

Université de Montréal

**Activités inflammatoires des angiopoïétines  
sur les neutrophiles**

par

Paul-Eduard Neagoe

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en pharmacologie

Avril 2012

© Paul-Eduard Neagoe, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Activités inflammatoires des angiopoïétines sur les neutrophiles

Présentée par :  
Paul-Eduard Neagoe

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Christian Beausejour, président-rapporteur  
Martin G. Sirois, directeur de recherche  
Guy Rousseau, membre du jury  
Patrick McDonald, examinateur externe

## Résumé

L'angiogenèse, caractérisée par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, est un processus accompagné par l'inflammation, impliquant la synthèse et la relâche de différents facteurs de croissance par les cellules inflammatoires. Parmi ces facteurs, seuls le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et les angiopoïétines (Ang1 et Ang2) peuvent participer à la régulation de l'inflammation et de l'angiogenèse.

La famille des angiopoïétines comporte quatre membres, desquels l'Ang1 et l'Ang2 ont été les plus étudiés. Ces deux médiateurs inflammatoires sont capables d'activer le récepteur Tie2, dont l'expression a initialement été rapportée sur les cellules endothéliales (CE). Notre laboratoire a été le premier à démontrer l'expression de Tie2 à la surface des neutrophiles, ainsi que sa capacité, suite à son activation par l'Ang1 ou l'Ang2, à induire la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF), l'activation de la  $\beta$ 2-intégrine, la migration des neutrophiles ainsi que leur adhésion aux CE. D'autres études ont montré que les CE emmagasinent et relâchent le VEGF et l'Ang2, tandis que les péricytes et les cellules musculaires lisses contiennent l'Ang1. Puisque les neutrophiles relâchent le VEGF et que les deux angiopoïétines ont la capacité d'activer Tie2 sur ces derniers, nous avons voulu déterminer si les neutrophiles contiennent l'Ang1 et/ou l'Ang2 et si elles peuvent être relâchées suite à une stimulation avec des agonistes proinflammatoires. Nous avons découvert que l'Ang1, mais pas l'Ang2 est présente dans les neutrophiles, et qu'elle est relâchée suite à une stimulation au phorbol myristate acetate (PMA). De plus, nous avons démontré que l'Ang1 est localisée au niveau du cytosol et que sa relâche est calcium-indépendante, contrairement au VEGF, qui est localisé dans les granules  $\beta$  et sa relâche est calcium-dépendante. Cette étude démontre pour la première fois l'expression et la localisation de l'Ang1 dans les neutrophiles. Une récente étude effectuée dans notre laboratoire a démontré que les angiopoïétines induisent la migration des neutrophiles en activant le récepteur Tie2 et la voie de la PI3K. De plus, les angiopoïétines ont potentialisé la migration induite par l'IL-8. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'Ang1 et/ou l'Ang2 seraient capables d'induire la relâche et/ou la synthèse de l'IL-8 par les neutrophiles. Nous avons démontré pour la

première fois, la capacité de l'Ang1 à induire l'expression de l'ARNm, ainsi que la synthèse et la relâche d'IL-8 par les neutrophiles. Cependant, un traitement avec l'Ang2 seule ou en combinaison avec l'Ang1 n'a eu aucun effet sur les activités mentionnées ci-dessus. Nous avons aussi observé que la synthèse et la relâche d'IL-8 induite par l'Ang1 requièrent la transcription de l'ADN en ARNm, suivie par la stabilisation de ce dernier, qui ultimement induit la traduction de l'ARNm de l'IL-8 en sa protéine. Finalement, nous avons démontré que la stimulation des neutrophiles avec l'Ang1 induit ces activités en activant la voie de la p42/44 MAPK, tout en étant indépendantes de la p38 MAPK et la PI3K/Akt. Ces résultats sont en lien direct avec une récente étude dans laquelle nous avons observé que l'Ang1, mais pas l'Ang2 est capable d'augmenter la survie des neutrophiles via la relâche d'IL-8.

**Mots-clés** : angiogenèse, inflammation, neutrophiles, interleukine-8, angiopoïétines, Tie2

## Abstract

Angiogenesis is known as the formation of new blood vessels from pre-existent ones. This process is accompanied by inflammation, which involves the synthesis and release of numerous growth factors by inflammatory cells. Among the growth factors involved in these activities, only the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the angiopoietins (Ang1 and Ang2) can modulate both the inflammatory and the angiogenic processes.

The angiopoietins family has four fully characterized members, from which Ang1 and Ang2 have been the most extensively studied. Ang1 and Ang2 are both capable to activate the receptor Tie2, initially discovered on the endothelial cell (EC) surface. We were the first group to report the expression of Tie2 on neutrophils along with its activation by Ang1 and Ang2 which can enhance platelet-activating factor (PAF) synthesis,  $\beta$ 2-integrin activation, neutrophil migration and adhesion onto EC. Other studies have shown that EC have endogenous stores of VEGF and Ang2, whereas pericytes and smooth muscle cells contain intracellular pools of Ang1. Since neutrophils can release VEGF and that both angiopoietins can activate Tie2 receptor, we wanted to assess if neutrophils contain Ang1 and/or Ang2, and if so, investigate their capacity to be released under inflammatory stimuli. We observed that Ang1, but not Ang2, is found in the neutrophils and that it can be only released upon phorbol myristate acetate (PMA) stimulation. Moreover, using the nitrogen sub-cellular fractionation technique, we demonstrated that Ang1 is found in the cytosolic fraction and its release is calcium-independent, while VEGF is found in  $\beta$ -granules and its release is calcium-dependent. This study demonstrates for the first time the expression and release of Ang1 from the neutrophils and its localization in the cytosol.

In one of our recent studies, we have shown that angiopoietins are capable to induce neutrophil migration through Tie2 activation and via the PI3K/Akt signalling pathway. Moreover, both angiopoietins were shown to potentiate IL-8-induced neutrophil migration. Thus, we sought to investigate the capacity of Ang1 and/or Ang2 to induce IL-8 synthesis and/or release from human neutrophils. We demonstrated for the first time, the capacity of Ang1 to induce IL-8 mRNA

expression, along with its protein synthesis and release from the neutrophils. However, a treatment with Ang2, alone or in combination with Ang1, had no effect on these aforementioned activities. We also observed that Ang1-induced IL-8 protein synthesis and release requires the transcriptional mechanism from IL-8 DNA to mRNA, followed by the mRNA stabilization, which ultimately enhances its translation into IL-8 protein. Finally, we also observed that neutrophil stimulation with Ang1 enhances IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release by activating the p42/44 MAPK signalling pathway, while being independent from p38 MAPK and PI3K/Akt. These results are in line with one of our recent studies, in which we observed that Ang1, but not Ang2, is capable to enhance neutrophil survival, by diminishing their apoptosis through the release of IL-8 by the neutrophils.

