocytes T [161]. Cette fonction des neutrophiles est loin d'être secondaire puisque des études *in vitro* démontrent que les neutrophiles maintenant devenus cellules dendritiques sont 10 000 fois plus efficaces pour présenter l'antigène que les cellules dendritiques issues des monocytes [162].

1.3.3 Effets pro-inflammatoires des neutrophiles

L'arrivée des neutrophiles au site lésé symbolise la phase précoce de la réponse inflammatoire. Nous constatons que les neutrophiles arrivent dès les premières minutes suivant le trauma local. Hautement mobiles, ils sont attirés par les chimiokines déjà exprimées par les CE, les macrophages et les mastocytes au site inflammatoire. À ce moment, ils utilisent une panoplie de stratégies pour permettre de créer un environnement inflammatoire et de contrer l'infection.

1.3.3.1 La dégranulation

Les granules neutrophiliques constituent un puissant arsenal dans l'inflammation puisqu'elles contiennent une multitude de substances cytotoxiques, ultimement relâchées pour tuer les micro-organismes. En effet, les neutrophiles possèdent trois types différents de granules : les granules azurophiles (ou granules primaires), les granules spécifiques (ou granules secondaires) et les granules gélatinases (ou granules tertiaires). Les trois types de granules partagent des caractéristiques structurales communes, telles qu'une double couche lipidique formant leur membrane, ainsi qu'une matrice intragranulaire contenant des protéines destinées à l'exocytose ou à être transloquées au phagosome [163]. Toutefois, c'est au niveau du contenu protéique que les différents sous-ensembles de ces granules se distinguent. D'abord, les granules azurophiles se caractérisent par leur contenu riche en myéloperoxydase (MPO), une enzyme aux propriétés microbicides. Suite à l'activation des neutrophiles, la MPO est soit relâchée dans les phagosomes ou dans l'espace extracellulaire. La MPO agit avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) engendré par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

(NADPH) oxydase de façon à augmenter son potentiel toxique [164]. Les granules azurophiles contiennent également la *neutrophil elastase* (NE), une sérine protéinase sécrétée lors de l'inflammation pour dégrader les membranes bactériennes [165]. Les granules spécifiques contiennent essentiellement la lactoferrine (augmente l'expression des molécules d'adhésion et retarde l'apoptose), la collagénase et la gélatinase (dégradent les membranes) [165-167]. Finalement, les granules gélatinases, comme leur nom l'indique, renferment seulement la gélatinase [167, 168].

Les différents types de granules des neutrophiles n'ont pas nécessairement une exocytose simultanée. En fait, la dégranulation suit une hiérarchie et s'effectue, dans l'ordre, en débutant par les granules gélatinases, suivies des granules spécifiques, pour ainsi finir avec les granules azurophiles [169]. Cette mobilisation progressive des granules est dépendante de la concentration en calcium intracellulaire du neutrophile [170]. Ceci permet au neutrophile de commencer la relâche de granules gélatinases dès son activation chimiotactique, mais d'effectuer une exocytose plus complète des autres types de granules seulement lors de sa rencontre avec les bactéries dans le tissu infecté. À ce moment, la riche diversité du contenu des granules permet aux neutrophiles de cibler et d'attaquer les bactéries via la fragmentation de la membrane, l'inhibition des voies métaboliques bactériennes ou encore la production de ROS [171].

1.3.3.2 La production de ROS

Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) sont des éléments chimiques oxygénés comprenant les radicaux libres, les peroxydes et les ions oxygénés. Leur configuration chimique particulière leur confère des caractéristiques chimiquement très réactives. Bien que les ROS puissent être d'origine exogène, comme dans le cas de ceux produits par des rayonnements ionisants, c'est essentiellement les ROS endogènes qui sont impliqués dans les mécanismes pro-inflammatoires des neutrophiles [172]. Lorsque le neutrophile rencontre des peptides bactériens, tels que le N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), ou des médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-8, ses récepteurs (pour la plupart couplées aux protéines G) s'activent et induisent rapidement un signal amenant à l'assemblage de la NADPH oxydase. Ce complexe multiprotéique est dormant chez les cellules en état de quiescence, et ses composantes sont alors éparpillées dans le cytosol et la membrane

de la cellule. Ainsi, suite à l'activation du neutrophile, les composantes s'assemblent à la membrane cellulaire et l'enzyme devient activée, permettant de catalyser la réduction de l'O₂ pour former des anions superoxydes (O₂⁻) et des ROS tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'hydroxyle (OH•) et l'acide hypochloreux (HClO) [173].

Les ROS produits lors de ce métabolisme oxydatif sont ensuite largués soit dans l'espace extracellulaire, soit dans les phagosomes contenant les bactéries ou autres particules phagocytées dans le but de les tuer et de les dégrader [174]. Outre son rôle dans la défense de l'organisme, les ROS participent aussi dans la régulation de certaines voies de signalisation cellulaires (modulation de kinases, de phosphatases et de certains facteurs de transcription) [175], dans la chimiotaxie [176], dans l'autophagie [177] et dans la présentation d'antigènes [178].

1.3.3.3 La synthèse et la relâche de cytokines

Le neutrophile activé, adhérent ou migré est en mesure de générer un nombre considérable de cytokines pro-inflammatoires. Selon le type de stimulation qu'il subit, il peut varier sa production de manière à agir sur des types cellulaires différents, pour des effets précis. La liste étant très longue [179], seules les principales cytokines (l'IL-1, le TNF- α , le MIP-1 et l'IL-8) seront abordées dans cet ouvrage.

D'abord, l'IL-1 est une famille comprenant 11 membres, mais les plus étudiés et ceux relâchés par les neutrophiles sont l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-1RA [180, 181]. Si l'IL-1 α et l'IL-1 β sont des cytokines très inflammatoires, l'IL-1RA est leur antagoniste naturel (*IL-1 receptor antagonist*). Ce dernier se lie aussi au récepteur à IL-1, mais n'induit aucun effet (antagoniste compétitif) [182]. Les IL-1 relâchées par les neutrophiles vont augmenter l'expression des molécules d'adhésion des CE afin de favoriser la diapédèse des neutrophiles et des autres types cellulaires. L'IL-1 α et l'IL-1 β peuvent aussi agir sur l'activation de presque tous les types cellulaires, de manière à amplifier leur synthèse de façon autocrine ou paracrine [183].

Bien que relâché par les neutrophiles, le TNF- α est majoritairement produit par les monocytes et macrophages. La plupart des types cellulaires possèdent l'un ou l'autre de ses récepteurs, les *tumor necrosis factor receptor-1* et *-2* (TNFR1 et TNFR2) [184]. Via ses récepteurs, le TNF- α active les voies des MAPK et joue un rôle dans la

différenciation, la prolifération et la mort cellulaire. Par contre, il peut aussi agir sur l'activation du *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) afin d'induire la transcription de protéines impliquées dans la survie cellulaire, dans l'inflammation et dans la production de facteurs anti-apoptotiques. Ces propriétés contradictoires compliquent l'appréhension des effets du TNF- α dans une situation précise, mais lui permettent une réaction appropriée dans l'inflammation [185, 186].

La famille des MIP-1 est principalement composée du MIP-1 α et du MIP-1 β . Elles sont produites majoritairement par les macrophages, neutrophiles, lymphocytes et cellules dendritiques et agissent sur les granulocytes. En tant que chimiokines très puissantes, leur action principale est d'induire la migration des leucocytes, mais elles peuvent également provoquer des hausses de calcium intracellulaire et moduler la production d'autres cytokines [187, 188].

Finalement, l'IL-8 est la cytokine sécrétée en plus grande quantité par le neutrophile. Sa fonction principale est aussi chimiotactive, bien que son implication ait été démontrée dans la phagocytose et dans l'angiogenèse. Au site inflammatoire, sa relâche cible particulièrement les neutrophiles via les récepteurs CXCR1 et CXCR2, engendrant la dégranulation, la production de ROS, l'expression d'intégrines et la production et relâche d'autres cytokines [189].

1.3.3.4 Autres mécanismes inflammatoires des neutrophiles

Depuis quelques années, le neutrophile est l'une des cellules sanguines des plus étudiées. Ces nombreuses recherches à son sujet ont permis de découvrir certains mécanismes participant aux caractéristiques inflammatoires et bactéricides des neutrophiles. Le plus connu est la formation des *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), un sujet principal de cet ouvrage décrit plus en détail dans la **Section 1.4 Les Neutrophil Extracellular Traps (NETs)**.

Un autre mécanisme du neutrophile récemment découvert est la relâche de microparticules (MPs). Ces MPs sont des petites vésicules variant entre 0,1 et 1,0 μ m relâchées via un bourgeonnement des neutrophiles, mais aussi des érythrocytes, des CE, des plaquettes et des autres leucocytes. Elles contiennent la membrane, le cytosol et certains composants et marqueurs membranaires de la cellule mère, mais se distinguent

des corps apoptotiques (1 à 5 μm) et des exosomes (30 à 100 nm). Les avancées actuelles suggèrent que la production de MPs coïnciderait avec la fin de l'activation des cellules et/ou le début de l'apoptose [190, 191]. Les MPs dérivées des neutrophiles sont peu présentes en conditions physiologiques, mais une concentration élevée a été rapportée dans plusieurs maladies comportant un désordre inflammatoire. Selon la pathologie, les rôles et les effets de ces MPs sont encore méconnus, mais des concentrations disproportionnées peuvent agir à titre de biomarqueurs de ces maladies [192].

1.3.4 Les pathologies associées aux neutrophiles

Les désordres associés aux neutrophiles sont nombreux étant donné leurs multiples effets dans la réponse immunitaire et inflammatoire. D'abord, les désordres peuvent être associés au nombre de neutrophiles circulants. La neutropénie, caractérisée par un compte cellulaire en dessous de 1500 neutrophiles par μL de sang, peut être causée par certains types de leucémie ou par la chimiothérapie. Évidemment, les risques d'infections sont alors fortement augmentés [193]. À l'inverse, la neutrophilie (sous-type des leucocytoses) cause une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang. Une hausse raisonnable peut être pathophysiologique lorsque le corps combat une infection par exemple, mais une hausse plus prononcée et constante est souvent caractérisée par la présence anormale de neutrophiles immatures dans le sang, indiquant souvent une leucémie myéloïde chronique [194].

Les pathologies des neutrophiles peuvent aussi être causées par un dérèglement de leurs activités biologiques. Lors de la dégranulation, les granules azurophiles des neutrophiles relâchent la NE qui doit être ensuite inhibée par l'enzyme α_1 -antitrypsine. Une déficience de cette enzyme due à une maladie génétique amplifie les effets de la NE et crée une inflammation chronique dans les tissus pulmonaires menant à la maladie pulmonaire obstructive chronique [195]. Une perturbation de la production de ROS par un métabolisme oxydatif neutrophilique suractivé est aussi la source de bien des problèmes. Les ROS produits en trop grande quantité peuvent causer les syndromes de détresse respiratoire par les dommages causés à l'épithélium [196]. Lors de l'ischémie-reperfusion du cerveau, les neutrophiles produisent trop de ROS, endommagent l'endothélium et induisent une perméabilité de la barrière hématoencéphalique [197].

Les ROS sont donc une cible thérapeutique dans plusieurs études en cours : des bloqueurs de transporteurs du calcium (ex : Benidipine) et des *scavengers* de ROS (ex : edaravone) sont utilisés pour diminuer la formation ou la concentration des ROS, mais sans trop de succès clinique [198, 199].

La prolongation de la survie des neutrophiles par des facteurs anti-apoptotiques (LPS, GM-CSF, G-CSF, etc.) facilite aussi l'intensification de l'état inflammatoire et mène à des dommages tissulaires importants, que ce soit dans le cas d'inflammation aiguë, tels que le syndrome de réponse inflammatoire systémique et le choc septique, ou encore dans le contexte d'inflammation chronique, telles que dans l'arthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn [200-203].

L'implication des différents mécanismes des neutrophiles dans les nombreuses pathologies avec dysfonctions neutrophiliques est maintenant assez bien documentée. Cependant, il est difficile de spécifier les proportions dans lesquelles ces mécanismes influencent les désordres cardiovasculaires. Bien que plusieurs recherches démontrent que la dégranulation et la production de ROS soient les acteurs principaux des effets pro-inflammatoires des neutrophiles [204-206], il est tout à fait possible que les découvertes relativement récentes des NETs et des MPs remettent en doute certaines conclusions de recherches antérieures.

1.4 Les *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs)

Les *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) sont des réseaux de fibres extracellulaires, essentiellement composés d'ADN provenant des neutrophiles [207]. Bien avant leur découverte, plusieurs groupes étudiant la biologie du neutrophile avaient déjà rapporté des changements non habituels du neutrophile dans certaines conditions. C'est en 1996 que pour la première fois, un groupe rapporte une forme de mort du neutrophile différente de l'apoptose ou de la nécrose. Ils remarquent que les neutrophiles stimulés au phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) meurent rapidement, mais gardent leur ADN presque intact [208]. La découverte des NETs est toutefois attribuée au groupe d'Arturo Zychlinsky qui, en 2004, décrit en détail les larges toiles composées d'ADN décondensé qu'il nomme *Neutrophil Extracellular Traps* [209]. Depuis ce temps, les NETs représentent un thème de recherche en plein essor, et qui conserve encore bien des secrets.

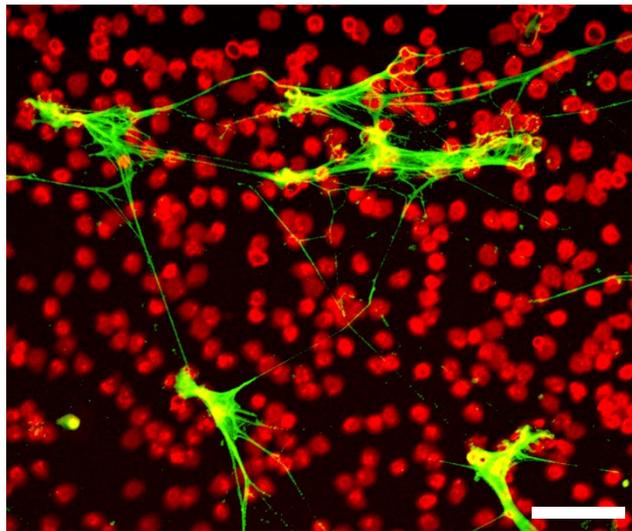


Figure 1.7. La production de NETs par les neutrophiles : observation par microscopie confocale. Les neutrophiles (en rouge) libèrent leur ADN (en vert) sous la forme d'un réseau en toile. Échelle, 50 µm. Image personnelle © Simon Lavoie, 2017.

1.4.1 Structure et composantes des NETs

La chromatine nucléaire est une structure complexe composée d'ADN double brin (ADNdb) fermement enroulé autour des histones pour former des nucléosomes. Ces nucléosomes se regroupent pour former des fibres d'environ 30 nm [210]. Lors de la relâche des NETs (aussi appelée NETose, en référence aux autres types de morts cellulaires), la structure de l'ADN est composée de filaments lisses d'environ 15 à 17 nm de diamètre parsemés de petits domaines globulaires d'environ 25 nm, les deux

s'agréant pour former des fils jusqu'à 50 nm de diamètre. Les filaments de NETs sont relâchés grâce à la décondensation et l'étalement de la chromatine, permettant au contenu génétique d'atteindre trois à cinq fois le volume de la chromatine condensée [211]. Ces filaments ne sont composés d'aucune membrane et sont extrêmement fragiles [209]. La figure 1.8 permet de mieux apprécier la structure de ces NETs et des neutrophiles qui les relâchent.

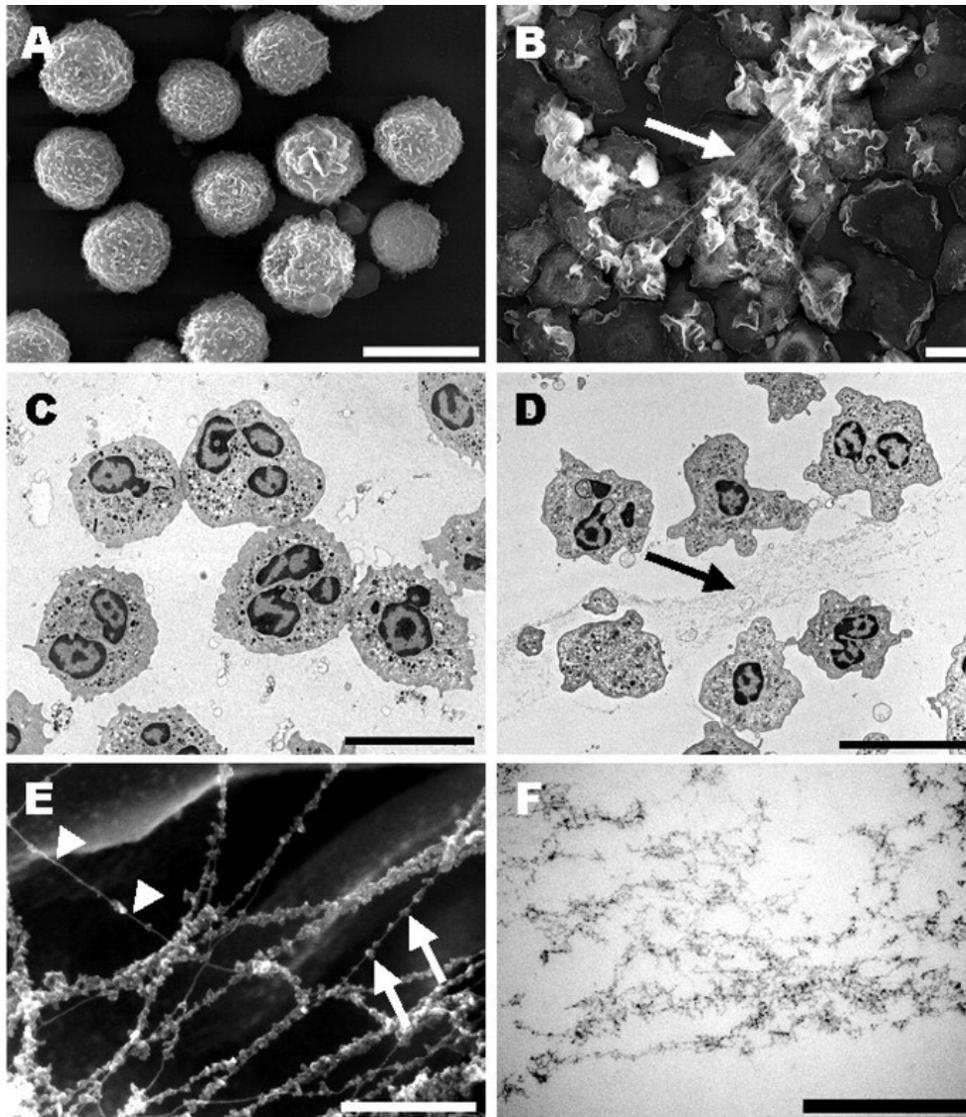


Figure 1.8. Formation et structures des NETs : observation par microscopie électronique. Les neutrophiles au repos (A et C) sont ronds et en absence de fibres alors que ceux stimulés avec du PMA pendant 30 min (B et D) sont plats et forment des filaments d'ADN. Ces filaments consistent en des régions lisses (têtes de flèches) et des domaines globulaires (flèches) (E et F). Échelles : A à D, 10 μm ; E-F, 500 μm . Reproduit de [209] avec la permission de AAAS.

La charge électrostatique négative de l'ADN confère aux NETs des propriétés adhérentes pour les protéines du neutrophile se liant le long des filaments de NETs [212]. Plus de 70% des protéines liées aux NETs sont des histones (plus particulièrement les histones des classes H2A, H2B, H3, H4, surnommées histones de cœur, et les histones H1, histones de liaison). Bien que la quantité entre les histones de cœur soit la même dans le noyau des neutrophiles au repos, les histones H2A et H2B sont plus nombreuses sur les NETs et leur poids moléculaire ainsi que leur stœchiométrie sont altérés lorsqu'elles y sont liées. Le reste des protéines associées aux NETs proviennent des granules, du cytosol ou du cytosquelette du neutrophile. En excluant les histones, c'est la NE qui constitue la protéine la plus abondante, constituant près du tiers des autres protéines liées aux NETs. Tout comme la NE, d'autres protéines provenant des granules azurophiles se retrouvent sur les NETs, telles que la cathepsine G et la MPO. Des protéines des granules spécifiques (la lactoferrine) et gélatinases (la gélatinase) ont aussi été identifiées [209, 213]. Le **Tableau II** résume les principales protéines présentes sur les NETs et leur localisation au sein du neutrophile. Ces protéines colocalisées aux NETs permettent d'identifier les NETs et de les distinguer de l'ADN libre circulant.

Granules	Noyau	Cytosquelette	Cytoplasme
NE (<i>A</i>)	H2A	Actine - β et - γ	Calprotectine
Lactoferrine (<i>S</i>)	H2B	Myosine-9	Calgranuline
Azurocidine 1 (<i>A</i>)	H3	α -Actinine	Catalase
Cathepsine G (<i>A</i>)	H4	Plastine-2	
MPO (<i>A</i>)	H1	Kératine-10	
Protéinase 3 (<i>A</i>)	MNDA		
Lysozyme C (<i>S, G</i>)			
BPI (<i>A</i>)			
Défensine 1 et 3 (<i>S</i>)			
Gélatinase (<i>S, G</i>)			

Tableau II. Protéines colocalisées avec les NETs. Liste des principales protéines liées aux NETs selon leur lieu d'origine dans la cellule et la quantité présente (plus présent au moins présent, de haut et bas). Le type de granules est représenté entre parenthèses : A, azurophiles; S, spécifiques; G, gélatinases [209, 213].

1.4.2 Mécanismes de formation

Les nombreuses et récentes études sur la formation des NETs rendent l'interprétation des mécanismes très laborieuse. Sans compter que l'utilisation et la découverte constante de nouveaux agents bactériens et pharmacologiques induisant la NETose compliquent davantage la tâche. Malgré ce préambule, la communauté scientifique a su mettre en lumière certaines grandes lignes qui semblent être communes à la NETose, qu'elle soit microbienne, inflammatoire ou endogène. La formation des NETs se divise d'abord en deux mécanismes distincts : la NETose suicidaire et la NETose viable.

1.4.2.1 NETose suicidaire

La NETose est une forme unique de mort cellulaire. Quelques minutes après leur activation par des stimuli variés, les neutrophiles s'aplatissent et s'attachent fermement au milieu environnant. Durant l'heure suivante, le noyau perd ses lobules, sa chromatine se décondense et les feuillettes internes et externes de la membrane nucléaire se détachent. Ensuite, la membrane nucléaire se brise en plusieurs petites vésicules permettant au cytoplasme et au nucléoplasme de se mélanger en une masse homogène, suivi par une désintégration complète des granules. Finalement, le neutrophile semble contracté jusqu'à la rupture de la membrane cytoplasmique ce qui laisse la place à l'excrétion des minces filaments d'ADN, les NETs [214]. Sous condition *in vitro*, ce processus de NETose suicidaire nécessite environ 3 heures [215, 216].

Du point de vue moléculaire, l'activation du neutrophile débute soit avec la liaison d'un ligand à des récepteurs TLR ou Fc, avec l'activation du complément, ou bien encore avec l'action des cytokines [217]. Bien que les mécanismes impliqués varient selon les agonistes, la plupart de ceux-ci engendrent une élévation de l'entrée de calcium extracellulaire et une relâche des réserves intracellulaires de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique. Une concentration augmentée de Ca^{2+} a pour effet d'augmenter l'activité de la protéine kinase C (PKC) et de phosphoryler la gp91phox, une sous-unité de la NADPH oxydase [215]. Ceci induit l'assemblage des sous-unités membranaires de la NADPH oxydase en un complexe fonctionnel générant des ROS. C'est sous l'effet de ces ROS que les granules se dégradent et que la membrane nucléaire se rompt,

mélangeant le contenu nucléaire, granulaire et cytoplasmique. C'est le cas de la NE et de la MPO qui, normalement présentent dans les granules azurophiles, vont migrer dans le noyau. La NE dégrade les liens entre les histones H1 et les histones de cœur, alors que la MPO accentue la décondensation de la chromatine [218]. Une protéine très importante dans la NETose entre alors en jeu. La protéine arginine déiminase 4 (PAD4) est activée par la PKC et migre aussi au noyau. À ce niveau, elle remplace certains résidus arginines des histones de cœur par des citrullines, éliminant ainsi la charge positive des histones et affaiblissant leurs attaches à l'ADN [219, 220]. Pour terminer, la rupture de la membrane cytoplasmique permet la relâche des NETs et la perte de fonctions cellulaires normales du neutrophile, comme la migration et la phagocytose [218].

L'activation de la PKC jouant un rôle central dans la NETose suicidaire, il est très fréquent d'utiliser le PMA, un puissant activateur synthétique de PKC, pour induire la formation de NETs [215]. Produit par certaines bactéries, l'ionophore de calcium A23187 et l'ionomycine permettent d'augmenter le transport calcique et sont donc aussi fréquemment utilisés dans l'induction de la NETose [221, 222]. De manière plus physiologique, le LPS et l'IL-8 sont aussi des agonistes de choix [209, 223].

1.4.2.2 NETose viable

Contrairement à la NETose suicidaire nécessitant des heures avant d'être effective, Clark et coll. ont rapporté pour la première fois en 2007 la formation de NETs après seulement 30 minutes de stimulation avec le LPS et des plaquettes activées [224]. Ils ont observé que les neutrophiles formant ces NETs demeuraient imperméables au *Sytox Green*, le marqueur d'ADNdb, indiquant que leur structure restait intacte. Des études subséquentes démontraient que ces neutrophiles pouvaient continuer d'exercer la migration et la phagocytose, et le terme NETose viable a été attribué [225]. La NETose viable est essentiellement stimulée par la liaison des stimuli aux TLR et au récepteur pour la protéine C3 du complément [226]. Elle est indépendante de la formation de ROS et de l'activation de la PKC, et survient après 5 à 60 minutes de stimulation. Elle débute par une croissance de l'enveloppe nucléaire, par une décondensation de la chromatine et la formation de vésicules nucléaires contenant l'ADN. Ces vésicules fusionnent avec la membrane cytoplasmique, permettant de relâcher les NETs dans l'espace extracellulaire

sans aucune perméabilité cellulaire. Malgré leur contenu génétique déplété, la durée de vie des neutrophiles en NETose viable n'est pas affectée [211, 225]. Le mécanisme moléculaire de ce processus est toutefois méconnu et nécessite encore plusieurs études.

En 2009, Yousefi et coll. ont bousculé la communauté scientifique en démontrant que les NETs relâchés lors de la NETose viable étaient en partie constitués d'ADN mitochondrial (ADNmt) [227]. De façon ROS dépendante et après déjà 15 minutes de stimulation, les mitochondries fusionnent à la membrane cytoplasmique et relâchent l'ADNmt, lequel possède des propriétés pro-inflammatoires [227, 228]. Malgré les ressemblances avec la NETose viable, la nécessité des ROS pousse certains à considérer cette NETose comme un processus distinct.

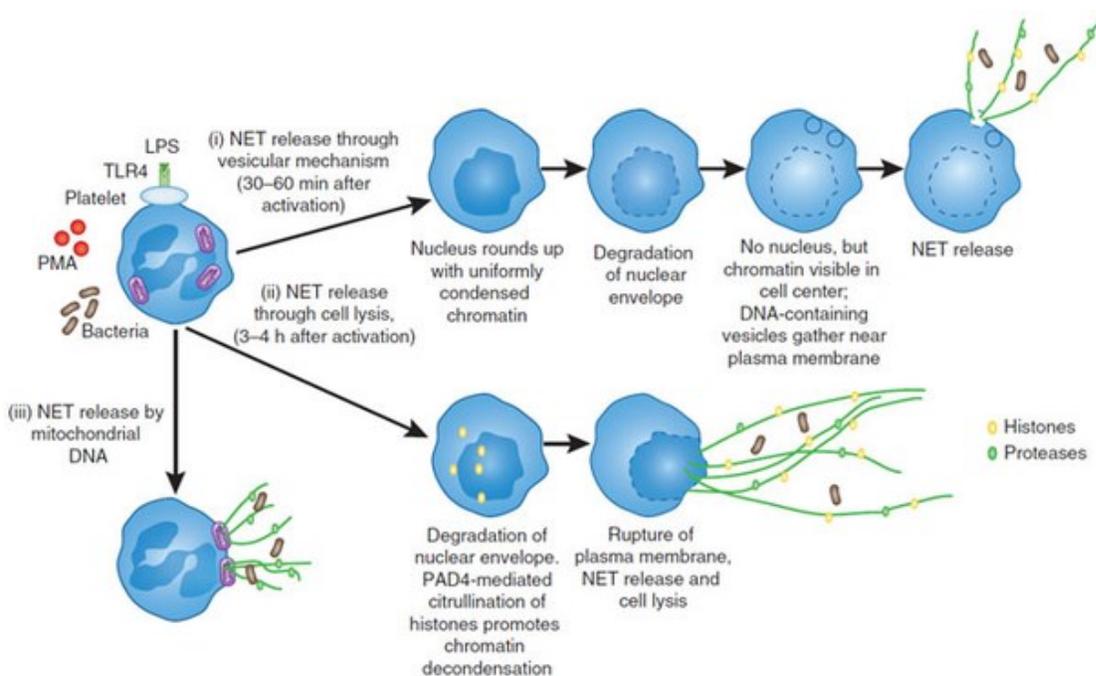


Figure 1.9. Représentations des différents types de NETose. Suite à leur activation provenant d'agonistes variés, les neutrophiles relâchent les NETs par des mécanismes de (1) NETose viable, caractérisée par une relâche rapide et une conservation de l'activité biologique du neutrophile; (2) NETose suicidaire, où le neutrophile meurt lentement et relâche les NETs suite à une rupture de la membrane; (3) NETose mitochondriale, où l'ADN des NETs provient des mitochondries fusionnées à la membrane cytoplasmique. Reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Medicine, Copyright© 2011 [229].

1.4.3 Rôle des NETs dans l'infection

Les neutrophiles sont en mesure d'induire la production de NETs suite à la présence de différentes souches bactériennes, particulièrement grâce aux composantes de surface des bactéries à Gram positif (comme l'acide lipotéichoïque) et Gram négatif (comme le LPS), ou aux peptides bactériens (tel que le fMLP) [230]. Les exemples les plus notoires de souches bactériennes induisant les NETs sont *Staphylococcus aureus* [231], *Streptococcus* [232], *Mycobacterium tuberculosis* [233], *Haemophilus influenzae* [234] et *Klebsiella pneumoniae* [218]. Depuis leur découverte, plusieurs groupes de recherche ont démontré un rôle protecteur des NETs contre les organismes infectieux [235-237]. D'ailleurs, un modèle de souris transgénique PAD4^{-/-} est significativement plus susceptible aux infections comparativement aux témoins PAD4^{+/+} [220]. En effet, les NETs peuvent agir sur les bactéries de deux façons : 1) par l'immobilisation du pathogène et 2) par l'inhibition de la croissance et/ou la mort du microbe [238]. La chromatine purifiée des NETs ne permet pas à elle seule de tuer les pathogènes en condition *in vitro*. L'effet bactéricide des NETs provient donc des protéines ayant des effets antibactériens tels que la MPO, la lactoferrine et la NE. Ces protéines agissent directement sur la dégradation des membranes pathogéniques [239]. Les champignons tels qu'*Aspergillus nidulans* et *Candida albicans* peuvent aussi entreprendre la NETose. À ce moment, c'est surtout via la calprotectine présente sur les NETs (par la chélation du zinc) que ceux-ci peuvent contrer la propagation [213]. Le rôle bactéricide des NETs demeure cependant limité puisque plusieurs souches bactériennes survivent à leurs interactions avec les NETs sans perte de viabilité. Le mécanisme principal des NETs pour contrer les pathogènes demeure ainsi l'immobilisation de ceux-ci au niveau local, afin de limiter leur propagation au niveau systémique [240, 241].

Bien que la plupart des pathogènes soient susceptibles d'être emprisonnés ou tués par les NETs, d'autres ont su trouver le moyen de contrer leurs effets ou même d'utiliser la chromatine des NETs à leur avantage [242]. Par exemple, des colonies de *H. influenzae* peuvent résister à un traitement aux NETs par leur habilité à former des « biofilms » à partir de certains éléments structurels des NETs. Ainsi, bien que cette souche induit la NETose, la bactérie évite leurs dommages grâce à une couche de

lipooligosaccharides qui se lie fermement aux NETs pendant que la bactérie y échappe [234]. Dans le cas du *Streptococcus suis*, la bactérie est en mesure de sécréter de la DNase afin de dégrader les NETs qui l'ont emprisonné, permettant ainsi de s'échapper [243].

1.4.4 Rôle des NETs dans les maladies non infectieuses

Les NETs possèdent aussi un côté plus négatif dans l'homéostasie. À l'heure actuelle, un nombre important de recherches portent sur les implications des NETs dans les nombreuses pathologies inflammatoires.

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par la circulation d'auto-anticorps reconnaissant des antigènes intracellulaires. Les NETs deviennent alors une cible de choix pour ces auto-anticorps puisqu'ils sont formés de composantes normalement intracellulaires (ADN, histones, protéines granulaires), mais se retrouvant maintenant à l'extérieur de la cellule [212]. Ainsi, dans les sérums des patients atteints de lupus érythémateux disséminé ou d'arthrite rhumatoïde, nous retrouvons un nombre important d'auto-anticorps dirigés contre les histones citrullinisées H1 et H4 [244, 245]. Ces sérums sont aussi composés d'anticorps diminuant l'activité de la DNase I, l'enzyme qui permet la dégradation des NETs [246]. De plus, ces auto-anticorps peuvent à leur tour induire la relâche de NET, complétant alors un cercle vicieux qui propage une inflammation chronique dans ces pathologies [247].

Les NETs, par leur profil protéique inflammatoire, ont la capacité d'activer d'autres cellules avoisinantes et causer des dommages vasculaires [215]. L'exemple le plus simple est sans doute le thrombus sanguin, où les NETs induisent l'adhésion des plaquettes et des globules rouges, tout en augmentant la production de thrombine et en augmentant l'activité des facteurs de coagulation pour mener à la formation du caillot [248]. Pour le prouver, l'inhibition de PAD4 possède un effet protecteur dans un modèle murin développant une thrombose veineuse profonde [249]. Dans le diabète sucré, une maladie inflammatoire chronique où les contraintes de résistance à l'insuline mènent à une hyperglycémie, les neutrophiles produisent plus de ROS et relâchent davantage de cytokines [250]. Par le fait même, il a été démontré que les niveaux élevés de glucose induisent la NETose, que les patients diabétiques possèdent des niveaux plus élevés de

NETs circulant dans leur plasma, et que leurs neutrophiles fraîchement isolés étaient davantage prompts à la NETose *in vitro*. De plus, la cicatrisation est améliorée chez des souris diabétiques transgéniques PAD4^{-/-} ou lorsque qu'on leur injecte de la DNase I [251]. On retrouve des effets et des mécanismes semblables chez d'autres désordres cardiovasculaires : dans la maladie coronarienne, la quantité de NETs détectée dans les coronaires de patients humains corrèle positivement avec la taille de l'infarctus et négativement avec la guérison des tissus cardiaques, tout en observant des effets positifs à l'ajout de la DNase I [252]; dans l'hypertension artérielle, les neutrophiles isolés de patients produisent davantage de NETs suite à un traitement bactérien [253].

Dans la fibrose kystique, la production augmentée de mucus permet des colonisations fréquentes et rapides de bactéries, ce qui cause une infiltration importante de neutrophiles et une inflammation chronique. Dans les sécrétions par la toux de ces patients, il y a une quantité considérable de constituants des NETs tels que l'ADN, la NE et la MPO [254]. Un traitement pour diminuer les symptômes de cette maladie consiste à administrer la DNase I par inhalation (dornase alfa; Pulmozyme®). Il s'agit d'un des premiers traitements pharmacologiques approuvés chez l'humain pour contrer les effets des NETs dans une pathologie [255, 256].

Finalement, dans les cancers à tumeurs solides, il a été démontré que les cellules cancéreuses circulantes utilisent les NETs présents près d'un organe différent de la souche du cancer afin d'y adhérer et de favoriser leur interaction avec la gélatinase et la NE, des protéines présentes sur les NETs ayant des effets pro-tumoraux. Les cellules cancéreuses peuvent alors proliférer, migrer et former de nouveaux vaisseaux sanguins. Des tests *in vitro* ainsi qu'*in vivo* démontrent toutefois que la DNase I et un inhibiteur de la NE peuvent empêcher l'adhésion des cellules cancéreuses et prévenir la formation de métastases [257, 258].

1.4.5 Extracellular Traps non neutrophiliques

La plupart des recherches effectuées sur la relâche extracellulaire d'ADN portent évidemment sur les neutrophiles, puisque ces cellules ont été les premières à être associées avec cette relâche. Or, depuis la fin des années 2000, il semble maintenant évident que d'autres types cellulaires possèdent la capacité de produire des *Extracellular*

Traps (ETs, lorsque non neutrophiliques), incluant les éosinophiles [259], les mastocytes [260] et les monocytes/macrophages [261]. Bien que plusieurs caractéristiques des ETs non neutrophiliques s'apparentent aux NETs, il existe certaines différences notoires [262].

Les ETs des éosinophiles proviennent à la fois du noyau et de la mitochondrie, mais dans un ratio plus égal que les neutrophiles. Leur relâche est complètement dépendante de la production de ROS et on y retrouve plusieurs gènes mitochondriaux colocalisés, comme la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase (Co₁) ou encore la sous-unité 1 de la NADH déhydrogénase (ND₁). Bien que les éosinophiles répondent à des agonistes similaires que pour les neutrophiles lors de la ETose, c'est via l'action de l'IFN- γ que les éosinophiles relâchent le plus rapidement (dans les 15 premières secondes) et le plus abondamment leur ADN. Cette action dans l'ordre des secondes est immensément plus rapide que celle des neutrophiles débutant leur NETose après 10 à 15 minutes de stimulation. De plus, à l'opposé des neutrophiles, les ETs éosiphiliques sont rarement associés avec la mort cellulaire [259, 263].

Chez les mastocytes, les ETs sont formés suite à la rencontre d'un pathogène et contiennent des protéines spécifiques aux mastocytes (tryptase et certaines cathelicidines). Étant donné leur capacité limitée pour la phagocytose, les mastocytes pourraient utiliser les ETs en combinaison avec leur dégranulation pour amplifier leur effet antimicrobien. De plus, la DNase ne suffit pas pour neutraliser les ETs mastocytaires et l'ajout d'enzymes permettant de dégrader la tryptase est nécessaire [260, 264].

La découverte de la ETose par les monocytes et macrophages est relativement récente et peu de caractéristiques spécifiques leur ont été attribuées. Notons toutefois que tout comme les NETs, les ETs monocytaires et macrophagiens sont dépendants de la NADPH et du stress oxydatif [261]. Les recherches sur les NETs et les ETs progressent toutefois à un rythme incroyable. Récemment, les hétérophiles aviaires (les granulocytes les plus abondants chez la poule) ont démontré la capacité de produire des ETs sous stimulation au PMA et au peroxyde d'hydrogène [265]. De manière tout aussi surprenante, les racines des plantes sont aussi en mesure de libérer leur ADN pour se défendre contre les champignons et leurs spores [266, 267]. Ces avancées démontrent

bien l'intérêt actuel de la communauté scientifique au sujet des NETs et les tentatives de plusieurs groupes à trouver réponse aux nombreuses interrogations qui y sont encore associées.

1.5 Objectifs de recherche

Il a été démontré que l'Ang1 et l'Ang2 avaient la capacité d'induire des activités pro-inflammatoires chez le neutrophile grâce au récepteur Tie2 présent à sa surface. En effet, les angiopoïétines causent la synthèse et la relâche du PAF, l'activation du complexe β -intégrine (CD11b/CD18) et l'adhésion des neutrophiles sur la matrice extracellulaire [68, 70, 71, 102]. De plus, l'Ang1 et l'Ang2 induisent la migration des neutrophiles et amplifient les activités chémotaxiques de l'IL-8 [68, 71, 102]. Il a également été démontré que les neutrophiles relâchent leur contenu génétique (NETs) lors d'une infection bactérienne ou dans plusieurs maladies ayant un profil vasculaire inflammatoire [209, 229].

Considérant les affirmations énumérées précédemment, les buts de ce travail sont : 1) de vérifier si les angiopoïétines sont en mesure d'induire la relâche de NETs par les neutrophiles et de comparer leurs effets avec des agonistes déjà connus; 2) d'étudier les mécanismes d'action normalement impliqués dans l'activation intracellulaire des neutrophiles par lesquels les angiopoïétines pourraient induire la NETose; et 3) d'analyser les effets de ces NETs sur l'activation des neutrophiles et des CE dans des contextes *in vitro* d'adhésion cellulaire à de la ME ou à des HUVEC, ainsi que la formation de tubules simulant la formation des capillaires sanguins. Ces objectifs de recherche permettront de répondre à l'hypothèse stipulant que la formation de NETs induite par les angiopoïétines pourrait constituer une nouvelle voie par laquelle les angiopoïétines peuvent agir dans les processus inflammatoires et angiogéniques.

CHAPITRE 2 : ARTICLE

**Human NETs synthesis contributes to angiopoietins-mediated
in vitro pro-inflammatory and pro-angiogenic activities**

**Simon S. Lavoie*†¹, Elizabeth Dumas*†¹, Branka Vulesevic*†, Paul-Eduard Neagoe*,
Michel White*‡ and Martin G. Sirois*†**

*Research center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger St., Montreal, Quebec, Canada.

Departments of pharmacology and physiology† and medicine‡, Faculty of medicine,
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

¹These authors contributed equally to this work

Corresponding author: Martin G. Sirois. Research Center of Montreal Heart Institute,
5000 Belanger Street, Montreal, Qc, Canada, H1T 1C8.

Phone #: 514-376-3330 ext. 3583, Fax #: 514-376-1355,

E-mail: martin.sirois@icm-mhi.org

Running title: Ang1 and Ang2 induce NETs synthesis and release

Key Words: Human, Neutrophils, Endothelial Cells, Cytokines, Adhesion Molecules,
Cell Activation, Chemotaxis, Inflammation, Angiogenesis.

Total character count: 61,644

Total number of figures: 7 + 1 Supp. Data.

Total number of color figures: 2 (Fig. 1 and 7)

2.1 Abstract

Neutrophil extracellular traps (NETs) are composed of nuclear DNA in a web-like structure extruded from neutrophils in response to either bacterial infection or inflammation. We previously reported the expression of angiopoietin Tie2 receptor on human neutrophils and the capacity of both angiopoietins (Ang1 and Ang2) to induce pro-inflammatory activities, such as synthesis and release of platelet-activating factor (PAF), up-regulation of β_2 -integrin complex (CD11/CD18) and neutrophil chemotaxis. On the other hand, only Ang1 but not Ang2 is capable to promote translational and transcriptional activities in neutrophils. Herein, we addressed whether Ang1 and/or Ang2 could modulate the release of NETs, and if they contribute to angiopoietins-mediated pro-inflammatory activities. We observed that Ang1 and Ang2, alone or combined (10 nM; 3 hours) increase NETs synthesis and release by about (\approx 2.5-fold) as compared to PBS-treated neutrophils. The release of NETs is Tie2-dependent, and requires downstream intracellular participation of PI3K, p38 and p42/44 MAPK pathways; reactive oxygen species (ROS) production; intracellular calcium [Ca^{2+}]_i store depletion and protein arginine deiminase 4 (PAD4) activation. These isolated NETs induced neutrophils and endothelial cells (ECs) activation; leading to neutrophil adhesion onto human extracellular matrix (hECM) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC); and *in vitro* formation of capillary-like tubes by ECs. Our study is the first one to report the capacity of Ang1 and Ang2 to promote the release of NETs and that these NETs contribute to angiopoietins-mediated *in vitro* pro-inflammatory and pro-angiogenic activities.

2.2 Introduction

Neutrophils act as the first line of defense against pathogens by releasing proteolytic granules and bacterial phagocytosis. Neutrophils can as well guide and shape subsequent immunity through the recruitment of monocytes, activation of dendritic cells, proliferation and maturation of lymphocytes (1, 2). In addition to the bacterial-induced inflammatory response, neutrophils can play a damaging role in the pathogenesis of many acute and chronic inflammatory diseases through their capacity to promote the release of cytokines, chemokines, reactive oxygen species (ROS) and, more recently reported, the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) (3, 4). The latter is a newly discovered pathogen killing mechanism (NETosis) that has been described as the extracellular release of neutrophil nuclear DNA, which contains microbicidal proteins such as neutrophil elastase (NE) and myeloperoxidase (MPO), upon their activation by bacterial or fungal species (4, 5). NETs were originally characterized for trapping bacteria and helping to contain infection, but as a result of their cytotoxic and immunogenic components, dysregulated NETs formation or clearance is now associated with a variety of non-infectious pathologies, such as solid tumor cancer, autoimmunity diseases, vasculitis and diabetes (6, 7). A better understanding of the central mechanisms responsible for the formation of NETs and their effects may provide new insights for the improvement of therapeutic strategies targeting these pathologies. NETosis can be induced by various pro-inflammatory mediators and some signaling pathways have already been assessed, but the involvement of many other cytokines and the pathways associated with NETosis remain to be addressed. An involvement of ROS generation, protein arginine deiminase 4 (PAD4) activation and calcium seem to be necessary in

most NETosis processes (8-10). Furthermore, it has been shown that in function of the stimuli, MAPK and PI3K pathways can be involved in NETs synthesis and release (11, 12). More recently, it has also been reported that NETs can contribute to angiogenesis in diseases characterized by a dysfunction of vascular homeostasis via the activation of myeloperoxidase/H₂O₂-mediated TLR-4 signaling in ECs (13).