**Keywords** : angiogenesis, inflammation, neutrophils, interleukin-8, angiopoietins, Tie2

## Table des matières

1.0	INTRODUCTION.....	1
1.1	L'angiogenèse .....	1
1.1.2	L'angiogenèse et la vasculogenèse : définitions et mécanismes .....	1
1.1.3	L'angiogenèse physiologique et pathologique .....	2
1.1.4	Régulation de l'angiogenèse .....	3
1.2	Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	4
1.2.1	Découverte et caractérisation des membres du VEGF.....	4
1.2.1.2	Les isoformes et analogues du VEGF .....	4
1.2.1.3	Régulation de l'expression génique du VEGF.....	5
1.2.2	Les récepteurs du VEGF .....	6
1.2.2.1	Caractérisation des récepteurs du VEGF.....	6
1.2.2.2	Le VEGFR-1 : ligands et fonctions.....	6
1.2.2.3	Le VEGFR-2 : ligands et fonctions.....	9
1.2.3	Le rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique.....	9
1.2.4	L'implication du VEGF dans l'angiogenèse pathologique .....	10
1.3	Les angiopoïétines.....	12
1.3.1	Structure, localisation et fonctions de l'Ang1 et l'Ang2.....	12
1.3.2	L'angiopoïétine-3 et l'angiopoïétine-4.....	15
1.3.3	La famille des récepteurs Tie .....	16
1.3.3.1	Structure, localisation et propriétés de Tie1 et Tie2.....	16
1.3.3.2	Signalisation intracellulaire induite par Tie2 .....	17
1.3.4	Rôle des récepteurs Tie dans l'embryogenèse .....	21
1.3.5	Effets biologiques régulés par Ang1 et Ang2 .....	22
1.3.6	Les angiopoïétines et l'angiogenèse physiologique .....	25
1.3.7	Les angiopoïétines et l'angiogenèse tumorale.....	29
1.3.7.1	Rôle de l'Ang1 dans le développement vasculaire tumoral .....	29
1.3.7.2	Rôle de l'Ang2 dans le développement vasculaire tumoral .....	31
1.3.7.3	Régulation de l'homéostasie vasculaire tumorale par le récepteur Tie2 et les intégrines.....	32
1.3.8	Les implications thérapeutiques des angiopoïétines .....	33

1.3.8.1	Les inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase ciblant Tie2.....	34
1.3.8.2	Les pièges moléculaires contre les angiopoïétines.....	35
1.4	L'inflammation et l'angiogenèse .....	36
1.4.1	La réponse inflammatoire.....	36
1.4.1.1	L'inflammation aiguë.....	36
1.4.1.2	La résolution de l'inflammation aiguë .....	37
1.4.1.3	L'inflammation chronique.....	38
1.4.2	Cellules impliquées dans la réponse inflammatoire.....	39
1.4.3	Médiateurs impliqués dans l'inflammation.....	41
1.4.4	L'interleukine-8.....	43
1.4.4.1	Découverte et expression de l'IL-8 .....	43
1.4.4.2	Régulation génique de la synthèse de l'IL-8.....	44
1.4.4.3	Récepteurs et signalisation de l'IL-8 : rôle dans l'inflammation ....	47
1.5	Les neutrophiles .....	50
1.5.1	Genèse des neutrophiles : la myélopoïèse.....	50
1.5.2	Régulation des neutrophiles dans la circulation sanguine.....	51
1.5.3	Les granules chez les neutrophiles .....	52
1.5.3.1	La granulopoïèse : formation des granules chez les neutrophiles ...	52
1.5.3.2	Les granules azurophiles .....	54
1.5.3.3	Les granules négatifs à la peroxydase .....	56
1.5.3.4	Les vésicules sécrétoires .....	58
1.5.3.5	Les mécanismes de dégranulation.....	58
1.5.3.6	Rôles de la dégranulation dans la réponse inflammatoire.....	60
1.6	Thèmes de recherche .....	62
1.6.1	Hypothèse du premier projet de recherche.....	62
1.6.2	Hypothèse du deuxième projet de recherche.....	63
2.0	Article #1 .....	64
2.1	ABSTRACT .....	66
2.2	INTRODUCTION.....	68
2.3	MATERIAL AND METHODS .....	71
2.4	RESULTS.....	76



2.5	DISCUSSION .....	81
2.6	ACKNOWLEDGEMENTS .....	85
2.7	REFERENCES .....	86
2.8	FIGURE LEGENDS .....	93
2.9	FIGURES .....	96
3.0	Article #2 .....	104
3.1	ABSTRACT .....	106
3.2	INTRODUCTION .....	107
3.3	MATERIAL AND METHODS .....	110
3.4	RESULTS .....	114
3.5	DISCUSSION .....	123
3.6	ACKNOWLEDGEMENTS .....	130
3.7	REFERENCES .....	135
3.8	FIGURES .....	143
4.0	DISCUSSION .....	159
4.1	Les neutrophiles contiennent et relâchent l'Ang1 .....	159
4.2	L'expression génique du VEGF et des angiopoïétines .....	159
4.3	Ang1 est localisée dans le cytosol du neutrophile humain .....	161
4.4	Seul le PMA est capable d'induire la relâche d'Ang1 par les neutrophiles .....	162
4.5	Implications dans l'inflammation de l'Ang1 contenue dans les neutrophiles .....	164
4.6	Perspectives .....	166
4.7	Conclusions de la première étude .....	167
4.8	Implication des angiopoïétines dans la synthèse et la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles .....	168
4.9	Seule l'Ang1 a la capacité d'induire la relâche et la synthèse de l'IL-8 ...	168
4.10	L'Ang1 module l'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans les neutrophiles .....	170
4.11	La synthèse et la relâche de l'IL-8 induite par l'Ang1 sont régulées par l'activité transcriptionnelle et traductionnelle des neutrophiles .....	172
4.12	La surexpression de l'ARNm de l'IL-8 induite par l'Ang1 pourrait être modulée par divers facteurs de transcriptions, dont le NF- $\kappa$ B .....	174

4.13	L'Ang1 induit l'expression de l'ARNm de l'IL-8 ainsi que la synthèse et la relâche de sa protéine via l'activation de la p42/44 MAPK.....	176
4.14	L'Ang1 induit la survie des neutrophiles via la relâche de l'IL-8 .....	177
4.15	Conclusions de la deuxième étude .....	178
4.16	Perspectives.....	179
5.0	RÉFÉRENCES.....	181

## Liste des tableaux

Table I: Percentage of IL-8 released by neutrophils

## Liste des figures

Figure 1. Les récepteurs du VEGF et leurs ligands.

Figure 2. Structure des différents isoformes des angiopoïétines.

Figure 3. Voies de signalisation intracellulaires induites par l'activation de Tie2.

Figure 4. Implication des angiopoïétines dans la vasculogénèse et l'angiogénèse.

Figure 5. Voies de signalisation intracellulaires régulant le gène de l'IL-8.

### Article #1

Figure 1: Expression and quantification of angiopoietins and VEGF mRNA in neutrophils.

Figure 2: Detection of Ang1, Ang2 and VEGF protein expression in neutrophils by FACS analysis.

Figure 3: Agonists-mediated VEGF and Ang1 neutrophil secretion.

Figure 4: Localization of Ang1 and VEGF in neutrophils.

Figure 5: Pentoxifylline inhibits VEGF but not Ang1 release from PMA-treated neutrophils.

Figure 6: BAPTA-AM inhibits VEGF but not Ang1 release from PMA-treated neutrophils.

### Article #2

Figure 1: Effect of angiopoietins on IL-8 release by the neutrophils.

Figure 2: Effect of angiopoietins on IL-8 protein and mRNA synthesis by the neutrophils.

Figure 3: Effect of CHX on IL-8 mRNA expression, IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils.

Figure 4: Effect of ActD on IL-8 mRNA expression, IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils.

Figure 5: Effect of SB203580, U0126 and Triciribine on IL-8 mRNA expression, IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils.

Figure 6: Effect of U0126 on ERK-1/2 phosphorylation by the neutrophils.

## Liste des abréviations

Ang	angiopoïétine
ABIN-2	<i>A20 binding inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B activation-2</i>
ActD	actinomycine D
AP-1	<i>activating protein-1</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BPI	<i>bactericidal/permeability-increasing protein</i>
C/EBP	<i>CAAT/enhancer-binding protein</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CE	cellules endothéliales
CHX	cycloheximide
CML	cellules musculaires lisses
Dok-R	<i>tyrosine kinase-related protein</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	synthase de l'oxyde nitrique endothéliale
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FKHR	facteur de transcription pro-apoptotique <i>forkhead</i>
fMLP	formyl-Met-Leu-Phe
GCP-2	<i>granulocyte chemotactic protein-2</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
G-CSFR	<i>G-CSF receptor</i>
Grb2	<i>growth factor receptor bound 2</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1 <math>\alpha</math></i>
HNP	<i>human neutrophil peptide</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IFN	interféron
IKK	<i>inhibitor <math>\kappa</math>B kinase</i>
IL-8	interleukine-8
iNOS	synthase de l'oxyde nitrique inductible

IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
I $\kappa$ B	<i>inhibitor <math>\kappa</math>B</i>
JNK	<i>c-JUN N-terminal kinase</i>
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEC	matrice extracellulaire
MET	<i>monocytes expressing Tie2</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MPO	myéloperoxidase
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NGAL	<i>neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>
NK	<i>natural killer</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NRE	<i>negative regulatory element</i>
NRF	<i>NF-<math>\kappa</math>B repression factor</i>
PAF	<i>platelet-activating factor</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PI	<i>phosphatidylinositol</i>
PI3K	phosphatidylinositol-3-phosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PMA	phorbol myristate acétate
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand - 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RTK	récepteur tyrosine kinase
SH2	<i>Src homology 2</i>
SHP2	<i>phosphatase containing SH2 domain</i>
TGF	<i>tumor growth factor</i>
Tie2	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains - 2</i>

TIMP	<i>tissue inhibitor metalloproteinase</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VE-cadhérine	<i>vascular endothelial-cadhérine</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>VEGF receptor</i>
VEPTP	<i>vascular endothelial protein tyrosine phosphatase</i>

*À ma grand-mère maternelle Lidia*



## Remerciements

Tout d'abord, j'aimerais remercier mes parents qui m'ont apporté un support moral durant les moments les plus difficiles en étant toujours là pour moi. Je remercie également le docteur Martin Sirois (alias le Calife 25) qui pendant toutes ces années a été plus que mon superviseur, mais bien mon tuteur et mon collègue, me faisant sentir son égal dans toutes les discussions scientifiques avec lui. Son humour et sa joie de vivre furent aussi très appréciés tout au long de mon doctorat.

J'aimerais particulièrement remercier mes anciens collègues Ricardo Maliba et Alexandre Brkovic, qui avaient un sens de l'humour très particulier, mais qui cadrerait très bien avec moi puisqu'on a eu de nombreux moments drôles au début de mes études doctorales. Je remercie également les stagiaires Sandra Boulos et Catherine Cloutier-Grenier pour leur souffle de jeunesse et leur sens de l'humour et mon collègue Abdennebi Rechka pour son bon thé marocain.

Un grand merci aussi à mes collègues actuelles Elizabeth Dumas, Lydia Haddad pour les nombreuses discussions scientifiques intéressantes et aussi pour leur excellent sens de l'humour. Merci aussi à Fadi Hajjar pour avoir fait quelques-unes de mes expériences et pour sa collaboration scientifique.

Merci aussi aux nombreux collègues qui ont enflammé la passion pour le hockey dans les corridors... Louis Villeneuve, George Vaniotis, John Assimakopoulos, Nour El-Amine et un merci particulier à Denis le concierge, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions sur le hockey en fin de journée...

Je tiens également à remercier les organismes subventionnaires pour m'avoir accordé des bourses durant mon stage doctoral : les Instituts de recherche en santé du Canada, la Fondation des maladies du cœur du Québec, les Fonds de la recherche en santé du Québec et la Faculté d'études supérieures de l'Université de Montréal.

Finalement, j'aimerais surtout remercier cette dame qui, en signant sa carte de don d'organes, m'a permis de finir mes études doctorales et qui a fait la plus grande différence dans ma jeune vie.



# 1.0 INTRODUCTION

## 1.1 L'angiogenèse

### 1.1.1 L'endothélium : structure et fonctions

L'endothélium est une structure composée de cellules endothéliales (CE) reliées par une lame basale formée de collagène qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins, constituant une barrière qui crée une perméabilité sélective entre le sang et les tissus. Cette barrière permet, par la coopération entre les CE et la lame basale, un échange de substances nutritives tout en empêchant l'entrée de molécules nocives dans les tissus. La fonction de coagulation en cas de blessure des vaisseaux sanguins est aussi régulée par les CE, qui possèdent des molécules inhibant l'agrégation plaquettaire, mais aussi par la lame basale qui, une fois endommagée, favorise la coagulation afin d'empêcher le déversement du sang dans la région tissulaire. La vasomotricité, qui se définit comme la capacité des vaisseaux sanguins à se contracter (vasoconstriction) ou se dilater (vasodilatation), est finement régulée par les CE qui envoient des signaux moléculaires aux cellules musculaires lisses (CML) qui y sont juxtaposées. De plus, les CE participent au processus inflammatoire, étant impliquées dans la formation d'œdème et la transmigration leucocytaire. Finalement, selon le stade de développement ou les besoins de l'organisme adulte, l'endothélium agit comme une structure dynamique, étant impliqué dans le processus angiogénique<sup>1</sup>.

### 1.1.2 L'angiogenèse et la vasculogenèse : définitions et mécanismes

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est distinct de la vasculogenèse, qui se caractérise par la conception de vaisseaux sanguins *de novo* à l'aide d'hémangioblastes, qui sont des cellules précurseurs se différenciant en angioblastes (précurseurs des CE), et de cellules souches hématopoïétiques (précurseurs des cellules sanguines)<sup>2</sup>. Le processus angiogénique débute par une

augmentation de la perméabilité vasculaire et est suivi par la déstabilisation des vaisseaux sanguins déjà existants, qui est entamée par la dégénérescence des cellules murales (péricytes et CML) autour des vaisseaux sanguins établis afin de permettre la dégradation de la membrane basale des CE et de la matrice extracellulaire (MEC). Par la suite, une nouvelle matrice est remodelée par des protéases spécifiques afin de permettre aux CE migrantes de proliférer et de s'y attacher pour développer le vaisseau sanguin nouvellement formé<sup>3, 4</sup>. Suite à la formation de la structure tubulaire du vaisseau, de nouvelles cellules murales (péricytes et CML) sont recrutées, permettant ainsi la maturation du nouveau vaisseau sanguin. Cependant, en l'absence de recrutement des cellules murales, les vaisseaux sanguins juvéniles régressent et disparaissent par un processus d'apoptose et de nécrose cellulaire. La base moléculaire de l'angiogenèse ne provient pas seulement des CE en prolifération, mais également des cellules circulantes (principalement les plaquettes et les neutrophiles) qui relâchent de nombreux facteurs de croissance et protéases dans le milieu environnant<sup>5-7</sup>.