We and other groups reported pro-inflammatory and pro-angiogenic activities of angiopoietins-1 and -2 (Ang1 and Ang2) on ECs and leukocytes under in vitro and in vivo conditions (14-17). Both Ang1 and Ang2 can induce, in a Tie2-dependent manner, endothelial platelet-activating factor (PAF) synthesis, endothelial P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto ECs (14, 18). Although Tie2 was initially considered as an endothelial-specific receptor, we reported its expression on human neutrophils, and its activation by the angiopoietins, leading to the synthesis and release of PAF, up-regulation of β 2-integrin complex (CD11/CD18) and neutrophil adhesion onto human extracellular matrix (hECM) (15, 18-20). In addition, both Ang1 and Ang2 induce neutrophil migration and potentiate interleukin-8 (IL-8) chemotactic activity (15, 19, 20). More recently, we reported a differential capacity between angiopoietins to promote transcriptional activities in human neutrophils. Indeed, only Ang1 can support transcriptional and translational activities associated to synthesis and/or release of specific cytokines (e.g. IL-1 β , IL-1RA, IL-8 and MIP-1 β) while Ang2 has no such effect (21-24).

Since we observed that both angiopoietins can activate Tie2 on the neutrophils and mediate pro-inflammatory activities, we wanted to examine whether angiopoietins can induce NETs formation, assess the underlying mechanisms, and interrogate the role

of these particular NETs inducing mechanism on pro-inflammatory and pro-angiogenic activities under in vitro conditions.

2.3 Material and Methods

Neutrophil isolation and purification

Venous blood was obtained from healthy donors free from anti-inflammatory medication for at least 20 days. The study has been approved by the human ethical committee of the Montreal Heart Institute and performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects provided written informed consent (Montreal, QC, Canada; ethics No. ICM#01-069). Neutrophils were isolated as described previously (18, 23). Upon isolation, neutrophils were resuspended in phenol red-free RPMI-1640 medium (Cambrex BioScience, Walkersville, MD, USA) supplemented with 25 mM Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (Sigma, Oakville, ON, Canada), 1% penicillin/streptomycin/Glutamax (GIBCO, Grand Island, NY, USA), 1 mM CaCl₂ (BDH Chemicals, Toronto, ON, Canada) and 1% bovine serum albumin, fraction V (Sigma). Contamination of isolated neutrophil suspensions with peripheral blood mononuclear cells was less than 0.1% as determined by morphological analysis and flow cytometry. Viability was found to be greater than 98%, as assessed by Trypan blue dye exclusion assay (22, 23).

Confocal microscopic analyses of Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

Neutrophils (1x10⁶ cells/mL) in RPMI were incubated in 35 mm petri dishes with 14 mm glass microwell inserts (MatTek; cat#P35G-1.0-14-C Ashland, MA, USA) at 37°C, 5% CO₂ for 3 hours with different agonists (PBS control buffer solution, PMA (25 nM; Calbiochem, La Jolla, CA, USA), PAF (100 nM; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), interleukin-8 (IL-8; 25 nM; Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), LPS (100 ng/mL;

Escherichia coli O111:B4; Sigma), Ang1 and Ang2 (0.1 - 10 nM; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)). A fluorescent cell-impermeant nucleic acid stain (SytoxGreen; Life Technologies, Burlington, ON, Canada) (1 μ M) was then added to detect extracellular double-stranded DNA (dsDNA). Image acquisitions were obtained by confocal fluorescence microscopy (LSM 710, Carl Zeiss, Toronto, ON, Canada) with the microscope configured to acquire a 5 x 5 mosaic of images at 20x magnification (Zen 2, Carl Zeiss). To obtain total NETs area, an algorithm in ImagePro Plus 7 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) calculated the area occupied by NETs. A threshold was applied to exclude low fluorescence background.

Quantification of NETs by fluorometric assays

Neutrophils (5×10^6 cells/mL of RPMI) were added to 12-well plates and pretreated at 37°C, 5% CO₂ for 30 minutes with selective inhibitors, namely a Tie2 kinase inhibitor (Tie2i; 2.5 μ M; Abcam, Toronto, ON, Canada), a p38 MAPK inhibitor (SB203580; 10 μ M; Calbiochem), a MEK inhibitor (U0126; 20 μ M; Millipore, Billerica, MA, USA), a PI3K inhibitor (LY294002; 10 μ M; Cayman Chemical), a PAD4 inhibitor (GSK484; 10 μ M; Cayman), extracellular or intra/extracellular calcium chelators (BAPTA; 10 μ M; Enzo, Farmingdale, NY, USA and BAPTA-AM; 10 μ M; Calbiochem respectively), a NADPH oxidase inhibitor (DPI; 25 μ M; EMD Millipore, Etobicoke, ON, Canada), and dissolving compound vehicle (DMSO 0.1%; Sigma). Ang1, Ang2 or PMA were then added to neutrophils and incubated for 3 hours. The isolation of NETs was performed as per manufacturer's instructions (NETosis Assay Kit protocol; cat#601010, Cayman Chemical). Briefly, neutrophils were carefully washed two times with PBS and S7 Nuclease (15 U/mL; Sigma) was added for 15 minutes at 37°C, 5% CO₂ to release NETs

bound to the external surface of neutrophils with no or minor loss of NETs structure and activity. The reaction was stopped with the addition of 10 mM EDTA and cell debris was removed by centrifugation at 300g for 5 minutes. For further studies of the biological activity of NETs, an additional centrifugation step (70 000g; 60 minutes) was performed to pellet NETs and the supernatant containing EDTA was removed. NETs were subsequently suspended in RPMI buffer and quantified using Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits (cat#P7589, Invitrogen, Eugene, OR, USA) as per the manufacturer's instructions.

Assessment of cellular redox changes

To assess ROS production, neutrophils (5×10^6 cells/mL of RPMI) were loaded with Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (DCFDA, 20 μ M; Abcam) for 30 minutes. After washing with media to remove the excess stain, neutrophils were pretreated with an NADPH oxidase inhibitor (DPI; 25 μ M), DMSO control vehicle, or PBS for 30 minutes prior to the addition of angiopoietins and incubation for 3 hours at 37°C, 5% CO₂. Cells were washed, resuspended in HBSS (1×10^6 cells/mL) and fluorescence was acquired immediately by flow cytometry (LSR II, BD Biosciences). Non-stained cells were used as a negative control for gating purposes and the number of ROS positive cells were calculated using BD software (BD FACSDiva, BD Biosciences). Histograms were prepared using FlowJo v.10 software (FlowJo LLC, Ashland, Oregon).

Neutrophil adhesion assays

The adhesion of neutrophils onto HUVEC (Lonza, Walkersville, MD, USA) or hECM (cat#354237, Corning, Bedford, MA) was measured under static conditions as described previously (18). HUVEC were seeded (40 000 cells/well; 48-well plates) and cultured in endothelial basal medium 2 (EBM-2; Clonetics, San Diego, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Etobicoke, ON, Canada), endothelial growth medium 2 singlequot (Clonetics) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin; Sigma), and were used between passages 3 and 5. For the adhesion experiments, NETs (0 – 750 ng/mL) were pretreated with or without DNase I (Sigma; 10 U/mL) for 1 hour, mixed with neutrophils (1×10^5 cells in 250 μ L HBSS+CaCl₂ (5 mM) and termed HBSS+) and added onto 3-days post-confluent HUVEC, and maintained at 37°C for 7.5 minutes. The wells were then carefully rinsed with PBS to remove non-adherent neutrophils and bound neutrophils were fixed with PBS supplemented with 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde. The adhesion of neutrophils onto HUVEC monolayers was assessed using a color video digital camera adapted to a binocular microscope. For each well, four fields of view (FOV) were randomly selected, and the neutrophils in each FOV were counted and averaged as the number of bound neutrophils/FOV, using ImageJ v1.50i (Bethesda, MD, USA). For the adhesion of neutrophils onto hECM, 48-well plates were coated with 125 μ L/well of hECM diluted in serum-free RPMI at a concentration of 20 μ g/mL. Briefly, the plates were incubated with 20 μ g/mL hECM for 2 hours at room temperature, washed twice with serum-free RPMI (250 μ L/wash), and dried for a minimum of 2 hours. As described for the HUVEC experiments, NETs (with or without DNase I) were added to neutrophils

(1×10^6 cells/mL; 250 μ L/well) and then added to hECM-coated plates. The subsequent steps were identical to studies of neutrophil adhesion onto HUVEC. When using blocking antibodies, prior to the adhesion assays, neutrophils were pre-incubated (37°C for 15 minutes) in the presence of a control goat IgG or a blocking goat polyclonal anti-human β 2-integrin/CD18 antibody (α -CD18; 2 μ g/mL; Gln23-Asn700, Accession Number #AAA59490, R&D Systems) and then washed; HUVEC were incubated (37°C for 15 minutes) in presence of a P-selectin antagonist (human recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand immunoglobulin; rPSGL-Ig; 1 μ g/mL) (R&D Systems) and then washed. The adhesion assays were then performed as detailed above.

Endothelial cells capillary-like tube formation assay

Micro (μ)-angiogenesis 15-well slides (Ibidi, Verona, WI, USA) coated with Matrigel (cat#356234, BD Biosciences) (diluted as per Manufacturer's instructions) were seeded with HUVEC (1×10^4 cells/well) mixed with PBS, vascular endothelial growth factor (VEGF, 40 ng/mL; Peprotech) or NETs induced by different agonists in EBM-2 growth factor free media for 4 hours. Cells were then photographed using a color video digital camera adapted to a binocular microscope and the formation of capillary-like structures was analyzed (total tube length, number of loops and their area) from 4 random FOV using ImageJ v1.50i.

Statistical analysis

The data are presented as means \pm SEM from at least three (3) independent experiments. Each experiment is deriving from independent donors. Statistical analyses were performed with SPSS 24 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Groups were compared by

analysis of variance, followed by Dunnett's post hoc test for multiple comparisons. If variances were heterogeneous, Brown-Forsythe correction was followed by Dunnett T3 comparisons when applicable. Results were considered significantly different at p values less than 0.05.

2.4 Results

Angiopoietins induce NETosis in human neutrophils

We previously reported the capacity of both angiopoietins (Ang1 and Ang2) to promote equipotent pro-inflammatory activities in neutrophils, whereas Ang1 possesses a differential capacity as compared to Ang2 to support transcriptional and translational activities (18, 20-24).

Herein, we sought to determine whether Ang1 and/or Ang2 could induce NETosis in human neutrophils. In a first series of experiments, neutrophils were treated with PBS (control vehicle), Ang1 and/or Ang2 (0.1 - 10 nM) (15, 25-28) for 3 hours. By adding a fluorescent cell-impermeant nucleic acid stain (Sytox Green) that labels extracellular DNA, we observed that Ang1 and Ang2 alone or combined can induce NETs formation in a concentration-dependent manner with a maximal effect at 10 nM (Ang1, 2.3-fold; Ang2, 2.3-fold or Ang1+Ang2, 2.8-fold increase as compared to PBS-treated neutrophils). Since NETs formation fluctuate from one donor to another, the data are reported as relative fold increase of DNA-stained area as compared to PBS-treated neutrophils, which is set to 1 (Fig. 1A and B). Neutrophils were also treated with different agonists as positive controls including PMA (25 nM) (4), IL-8 (25 nM) (29), LPS (100 ng/mL) (30) and PAF (100 nM) (31). NETs induced by angiopoietins (Ang1, Ang2 and Ang1+Ang2; 10 nM) were morphologically similar to NETs triggered by these agonists (Fig. 1C). Quantification of DNA-stained area showed that PMA is a potent pharmacological inducer of NETs formation (>70-fold), whereas, Ang1 and/or Ang2 were as potent as physiological agonists (e.g. IL-8, LPS or PAF) in promoting NETs

formation (Fig. 1D). The validation of NETosis was also assessed by colocalization of dsDNA (Sytox green staining) with MPO and citrullinated histone H3 proteins (Supplemental Data – Figure 1).

Angiopoietins-mediated NETs formation: Intracellular cell signaling pathways

We and other groups reported that angiopoietins' activities on leukocytes (e.g. monocytes, eosinophils and neutrophils) are Tie2-dependent (15, 16, 18-20, 24). Herein, neutrophils were pretreated with a Tie2 kinase inhibitor (Tie2i; 2.5 μ M) (32) or the control vehicle (DMSO; 0.1%) for 30 minutes prior to incubation in the presence of agonists (PBS, Ang1, Ang 2 and Ang1+Ang2 (10 nM)) for 3 hours. Pre-treatment with Tie2i did not significantly affect the basal (PBS) level of NETs release, but prevented Ang1 and/or Ang2 (10 nM) from inducing NETs release (Fig. 2A).

Depending on the cells being stimulated (ECs or neutrophils), the biological actions of both angiopoietins can be mediated through the activation of MEK, p38 MAPK and/or PI3K pathways (14, 20, 21, 33, 34). Using selective inhibitors of MEK1/2 (U0126; 20 μ M) (35), p38 MAPK (SB203580; 10 μ M) (36), or PI3K (LY294002; 10 μ M) (37) we assessed the role of these kinases in modulating angiopoietins-induced NETs production from neutrophils. Each of these inhibitors reduced the basal (PBS) release of NETs from neutrophils by about \approx 20% (Fig. 2B). In addition, the release of NETs evoked by Ang1 and Ang2 (10 nM), administered separately or together, was reduced to near basal levels by pretreatment with either U0126, SB203580 or LY294002 (Fig. 2B).

We also addressed the capability of extracellular and/or intracellular calcium to modulate angiopoietins-induced NETs production by using an extracellular Ca^{2+}

chelator (BAPTA; 10 μ M) (38), or an intracellular Ca²⁺ chelator (BAPTA-AM; 10 μ M) (10). Pre-treatment with these inhibitors did not significantly affect the basal level of NETs release. However, the release of NETs mediated by Ang1, Ang2 or combined angiopoietins was partially but not significantly reduced by extracellular calcium chelation with BAPTA, whereas NETs formation was completely abrogated when intracellular calcium was chelated using BAPTA-AM (Fig. 2C).

It has been reported that PAD4 catalyzes the de-amination of arginine into citrulline in histones, thus weakening the binding of histones to DNA (9). Using a selective PAD4 inhibitor (GSK484; 10 μ M) (39), we observed a partial reduction (\approx 35%) of basal (PBS) NETs release and a complete inhibition of angiopoietins-evoked NETs release (Fig. 2D).

ROS production by NADPH oxidase in neutrophils can influence NETs formation upon stimulation with PMA and other agonists (8, 40). Herein, we report that treatment with Ang1 and Ang2 (10 nM; 3 hours), separately or in combination, increased the number of ROS positive neutrophils by 125 to 200% as compared to PBS-treated cells (Fig. 3A and 3B). When neutrophils were pretreated with a selective NADPH oxidase inhibitor (DPI; 25 μ M) (41), we observed a marked reduction (\approx 75%) in neutrophils staining positively for ROS under basal conditions, and angiopoietins-mediated ROS synthesis was completely blocked (Fig. 3B). Inhibiting NADPH oxidase also reduced basal NETs production by 40% and prevented angiopoietins from increasing NETs synthesis (Fig. 3C).

NETs pro-inflammatory activities on neutrophils and endothelial cells

We next wanted to assess if NETs released under angiopoietins stimulation trigger pro-inflammatory responses through neutrophil β 2-complex (CD11b/CD18) activation and endothelial cell P-selectin translocation.

Binding of neutrophils onto human extracellular matrix (hECM)

Neutrophils exposed to PBS or PMA (25 nM) were immediately transferred onto hECM-coated plates and incubated for 7.5 minutes to set the basal and maximal binding of neutrophils onto hECM (25 and 220 neutrophils per FOV, respectively) (Fig. 4A and B). Treatment of neutrophils for 3 hours with PBS, Ang1, Ang2, Ang1+Ang2 (10 nM) or PMA (25 nM) induced the release of 97, 230, 218, 256, and 707 ng/mL of NETs respectively. These NETs were collected, added to neutrophils for 7.5 minutes, which increased neutrophil adhesion onto hECM by 1.2-, 3.2-, 3.3-, 3.2- and 4.9-fold as compared to basal binding (PBS alone) (Fig. 4A and B). To assess the direct capacity of NETs to promote neutrophil activation and adhesion, NETs were degraded by a 1-hour incubation period with DNase I (10 U/mL) (4), which completely abrogated the capacity of NETs to promote neutrophil adhesion onto hECM, whereas the addition of DNase I to PBS or PMA alone (in absence of NETs) did not alter their corresponding capacity to support neutrophil adhesion onto hECM (Fig. 4A and B). A NETs concentration-dependent assay (100, 200, 400 and 800 ng/mL) was performed to assess the binding kinetics of neutrophils onto hECM. These concentrations increased neutrophil adhesion onto hECM by 1.5-, 3.1-, 4.4- and 5.6-fold as compared to basal binding (PBS alone) (Fig. 4C). Based on this latter observation, an intermediate concentration of NETs (200 ng/mL) being produced by neutrophils stimulated with PBS,

angiopoietins or PMA induced an equivalent neutrophil adhesion onto hECM (\approx 3-fold increase), which was abrogated by DNase I treatment (Fig. 4D). To assess whether the binding of neutrophils onto hECM was mediated by the capacity of NETs to activate neutrophils or the possible stickiness of NETs, neutrophils were pretreated with a blocking CD18 antibody (α -CD18; 2 μ g/mL; 15 min) (18) prior to NETs exposure. This pretreatment completely inhibited the adhesion of neutrophils onto hECM induced by PMA alone or by isolated NETs (Fig. 4E). Pretreatment of neutrophils with a control goat IgG did not interfere with neutrophil adhesion onto hECM (data not shown).

Binding of neutrophils onto human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)

As performed in Figure 4, we now assessed the binding of neutrophils onto activated HUVEC. Neutrophils were mixed with PBS or PMA (25 nM) and immediately added onto HUVEC for 7.5 minutes, providing basal and maximal adhesion of neutrophils onto HUVEC (39 and 236 neutrophils/FOV respectively); Treatment with NETs isolated from PBS-stimulated neutrophils (105 ng/mL) induced a slight but not significant increase of neutrophil adhesion onto HUVEC; whereas NETs isolated from treatments with angiopoietins (Ang1, Ang2, Ang1+Ang2 or PMA; 198, 207, 254, and 723 ng/mL, respectively) increased neutrophil adhesion onto HUVEC by 3.4-, 3.2-, 3.3- and 4.8-fold as compared to basal binding (PBS alone), and these effects were obliterated by the exposure of NETs to DNase I treatment (Fig. 5A and B). A NETs concentration-dependent assay (100, 200, 400 and 800 ng/mL) was performed, leading to an increased adhesion of neutrophils onto HUVEC by 1.3-, 3.6-, 4.8- and 5.9-fold as compared to basal levels (Fig. 5C). At an intermediate concentration (200 ng/mL), these NETs were also equipotent to promote neutrophil adhesion onto HUVEC (2.9- to 3.4-fold increase),

which was eliminated by DNase I treatment (Fig. 5D). Next, we assessed the capacity of NETs to promote neutrophil adhesion onto HUVEC through the endothelial P-selection translocation and neutrophil β 2-complex (CD11b/CD18) activation. In this series of experiments, HUVEC were pretreated with a P-selectin antagonist (rPSGL-Ig; 1 μ g/mL for 15 minutes) (43), whereas neutrophils were pretreated with a blocking CD18 antibody (α -CD18; 2 μ g/mL for 15 minutes) prior to the addition of neutrophils onto HUVEC. The basal adhesion of neutrophils onto HUVEC was unaltered by rPSGL-Ig, α -CD18 or dual rPSGL-Ig/ α -CD18 pretreatment. However, pretreatment of: 1) HUVEC with rPSGL-Ig, 2) neutrophils with α -CD18 or 3) combined pretreatment of HUVEC and neutrophils with rPSGL-Ig + α -CD18 respectively reduced PMA-induced neutrophil adhesion onto HUVEC by 73, 74 and 99% respectively (Fig. 5E). Similarly, a pretreatment with rPSGL-Ig or α -CD18 provided a partial inhibition (\approx 52-85%) of neutrophil adhesion onto HUVEC mediated by NETs isolated from angiopoietins and PMA stimulation, and this effect was completely prevented ($>$ 96%) by the dual blockade of P-selectin and β 2-complex (Fig. 5E). Again, pretreatment of neutrophils with a control goat IgG did not interfere with neutrophil adhesion onto HUVEC (data not shown).

NETs pro-angiogenic activities on EC capillary-like tube formation

The effect of NETs on in vitro EC capillary-like tube formation was assessed using a “mimicking” 2-dimensional Matrigel assay of in vivo angiogenesis. Isolated HUVEC were mixed with PBS, vascular endothelial growth factor (VEGF; 40 ng/mL; positive control) (44) or NETs in EBM-2 media and seeded on Matrigel for 4 hours. Treatment with VEGF increased the length, number and area of capillary-like tube loops by 58, 265 and 157% respectively as compared to basal PBS-treated HUVEC (Fig. 6A-D). In

comparison, NETs isolated from treatments with PBS, angiopoietins (Ang1, Ang2, Ang1+Ang2) or PMA (89, 199, 203, 234 and 676 ng/mL, respectively) increased capillary-like tube length by 23% to 33% (Fig. 6A and B), the number of closed loops by 100 to 140% (Fig. 6A and C) and tubules area by 56 to 80% as compared to basal PBS-treated HUVEC (Fig. 6D).

2.5 Discussion

In the present study, we report for the first time the capacity of both angiopoietins to promote the synthesis and release of NETs; a process that is dependent on intracellular calcium, and through the activation of PI3K, p38 and p42/44 MAPK pathways, ROS production and PAD4 activation. We have also shown that angiopoietin-induced NETs can also modulate a rapid functional up-regulation of β 2-integrin complex (CD11/CD18) and endothelial P-selectin translocation, contributing to increase neutrophil adhesion onto hECM and activated ECs (Fig. 7). Finally, these NETs can induce in vitro pro-angiogenic activities associated to ECs capillary-like tube formation.

Angiopoietins induce NETosis in human neutrophils

Herein, we report that angiopoietins 1 and 2 have an equipotent capacity to induce NETs synthesis and release by human neutrophils, and their combination did not provide further increase. Our results are in line with our previous studies demonstrating an equal capacity between Ang1 and Ang2 (0.1 pM to 10 nM) to induce non-transcriptional-mediated pro-inflammatory activities, such as the synthesis and release of PAF, up-regulation of the β 2-integrin complex (CD11/CD18) and neutrophil adhesion and migration (14, 18, 20). However, at the highest concentration tested (10 nM), but within a concentration range used in other studies to promote various biological activities (15, 25-28), Ang1 has the capacity to induce transcriptional and translational activities in human neutrophils whereas Ang2 does not (21, 23, 24). In the current study, both angiopoietins significantly increased NETs synthesis and release at the highest concentration (10 nM). Although our current data could suggest that Ang1 induced NETs

synthesis through transcriptional and/or translational activities, it has been well described by Sollberger et al. that NETs formation evoked by PMA and other stimuli is independent of transcriptional and translational activities (45). Hence, this explains the capacity of both Ang1 and Ang2 (10 nM) to promote NETs synthesis and release.