### **1.1.3 L'angiogenèse physiologique et pathologique**

L'angiogenèse peut être un processus physiologique et bénéfique pour l'organisme vivant, notamment lors du développement du système cardiovasculaire embryonnaire<sup>8</sup>, qui pourvoit la croissance adéquate des différents organes. À la fin de la croissance somatique (âge postnatal), la plupart des vaisseaux sanguins entrent dans un état de quiescence, sauf ceux contribuant à la croissance de l'endomètre lors du cycle menstruel ou du placenta en période de grossesse<sup>9, 10</sup>. Cependant, les CE préservent leur mécanisme de division cellulaire afin de permettre la réparation des tissus lors d'éventuels traumatismes<sup>11</sup> ou d'assurer une oxygénation adéquate aux tissus environnants en conditions hypoxiques et inflammatoires. Cependant, le processus angiogénique peut aussi devenir pathologique lorsque la prolifération des nouveaux vaisseaux sanguins devient non contrôlée. De nombreuses pathologies, comme l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la rétinopathie et la formation de métastases ont en commun le développement d'une angiogenèse dérégulée<sup>12</sup>. Des études ont par ailleurs observé une distinction entre la structure des

néovaisseaux présents dans ces pathologies inflammatoires et les néovaisseaux tumoraux. Dans le premier cas, la vascularisation tumorale est désorganisée et les vaisseaux juvéniles présentent de nombreuses fenestrations, alors que les maladies inflammatoires non tumorales montrent le développement d'une vascularisation plus structurée, moins poreuse et par conséquent, moins perméable<sup>13, 14</sup>.

#### **1.1.4 Régulation de l'angiogenèse**

L'angiogenèse est régulée par de nombreux facteurs, soit physiques, comme les effets hémodynamiques (forces de cisaillement, flot sanguin), cellulaires, telles les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaires, ou moléculaires, correspondant aux protéines membranaires (intégrines, VE-cadhérine et éphrines) et facteurs de croissance solubles (VEGF, angiopoïétines, interleukines, *fibroblast growth factor* (FGF) et *platelet-derived growth factor* (PDGF))<sup>5</sup>. Le VEGF et les angiopoïétines sont quant à eux deux facteurs essentiels au développement et au maintien du processus angiogénique, tant physiologique que pathologique<sup>15-20</sup>.

## 1.2 Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

### 1.2.1 Découverte et caractérisation des membres du VEGF

#### 1.2.1.1 Découverte du VEGF

Le laboratoire du docteur Dvorak à Harvard isola en 1983 une nouvelle molécule à partir d'une tumeur cancéreuse et l'identifia comme le *vascular permeability factor* (VPF) due à sa capacité d'induire une augmentation rapide de la perméabilité vasculaire<sup>21</sup>. Cependant, Dr Dvorak et son équipe n'ont jamais été en mesure de cloner ladite molécule avant sa caractérisation (séquençage et clonage) par le groupe des docteurs Ferrara et Henzel en 1989 et qu'ils nommèrent le VEGF<sup>22, 23</sup>. Fait intéressant, le groupe du Dr Ferrara a caractérisé le VEGF pour ses propriétés d'agent mitogénique et non pour sa capacité à induire la perméabilité vasculaire, tel qu'initialement découvert par l'équipe du Dr Dvorak.

#### 1.2.1.2 Les isoformes et analogues du VEGF

Le gène *homo sapiens* du VEGF (nommé VEGF-A) peut donner naissance, suite à l'épissage alternatif de ses 8 exons, à quatre isoformes distincts composés de 206, 189, 165 ou 121 acides aminés respectivement<sup>24, 25</sup>. Le VEGF-A<sub>165</sub> est l'isoforme le plus exprimé chez l'humain et ses propriétés sont semblables à celles du VEGF initialement caractérisé par le groupe du Dr Ferrara. Le VEGF-A<sub>165</sub> se distingue notamment par sa capacité de liaison aux sulfates d'héparane de la MEC, propriété qui est perdue par le VEGF-A<sub>121</sub><sup>26</sup>. Ce dernier est entièrement soluble dans la circulation sanguine à cause de l'absence des exons 6 et 7, alors que son isoforme, le VEGF-A<sub>165</sub> a gardé l'exon 7, lui conférant ainsi une disponibilité circulatoire plus restreinte. Les isoformes comportant 206 et 189 acides aminés ont conservé la traduction des exons 6 et 7, leur conférant la disponibilité la plus restreinte de tous les isoformes du VEGF, étant ainsi complètement séquestrés à la MEC<sup>27</sup>. La liaison à la MEC détermine la disponibilité circulante des différents isoformes du VEGF et permet aussi l'augmentation de l'activité mitogénique de ces isoformes<sup>28</sup>. Ainsi, le

VEGF<sub>189</sub> et le VEGF<sub>206</sub> sont les isoformes les plus actifs, mais leur disponibilité est très réduite, alors que le VEGF-A<sub>121</sub> a une disponibilité très élevée, tout en étant le moins actif de tous les isoformes. Le VEGF-A<sub>165</sub> est alors considéré comme étant l'isoforme le plus optimal, possédant à la fois la meilleure combinaison de biodisponibilité et de capacité à induire des activités biologiques de tous les isoformes caractérisés du VEGF<sup>29</sup>. En plus de ces isoformes, la famille du VEGF comporte aussi plusieurs analogues, dont le *placental growth factor* (PlGF), le VEGF-B, -C, -D et -E. Ces analogues partagent une homologie structurale restreinte avec le VEGF-A, provenant dans certains cas de gènes distincts<sup>30-34</sup>.

### 1.2.1.3 Régulation de l'expression génique du VEGF

L'induction génique du VEGF se fait principalement lors d'une diminution de la tension d'oxygène, survenant lors d'événements pathophysiologiques<sup>35</sup>. Le *hypoxia inducible factor* (HIF)-1 $\alpha$  est le facteur de transcription responsable de l'augmentation de l'expression de l'ARNm du VEGF en conditions hypoxiques<sup>36</sup>. La régulation du HIF-1 $\alpha$  est sous la responsabilité du gène *von Hippel-Lindau* (vHL), qui induit la synthèse de la protéine vHL *tumor suppressor* (pVHL), cette dernière se liant au HIF-1 $\alpha$  lors de conditions de tension d'oxygène normales, menant ce dernier vers une dégradation sélective par le protéasome. En conditions hypoxiques, l'arrêt de la transcription génique du vHL entraîne une baisse de l'expression de la protéine, ce qui a pour effet de laisser libre cours au facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  pour que ce dernier puisse induire la transcription génique du VEGF<sup>37, 38</sup>. Plusieurs facteurs de croissance, dont le PDGF, le FGF, le *transforming growth factor* (TGF), l'*epidermal growth factor* (EGF), l'*insulin-like growth factor* (IGF) et le *keratinocyte growth factor* (KGF) sont également capables d'augmenter l'expression de l'ARNm du VEGF. Tous ces facteurs de croissance sont relâchés de manière paracrine ou autocrine, agissant ainsi de concert avec l'environnement hypoxique afin d'augmenter l'expression génique et subséquentement protéique du VEGF<sup>39, 40</sup>. De plus, certaines cytokines pro-inflammatoires, telles l'interleukine (IL)-1 $\alpha$  et l'IL-6, induisent une hausse de l'expression génique et protéique du VEGF. Cet effet est en lien avec la capacité du VEGF à induire l'hyperperméabilité vasculaire et

l'inflammation<sup>40</sup>. Finalement, certaines mutations de l'oncogène Ras dans certains types de tumeurs induisent également l'augmentation de l'expression du VEGF, menant ainsi à la progression tumorale et favorisant le développement de métastases<sup>41, 42</sup>.

## 1.2.2 Les récepteurs du VEGF

### 1.2.2.1 Caractérisation des récepteurs du VEGF

Les récepteurs du VEGF font partie de la famille des récepteurs couplés aux domaines tyrosine kinase (RTK) qui englobe trois membres : VEGFR-1, -2 et -3. Ces récepteurs ont une structure moléculaire similaire, étant composés d'une partie extracellulaire formée par sept domaines ressemblant à l'immunoglobuline, d'un domaine transmembranaire ainsi que d'une partie intracellulaire constituée par deux domaines tyrosine kinase<sup>43, 44</sup>. Le VEGFR-1 et -2, localisés à la surface des CE, sont activés suite à leur liaison avec le VEGF-A<sup>45</sup>, tandis que le VEGFR-3, situé principalement à la surface des CE lymphatiques, peut seulement être activé suite à sa liaison au VEGF-C ou -D<sup>46, 47</sup>. Le VEGF-A<sub>165</sub> a aussi la capacité de lier la neuropiline, qui est une protéine adaptatrice pour les ligands des RTK située à proximité des récepteurs du VEGF à la surface membranaire des CE<sup>48</sup>. Le rôle de la neuropiline est de potentialiser les effets du VEGF-A<sub>165</sub> suite à sa liaison et à l'activation du VEGFR-2<sup>49-51</sup>.

### 1.2.2.2 Le VEGFR-1 : ligands et fonctions

Le VEGFR-1 possède la capacité de lier et d'être activé par le VEGF-A, le PlGF et le VEGF-B, les deux derniers analogues étant des agonistes exclusifs de ce récepteur<sup>52, 53</sup>. L'affinité du VEGF-A pour ce récepteur est dix fois plus élevée que pour le VEGFR-2<sup>54</sup>, mais l'activation du VEGFR-1 par ce même agoniste, induit seulement une faible autophosphorylation des résidus tyrosine kinase<sup>55, 56</sup>. Ces observations ont permis d'attribuer au VEGFR-1 un rôle prédominant dans la séquestration du VEGF-A, prévenant la liaison et subséquentement l'activation du VEGFR-2 par ce dernier<sup>53</sup>. Ce phénomène a été confirmé durant une étude de

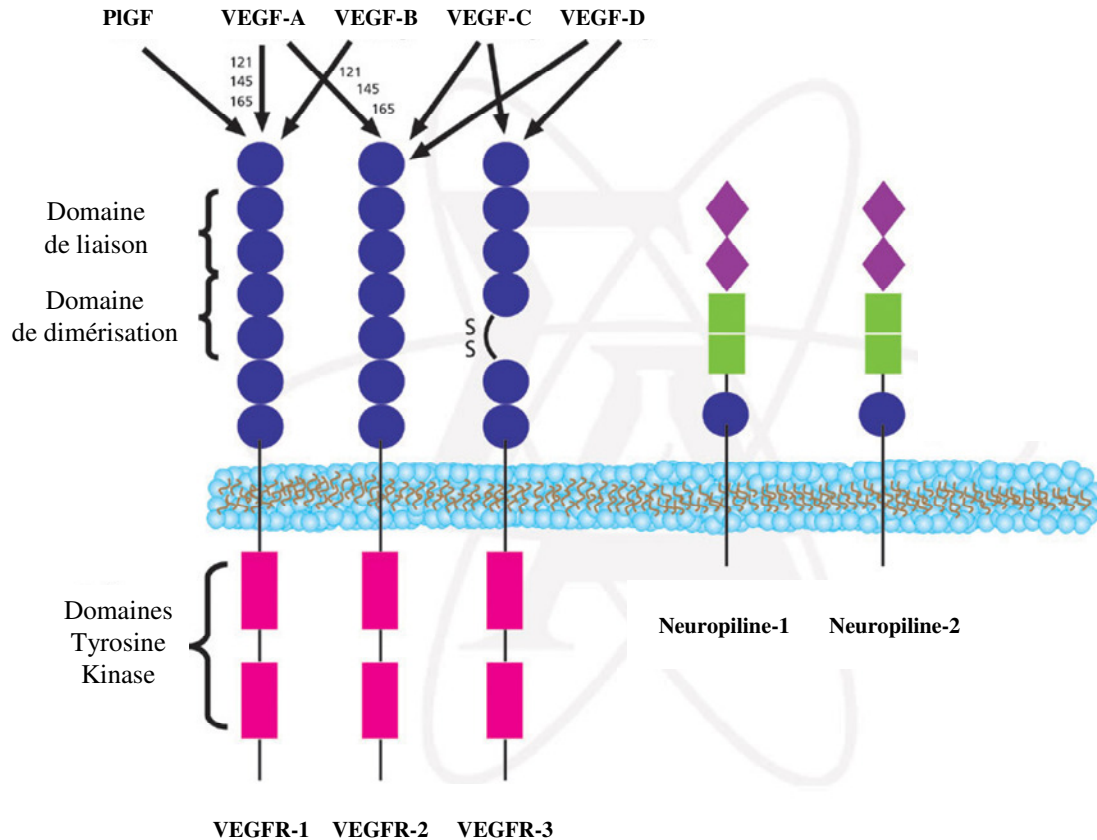


mutagenèse dirigée qui a démontré une croissance normale du système vasculaire chez la souris transgénique manquant le domaine tyrosine kinase de VEGFR-1<sup>57</sup>. Cependant, dans certains types cellulaires et dépendamment de l'environnement dans lequel ces cellules sont soumises, le VEGFR-1 a la capacité d'induire un signal mitogénique<sup>58</sup>, la migration des monocytes<sup>59</sup> et l'augmentation de l'expression de *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9) dans les CE du poumon et les cellules métastatiques de tumeurs pulmonaires<sup>60</sup>. De plus, suite à son activation par le VEGF-A, le VEGFR-1 est capable de stimuler la relâche de facteurs de croissance dans certains lits vasculaires<sup>61</sup>. Certaines études ont également démontré l'implication du VEGFR-1 dans le système nerveux, notamment par l'augmentation de l'expression de ce dernier à la surface des astrocytes suite à un traitement au VEGF<sup>62</sup> ou à une blessure<sup>63</sup> ainsi que par l'induction de la migration des astrocytes suite à l'activation du VEGFR-1<sup>64</sup>.