Intracellular mechanisms involved in angiopoietins-mediated NETs release

Classically, Tie2 was recognized as being expressed on endothelial and hematopoietic stem cells (46). However, we detected Tie2 expression in neutrophils by RT-PCR and immunocytochemistry and reported the capacity of Ang1 and Ang2, acting through Tie2, to induce downstream PI3K, p38 and p42/44 MAPK signaling (14, 20, 22). Other groups have reported the expression of Tie2 receptors on neutrophils, eosinophils and monocytes, and corresponding Tie2-dependent biological activities (15, 16, 19). More recently, Burnett et al. reported the expression of Tie2 receptor on mouse neutrophils, and using blocking anti-Tie2 and anti-CD18 antibodies, they reported that Ang1 induces mouse neutrophil chemotaxis in a partially Tie2 and CD18 dependent manner (28). In our study, we used a selective Tie2 inhibitor that acts on Tie2 receptor's kinase activity, thus, leaving Tie2 receptor site freely accessible for the binding of Ang1 and Ang2 (32). We observed that the inhibition of Tie2 receptor's kinase activity prevented Ang1 and Ang2 from increasing NETosis. Our data demonstrate that the synthesis and release of NETs mediated by Ang1 and Ang2 on human neutrophils is Tie2-dependent. These data are consistent with previous studies showing that the inhibition of human Tie2 activation blocks the biological actions of both angiopoietins in ECs and leukocytes (18, 19, 47). The latest data from Burnett et al. (28) may suggest that in function of the species (mouse vs human), angiopoietins can bind differently to Tie2 and/or CD18 and contribute

differently to angiopoietins biological activities. In addition, the authors specified that Ang1 is able to bind directly to mouse neutrophil surface CD18 but at very low levels or weakly. Yet, it remains to be established if angiopoietins can bind onto human neutrophil surface CD18 and if this complex participates to biological activities other than NETosis.

Angiopoietins 1 and 2 activate PI3K, p38 and p42/44 MAPK in both ECs and neutrophils (14, 19, 20, 22, 48-50). These signaling pathways are major contributors in the regulation of neutrophil functions such as adhesiveness, chemotaxis, release of specific granular contents, and oxidative burst (51). Herein, we show that, as reported for other agonists (40, 52, 53), the PI3K, p38 and p42/44 MAPK pathways are all involved in angiopoietins-mediated NETs formation.

Neutrophil activation in response to various pro-inflammatory stimuli involves calcium flux either via extracellular calcium influx and/or release from an intracellular calcium store (54). Depending on the agonists, both intra- and extracellular calcium pools can modulate NETosis (10, 52, 55). In this study, we observed that angiopoietin-mediated NETosis is dependent on intracellular calcium: while chelation of extracellular calcium with BAPTA led to a partial non-significant reduction, chelation of intracellular calcium by loading the cells with BAPTA-AM completely abrogated NETs synthesis. These results are supported by previous studies demonstrating that both PMA and bacterial stimulation are dependent on an elevation in intracellular calcium via release from intracellular stores, but less dependent on extracellular calcium influx to induce NETosis (10, 55).

ROS formation by the multienzyme complex NADPH oxidase is also an integral part of most signaling cascades leading to NETs release (56). Ang1 increases ROS production in ECs (57, 58) and NADPH oxidase-derived ROS production is required for IL-8-, PMA- and bacterial-mediated NETosis (30, 55). Herein, we show that both angiopoietins 1 and 2 promoted ROS formation. Furthermore, a selective NADPH oxidase inhibitor prevented both ROS formation and NETosis, indicating a requirement of NADPH oxidase-derived ROS formation for angiopoietins to induce NETosis.

There are numerous studies reporting the seminal role played by PAD4 in its capacity to catalyze histone hypercitrullination and chromatin decondensation, which leads to the formation of cytokines- and bacterial-mediated NETs (4, 9). Herein, we also confirm the essential contribution of PAD4 following angiopoietins-mediated NETosis.

In addition, we observed that the exposure of neutrophils to some of the inhibitors involved into NETosis even under basal condition were capable to reduce the release of NETs. This could be explained by the fact that a certain fraction of neutrophils are already engaged under physiological processes associated to NETosis, which can be blocked/delayed by such inhibitors.

Functional role of NETs on pro-inflammatory and pro-angiogenic activities

Full activation of neutrophils is a two-step process initiated by specific priming by pro-inflammatory cytokines or by cell-cell interaction with activated ECs (59). We previously reported that angiopoietins directly promote acute β 2-complex (CD11/CD18) activation, recruitment of leukocytes, and neutrophil adhesion onto hECM and HUVEC (18). It has also been shown that NETs promote thrombosis by stimulating platelet and red blood cell adhesion and aggregation (60). Herein, we show that NETs,

independently from the stimuli (e.g. angiopoietins or PMA) induce in a concentration-dependent manner the binding of neutrophils onto hECM and HUVEC. This effect appears to be dependent on NETs integrity since their degradation with DNase I (4) completely abrogated neutrophil adhesion onto both hECM and ECs, which is in agreement with previous studies (61, 62). In addition, the combination of DNase I with PMA alone (in absence of NETs) did not alter the capacity of PMA to promote neutrophil adhesion onto hECM and HUVEC. Thus, DNase I (aside its capacity to degrade DNA from NETs) did not interfere with the activation of neutrophils and ECs by pro-inflammatory agonist (e.g. PMA).

The use of a blocking CD18 antibody (α -CD18), as opposed to corresponding control IgG, completely prevented NETs ability to promote neutrophil adhesion onto hECM, and by about 75% the binding of neutrophils onto HUVEC, suggesting that NETs can induce β 2-complex (CD11/CD18) activation. We also used a P-selectin antagonist (rPSGL-Ig) and observed a partial blockade of neutrophil adhesion onto HUVEC. When rPSGL-Ig and α -CD18 were combined, there was a complete inhibition of NETs-mediated neutrophil adhesion onto HUVEC. In a recent study, Grässle et al. reported that von Willebrand factor (vWF) released by HUVEC directly binds and immobilizes extracellular DNA released from leukocytes. Therefore, they hypothesized that vWF might act as a linker for leukocyte adhesion to endothelial cells, without excluding the possible participation of other contributors (42). According to this, we observed that when either P-selectin or CD18 integrin were no longer accessible, there was a residual binding capacity of neutrophil onto HUVEC, in which vWF might participate. However, with the double blockade of P-selectin and CD18 integrins, there was a full inhibition of

neutrophil binding onto HUVEC, suggesting that under such condition, vWF availability is not sufficient to support neutrophil adhesiveness onto endothelial cells.

To secure that the adhesion of neutrophils onto hECM and HUVEC was not due to the presence of residual Ang1 or Ang2 agonists or from the release of endogenous Ang1 by neutrophils or Ang2 by endothelial cells, we performed a control study in which HUVEC and neutrophils were pretreated with Tie2 inhibitor prior to the addition of NETs, and in all cases, the binding of neutrophils onto hECM and HUVEC was unaltered (data not shown).

Angiogenesis is a complex *in vivo* process that involves ECs migration and proliferation to occupy the surrounding tissue and form capillaries. While angiogenesis is normally a tightly controlled process that rarely occurs in the adult organism, a number of studies connect angiogenesis and inflammation, tending to prolong and intensify the inflammatory response (13, 63, 64). Among major regulators of blood vessel formation are angiopoietins (17, 65). Our findings show that the pro-angiogenic effects of angiopoietins under *in vitro* condition can be mediated via NETosis. In addition, we recently reported using a murine *in vivo* sponge/Matrigel angiogenic assay, that Ang1 and Ang2 are highly potent and efficient in recruiting ECs, smooth muscle cells (SMCs), and inflammatory cells (neutrophils and macrophages) to induce the formation of functional neovessels and their maturation by the coordinated ensheathing of SMCs around them (17). We revisited some of these specimens, and observed a co-localization of NETs with neutrophils in the sponge/Matrigel samples loaded with Ang1 and Ang2 at the angiogenic sites compared to PBS-treated specimens (unpublished data). Subsequent studies will be needed to validate whether NETs being release by neutrophil

at angiogenic sites are participating in angiopoietins-mediated in vivo angiogenesis. However, our observations are in agreement with a recent study reporting that NETs release in response to PMA have pro-angiogenic activities both under in vitro and in vivo conditions (13).

Activation of the endothelium, associated with increased endothelial inflammatory response, has been described in various pathological processes, including sepsis, vascular complications of diabetes, ischemia-reperfusion injury and atherosclerosis. As a consequence, the release of pro-inflammatory cytokines, including Ang1 by neutrophils and Ang2 by ECs (66, 67) may contribute to stabilize or prolong vascular pathological disorders and angiogenesis (68). Ang1 regulates endothelial cell survival and blood vessel maturation, while the increased concentration of Ang2 in patient serum correlates with a poor prognosis in sepsis, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome (68). In conclusion, our data are the first one to report the capacity of both angiopoietins to promote NETosis, which are in line with their pro-inflammatory and pro-angiogenic activities. These latter findings suggest a novel avenue by which both angiopoietins might modulate vascular homeostasis.

2.6 References

1. Lekstrom-Himes, J. A., and J. I. Gallin. 2000. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med* 343: 1703-1714.
2. Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6: 173-182.
3. Kolaczkowska, E., and P. Kubes. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13: 159-175.
4. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
5. Urban, C. F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 8: 668-676.
6. Manda, A., M. P. Pruchniak, M. Arazna, and U. A. Demkow. 2014. Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology. *Cent Eur J Immunol* 39: 116-121.
7. Wong, S. L., M. Demers, K. Martinod, M. Gallant, Y. Wang, A. B. Goldfine, C. R. Kahn, and D. D. Wagner. 2015. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med* 21: 815-819.
8. Rohm, M., M. J. Grimm, A. C. D'Auria, N. G. Almyroudis, B. H. Segal, and C. F. Urban. 2014. NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 82: 1766-1777.

9. Li, P., M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, and Y. Wang. 2010. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* 207: 1853-1862.
10. Gupta, A. K., S. Giaglis, P. Hasler, and S. Hahn. 2014. Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS One* 9: e97088.
11. Rada, B., M. A. Jendrysik, L. Pang, C. P. Hayes, D. G. Yoo, J. J. Park, S. M. Moskowitz, H. L. Malech, and T. L. Leto. 2013. Pyocyanin-enhanced neutrophil extracellular trap formation requires the NADPH oxidase. *PLoS One* 8: e54205.
12. Hakkim, A., T. A. Fuchs, N. E. Martinez, S. Hess, H. Prinz, A. Zychlinsky, and H. Waldmann. 2011. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 7: 75-77.
13. Aldabbous, L., V. Abdul-Salam, T. McKinnon, L. Duluc, J. Pepke-Zaba, M. Southwood, A. J. Ainscough, C. Hadinnapola, M. R. Wilkins, M. Toshner, and B. Wojciak-Stothard. 2016. Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 2078-2087.
14. Maliba, R., S. Lapointe, P. E. Neagoe, A. Brkovic, and M. G. Sirois. 2006. Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways. *Cell Signal* 18: 1947-1957.

15. Sturn, D. H., C. Feistritzer, B. A. Mosheimer, A. Djanani, K. Bijuklic, J. R. Patsch, and C. J. Wiedermann. 2005. Angiopoietin affects neutrophil migration. *Microcirculation* 12: 393-403.
16. Patel, A. S., A. Smith, S. Nucera, D. Biziato, P. Saha, R. Q. Attia, J. Humphries, K. Mattock, S. P. Grover, O. T. Lyons, L. G. Guidotti, R. Siow, A. Ivetic, S. Egginton, M. Waltham, L. Naldini, M. De Palma, and B. Modarai. 2013. TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb. *EMBO Mol Med* 5: 858-869.
17. Sinnathamby, T., J. Yun, M. E. Clavet-Lanthier, C. Cheong, and M. G. Sirois. 2015. VEGF and angiopoietins promote inflammatory cell recruitment and mature blood vessel formation in murine sponge/Matrigel model. *J Cell Biochem* 116: 45-57.
18. Lemieux, C., R. Maliba, J. Favier, J. F. Theoret, Y. Merhi, and M. G. Sirois. 2005. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 105: 1523-1530.
19. Feistritzer, C., B. A. Mosheimer, D. H. Sturn, K. Bijuklic, J. R. Patsch, and C. J. Wiedermann. 2004. Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1077-1084.
20. Brkovic, A., M. Pelletier, D. Girard, and M. G. Sirois. 2007. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *J Leukoc Biol* 81: 1093-1101.

21. Neagoe, P. E., E. Dumas, F. Hajjar, and M. G. Sirois. 2012. Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils. *J Cell Physiol* 227: 3099-3110.
22. Dumas, E., P. E. Neagoe, P. P. McDonald, M. White, and M. G. Sirois. 2016. New Insights into the Pro-Inflammatory Activities of Ang1 on Neutrophils: Induction of MIP-1beta Synthesis and Release. *PLoS One* 11: e0163140.
23. Haddad, L. E., and M. G. Sirois. 2014. Angiopoietin-1 upregulates de novo expression of IL-1beta and Il1-Ra, and the exclusive release of Il1-Ra from human neutrophils. *PLoS One* 9: e88980.
24. Dumas, E., C. Martel, P. E. Neagoe, A. Bonnefoy, and M. G. Sirois. 2012. Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 promotes neutrophil viability: Role of interleukin-8 and platelet-activating factor. *Biochim Biophys Acta* 1823: 358-367.
25. Kim, I., S. O. Moon, S. H. Kim, H. J. Kim, Y. S. Koh, and G. Y. Koh. 2001. 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* 276: 7614-7620.
26. Pizurki, L., Z. Zhou, K. Glynos, C. Roussos, and A. Papapetropoulos. 2003. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol* 139: 329-336.
27. Teichert-Kuliszewska, K., P. C. Maisonpierre, N. Jones, A. I. Campbell, Z. Master, M. P. Bendeck, K. Alitalo, D. J. Dumont, G. D. Yancopoulos, and D. J.

- Stewart. 2001. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 49: 659-670.
28. Burnett, A., I. Gomez, D. D. De Leon, M. Ariaans, P. Progiias, R. A. Kammerer, G. Velasco, M. Marron, P. Hellewell, and V. Ridger. 2017. Angiopoietin-1 enhances neutrophil chemotaxis in vitro and migration in vivo through interaction with CD18 and release of CCL4. *Sci Rep* 7: 2332.
29. Gupta, A. K., P. Hasler, W. Holzgreve, S. Gebhardt, and S. Hahn. 2005. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 66: 1146-1154.
30. Fuchs, T. A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176: 231-241.
31. Yost, C. C., M. J. Cody, E. S. Harris, N. L. Thornton, A. M. McInturff, M. L. Martinez, N. B. Chandler, C. K. Rodesch, K. H. Albertine, C. A. Petti, A. S. Weyrich, and G. A. Zimmerman. 2009. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood* 113: 6419-6427.
32. Hasenstein, J. R., K. Kasmerchak, D. Buehler, G. R. Hafez, K. Cleary, J. S. Moody, and K. R. Kozak. 2012. Efficacy of Tie2 receptor antagonism in angiosarcoma. *Neoplasia* 14: 131-140.
33. Kim, I., J. L. Oh, Y. S. Ryu, J. N. So, W. C. Sessa, K. Walsh, and G. Y. Koh. 2002. Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells. *FASEB J* 16: 126-128.

34. Bhattacharya, D., S. Chaudhuri, M. K. Singh, and S. Chaudhuri. 2015. T11TS inhibits Angiopoietin-1/Tie-2 signaling, EGFR activation and Raf/MEK/ERK pathway in brain endothelial cells restraining angiogenesis in glioma model. *Exp Mol Pathol* 98: 455-466.
35. Cadrillier, A., K. Kessenbrock, B. M. Gilliss, J. X. Nguyen, M. B. Marques, M. Monestier, P. Toy, Z. Werb, and M. R. Looney. 2012. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 122: 2661-2671.
36. Riyapa, D., S. Buddhisa, S. Korbsrisate, J. Cuccui, B. W. Wren, M. P. Stevens, M. Ato, and G. Lertmemongkolchai. 2012. Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against burkholderia pseudomallei and are influenced by bacterial and host factors. *Infect Immun* 80: 3921-3929.
37. Tang, S., Y. Zhang, S. W. Yin, X. J. Gao, W. W. Shi, Y. Wang, X. Huang, L. Wang, L. Y. Zou, J. H. Zhao, Y. J. Huang, L. Y. Shan, A. S. Gounni, Y. Z. Wu, and J. B. Zhang. 2015. Neutrophil extracellular trap formation is associated with autophagy-related signalling in ANCA-associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 180: 408-418.
38. Tymianski, M., M. P. Charlton, P. L. Carlen, and C. H. Tator. 1994. Properties of neuroprotective cell-permeant Ca²⁺ chelators: effects on [Ca²⁺]_i and glutamate neurotoxicity in vitro. *J Neurophysiol* 72: 1973-1992.
39. Lewis, H. D., J. Liddle, J. E. Coote, S. J. Atkinson, M. D. Barker, B. D. Bax, K. L. Bicker, R. P. Bingham, M. Campbell, Y. H. Chen, C. W. Chung, P. D. Craggs, R. P. Davis, D. Eberhard, G. Joberty, K. E. Lind, K. Locke, C. Maller, K.

- Martinod, C. Patten, O. Polyakova, C. E. Rise, M. Rudiger, R. J. Sheppard, D. J. Slade, P. Thomas, J. Thorpe, G. Yao, G. Drewes, D. D. Wagner, P. R. Thompson, R. K. Prinjha, and D. M. Wilson. 2015. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol* 11: 189-191.
40. Keshari, R. S., A. Verma, M. K. Barthwal, and M. Dikshit. 2013. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem* 114: 532-540.
41. Palmer, L. J., P. R. Cooper, M. R. Ling, H. J. Wright, A. Huissoon, and I. L. Chapple. 2012. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol* 167: 261-268.
42. Grassle, S., V. Huck, K. I. Pappelbaum, C. Gorzelanny, C. Aponte-Santamaria, C. Baldauf, F. Grater, R. Schneppenheim, T. Obser, and S. W. Schneider. 2014. von Willebrand factor directly interacts with DNA from neutrophil extracellular traps. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 1382-1389.
43. Rollin, S., C. Lemieux, R. Maliba, J. Favier, L. R. Villeneuve, B. G. Allen, S. Soker, N. G. Bazan, Y. Merhi, and M. G. Sirois. 2004. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood* 103: 3789-3797.
44. Goodwin, A. M. 2007. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res* 74: 172-183.
45. Sollberger, G., B. Amulic, and A. Zychlinsky. 2016. Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Independent of De Novo Gene Expression. *PLoS One* 11: e0157454.

46. Dumont, D. J., T. P. Yamaguchi, R. A. Conlon, J. Rossant, and M. L. Breitman. 1992. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7: 1471-1480.
47. Palmer, G. M., Z. Tiran, Z. Zhou, M. E. Capozzi, W. Park, C. Coletta, A. Pyriochou, Y. Kliger, O. Levy, I. Borukhov, M. W. Dewhirst, G. Rotman, J. S. Penn, and A. Papapetropoulos. 2012. A novel angiopoietin-derived peptide displays anti-angiogenic activity and inhibits tumour-induced and retinal neovascularization. *Br J Pharmacol* 165: 1891-1903.
48. Abdel-Malak, N. A., M. Mofarrahi, D. Mayaki, L. M. Khachigian, and S. N. Hussain. 2009. Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration, and differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 209-216.
49. Abdel-Malak, N. A., C. B. Srikant, A. S. Kristof, S. A. Magder, J. A. Di Battista, and S. N. Hussain. 2008. Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1-dependent autocrine production of interleukin-8. *Blood* 111: 4145-4154.
50. Yuan, H. T., E. V. Khankin, S. A. Karumanchi, and S. M. Parikh. 2009. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 29: 2011-2022.
51. Kim, D., and C. L. Haynes. 2013. The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression. *Analyst* 138: 6826-6833.

52. Behnen, M., C. Leschczyk, S. Moller, T. Batel, M. Klinger, W. Solbach, and T. Laskay. 2014. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIb and Mac-1. *J Immunol* 193: 1954-1965.
53. Munoz-Caro, T., S. J. Mena Huertas, I. Conejeros, P. Alarcon, M. A. Hidalgo, R. A. Burgos, C. Hermosilla, and A. Taubert. 2015. Eimeria bovis-triggered neutrophil extracellular trap formation is CD11b-, ERK 1/2-, p38 MAP kinase- and SOCE-dependent. *Vet Res* 46: 23.
54. Clemens, R. A., and C. A. Lowell. 2015. Store-operated calcium signaling in neutrophils. *J Leukoc Biol* 98: 497-502.
55. Parker, H., M. Dragunow, M. B. Hampton, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. 2012. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol* 92: 841-849.
56. Stoiber, W., A. Obermayer, P. Steinbacher, and W. D. Krautgartner. 2015. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules* 5: 702-723.
57. Chen, J. X., H. Zeng, M. L. Lawrence, T. S. Blackwell, and B. Meyrick. 2006. Angiotensin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1563-1572.
58. Harfouche, R., N. A. Malak, R. P. Brandes, A. Karsan, K. Irani, and S. N. Hussain. 2005. Roles of reactive oxygen species in angiotensin-1/tie-2 receptor signaling. *FASEB J* 19: 1728-1730.

59. Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 31: 318-324.
60. Fuchs, T. A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, Jr., S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, and D. D. Wagner. 2010. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 15880-15885.
61. Cools-Lartigue, J., J. Spicer, B. McDonald, S. Gowing, S. Chow, B. Giannias, F. Bourdeau, P. Kubes, and L. Ferri. 2013. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* 123(8): 3446–3458.
62. Monti, M., F. Iommelli, V. De Rosa, M. V. Carriero, R. Miceli, R. Camerlingo, G. Di Minno, and S. Del Vecchio. 2017. Integrin-dependent cell adhesion to neutrophil extracellular traps through engagement of fibronectin in neutrophil-like cells. *PLoS One* 12: e0171362.
63. Costa, C., J. Incio, and R. Soares. 2007. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10: 149-166.
64. Walsh, D. A., and C. I. Pearson. 2001. Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res* 3: 147-153.
65. Fagiani, E., and G. Christofori. 2013. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett* 328: 18-26.
66. Hegen, A., S. Koidl, K. Weindel, D. Marme, H. G. Augustin, and U. Fiedler. 2004. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive

and negative regulatory promoter elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1803-1809.

67. Neagoe, P. E., A. Brkovic, F. Hajjar, and M. G. Sirois. 2009. Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms. *Growth Factors* 27: 335-344.
68. Saharinen, P., L. Eklund, and K. Alitalo. 2017. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov*.

2.7 Acknowledgments

We are thankful to all our volunteers for providing us so kindly with blood samples, Mr. Louis Villeneuve for his confocal microscopy technical support and Dr. Bruce G. Allen for proof-reading.

2.8 Conflict of interest disclosure

The authors declare that they have no competing interests.

2.10 Footnotes

1. These authors contributed equally to this work.
2. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-97943), Heart and Stroke Foundation of Québec and Fonds de recherche Québec Santé (FRQS) - Research Network on Cardiometabolic Health, Diabetes and Obesity (CMDO) to Dr. Martin G. Sirois. Mr. Simon Lavoie was recipient of graduate studentship from the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal (FICM).
3. Address correspondence and reprint requests to Dr. Martin G. Sirois, Research Center of Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Qc, Canada, H1T 1C8. Phone #: 514-376-3330 ext. 3583 Fax #: 514-376-1355 E-mail: martin.sirois@icm-mhi.org
4. Abbreviations used in this article: Ang1, Angiotensin 1; Ang2, Angiotensin 2; EC, Endothelial cell; FOV, Field of view; MPO, Myeloperoxidase; NE, Neutrophil elastase; NETs, Neutrophil extracellular traps; ROS, Reactive oxygen species; rPSGL-Ig, recombinant P-selectin glycoprotein ligand immunoglobulin; PAD4, Protein arginine deiminase 4; PAF, Platelet activating factor; VEGF, Vascular endothelial growth factor.