La liaison du PIGF au VEGFR-1 peut entraîner une réponse proangiogénique par trois mécanismes distincts : (1) par la capacité du PIGF d'activer le VEGFR-1 de manière directe, (2) en délogeant le VEGF-A de sa liaison avec le VEGFR-1, ainsi le déplaçant vers le VEGFR-2, activant ainsi ce dernier et (3) par la présence d'une phosphorylation croisée entre les domaines tyrosine kinase du VEGFR-1 et du VEGFR-2 activés par le PIGF et le VEGF-A respectivement<sup>65, 66</sup>.

L'activation du VEGFR-1 par le VEGF-B joue un faible rôle dans le processus angiogénique, puisqu'il est seulement impliqué dans l'hypertrophie du myocarde chez la souris<sup>67, 68</sup>. Cependant, une récente étude a démontré la capacité du VEGF-B à protéger les neurones moteurs contre leur dégénérescence en augmentant l'expression du VEGFR-1 dans ces mêmes neurones<sup>69</sup>.

Finalement, nous retrouvons le VEGFR-1 sous une forme soluble sanguine (sVEGFR1), qui est une forme tronquée de son homologue membranaire, étant uniquement composée de son domaine extracellulaire<sup>70</sup>. Le sVEGFR-1 joue le même rôle que le VEGFR-1 membranaire, provoquant la séquestration du VEGF-A, sans toutefois avoir la possibilité d'induire une activité biologique<sup>71</sup>.



**Figure 1. Les récepteurs du VEGF et leurs ligands.** Les récepteurs du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sont : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. À ces trois récepteurs s'ajoutent la neuropiline-1 et -2, des corécepteurs du VEGFR-2 et VEGFR-3 qui facilitent la liaison du VEGF et potentialisent les activités biologiques induites par la stimulation de ces récepteurs avec le VEGF-A<sub>165</sub>. Les récepteurs du VEGF sont composés de domaines extracellulaires semblables aux immunoglobulines, qui servent à la fois de domaine de liaison au VEGF et de dimérisation du récepteur, ainsi que de domaines tyrosines kinases intracellulaires pour la transmission du signal en aval. La famille du VEGF comporte plusieurs membres classifiés selon la longueur de la protéine (isoformes) ou l'épissage alternatif (analogues). Les analogues sont le VEGF-A,-B,-C,-D et le *placental growth factor* (PlGF), alors que les isoformes du VEGF sont le VEGF-A<sub>121</sub>, <sub>145</sub>, <sub>165</sub>, <sub>189</sub> et <sub>206</sub>, desquels la forme prédominante est le VEGF-A<sub>165</sub>. Le VEGF-A se lie au VEGFR-1 et -2, le VEGF-C et -D se lient au VEGFR-2 et -3, alors que le VEGF-B et le PlGF se lient uniquement au VEGFR-1<sup>72-74</sup>. (Figure modifiée d'après [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) © SIGMA)

### 1.2.2.3 Le VEGFR-2 : ligands et fonctions

Le VEGFR-2 est capable de lier le VEGF-A, -C et -D, le VEGF-A ayant environ dix fois moins d'affinité pour ce récepteur que pour le VEGFR-1<sup>56, 75</sup>. Le VEGF-C et le VEGF-D jouent un rôle limité dans l'angiogenèse vasculaire, puisqu'ils activent de façon prédominante le VEGFR-3, localisé majoritairement sur les CE lymphatiques, induisant l'angiogenèse lymphatique<sup>76</sup>. Le VEGFR-2 joue un rôle clé dans l'angiogenèse, puisqu'il induit des effets mitogéniques, proangiogéniques et inflammatoires suite à sa liaison au VEGF, par des mécanismes telles l'induction de la perméabilité vasculaire et la migration des CE<sup>77, 78</sup>. Toutes ces activités biologiques sont induites suite à l'autophosphorylation des résidus tyrosine kinase intracellulaires du VEGFR-2, qui mène à l'activation de plusieurs voies de signalisation, notamment l'induction de la phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ), la phosphatidyl-inositol triphosphate (PI3K), la protéine activatrice Ras-GTP, la famille des Src<sup>79, 80</sup> et la voie de la protéine Raf- *mitogen-activated ERK-activating kinase* (MEK)-*extracellular regulated kinase* (ERK)<sup>81</sup>. De plus, le VEGFR-2 peut aussi induire des effets antiapoptotiques dans les CE, en passant par l'activation de la voie de signalisation de la PI3K/Akt<sup>82</sup>.

### 1.2.3 Le rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique

L'angiogenèse est un élément essentiel dans le développement de l'embryon, le VEGF jouant un rôle primordial dans ce processus. Ainsi, l'inactivation d'un allèle du VEGF chez l'embryon mène à des anomalies du développement, causées par une vascularisation insuffisante des organes et une diminution du nombre de cellules sanguines nucléées dans le système vasculaire, qui s'avèrent létales<sup>83, 84</sup>. Pendant la période postnatale, l'inactivation artificielle du VEGF cause un arrêt de la croissance suivi par une mortalité rapide due à l'insuffisance rénale causée par un sous-développement des glomérules<sup>85, 86</sup>.

Durant la période de croissance, le VEGF est impliqué dans le développement du squelette et la croissance longitudinale des os<sup>87, 88</sup>. Des études ont notamment démontré la nécessité d'un gradient de VEGF pour la formation des os et du cartilage

par les chondrocytes. De plus, lorsque le VEGF est manquant, nous assistons à une absence de vascularisation qui mène à une régression de la formation osseuse<sup>85, 89</sup>.

À l'âge adulte, la croissance cyclique folliculaire est régulée par des activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. Le VEGF joue un rôle d'activateur dans ce processus, puisque son inhibition supprime l'angiogenèse lutéale et retarde le développement folliculaire<sup>89-92</sup>.

#### **1.2.4 L'implication du VEGF dans l'angiogenèse pathologique**

L'angiogenèse pathologique impliquée dans la croissance tumorale ou le dommage tissulaire est un processus plus rudimentaire que l'angiogenèse physiologique, étant caractérisée par le développement d'une inflammation chronique, qui implique un déséquilibre de facteurs de croissance présents dans l'environnement sous-jacent, notamment le VEGF<sup>19, 93-95</sup>. Suite à ce déséquilibre, les vaisseaux sanguins juvéniles développent une structure anormale et deviennent très perméables aux protéines plasmatiques. Afin d'illustrer la différence de complexité entre les deux types d'angiogenèse, plusieurs groupes de recherche ont essayé d'imiter sans succès l'angiogenèse physiologique en combinant de multiples facteurs de croissance dans un cadre spatio-temporel bien défini, n'étant jamais capables d'induire la formation de vaisseaux sanguins matures, tandis que la seule présence du VEGF a été suffisante pour induire l'angiogenèse pathologique<sup>19, 93, 95-100</sup>.

Le VEGF joue un rôle clé dans plusieurs pathologies, notamment dans l'infarctus du myocarde<sup>101, 102</sup>, les accidents vasculaires cérébraux<sup>103</sup> et les maladies inflammatoires chroniques telles que le psoriasis<sup>104</sup> et l'arthrite rhumatoïde<sup>105</sup>, et ce, par l'entremise de sa surexpression provoquée tant par l'ischémie<sup>106, 107</sup>, que par une multitude de facteurs de croissance et cytokines<sup>16, 19</sup>.