2.11 Figure Legends

Figure 1. Angiopoietins induce NETosis in human neutrophils. Neutrophils were stimulated with control vehicle (PBS), angiopoietins (Ang1, Ang2 alone or combined; 0.1 - 10 nM), PMA (25 nM), IL-8 (25 nM), LPS (100 ng/mL) or PAF (100 nM) for 3 hours to induce NETosis. NETs formation was visualized by Sytox Green staining of double-stranded DNA (A, C). NETs formation after 3 hour-stimulation was quantified from confocal fluorescence microscopic images by measuring Sytox Green -stained area, and presented as fold increase as compared to PBS (B, D). Data are means \pm SEM from at least 6 independent experiments. Each experiment employed neutrophils isolated from a different donor. Significance of data (1-way ANOVA) compared to control PBS is indicated by * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. Scale bar 100 μm .

Figure 2. Intracellular mechanisms involved in angiopoietins-mediated NETosis. Neutrophils were stimulated with PBS, Ang1, Ang2, Ang1+Ang2 (10 nM; 3 hours), and when applicable, neutrophils were pretreated for 30 minutes with control vehicle (DMSO 0.1%) or selective inhibitors: Tie2 inhibitor (Tie2i; 2.5 μM) (A), MEK inhibitor (U0126; 20 μM), p38 MAPK inhibitor (SB203580; 10 μM) or PI3K inhibitor (LY294002; 10 μM) (B), extracellular or intracellular calcium chelators (BAPTA or BAPTA-AM; 10 μM respectively) (C), a PAD4 inhibitor (GSK484; 10 μM) (D). NETs were isolated and quantified as double-stranded DNA (ng/mL) by fluorometric assay (Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit). Data are means \pm SEM from at least 6 independent experiments. Each experiment employed neutrophils isolated from a

different donor. Significance of data (1-way ANOVA) is indicated by * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ as compared to control PBS; by †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ as compared to control DMSO and by § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ as compared to corresponding angiopoietin(s) + DMSO treatment. Dotted line corresponds to control basal level.

Figure 3. Angiopoietins-mediated NETosis is dependent on ROS production.

Neutrophils were stimulated with angiopoietins for 3 hours and stained with a cellular reactive oxygen species (ROS)-sensitive fluorogenic dye (DCFDA; 20 μ M; 30 minutes) and when applicable, neutrophils were pretreated for 30 minutes with control vehicle (DMSO 0.1%) or with an NADPH oxidase inhibitor (DPI; 25 μ M) (A, B). NETs were isolated and quantified as double-stranded DNA (ng/mL) by fluorometric assay (Quant-IT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit) (C). Data are means \pm SEM from at least 6 independent experiments. Each experiment employed neutrophils isolated from a different donor. Significance of data (1-way ANOVA) is indicated by * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ as compared to control PBS; by † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ as compared to control DMSO and by § $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$ as compared to corresponding angiopoietin(s) + DMSO treatment. Dotted line corresponds to control basal level.

Figure 4. NETs-mediated neutrophil adhesion onto hECM. Neutrophils were mixed with PBS, PMA (25 nM) or NETs derived from neutrophils stimulated with Ang1, Ang2, Ang1+Ang2 (10 nM) or PMA (25 nM) and immediately added to hECM-coated plates for 7.5 minutes. When applicable, NETs were treated with DNase I (10 U/mL; 1h) prior

to hECM adhesion assays. hECM-bound neutrophils were visualized using an inverted microscope (A). The bound neutrophils were counted in each of four randomly selected FOV and reported as the average number of adherent neutrophils/FOV (B-E). Concentration-dependent effect of NETs on neutrophil adhesion to hECM (C). Effect of 200 ng/mL NETs, isolated from neutrophils following the indicated treatments, on neutrophil adhesion onto hECM (D). Effect of 200 ng/mL NETs, isolated from neutrophils following the indicated treatments, on neutrophil adhesion onto hECM. Neutrophils were pretreated with PBS or a blocking CD18 antibody (α -CD18; 2 μ g/mL) prior to the adhesion assay (E). Data are means \pm SEM from at least 6 independent experiments. Each experiment employed neutrophils isolated from a different donor. Significance of data (1-way ANOVA) is indicated by * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 as compared to PBS-treated neutrophils, by † p < 0.05 as compared to NETs isolated from PBS stimulation and by § p <0.05; §§ p <0.01; §§§ p <0.001 as compared to corresponding NETs stimulation. Dotted line corresponds to control basal level. Scale bar 100 μ m.

Figure 5. NETs-mediated neutrophil adhesion onto HUVEC. Neutrophils were mixed with PBS, PMA (25 nM) or NETs-derived from neutrophil stimulation with Ang1, Ang2, Ang1+Ang2 (10 nM) or PMA (25 nM), immediately added onto a confluent monolayer of HUVEC, and incubated for 7.5 minutes. When applicable, NETs were treated with DNase I (10 U/mL; 1 hour) prior to HUVEC adhesion assay. Adherent neutrophils were visualized using an inverted microscope (A). The bound neutrophils were counted in each of four randomly selected FOV and reported as the average number of adherent neutrophils/FOV (B-E). Concentration-dependent effect of

NETs on neutrophil adhesion onto HUVEC (C). Effect of 200 ng/mL of NETs, isolated from neutrophils following the indicated treatments, on neutrophil adhesion onto HUVEC (D). Effect of 200 ng/mL NETs, isolated from neutrophils following the indicated treatments, on neutrophil adhesion onto HUVEC. Neutrophils were pretreated with a blocking CD18 antibody (α -CD18; 2 μ g/mL) and HUVEC were pretreated with a P-selectin antagonist (rPSGL-Ig; 1 μ g/mL) prior to the adhesion assay (E). Data are means \pm SEM from at least 6 independent experiments. Each experiment employed neutrophils isolated from a different donor. Significance of data (1-way ANOVA) is indicated by * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 as compared to PBS-treated neutrophils, by † p < 0.05; †† p < 0.01; ††† p <0.001 as compared to NETs isolated from PBS stimulation and by § p <0.05; §§ p <0.01; §§§ p <0.001 as compared to corresponding NETs stimulation. Dotted line corresponds to control basal level. Scale bar 100 μ m.

Figure 6. Pro-angiogenic effects of angiopoietins-mediated NETs. HUVEC stimulated with PBS, VEGF (40 ng/mL) or NETs-derived from neutrophil stimulation with Ang1, Ang2, Ang1+Ang2 (10 nM) for 4 hours. Capillary-like tube formation was visualized using an inverted microscope (A), the tube length (B), the number of loops (C) and their area (D) were calculated and averaged from 4 random FOV. Data are means \pm SEM from at least 6 independent experiments. Significance of data (1-way ANOVA) is indicated by * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 as compared to PBS-treated HUVEC. Black scale bar, 500 μ m; white scale bar, 200 μ m.

Figure 7. Proposed schematic illustration of mechanisms associated to angiopoietins-mediated NETosis: role of NETs onto neutrophil and endothelial cell activation. Angiopoietins bind to Tie2 receptor and induce NETosis through MEK, p38 MAPK and PI3K activation, as well as through ROS formation from NADPH oxidase activation, intracellular Ca²⁺ elevation and PAD4 activation. Upon their release, NETs can promote: (1) β_2 -integrin (CD11b/CD18) complex conformational change and neutrophil binding onto endothelial ICAM-1, (2) endothelial P-selectin translocation and interaction with neutrophil PSGL-1, and (3) a dual positive effect on CD11b/CD18 and P-selectin to promote enhanced adhesiveness of neutrophils onto ECs. Inhibitors and antagonists are highlighted in red.

2.12 Figures

Figure 1

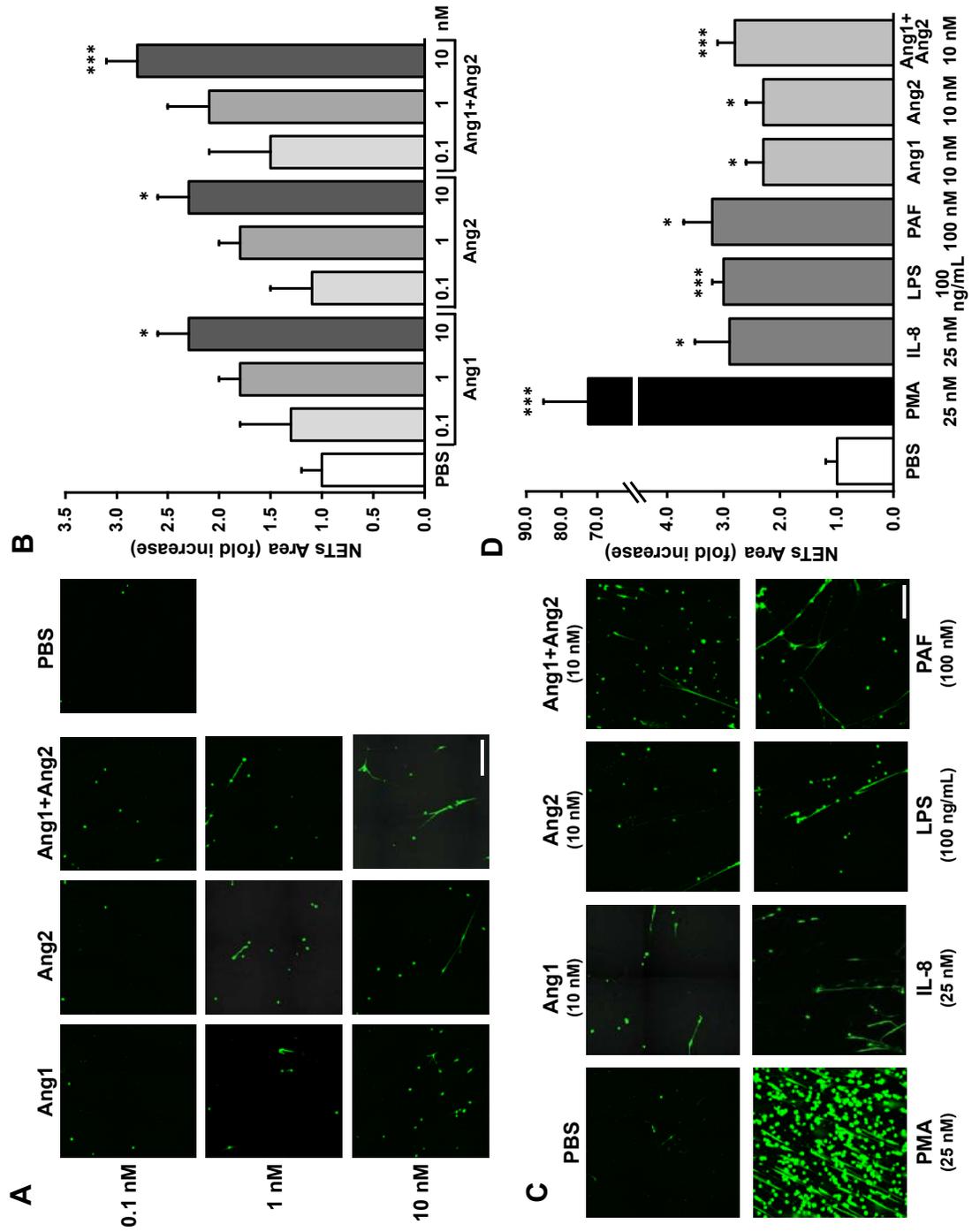


Figure 2

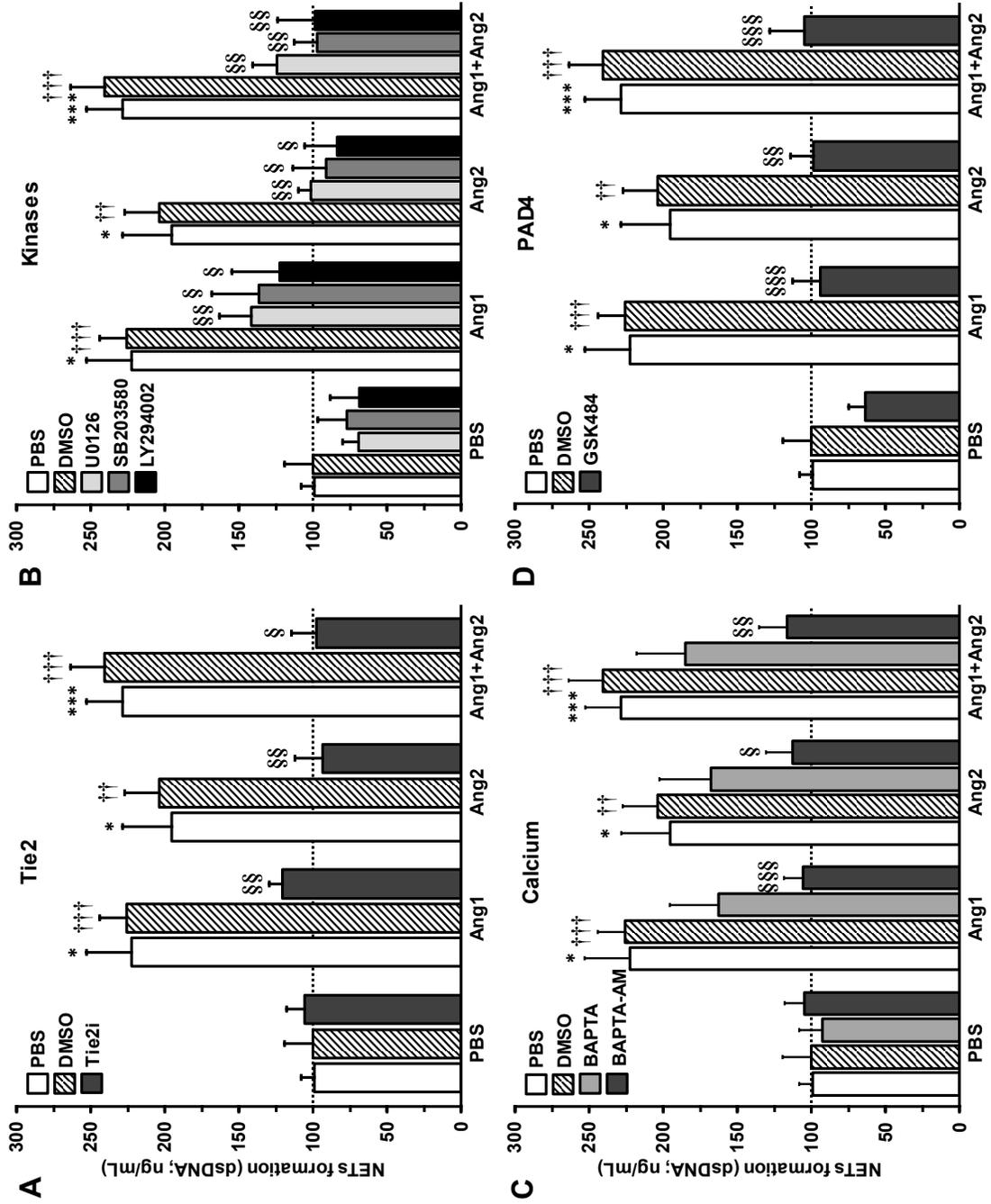


Figure 3

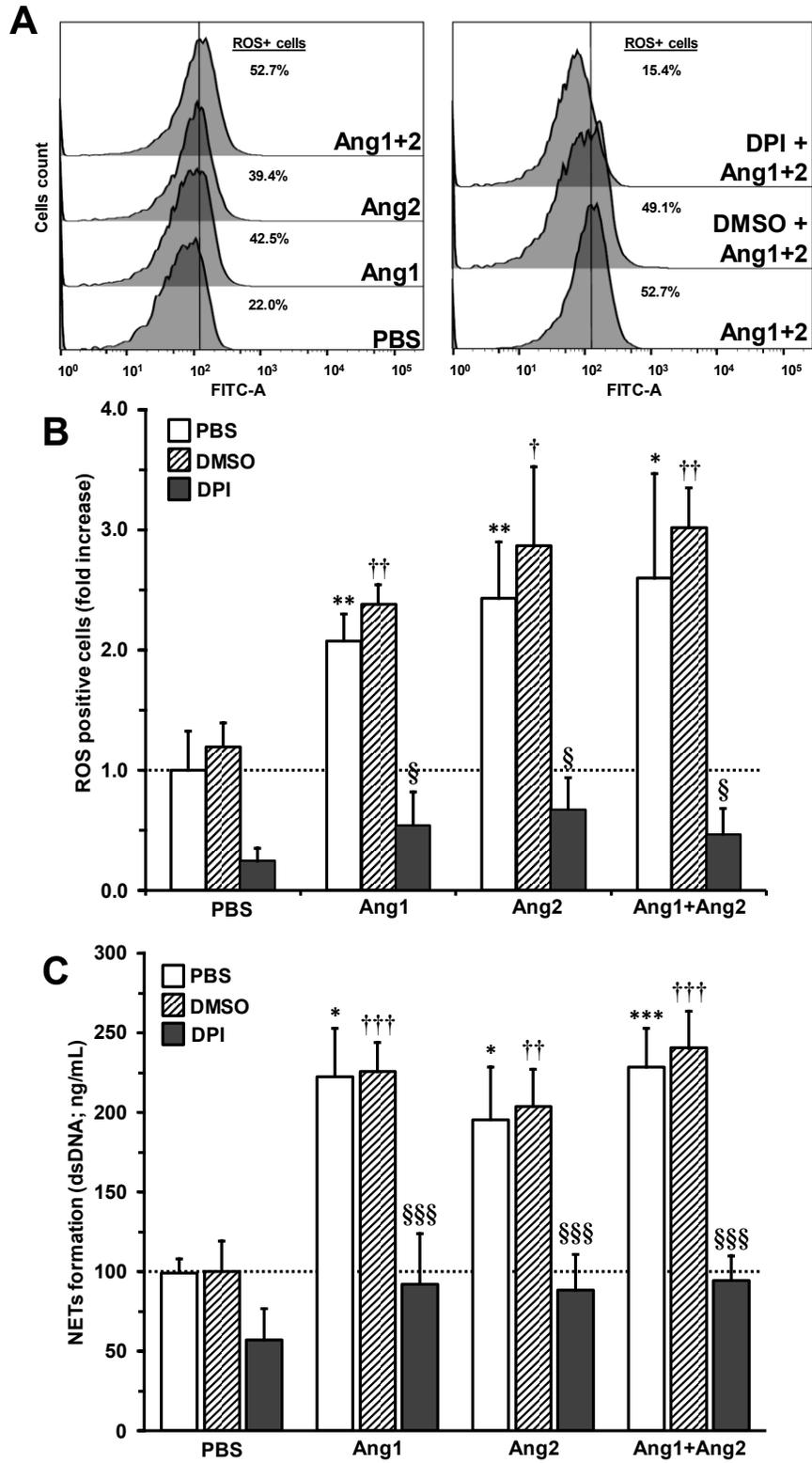


Figure 4

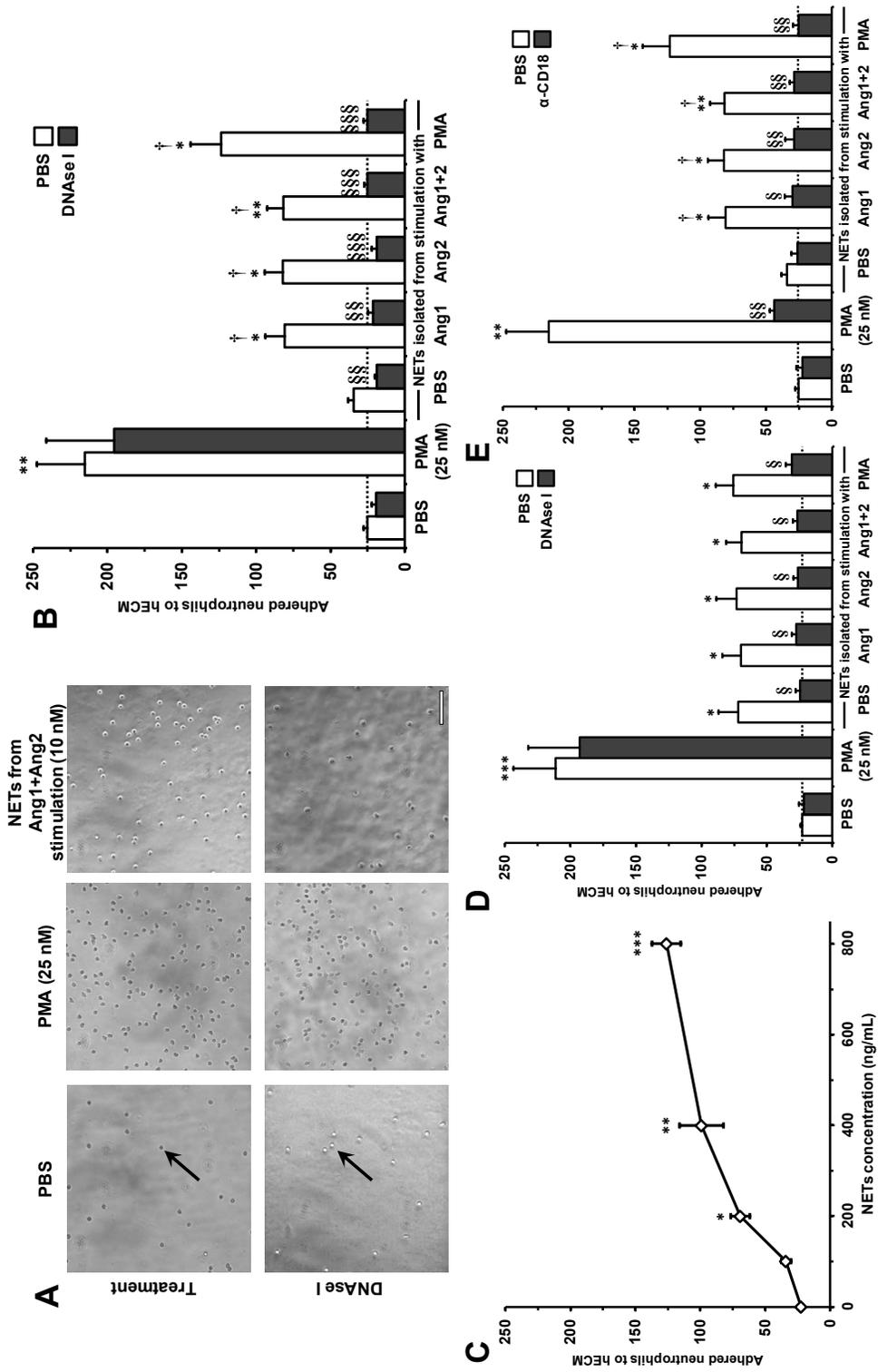


Figure 5

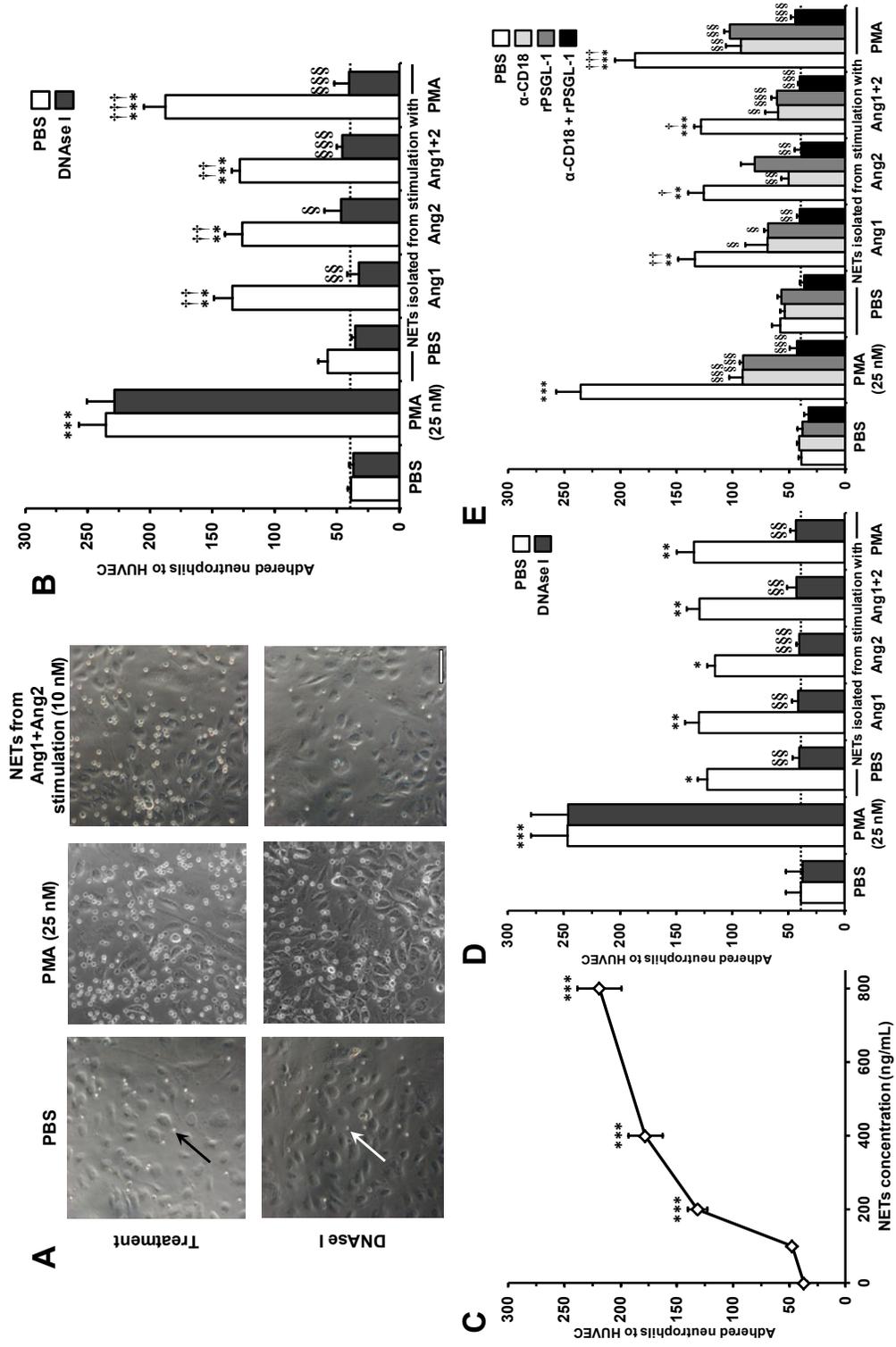


Figure 6

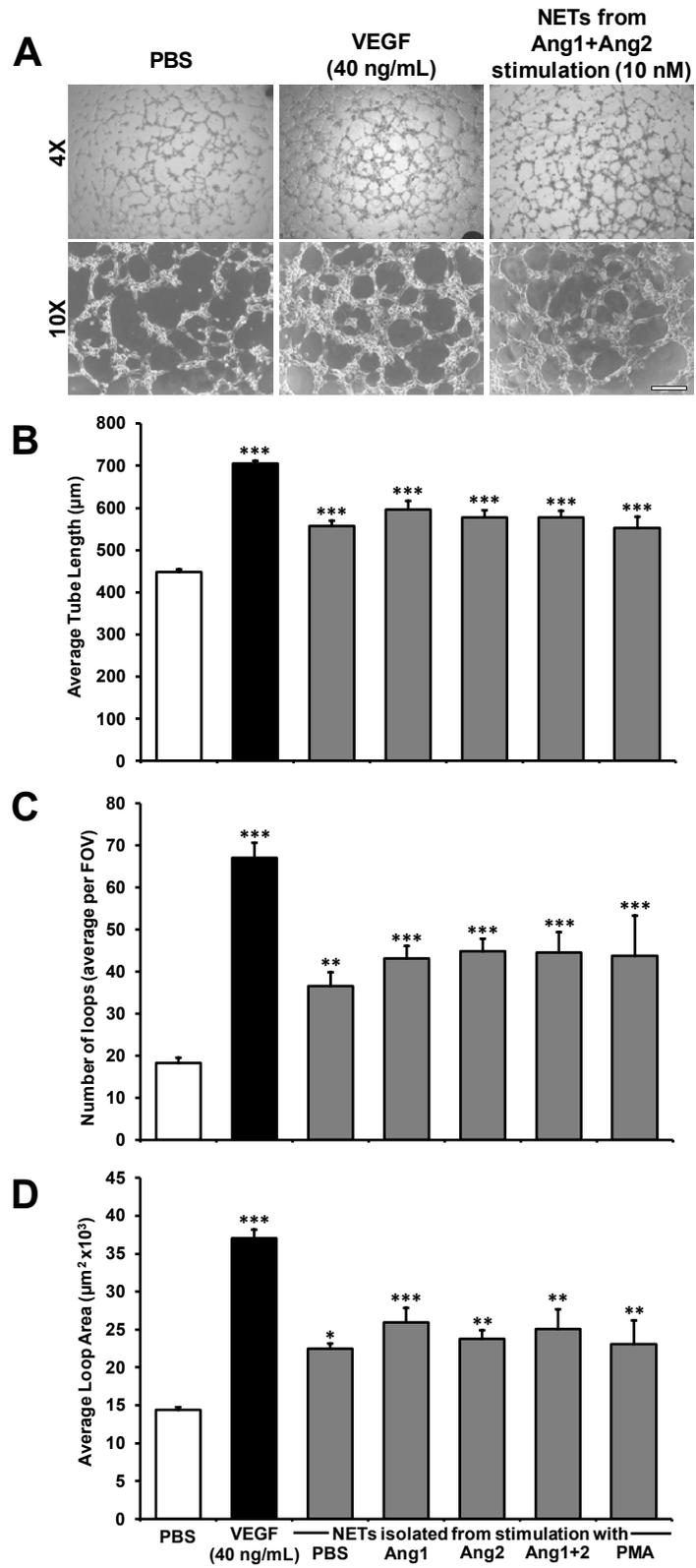
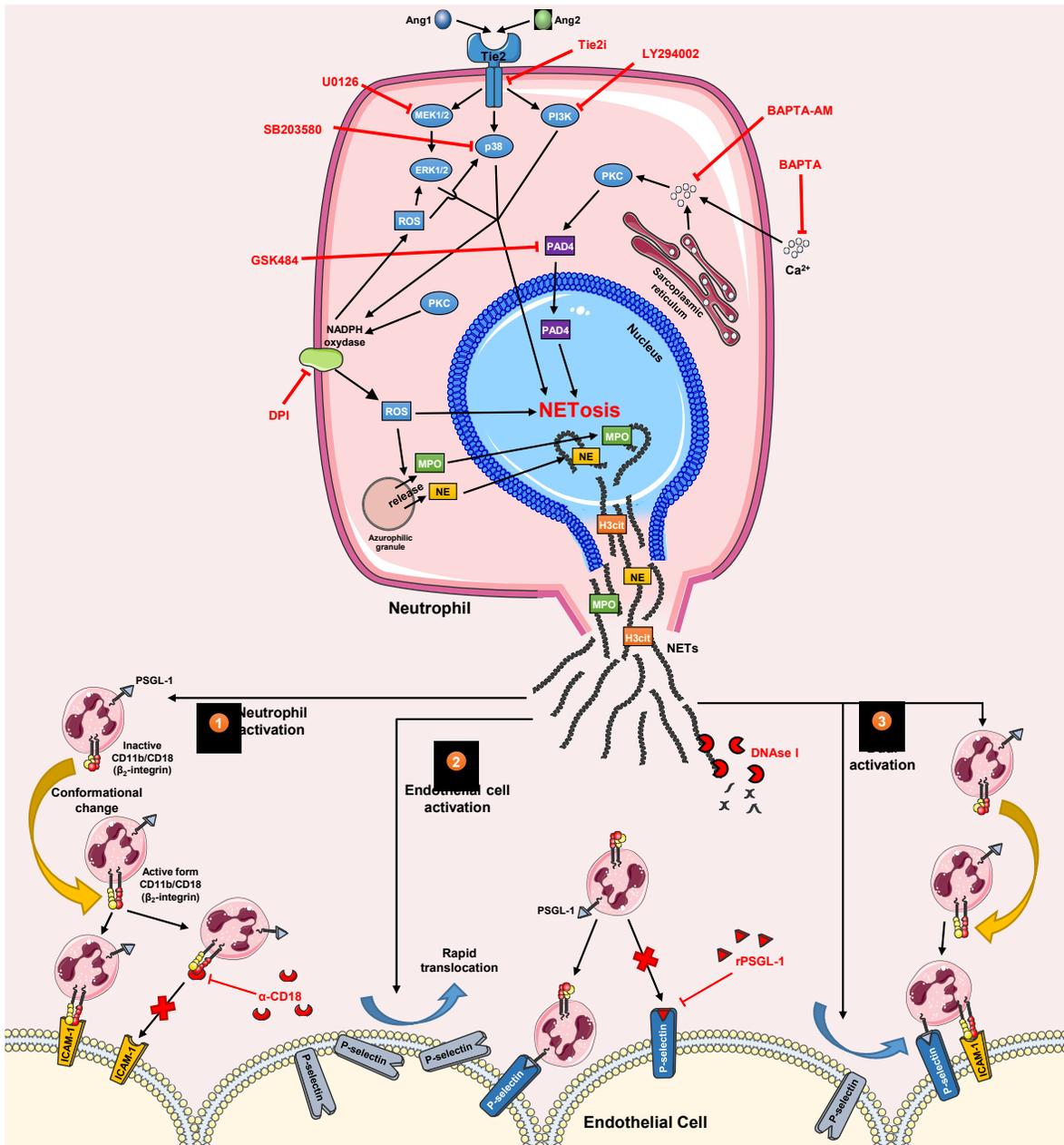
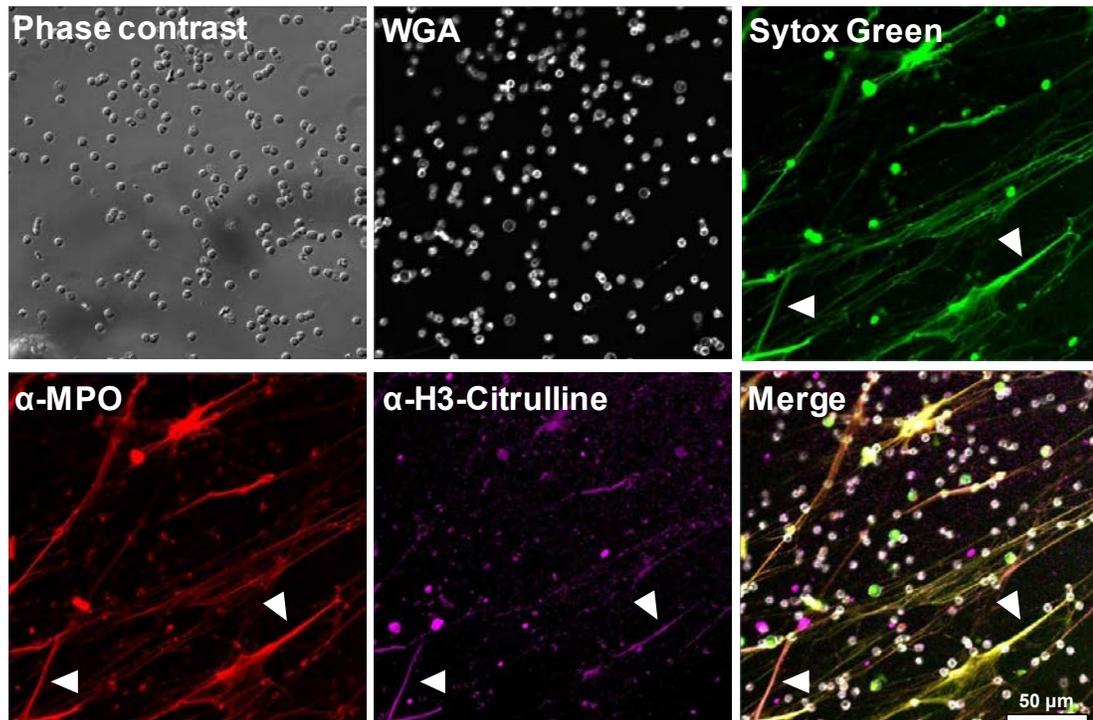


Figure 7



2.14 Supplemental Data



Supplemental Data – Figure 1. Detection of NETs by confocal immunofluorescence microscopy. Human neutrophils were isolated and stimulated with PMA (25 nM) for 3 hours. Cell membranes were stained with wheat germ agglutinin conjugated to Alexa Fluor 647 (WGA; 5.0 μg/mL; Life Technologies; white channel) and dsDNA with Sytox Green (1 μM; Life Technologies; green channel). To validate NETosis, colocalization of dsDNA with MPO and citrullinated histone H3 (white arrows) was assessed using an anti-MPO mouse antibody FITC conjugated (1:10; Abcam cat# ab11729; red channel) and an anti-histone H3 rabbit primary antibody (1 μg/mL; Abcam cat# ab5103) with Brilliant Violet 421 donkey anti-rabbit secondary antibody (1:50, Biolegend cat# 406410, purple channel).

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

Dans le but d'explorer les diverses méthodes par lesquelles les angiopoïétines peuvent induire des activités pro-inflammatoires et pro-angiogéniques, nous nous sommes intéressés au rôle des angiopoïétines dans la NETose. Ainsi, au cours de mon projet de maîtrise, nous avons pu démontrer que l'Ang1 et l'Ang2 induisent la NETose grâce à l'activation du récepteur Tie2 et des kinases qui y sont associées, à la production de ROS, au calcium intracellulaire et à l'activation de l'enzyme PAD4. Nous avons aussi démontré que ces NETs étaient en mesure d'induire l'activation des neutrophiles et des CE environnants, menant à l'adhésion des neutrophiles aux CE et à la formation *in vitro* de tubules de type capillaire par les CE. Nos travaux sont les premiers à attester l'effet des angiopoïétines sur la relâche de NETs.

3.1 Les angiopoïétines induisent la NETose

Dans cet ouvrage, nous rapportons l'effet équipotent des deux angiopoïétines à induire la NETose chez des neutrophiles humains et à des niveaux similaires aux agonistes intermédiaires (LPS, IL-8, PAF) utilisés dans des études semblables [216, 223, 268], mais demeurant très loin d'un agoniste pharmacologique aussi puissant que le PMA. La combinaison de l'Ang1 et de l'Ang2 n'ajoute pas d'effet additif. Précédemment, notre laboratoire et d'autres groupes de recherche avaient démontré que l'Ang1 et l'Ang2 (à des concentrations variant de 0,1 pM à 10 nM) possèdent une capacité égale à induire certaines activités pro-inflammatoires non transcriptionnelles chez les neutrophiles, comme la synthèse et la relâche du PAF, l'activation du complexe CD11b/CD18 (β_2 -intégrine) l'adhésion et la migration des neutrophiles [70, 71, 96, 102]. Cependant, seule l'Ang1, et seulement à sa plus forte concentration (10 nM) est en mesure d'induire des activités transcriptionnelles et traductionnelles chez le neutrophile [104-107]. Notons toutefois que ces concentrations d'angiopoïétines restent dans le rayon de concentrations utilisées par d'autres études pour promouvoir différentes activités biologiques [86, 102, 103, 269, 270].

Dans cette étude, la NETose induite par les angiopoïétines s'effectue seulement à des concentrations de 10 nM, ce qui aurait pu laisser suggérer que cette NETose était le fruit de processus transcriptionnels et/ou traductionnels. Or, une étude récente utilisant

des inhibiteurs de l'ARN polymérase II (actinomycine D) et de la traduction (cycloheximide) rapporte que leur utilisation n'a aucun effet sur la synthèse de NETs induite par le PMA, par les bactéries (LPS) ou par les levures (*C. albicans*) chez des neutrophiles murins et humains. Les auteurs affirment ainsi que la formation des NETs est complètement indépendante de protéines synthétisées *de novo* [271]. Ces résultats expliquent pourquoi l'Ang2 (10 nM) est également capable de promouvoir la NETose.

3.2 Mécanismes d'actions de la NETose induite par l'Ang1 et l'Ang2

À l'origine, le récepteur Tie2 était connu pour être seulement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des cellules souches hématopoïétiques [62]. Cependant, notre laboratoire a détecté l'expression de Tie2 à la surface des neutrophiles par RT-PCR et par immunocytochimie, démontrant par le fait même l'effet des angiopoïétines à activer les neutrophiles via les voies PI3K, p38 et p42/44 MAPK [70, 71, 107]. D'autres groupes ont à leur tour rapporté l'expression de Tie2 sur les neutrophiles, mais aussi à la surface des éosinophiles et des monocytes, et leur capacité à induire les mêmes activités biologiques reliées à Tie2 [68, 102, 272]. Plus récemment, une étude de Burnett et coll. utilisant des anticorps anti-Tie2 et anti-CD18 contre des neutrophiles murins rapporte des effets chémotaxiques de l'Ang1 suite à l'activation de Tie2, mais aussi de CD18, bien que la liaison de l'Ang1 sur CD18 soit qualifiée de faible [103].

Ces nouveaux résultats diffèrent un peu de nos résultats, puisque notre utilisation d'un inhibiteur sélectif de Tie2, inhibant l'activité du récepteur, mais laissant le site de liaison libre pour les angiopoïétines, a été suffisante pour bloquer l'augmentation de NETose causée par l'Ang1 et l'Ang2. Ceci démontre que les NETs induits et relâchés sous l'effet des angiopoïétines par les neutrophiles humains sont dépendants de l'activation de Tie2. Cette situation se retrouve aussi dans d'autres études démontrant que l'inhibition de Tie2 humain bloque les effets biologiques des angiopoïétines sur les CE et les leucocytes [68, 70, 273]. Ces différences entre ces dernières études et celle de Burnett et coll. peuvent toutefois être expliquées par les variations interspèces (humain vs souris) qui pourraient démontrer des différences quant à la participation du récepteur CD18. Il reste donc à établir si les angiopoïétines peuvent se lier et induire des activités biologiques autres que la NETose sur les neutrophiles humains via leur récepteur CD18.

Suite à leur liaison avec Tie2, les angiopoïétines activent les voies PI3K, p38 et p42/44 MAPK chez les CE et chez les neutrophiles, lesquels sont nécessaires pour la régulation des différentes fonctions neutrophiliques telles que l'adhésion, la dégranulation et le stress oxydatif [87, 107, 274, 275]. Dans cette étude, nous observons que les trois kinases sont impliquées dans la NETose induite par les angiopoïétines. Ces

observations sont en accord avec d'autres études démontrant l'implication de ces mêmes kinases dans la NETose induite par de nombreux autres agonistes [276-278].

L'activation des neutrophiles en réponse à différents stimuli pro-inflammatoires implique bien souvent le calcium puisque ce dernier est un second messager occupant un rôle primordial dans la production de ROS, la phagocytose ou encore la dégranulation. L'influx de calcium peut provenir de l'intérieur, c'est-à-dire des réserves présentes dans le réticulum endoplasmique du neutrophile, ou de l'environnement extérieur de la cellule. Grâce aux différents canaux calciques, le calcium est transféré dans le cytoplasme du neutrophile et déclenche certaines réactions comme l'activation de la PKC et la phosphorylation subséquente de la gp91phox dans la relâche de ROS [279]. Sans surprise, des études démontrent que le calcium participe à la NETose, mais selon l'agoniste utilisé, l'implication entre le calcium intracellulaire et celui extracellulaire peut varier sensiblement [277, 280, 281]. Dans la présente étude, nous observons que la chélation du calcium intracellulaire par le BAPTA-AM inhibe complètement la relâche de NETs induite par les angiopoïétines. Toutefois, la chélation du calcium extracellulaire n'engendre qu'une inhibition partielle de la NETose. Ceci suggère que la sortie du calcium des réserves intracellulaires est suffisante pour l'Ang1 et l'Ang2 à causer la NETose, sans l'entrée plus massive du calcium extracellulaire. Un mécanisme similaire est rapporté par certaines études où le PMA et certaines bactéries nécessitent davantage la relâche calcique intracellulaire pour induire la formation de NETs [280, 281].

Tout comme le calcium, la production de ROS par la NADPH oxydase est nécessaire pour la NETose. L'Ang1 augmente la production de ROS dans les CE [282, 283] et les ROS sont essentiels à la NETose induite par l'IL-8, le PMA et certaines bactéries [216, 281]. Dans notre étude, les deux angiopoïétines augmentent la production de ROS dans le neutrophile et ces ROS formés par la NADPH oxydase sont essentiels à la NETose induite subséquemment. Parker et coll. mentionnent que les agonistes tels que le PMA et les bactéries nécessitent l'activation de la NADPH oxydase pour la NETose, mais ceux nécessitant l'entrée du calcium extracellulaire ne sont généralement pas dépendants du stress oxydatif [281]. Puisque nous avons démontré que les

angiopoïétines ne sont pas dépendantes du calcium extracellulaire pour induire leur NETose, nos résultats concordent avec l'affirmation émise par Parker et coll.

Pour conclure ces mécanismes intracellulaires, nous avons voulu vérifier l'importance de l'enzyme PAD4. Cette enzyme capable de catalyser la citrullination des histones et la décondensation de la chromatine est caractérisée comme essentielle dans la majorité des recherches sur les NETs [209, 220]. Comme prévu, c'est aussi le cas pour la NETose induite par les angiopoïétines puisqu'un inhibiteur de PAD4 empêche complètement ces effets.

Notons également que l'utilisation de certains de ces inhibiteurs semble avoir eu un certain effet sur la relâche de NETs en condition basale (sans agoniste). Ceci peut être expliqué par le fait que certains neutrophiles sont déjà, de façon basale, engagés dans le processus de NETose, d'autant plus que l'isolation des neutrophiles de manière extracorporelle peut engendrer une petite fraction de neutrophiles à entreprendre des processus physiologiques associés à la NETose. Certains de ces inhibiteurs ont donc pu bloquer ou retarder ces processus, et par le fait même, la NETose basale.