Le VEGF est également impliqué de manière importante dans le développement tumoral notamment par sa surexpression au niveau des tumeurs<sup>39, 108</sup>. Des études ont démontré que la surexpression du VEGF est surtout essentielle aux stades précoces du développement tumoral<sup>109</sup> et que dans certains cas, le VEGF est exprimé tant à l'intérieur de la tumeur que dans le stroma<sup>110-112</sup>. Suite à ces

découvertes, de nombreuses approches ont été mises en place afin de ralentir ou empêcher la croissance tumorale, notamment en développant des anticorps chimériques humanisés contre le VEGF<sup>113-115</sup> ou son récepteur, le VEGFR-2<sup>116</sup> ainsi que par la capture du VEGF circulant à l'aide d'un *VEGF-Trap* constitué d'un hybride de VEGFR-1/R-2 soluble<sup>117</sup>. Le VEGF joue aussi un rôle dans certaines pathologies des cellules sanguines, tels le myélome multiple, le lymphome des cellules T, la leucémie lymphoblastique aiguë, le lymphome de Burkitt et la leucémie myélocytique chronique<sup>118</sup>.

Le VEGF a la capacité de réguler le développement des maladies vasculaires intraoculaires. Une de ces pathologies, la rétinopathie, a comme caractéristique une occlusion de la veine centrale rétinienne. Ce phénomène provoque une néovascularisation oculaire due à l'augmentation de l'expression du VEGF dans l'humeur aqueuse de l'œil<sup>119, 120</sup>. D'autres pathologies oculaires, telles que l'hémorragie du corps vitreux, le détachement de la rétine et le glaucome, sont également causées par la surexpression du VEGF et peuvent ultimement mener à une perte complète de la vision<sup>121-124</sup>.

La capacité du VEGF à augmenter la perméabilité vasculaire lui permet de jouer un rôle actif dans le développement de l'œdème cérébral<sup>125</sup>. Le VEGF est aussi impliqué dans les pathologies concernant le système reproducteur féminin, tel le syndrome ovarien polykystique, causant une hyperplasie et une hypervascularisation de l'endomètre, ce qui entraîne ultimement le développement de l'endométriose<sup>126</sup>.

## 1.3 Les angiopoïétines

Les angiopoïétines, découvertes au milieu des années 1990, ont été regroupées dans une famille de facteurs de croissance qui s'avère être essentielle dans les stades avancés du développement vasculaire, permettant la continuation du processus de croissance et de maturation des vaisseaux sanguins entrepris par l'action du VEGF et de ses récepteurs<sup>127-129</sup>.

### 1.3.1 Structure, localisation et fonctions de l'Ang1 et l'Ang2

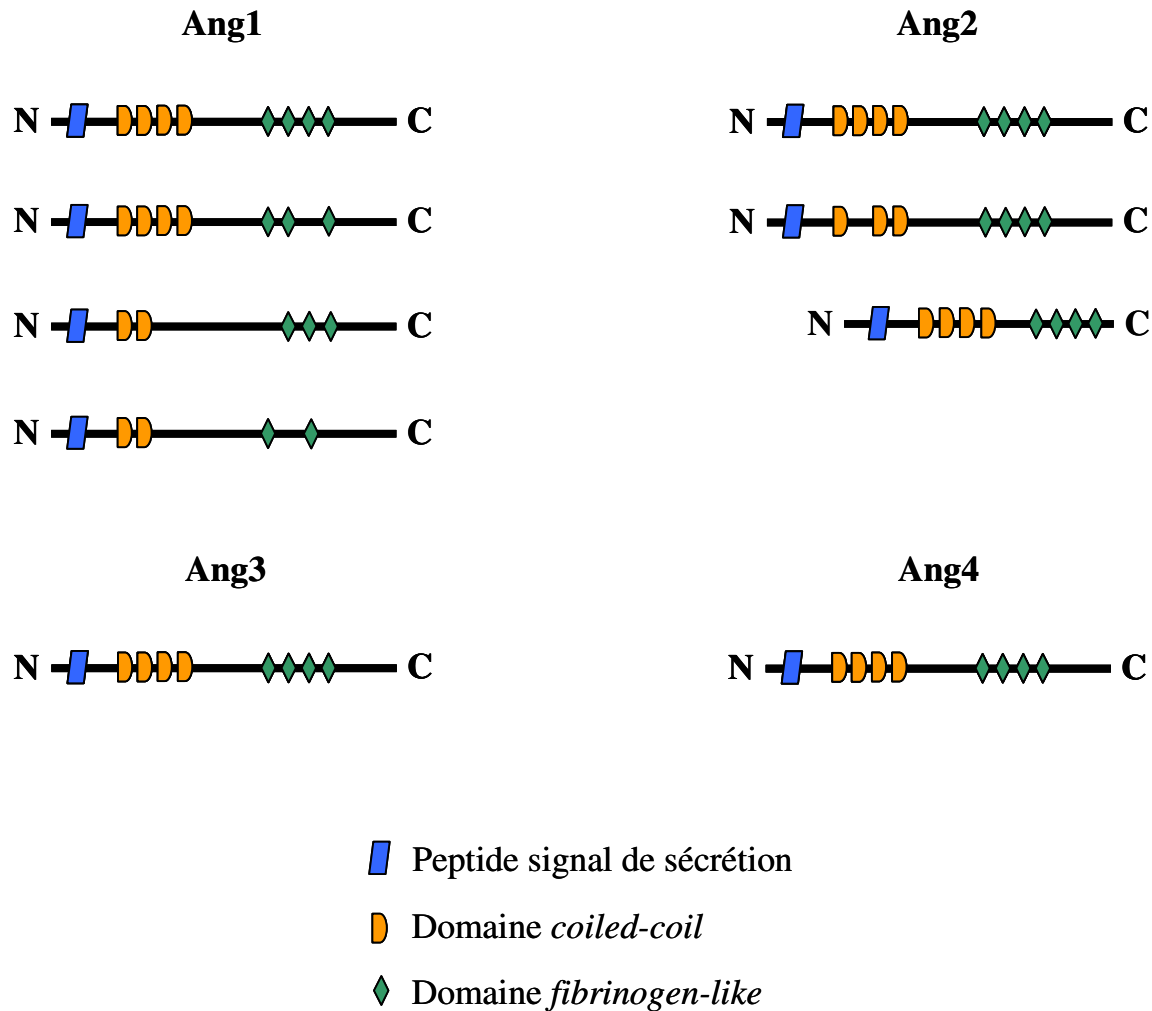
Jusqu'à ce jour, quatre angiopoïétines ont été identifiées, soit l'angiopoïétine-1 (Ang1), -2 (Ang2), -3 (Ang3) et -4 (Ang4), dont les mieux caractérisées sont l'Ang1 et l'Ang2, alors que l'Ang3 et l'Ang4 sont des orthologues retrouvés chez la souris et l'humain respectivement<sup>130</sup>. Les angiopoïétines, des ligands du récepteur Tie2<sup>127, 129, 131-133</sup> sont constituées de deux domaines, dont le premier est une structure *coiled-coil* située dans la partie N-terminale qui induit l'oligomérisation du ligand permettant à l'Ang1 et l'Ang2 de former des multimères hétérogènes, soit des trimères, tétramères et pentamères<sup>134</sup>. L'oligomérisation des angiopoïétines est nécessaire pour l'activation de Tie2, mais n'est pas requise pour leur liaison à ce récepteur, qui est cependant induite par le deuxième domaine, composé par une structure semblable au fibrinogène localisée dans la partie C-terminale de la protéine<sup>127, 135</sup>. Les angiopoïétines sont des glycoprotéines secrétées ayant un poids moléculaire d'approximativement 75 kDa, sous leur forme dimérique. L'Ang1, localisée sur le chromosome 8q22, est composée de 498 acides aminés, alors que l'Ang2 a 496 acides aminés, étant localisée sur le chromosome 8q23, leurs séquences étant homologues à 60%<sup>127, 129</sup>.