3.3 Activités biologiques liées aux NETs

3.3.1 Rôle des NETs dans les activités pro-inflammatoires

Le roulement et l'adhésion des neutrophiles sont les étapes initiales de leurs implications dans les activités pro-inflammatoires. Leur activation nécessite cependant un contact avec des cytokines pro-inflammatoires particulières (TNF α , IL-1 β , etc.) ou par des interactions cellules-cellules avec des CE activées [284]. Auparavant, nous avons déjà démontré que les angiopoïétines peuvent promouvoir directement l'activation du complexe β_2 -intégrine (CD11b/CD18), le recrutement des leucocytes et l'adhésion des neutrophiles sur la matrice extracellulaire humaine (hECM) et des CE de veines ombilicales humaines (HUVEC) [70]. Quant au pouvoir adhésif des NETs, des études montrent que les NETs augmentent les risques de thrombose en stimulant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et des érythrocytes [285].

Dans cet ouvrage, nous démontrons que les NETs, indépendamment du stimulus utilisé pour les produire (angiopoïétines ou PMA), ont la capacité d'induire l'adhésion des neutrophiles à la hECM et aux HUVEC de manière concentration-dépendante. Sachant que les NETs servent de transporteurs pour certaines protéines pro-inflammatoires telles que la MPO, la NE et l'IL-17 [209, 286], nous avons effectué les tests de nouveaux, mais en utilisant des concentrations égales de NETs (200 ng/mL) produits par PBS, Ang1, Ang2, Ang1+2 et PMA, afin de vérifier si certains stimuli induisaient des NETs plus ou moins inflammatoires que d'autres. Le fait que les NETs en concentrations égales apportent la même adhérence aux neutrophiles peu importe l'agoniste utilisé suggère que même si les profils protéiques synthétisés sont différents pour le PMA versus l'Ang1, et que ces profils se reflètent sur les NETs produits, cela n'a pas influencé la capacité des NETs à induire l'adhésion des neutrophiles. L'effet adhérent des NETs semble plutôt être dû à leur intégrité, puisque l'ajout de la désoxyribunocléase I (DNase I; une enzyme ayant la capacité de cliver l'ADN des NETs en hydrolysant les liens phosphodiester adjacents aux nucléotides de type pyrimidines [287]) inhibe complètement l'effet adhésif des NETs, tout comme on peut le constater dans des études similaires [257, 288]. De plus, la combinaison DNase I et PMA (sans

aucun NETs) n'ayant pas influencé l'adhésion des neutrophiles, nous pouvons affirmer que la DNase I ne fait que dégrader l'ADN et n'interfère pas dans l'activation des neutrophiles ou des CE.

Sachant que la charge électrostatique négative de l'ADN confère aux NETs des propriétés adhérentes pour les protéines [212], il est possible que cette charge permette d'agripper les neutrophiles et les CE afin de créer un point d'attache pour leur adhésion. Par contre, l'utilisation d'un anticorps bloquant CD18 (α -CD18) a complètement empêché l'adhésion des neutrophiles à la hECM, et partiellement aux HUVEC. Ces observations indiquent que les NETs activent le complexe β_2 -intégrine des neutrophiles. L'utilisation d'un antagoniste de la P-sélectine (rPSGL-Ig) a aussi réduit partiellement l'adhésion des neutrophiles aux HUVEC, mais lorsque combiné avec l' α -CD18, l'inhibition devenait alors complète. Ainsi, les NETs ont la capacité d'induire la translocation de la P-sélectine endothéliale et l'activation du complexe β_2 -intégrine, et ce sont ces deux voies qui permettent aux NETs d'induire l'adhésion des neutrophiles aux CE.

3.3.2 Rôle des NETs dans les activités pro-angiogéniques

L'angiogenèse a été décrite comme un processus *in vivo* complexe et finement régulée de manière à ce que les CE migrent et prolifèrent dans les tissus avoisinants pour former de nouveaux capillaires à partir des vaisseaux existants. Bien que l'angiogenèse soit un phénomène assez rare chez l'adulte en condition physiologique, plusieurs pathologies à caractère inflammatoire possèdent un lien étroit avec l'angiogenèse, permettant bien souvent d'intensifier la réponse inflammatoire [289]. Discutées à maintes reprises dans cet ouvrage, les angiopoïétines possèdent un rôle primordial dans l'angiogenèse. Nos recherches démontrent maintenant que l'Ang1 et l'Ang2 peuvent aussi promouvoir la formation *in vitro* de tubules de type capillaire par les CE via la NETose des neutrophiles. Une étude récente par Aldabbous et coll. utilisant des NETs produits sous PMA a aussi révélé des conclusions similaires aux nôtres [290]. Pour expliquer les mécanismes permettant aux NETs d'avoir un tel effet, les auteurs ajoutent que ce phénomène est dépendant de l'activation du récepteur TLR4 endothélial et de l'activation subséquente

de NF- κ B. Tout comme nos résultats obtenus dans nos études d'adhésion, la dégradation des NETs par la DNase I a aussi inhibé l'effet pro-angiogénique des NETs.

De plus, notre laboratoire a récemment démontré la capacité des deux angiopoïétines à recruter des CE, des CML et des leucocytes. En effet, à l'aide d'un modèle d'éponges imbibées de Matrigel placées sous la peau de souris pendant 4 à 21 jours, nous observons que ce recrutement de cellules induit par les angiopoïétines cause la formation et la stabilisation de nouveaux vaisseaux fonctionnels [291]. À partir de ces observations et de celles effectuées dans la présente étude, nous avons effectué de nouvelles analyses immunohistochimiques sur certains de ces échantillons qui révèlent la colocalisation des NETs avec les neutrophiles dans les éponges imbibées avec Ang1 et Ang2 (**Figure supplémentaire en annexe**). Bien évidemment, ces données n'étant que préliminaires, nous devons vérifier plus en détail que l'implication angiogénique *in vitro* des NETs induits par les angiopoïétines soit aussi le cas en condition *in vivo*.

Les angiopoïétines seraient donc non seulement en mesure de recruter les neutrophiles au site inflammatoire, mais pourraient les activer et les amener à la NETose, de sorte que ces NETs complètent une boucle de rétroaction positive amplifiant l'effet angiogénique des angiopoïétines. Ces NETs peuvent aussi augmenter l'adhésion des neutrophiles afin de favoriser leur migration au site inflammatoire et former une nouvelle génération de NETs, engendrant une seconde boucle de rétroaction positive.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

4.1 Conclusions et retour sur les objectifs

Les buts de ce travail étaient de vérifier la capacité des angiopoïétines à induire la formation de NETs, et, s'il y a lieu, de comprendre les mécanismes impliqués et le rôle de ces NETs dans un contexte inflammatoire. Nos travaux de recherche démontrent pour la première fois la capacité des deux angiopoïétines à induire la NETose chez des neutrophiles humains en condition *in vitro*. De plus, nos études ont permis de déterminer que ce mécanisme est dépendant de l'activation du récepteur Tie2, des voies de signalisation PI3K, p38 et p42/44 MAPK, de la sortie du calcium intracellulaire, de la production de ROS et de l'activation de l'enzyme PAD4. Finalement, nous avons démontré que ceux-ci participent dans l'adhésion des neutrophiles à la ME et aux CE, ainsi que dans la formation *in vitro* de tubes capillaires par des CE.

Un endothélium activé associé à une réponse inflammatoire accrue est une caractéristique de plusieurs processus pathologiques comme l'athérosclérose, le diabète ou les troubles d'ischémie-reperfusion. Par conséquent, les cellules impliquées relâchent différentes cytokines pro-inflammatoires incluant l'Ang1 par les neutrophiles et l'Ang2 par les CE. Alors que les angiopoïétines peuvent réguler la formation de vaisseaux sanguins et favoriser la survie de plusieurs cellules, l'augmentation de leur concentration au niveau sérique est souvent associée avec un mauvais pronostic dans les pathologies telles que la septicémie ou le syndrome de détresse respiratoire aiguë [52, 292, 293]. Dans cette étude, nous démontrons une voie additionnelle par laquelle les angiopoïétines peuvent modifier l'homéostasie vasculaire. Via la NETose, ils peuvent activer les neutrophiles et l'endothélium afin de contribuer à des activités biologiques pro-inflammatoires et pro-angiogéniques.

4.2 Perspectives futures

Bien que les NETs soient un sujet fortement d'actualité dans la communauté scientifique, la découverte de la participation des angiopoïétines dans leur formation engendre nécessairement des questionnements supplémentaires. En effet, d'un point de vue biochimique, nous avons démontré certains mécanismes essentiels à la formation de NETs induits par les angiopoïétines. Or, les mécanismes généraux de la NETose étant encore incomplets, des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux identifier les voies de signalisation. À la Figure 7 de l'article, nous tentons de schématiser un aperçu global de cette NETose, mais nous savons qu'il peut y exister plusieurs liens communicants entre ces différentes voies de signalisation. Des informations supplémentaires sur les canaux calciques impliqués ou sur les différents types de ROS produits pourraient aussi être approfondies.

Nous avons démontré que les NETs issus des stimulations aux angiopoïétines induisaient la formation *in vitro* de tubules de type capillaire. Bien qu'un article récent ait apporté certaines pistes de réflexion, il sera intéressant d'étudier les mécanismes intracellulaires des CE qui, suite à leur contact avec les NETs, leur permettent de s'aligner pour former des tubules. Cette meilleure compréhension de ce processus sera certainement utile pour faire un lien pertinent avec le processus *in vivo*. Notre modèle étant déjà en place, nous chercherons à comprendre si en condition *in vivo*, les NETs produits suite aux stimulations avec les angiopoïétines participent à l'angiogenèse et inversement, si une inhibition de cette NETose pourrait bloquer partiellement ou complètement cette angiogenèse. Si l'utilisation de la DNase I par exemple, un traitement déjà approuvé pour certains cas pathologiques de NETs, avait un effet considérable sur l'inflammation et l'angiogenèse dans les éponges de nos modèles animaux, les recherches translationnelles sur le traitement de certaines maladies vasculaires où l'implication des NETs est prouvée s'accéléraient considérablement. Ou encore, pour répondre au problème à la source, des inhibiteurs des angiopoïétines, comme le trebananib par exemple, pourront aussi être utilisés. Des traitements contre les NETs, soit directement avec la DNase I, ou indirectement avec des inhibiteurs de PAD4, seront d'autant plus utiles dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires où les

neutrophiles sont suractivés. Dans l'artériosclérose ou l'hypertension, on pense ici à pouvoir prévenir ou retarder les risques d'infarctus du myocarde ou d'angine, alors que des patients à risque de subir une thrombose veineuse profonde pourraient bénéficier du même effet protecteur que l'on peut observer présentement dans les modèles murins.

BIBLIOGRAPHIE

1. Zygmunt, M., et al., *Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003. **110** Suppl 1: p. S10-8.
2. Tahergorabi, Z. and M. Khazaei, *A review on angiogenesis and its assays*. Iran J Basic Med Sci, 2012. **15**(6): p. 1110-26.
3. Folkman, J. and Y. Shing, *Angiogenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 10931-4.
4. Otrrock, Z.K., et al., *Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(2): p. 212-20.
5. Camare, C., et al., *Angiogenesis in the atherosclerotic plaque*. Redox Biol, 2017. **12**: p. 18-34.
6. Prior, B.M., H.T. Yang, and R.L. Terjung, *What makes vessels grow with exercise training?* Journal of Applied Physiology, 2004. **97**(3): p. 1119-1128.
7. Heil, M. and W. Schaper, *Cellular mechanisms of arteriogenesis*. EXS, 2005(94): p. 181-91.
8. Adams, R.H. and K. Alitalo, *Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(6): p. 464-78.
9. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
10. Burri, P.H., R. Hlushchuk, and V. Djonov, *Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance*. Dev Dyn, 2004. **231**(3): p. 474-88.
11. Tammela, T., et al., *The biology of vascular endothelial growth factors*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 550-63.
12. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
13. Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey, *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(4): p. 777-94.
14. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
15. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
16. Shibuya, M., *Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis*. Cell Struct Funct, 2001. **26**(1): p. 25-35.
17. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(4): p. 201-7.
18. Stegmann, T.J., *FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis*. Expert Opin Investig Drugs, 1998. **7**(12): p. 2011-5.

19. Khurana, R. and M. Simons, *Insights from angiogenesis trials using fibroblast growth factor for advanced arteriosclerotic disease*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(3): p. 116-22.
20. Kano, M.R., et al., *VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3759-68.
21. Seghezzi, G., et al., *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1659-73.
22. Ucuzian, A.A., et al., *Molecular mediators of angiogenesis*. J Burn Care Res, 2010. **31**(1): p. 158-75.
23. Nyberg, P., L. Xie, and R. Kalluri, *Endogenous inhibitors of angiogenesis*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 3967-79.
24. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
25. Rizov, M., P. Andreeva, and I. Dimova, *Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction*. Taiwan J Obstet Gynecol, 2017. **56**(2): p. 127-132.
26. Torry, D.S. and R.J. Torry, *Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta*. Am J Reprod Immunol, 1997. **37**(1): p. 21-9.
27. Nissen, N.N., et al., *Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1445-52.
28. Greenhalgh, D.G., *The role of apoptosis in wound healing*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(9): p. 1019-30.
29. Booth, F.W. and D.B. Thomason, *Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models*. Physiol Rev, 1991. **71**(2): p. 541-85.
30. Olfert, I.M., et al., *Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016. **310**(3): p. H326-36.
31. Howell, K., R.J. Preston, and P. McLoughlin, *Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation*. J Physiol, 2003. **547**(Pt 1): p. 133-45.
32. Maynard, S.E. and S.A. Karumanchi, *Angiogenic factors and preeclampsia*. Semin Nephrol, 2011. **31**(1): p. 33-46.
33. Rajnoch, J., et al., *Regulators of angiogenesis in renal ischemia/reperfusion injury in normotensive and hypertensive rats: effect of tacrolimus*. Transplant Proc, 2005. **37**(1): p. 352-4.
34. Chung, A.S. and N. Ferrara, *Developmental and pathological angiogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 563-84.
35. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(3): p. 213-9.
36. Wojtukiewicz, M.Z., E. Sierko, and J. Rak, *Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer*. Semin Thromb Hemost, 2004. **30**(1): p. 5-20.

37. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1359-70.
38. Schettino, C., et al., *Targeting angiogenesis for treatment of NSCLC brain metastases*. Curr Cancer Drug Targets, 2012. **12**(3): p. 289-99.
39. Timar, J., et al., *Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy*. Pathol Oncol Res, 2001. **7**(2): p. 85-94.
40. Cury, V., et al., *Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1alpha and MMP-2*. J Photochem Photobiol B, 2013. **125**: p. 164-70.
41. Sander, A.L., et al., *In vivo effect of hyperbaric oxygen on wound angiogenesis and epithelialization*. Wound Repair Regen, 2009. **17**(2): p. 179-84.
42. Yergoz, F., et al., *Heparin mimetic peptide nanofiber gel promotes regeneration of full thickness burn injury*. Biomaterials, 2017. **134**: p. 117-127.
43. Koh, G.Y., et al., *Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin*. Exp Mol Med, 2002. **34**(1): p. 1-11.
44. Partanen, J., et al., *A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(4): p. 1698-707.
45. Davis, S., et al., *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-9.
46. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
47. Eklund, L. and B.R. Olsen, *Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling*. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 630-41.
48. Valenzuela, D.M., et al., *Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1904-9.
49. Procopio, W.N., et al., *Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30196-201.
50. Lee, H.J., et al., *Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4*. FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1200-8.
51. Suri, C., et al., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1171-80.
52. Neagoe, P.E., et al., *Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms*. Growth Factors, 2009. **27**(6): p. 335-44.
53. Park, Y.S., N.H. Kim, and I. Jo, *Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes*. Microvasc Res, 2003. **65**(2): p. 125-31.
54. Fiedler, U., et al., *The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4150-6.
55. Kampfer, H., J. Pfeilschifter, and S. Frank, *Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair*. Lab Invest, 2001. **81**(3): p. 361-73.

56. Koga, K., et al., *Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 6248-54.
57. Oliner, J., et al., *Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(5): p. 507-16.
58. Macdonald, P.R., et al., *Structure of the extracellular domain of Tie receptor tyrosine kinases and localization of the angiopoietin-binding epitope*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(38): p. 28408-14.
59. Schnurch, H. and W. Risau, *Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage*. *Development*, 1993. **119**(3): p. 957-68.
60. Dumont, D.J., et al., *The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors*. *Oncogene*, 1993. **8**(5): p. 1293-301.
61. Sato, T.N., et al., *Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(20): p. 9355-8.
62. Dumont, D.J., et al., *tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors*. *Oncogene*, 1992. **7**(8): p. 1471-80.
63. Wong, A.L., et al., *Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues*. *Circ Res*, 1997. **81**(4): p. 567-74.
64. Maisonpierre, P.C., et al., *Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family*. *Oncogene*, 1993. **8**(6): p. 1631-7.
65. Brown, L.F., et al., *Expression of Tie1, Tie2, and angiopoietins 1, 2, and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(6): p. 2179-83.
66. Liu, D., et al., *Tie2/TEK modulates the interaction of glioma and brain tumor stem cells with endothelial cells and promotes an invasive phenotype*. *Oncotarget*, 2010. **1**(8): p. 700-9.
67. Kitajima, D., et al., *Tie2 Regulates Tumor Metastasis of Oral Squamous Cell Carcinomas*. *J Cancer*, 2016. **7**(5): p. 600-7.
68. Feistritzer, C., et al., *Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils*. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **114**(5): p. 1077-84.
69. De Palma, M., et al., *Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors*. *Cancer Cell*, 2005. **8**(3): p. 211-26.
70. Lemieux, C., et al., *Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1523-30.
71. Brkovic, A., et al., *Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(4): p. 1093-101.
72. Willam, C., et al., *Tie2 receptor expression is stimulated by hypoxia and proinflammatory cytokines in human endothelial cells*. *Circ Res*, 2000. **87**(5): p. 370-7.
73. Bae, J.S. and A.R. Rezaie, *Thrombin upregulates the angiopoietin-Tie2 Axis: endothelial protein C receptor occupancy prevents the thrombin mobilization of*

- angiopoietin 2 and P-selectin from Weibel-Palade bodies.* J Thromb Haemost, 2010. **8**(5): p. 1107-15.
74. Saharinen, P., et al., *Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2.* J Cell Biol, 2005. **169**(2): p. 239-43.
75. D'Amico, G., et al., *Loss of endothelial Tie1 receptor impairs lymphatic vessel development-brief report.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 207-9.
76. Seegar, T.C., et al., *Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands.* Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 643-55.
77. Savant, S., et al., *The Orphan Receptor Tie1 Controls Angiogenesis and Vascular Remodeling by Differentially Regulating Tie2 in Tip and Stalk Cells.* Cell Rep, 2015. **12**(11): p. 1761-73.
78. Papapetropoulos, A., et al., *Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway.* J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9102-5.
79. Witzenbichler, B., et al., *Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2.* J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18514-21.
80. Hayes, A.J., et al., *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**(3): p. 224-37.
81. Suri, C., et al., *Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1.* Science, 1998. **282**(5388): p. 468-71.
82. Pfaff, D., U. Fiedler, and H.G. Augustin, *Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(4): p. 719-26.
83. Hanahan, D., *Signaling vascular morphogenesis and maintenance.* Science, 1997. **277**(5322): p. 48-50.
84. Kim, I., et al., *Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway.* Oncogene, 2000. **19**(39): p. 4549-52.
85. Mochizuki, Y., et al., *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**(Pt 1): p. 175-83.
86. Teichert-Kuliszewska, K., et al., *Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2.* Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 659-70.
87. Yuan, H.T., et al., *Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium.* Mol Cell Biol, 2009. **29**(8): p. 2011-22.
88. Harfouche, R. and S.N. Hussain, *Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1635-45.
89. Gill, K.A. and N.P. Brindle, *Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(2): p. 392-6.

90. Kent, L.W., et al., *Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts*. *Infect Immun*, 1998. **66**(2): p. 608-14.
91. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(10): p. 803-15.
92. Shaik-Dasthagirisahab, Y.B., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF), mast cells and inflammation*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2013. **26**(2): p. 327-35.
93. Naldini, A. and F. Carraro, *Role of inflammatory mediators in angiogenesis*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005. **4**(1): p. 3-8.
94. Roviezzo, F., et al., *Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(2): p. 738-44.
95. Seok, S.H., et al., *Angiopoietin-1 elicits pro-inflammatory responses in monocytes and differentiating macrophages*. *Mol Cells*, 2013. **35**(6): p. 550-6.
96. Maliba, R., et al., *Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways*. *Cell Signal*, 2006. **18**(11): p. 1947-57.
97. Maliba, R., et al., *Angiopoietin-mediated endothelial P-selectin translocation: cell signaling mechanisms*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(2): p. 352-60.
98. Nag, S., et al., *Increased angiopoietin2 expression is associated with endothelial apoptosis and blood-brain barrier breakdown*. *Lab Invest*, 2005. **85**(10): p. 1189-98.
99. Kwak, H.J., et al., *Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells*. *FEBS Lett*, 1999. **448**(2-3): p. 249-53.
100. Asahara, T., et al., *Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization*. *Circ Res*, 1998. **83**(3): p. 233-40.
101. Fiedler, U., et al., *Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation*. *Nat Med*, 2006. **12**(2): p. 235-9.
102. Sturn, D.H., et al., *Angiopoietin affects neutrophil migration*. *Microcirculation*, 2005. **12**(5): p. 393-403.
103. Burnett, A., et al., *Angiopoietin-1 enhances neutrophil chemotaxis in vitro and migration in vivo through interaction with CD18 and release of CCL4*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 2332.
104. Dumas, E., et al., *Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 promotes neutrophil viability: Role of interleukin-8 and platelet-activating factor*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1823**(2): p. 358-67.
105. Neagoe, P.E., et al., *Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils*. *J Cell Physiol*, 2012. **227**(8): p. 3099-110.
106. Haddad, L.E. and M.G. Sirois, *Angiopoietin-1 upregulates de novo expression of IL-1beta and III-Ra, and the exclusive release of III-Ra from human neutrophils*. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e88980.
107. Dumas, E., et al., *New Insights into the Pro-Inflammatory Activities of Ang1 on Neutrophils: Induction of MIP-1beta Synthesis and Release*. *PLoS One*, 2016. **11**(9): p. e0163140.

108. Schlessinger, J., *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 211-25.
109. Kim, K.T., et al., *Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 20126-31.
110. Barton, W.A., et al., *Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 524-32.
111. Peters, K.G., et al., *Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 51-71.
112. Jones, N., et al., *A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(8): p. 2658-68.
113. Jones, N. and D.J. Dumont, *The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R*. Oncogene, 1998. **17**(9): p. 1097-108.
114. Audero, E., et al., *Adaptor ShcA protein binds tyrosine kinase Tie2 receptor and regulates migration and sprouting but not survival of endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(13): p. 13224-33.
115. Thomas, M., et al., *Angiopoietin-2 stimulation of endothelial cells induces alphavbeta3 integrin internalization and degradation*. J Biol Chem, 2010. **285**(31): p. 23842-9.
116. Zhao, X. and J.L. Guan, *Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(8): p. 610-5.
117. Karar, J. and A. Maity, *PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 51.
118. Tadros, A., et al., *ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4407-9.
119. Felcht, M., et al., *Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 1991-2005.
120. Eklund, L. and P. Saharinen, *Angiopoietin signaling in the vasculature*. Exp Cell Res, 2013. **319**(9): p. 1271-80.
121. Kim, I., et al., *Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway*. Circ Res, 2000. **86**(1): p. 24-9.
122. Eklund, L., J. Kangas, and P. Saharinen, *Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems*. Clin Sci (Lond), 2017. **131**(1): p. 87-103.
123. Ahmed, A. and T. Fujisawa, *Multiple roles of angiopoietins in atherogenesis*. Curr Opin Lipidol, 2011. **22**(5): p. 380-5.
124. Rasul, S., et al., *Circulating angiopoietin-2 and soluble Tie-2 in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study*. Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 55.
125. Kumpers, P., et al., *The Tie2 receptor antagonist angiopoietin 2 facilitates vascular inflammation in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(10): p. 1638-43.
126. D'Amico, G., et al., *Tie1 deletion inhibits tumor growth and improves angiopoietin antagonist therapy*. J Clin Invest, 2014. **124**(2): p. 824-34.
127. Hashizume, H., et al., *Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth*. Cancer Res, 2010. **70**(6): p. 2213-23.

128. Saharinen, P., et al., *VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis*. Trends Mol Med, 2011. **17**(7): p. 347-62.
129. Chiu, J.W., et al., *A phase I trial of ANG1/2-Tie2 inhibitor trebaninib (AMG386) and temsirolimus in advanced solid tumors (PJC008/NCImusical sharp9041)*. Invest New Drugs, 2016. **34**(1): p. 104-11.
130. Theelen, T.L., et al., *Angiopoietin-2 blocking antibodies reduce early atherosclerotic plaque development in mice*. Atherosclerosis, 2015. **241**(2): p. 297-304.
131. Fujisawa, T., et al., *Angiopoietin-1 promotes atherosclerosis by increasing the proportion of circulating Gr1+ monocytes*. Cardiovasc Res, 2017. **113**(1): p. 81-89.
132. Cui, X., et al., *Angiopoietin/Tie2 pathway mediates type 2 diabetes induced vascular damage after cerebral stroke*. Neurobiol Dis, 2011. **43**(1): p. 285-92.
133. Lim, H.S., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2005. **180**(1): p. 113-8.
134. El-Banawy, H.S., et al., *Angiopoietin-2, endothelial dysfunction and renal involvement in patients with systemic lupus erythematosus*. J Nephrol, 2012. **25**(4): p. 541-50.
135. Tabruyn, S.P., et al., *Angiopoietin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation*. Am J Pathol, 2010. **177**(6): p. 3233-43.
136. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
137. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
138. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004651.
139. Kennedy, A.D. and F.R. DeLeo, *Neutrophil apoptosis and the resolution of infection*. Immunol Res, 2009. **43**(1-3): p. 25-61.
140. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *Homeostatic regulation of blood neutrophil counts*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5183-8.
141. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
142. Tofts, P.S., et al., *Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2011. **117**(22): p. 6050-2; author reply 6053-4.
143. Weiner, O.D., *Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(2): p. 196-202.
144. Kolsch, V., P.G. Charest, and R.A. Firtel, *The regulation of cell motility and chemotaxis by phospholipid signaling*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 5): p. 551-9.
145. Muller, W.A., *Getting leukocytes to the site of inflammation*. Vet Pathol, 2013. **50**(1): p. 7-22.
146. Monk, P.N., et al., *Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(4): p. 429-48.

147. Pober, J.S., M.S. Kluger, and J.S. Schechner, *Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 12-25.
148. Hidalgo, A., et al., *Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 477-89.
149. Yang, L., et al., *ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow*. Blood, 2005. **106**(2): p. 584-92.
150. Mamdouh, Z., et al., *Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 748-53.
151. Opal, S.M., *Severe Sepsis and Septic Shock*, in *Surgery*, J. Norton, Barie, P.S., Bollinger, R.R., Chang, A.E., Lowry, S., Mulvihill, S.J., Pass, H.I., Thompson, R.W., Editor. 2008, Springer: New York. p. 287-304.
152. Kobayashi, S.D. and F.R. DeLeo, *Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2009. **1**(3): p. 309-33.
153. Maianski, N.A., et al., *Apoptosis of neutrophils*. Acta Haematol, 2004. **111**(1-2): p. 56-66.
154. Prince, L.R., et al., *The role of TLRs in neutrophil activation*. Curr Opin Pharmacol, 2011. **11**(4): p. 397-403.
155. Bamboat, Z.M., et al., *Toll-like receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury*. Hepatology, 2010. **51**(2): p. 621-32.
156. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1281-92.
157. Bennouna, S. and E.Y. Denkers, *Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF-alpha to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF-alpha production*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4845-51.
158. Zhang, J.H., et al., *Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T lymphocytes*. J Immunol, 1992. **148**(1): p. 177-81.
159. Ishikawa, F. and S. Miyazaki, *New biodefense strategies by neutrophils*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. **53**(3): p. 226-33.
160. Sandilands, G.P., et al., *Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation*. Immunology, 2005. **114**(3): p. 354-68.
161. Fanger, N.A., et al., *Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid*. Blood, 1997. **89**(11): p. 4128-35.
162. Oehler, L., et al., *Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1019-28.
163. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
164. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 383-9.

165. Baici, A., et al., *Action of collagenase and elastase from human polymorphonuclear leukocytes on human articular cartilage*. Rheumatol Int, 1982. **2**(1): p. 11-6.
166. Wong, S.H., et al., *Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(1): p. 39-44.
167. Van den Steen, P.E., et al., *Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis*. FASEB J, 2002. **16**(3): p. 379-89.
168. Wright, H.L., et al., *Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(9): p. 1618-31.
169. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
170. Sengelov, H., et al., *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
171. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 197-223.
172. Hayyan, M., M.A. Hashim, and I.M. AlNashef, *Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications*. Chem Rev, 2016. **116**(5): p. 3029-85.
173. Chen, Y. and W.G. Junger, *Measurement of oxidative burst in neutrophils*. Methods Mol Biol, 2012. **844**: p. 115-24.
174. Mitra, S. and E. Abraham, *Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(8): p. 732-41.
175. Bokoch, G.M. and U.G. Knaus, *NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 502-8.
176. Yoo, S.K., et al., *Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo*. Nature, 2011. **480**(7375): p. 109-12.
177. Huang, J., et al., *Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6226-31.
178. Mantegazza, A.R., et al., *NADPH oxidase controls phagosomal pH and antigen cross-presentation in human dendritic cells*. Blood, 2008. **112**(12): p. 4712-22.
179. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 508.
180. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3720-32.
181. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 21-6.
182. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.
183. Contassot, E., H.D. Beer, and L.E. French, *Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13590.
184. Theiss, A.L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36099-109.
185. Kant, S., et al., *TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway*. Genes Dev, 2011. **25**(19): p. 2069-78.

186. Gaur, U. and B.B. Aggarwal, *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **66**(8): p. 1403-8.
187. Maurer, M. and E. von Stebut, *Macrophage inflammatory protein-1*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(10): p. 1882-6.
188. Ren, M., et al., *Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme*. *EMBO J*, 2010. **29**(23): p. 3952-66.
189. Dixit, N. and S.I. Simon, *Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 188.
190. Ardoin, S.P., J.C. Shanahan, and D.S. Pisetsky, *The role of microparticles in inflammation and thrombosis*. *Scand J Immunol*, 2007. **66**(2-3): p. 159-65.
191. Yuana, Y., R.M. Bertina, and S. Osanto, *Pre-analytical and analytical issues in the analysis of blood microparticles*. *Thromb Haemost*, 2011. **105**(3): p. 396-408.
192. Johnson, B.L., III, J.W. Kuethe, and C.C. Caldwell, *Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response*. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2014. **14**(3): p. 210-7.
193. Hsieh, M.M., et al., *Prevalence of neutropenia in the U.S. population: age, sex, smoking status, and ethnic differences*. *Ann Intern Med*, 2007. **146**(7): p. 486-92.
194. Chabot-Richards, D.S. and T.I. George, *Leukocytosis*. *Int J Lab Hematol*, 2014. **36**(3): p. 279-88.
195. Stoller, J.K. and L.S. Aboussouan, *A review of alpha1-antitrypsin deficiency*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012. **185**(3): p. 246-59.
196. Hasleton, P.S. and T.E. Roberts, *Adult respiratory distress syndrome - an update*. *Histopathology*, 1999. **34**(4): p. 285-94.
197. Jickling, G.C., et al., *Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015. **35**(6): p. 888-901.
198. Matsubara, M., et al., *Benidipine, an anti-hypertensive drug, inhibits reactive oxygen species production in polymorphonuclear leukocytes and oxidative stress in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. *Eur J Pharmacol*, 2008. **580**(1-2): p. 201-13.
199. Mishina, M., et al., *Administration of free radical scavenger edaravone associated with higher frequency of hemorrhagic transformation in patients with cardiogenic embolism*. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2008. **48**(7): p. 292-7.
200. Jimenez, M.F., et al., *Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome*. *Arch Surg*, 1997. **132**(12): p. 1263-9; discussion 1269-70.
201. Ertel, W., et al., *Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation*. *J Trauma*, 1998. **44**(5): p. 767-75; discussion 775-6.
202. Wera, O., P. Lancellotti, and C. Oury, *The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases*. *J Clin Med*, 2016. **5**(12).

203. Wright, H.L., R.J. Moots, and S.W. Edwards, *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(10): p. 593-601.
204. de Souza Ferreira, C., et al., *Neutrophil dysfunction induced by hyperglycemia: modulation of myeloperoxidase activity*. Cell Biochem Funct, 2012. **30**(7): p. 604-10.
205. Rose, F., et al., *Increased neutrophil mediator release in patients with pulmonary hypertension--suppression by inhaled iloprost*. Thromb Haemost, 2003. **90**(6): p. 1141-9.
206. Anker, S.D. and S. von Haehling, *Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview*. Heart, 2004. **90**(4): p. 464-70.
207. Yang, H., et al., *New Insights into Neutrophil Extracellular Traps: Mechanisms of Formation and Role in Inflammation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 302.
208. Takei, H., et al., *Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(2): p. 229-40.
209. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
210. Cooper, P.R., L.J. Palmer, and I.L. Chapple, *Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe?* Periodontol 2000, 2013. **63**(1): p. 165-97.
211. Delgado-Rizo, V., et al., *Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 81.
212. Sorensen, O.E. and N. Borregaard, *Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils*. J Clin Invest, 2016. **126**(5): p. 1612-20.
213. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000639.
214. Vorobjeva, N.V. and B.V. Pinegin, *Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease*. Biochemistry (Mosc), 2014. **79**(12): p. 1286-96.
215. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
216. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
217. Garcia-Romo, G.S., et al., *Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus*. Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra20.
218. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 677-91.
219. Wang, Y., et al., *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol, 2009. **184**(2): p. 205-13.
220. Li, P., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1853-62.

221. Douda, D.N., et al., *SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(9): p. 2817-22.
222. Barrientos, L., et al., *An improved strategy to recover large fragments of functional human neutrophil extracellular traps*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 166.
223. Gupta, A.K., et al., *Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia*. Hum Immunol, 2005. **66**(11): p. 1146-54.
224. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 463-9.
225. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
226. Byrd, A.S., et al., *An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to Candida albicans*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4136-48.
227. Yousefi, S., et al., *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1438-44.
228. McIlroy, D.J., et al., *Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery*. J Crit Care, 2014. **29**(6): p. 1133 e1-5.
229. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
230. Neeli, I., S.N. Khan, and M. Radic, *Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1895-902.
231. Pilszczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
232. Buchanan, J.T., et al., *DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps*. Curr Biol, 2006. **16**(4): p. 396-400.
233. Ramos-Kichik, V., et al., *Neutrophil extracellular traps are induced by Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2009. **89**(1): p. 29-37.
234. Juneau, R.A., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae initiates formation of neutrophil extracellular traps*. Infect Immun, 2011. **79**(1): p. 431-8.
235. Lauth, X., et al., *MI protein allows Group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition*. J Innate Immun, 2009. **1**(3): p. 202-14.
236. Berends, E.T., et al., *Nuclease expression by Staphylococcus aureus facilitates escape from neutrophil extracellular traps*. J Innate Immun, 2010. **2**(6): p. 576-86.
237. Halverson, T.W., et al., *DNA is an antimicrobial component of neutrophil extracellular traps*. PLoS Pathog, 2015. **11**(1): p. e1004593.
238. von Kockritz-Blickwede, M., S. Blodkamp, and V. Nizet, *Interaction of Bacterial Exotoxins with Neutrophil Extracellular Traps: Impact for the Infected Host*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 402.

239. Parker, H., et al., *Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(3): p. 369-76.
240. Menegazzi, R., E. Decleva, and P. Dri, *Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore?* Blood, 2012. **119**(5): p. 1214-6.
241. Baums, C.G. and M. von Kockritz-Blickwede, *Novel role of DNA in neutrophil extracellular traps*. Trends Microbiol, 2015. **23**(6): p. 330-1.
242. Cole, J.N., et al., *M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype MIT1 group A Streptococcus*. MBio, 2010. **1**(4).
243. de Buhr, N., et al., *Streptococcus suis DNase SsnA contributes to degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) and evasion of NET-mediated antimicrobial activity*. Microbiology, 2014. **160**(Pt 2): p. 385-95.
244. Dwivedi, N., et al., *Deimination of linker histones links neutrophil extracellular trap release with autoantibodies in systemic autoimmunity*. FASEB J, 2014. **28**(7): p. 2840-51.
245. Pratesi, F., et al., *Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(7): p. 1414-22.
246. Hakkim, A., et al., *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9813-8.
247. Khandpur, R., et al., *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis*. Sci Transl Med, 2013. **5**(178): p. 178ra40.
248. Brill, A., et al., *Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(1): p. 136-44.
249. Martinod, K., et al., *Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(21): p. 8674-9.
250. Alexandraki, K.I., et al., *Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation*. J Clin Immunol, 2008. **28**(4): p. 314-21.
251. Wong, S.L., et al., *Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing*. Nat Med, 2015. **21**(7): p. 815-9.
252. Mangold, A., et al., *Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size*. Circ Res, 2015. **116**(7): p. 1182-92.
253. Hofbauer, T., et al., *Arterial hypertension enhances neutrophil extracellular trap formation via an angiotensin-II-dependent pathway*. Atherosclerosis, 2017. **263**: p. e67-e68.
254. Ratjen, F., *Recent advances in cystic fibrosis*. Paediatr Respir Rev, 2008. **9**(2): p. 144-8.
255. Fuchs, H.J., et al., *Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients*

- with cystic fibrosis. *The Pulmozyme Study Group*. N Engl J Med, 1994. **331**(10): p. 637-42.
256. Konstan, M.W., et al., *Clinical use of dornase alpha is associated with a slower rate of FEV1 decline in cystic fibrosis*. *Pediatr Pulmonol*, 2011. **46**(6): p. 545-53.
 257. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(8): p. 3446-3458.
 258. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps in cancer progression*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(21): p. 4179-94.
 259. Yousefi, S., et al., *Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense*. *Nat Med*, 2008. **14**(9): p. 949-53.
 260. von Kockritz-Blickwede, M., et al., *Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation*. *Blood*, 2008. **111**(6): p. 3070-80.
 261. Chow, O.A., et al., *Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps*. *Cell Host Microbe*, 2010. **8**(5): p. 445-54.
 262. Goldmann, O. and E. Medina, *The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 420.
 263. Yousefi, S., D. Simon, and H.U. Simon, *Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease*. *Curr Opin Immunol*, 2012. **24**(6): p. 736-9.
 264. Abel, J., et al., *Staphylococcus aureus evades the extracellular antimicrobial activity of mast cells by promoting its own uptake*. *J Innate Immun*, 2011. **3**(5): p. 495-507.
 265. Chuammitri, P., et al., *Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009. **129**(1-2): p. 126-31.
 266. Wen, F., et al., *Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection*. *Plant Physiol*, 2009. **151**(2): p. 820-9.
 267. Hawes, M.C., et al., *Extracellular DNA: the tip of root defenses?* *Plant Sci*, 2011. **180**(6): p. 741-5.
 268. Yost, C.C., et al., *Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates*. *Blood*, 2009. **113**(25): p. 6419-27.
 269. Kim, I., et al., *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**(10): p. 7614-20.
 270. Pizurki, L., et al., *Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production*. *Br J Pharmacol*, 2003. **139**(2): p. 329-36.
 271. Sollberger, G., B. Amulic, and A. Zychlinsky, *Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Independent of De Novo Gene Expression*. *PLoS One*, 2016. **11**(6): p. e0157454.
 272. Patel, A.S., et al., *TIE2-expressing monocytes/macrophages regulate revascularization of the ischemic limb*. *EMBO Mol Med*, 2013. **5**(6): p. 858-69.

273. Palmer, G.M., et al., *A novel angiopoietin-derived peptide displays anti-angiogenic activity and inhibits tumour-induced and retinal neovascularization*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(6): p. 1891-1903.
274. Abdel-Malak, N.A., et al., *Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1-dependent autocrine production of interleukin-8*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4145-54.
275. Kim, D. and C.L. Haynes, *The role of p38 MAPK in neutrophil functions: single cell chemotaxis and surface marker expression*. Analyst, 2013. **138**(22): p. 6826-33.
276. Keshari, R.S., et al., *Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils*. J Cell Biochem, 2013. **114**(3): p. 532-40.
277. Behnen, M., et al., *Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via FcγRIIIb and Mac-1*. J Immunol, 2014. **193**(4): p. 1954-65.
278. Munoz-Caro, T., et al., *Eimeria bovis-triggered neutrophil extracellular trap formation is CD11b-, ERK 1/2-, p38 MAP kinase- and SOCE-dependent*. Vet Res, 2015. **46**: p. 23.
279. Clemens, R.A. and C.A. Lowell, *Store-operated calcium signaling in neutrophils*. J Leukoc Biol, 2015. **98**(4): p. 497-502.
280. Gupta, A.K., et al., *Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97088.
281. Parker, H., et al., *Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(4): p. 841-9.
282. Chen, J.X., et al., *Angiopoietin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1563-72.
283. Harfouche, R., et al., *Roles of reactive oxygen species in angiopoietin-1/tie-2 receptor signaling*. FASEB J, 2005. **19**(12): p. 1728-30.
284. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. Trends Immunol, 2010. **31**(8): p. 318-24.
285. Fuchs, T.A., et al., *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
286. Villanueva, E., et al., *Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 538-52.
287. Gueroult, M., et al., *How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis*. PLoS Comput Biol, 2010. **6**(11): p. e1001000.
288. Monti, M., et al., *Integrin-dependent cell adhesion to neutrophil extracellular traps through engagement of fibronectin in neutrophil-like cells*. PLoS One, 2017. **12**(2): p. e0171362.
289. Costa, C., J. Incio, and R. Soares, *Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?* Angiogenesis, 2007. **10**(3): p. 149-66.

290. Aldabbous, L., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Promote Angiogenesis: Evidence From Vascular Pathology in Pulmonary Hypertension*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(10): p. 2078-87.
291. Sinnathamby, T., et al., *VEGF and angiopoietins promote inflammatory cell recruitment and mature blood vessel formation in murine sponge/Matrigel model*. *J Cell Biochem*, 2015. **116**(1): p. 45-57.
292. Hegen, A., et al., *Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(10): p. 1803-9.
293. Saharinen, P., L. Eklund, and K. Alitalo, *Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway*. *Nat Rev Drug Discov*, 2017.

ANNEXE

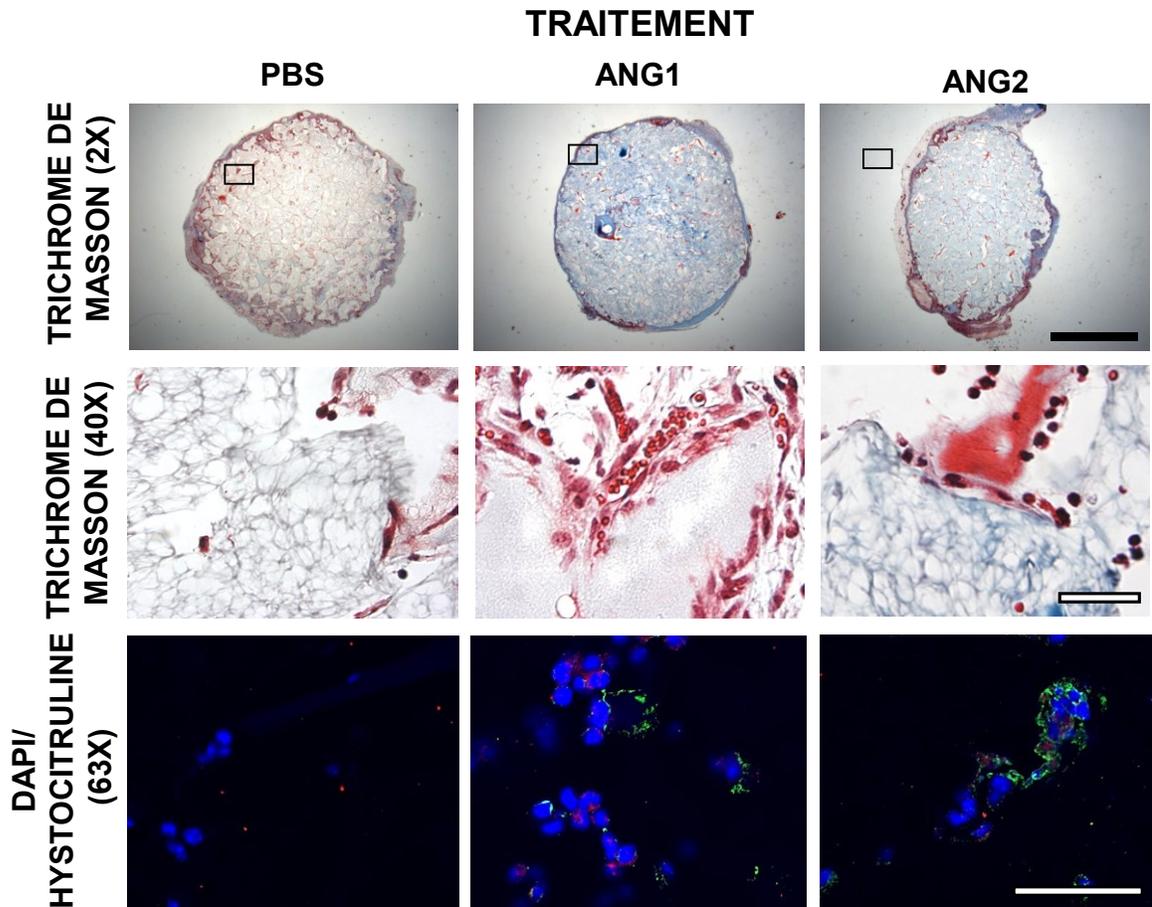


Figure A1. Implication des neutrophiles dans les activités inflammatoires et angiogéniques des angiopoïétines chez la souris. Coupes histologiques (coloration au trichrome de Masson, 2x et 40x) d'éponges composées d'alcool polyvinylique imbibées de Matrigel contenant PBS, Ang1 ou Ang2 (200 ng/200 μ L) et récoltées 7 jours après l'implantation sous-cutanée chez des souris C57BL/6 de 10-11 semaines. Les traitements avec Ang1 ou Ang2 induisent le recrutement des cellules inflammatoires, endothéliales et murales et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Une coloration avec DAPI (noyau cellulaire; en bleu) ainsi qu'à l'aide des anticorps XYZ (marqueur neutrophilique (en rouge) et anti-citrulline (en vert) montrent l'afflux de neutrophiles aux sites pro-angiogéniques et la présence de NETs à ce même endroit. Échelle noire, 3 mm; échelle blanche, 50 μ m.