L'angiopoïétine-1 est exprimée dans les cellules du mésenchyme et régule l'endothélium adjacent de façon paracrine. De plus, l'Ang1 est aussi exprimée abondamment dans les cellules du myocarde pendant le début du développement, les cellules périvasculaires (CML et péricytes) lors du développement tardif et dans les tissus chez l'adulte<sup>20, 129, 136</sup>, les cellules tumorales<sup>137, 138</sup> et les cellules neuronales dans le cerveau<sup>137</sup>. L'Ang2 est exprimée majoritairement dans les CE, où elle est

emmagasinée dans les corps de Weibel-Palade et relâchée rapidement suite à différents stimuli<sup>139</sup>. En conditions physiologiques, l'expression de l'Ang2 est augmentée lorsque le remodelage vasculaire est requis, comme dans le cas de la vascularisation de la rétine ou la régression du *corpus luteum* chez la femme lors du cycle ovarien<sup>129, 140</sup>. L'expression de l'Ang2 est également augmentée dans le cancer, et ce, tant au niveau des cellules tumorales<sup>141-143</sup>, que dans les CE des néovaisseaux tumoraux<sup>138, 144, 145</sup>. De plus, les neurones rétiniens et les cellules de Müller sont une source importante d'Ang2<sup>146, 147</sup>.

L'Ang1 est synthétisée par épissage alternatif, donnant ainsi naissance à quatre isoformes. Les isoformes épissés à partir de l'exon de longueur maximale (1,5 kb) et de l'exon d'une longueur de 1,3 kb se lient au récepteur Tie2 et induisent son autophosphorylation, alors que les isoformes codés par les exons de taille inférieure (0,9 kb et 0,7 kb) peuvent se lier à Tie2, sans toutefois induire son activation<sup>148</sup>. L'Ang2 a aussi des isoformes, dont l'Ang-2B détectée chez le poulet, qui a la particularité d'être composé par un domaine N-terminal tronqué<sup>149</sup>. De plus, un isoforme additionnel a été identifié, soit l'Ang-2(443) dont certaines parties de son domaine *coiled-coil* sont manquantes, le rendant ainsi incapable d'induire la phosphorylation de Tie2<sup>150</sup>.

L'Ang1 est un agoniste du récepteur Tie2, tandis que l'Ang2 a initialement été caractérisée comme son antagoniste<sup>129</sup>. Cependant, l'Ang2 peut aussi agir comme un agoniste du récepteur Tie2 selon le type cellulaire sur lequel Tie2 est exprimé, la durée de stimulation avec l'Ang2, la concentration utilisée, ainsi que la présence du récepteur Tie1 à la surface membranaire des cellules stimulées avec Ang2<sup>151-153</sup>. Suite à l'activation de l'endothélium par différents médiateurs proinflammatoires, l'Ang2 est rapidement relâchée dans le milieu extracellulaire, où elle active le récepteur Tie2 de manière autocrine, en s'y liant sous sa forme homodimérique ou multimérique<sup>135</sup>. Cependant, une étude a démontré que l'activité de l'Ang2 endogène relâchée par l'endothélium ne peut être inhibée par l'ajout de Tie2 soluble exogène, suggérant que l'Ang2 pourrait induire l'activation d'une boucle autocrine interne et ainsi agir indépendamment de l'activation du récepteur Tie2<sup>154</sup>.



**Figure 2. Structure des différents isoformes des angiopoïétines.** Pour la famille des angiopoïétines, quatre isoformes distincts de l'Ang1 ont été caractérisés, dont seulement les deux premiers (les plus longs) peuvent activer le récepteur Tie2<sup>148</sup>. La famille de l'Ang2 est constituée de trois isoformes, dont l'Ang2(443) ayant le domaine *coiled-coil* tronqué<sup>150</sup> et l'isoforme Ang2B, qui est uniquement exprimé chez le poulet, ayant la partie N-terminale tronquée<sup>149</sup>. L'Ang3 et l'Ang4, que l'on retrouve chez la souris et chez l'humain respectivement, n'ont pas d'isoformes supplémentaires<sup>133</sup>. Le domaine *coiled-coil* est essentiel à l'oligomérisation du ligand, alors que le domaine *fibrinogen-like* permet la liaison au récepteur Tie2<sup>155</sup>.



### 1.3.2 L'angiopoïétine-3 et l'angiopoïétine-4

L'angiopoïétine-3 (Ang3) est seulement exprimée chez les rongeurs, alors que l'Ang4 est uniquement retrouvée chez l'humain<sup>133</sup>. L'Ang3 (rongeur) et l'Ang4 (humain) sont des orthologues inter-espèces, qui partagent néanmoins leur composition en acides aminés à 65%<sup>133</sup>. De plus, le locus de l'Ang3 sur le chromosome murin et celui de l'Ang4 sur sa contrepartie humaine, ont une synténie semblable<sup>133</sup>. La structure protéique de l'Ang3 et l'Ang4 est apparentée à celle de l'Ang1 et l'Ang2, comprenant des domaines *coiled-coil* dans la région N-terminale et un domaine apparenté au fibrinogène dans la région C-terminale<sup>127, 129, 133</sup>. L'Ang3 et l'Ang4 sont majoritairement synthétisées sous une forme dimérique liée par un pont disulfide, ce qui leur confère une ressemblance à la forme native de l'Ang2<sup>127, 129, 133</sup>. L'Ang4 est exprimée dans certains types de tumeurs<sup>156-158</sup> et cette expression peut être augmentée par l'hypoxie et les facteurs de croissance endothéliaux dans une lignée cellulaire de glioblastome et les CE<sup>159-161</sup>. Par ailleurs, l'expression de l'Ang3 est augmentée dans les poumons, le cerveau et le cœur, en réponse à l'hypoxie chez les rats<sup>162</sup>.

Ces deux angiopoïétines ont des propriétés semblables quant à leur liaison au récepteur Tie2<sup>130</sup>. Initialement, l'Ang3 a été caractérisée comme un antagoniste de Tie2, à cause de sa capacité, lorsqu'elle est exprimée sous forme chimérique, à inhiber l'activation de ce dernier par l'Ang1 dans les CE humaines, alors que l'Ang4 agit comme un agoniste de Tie2<sup>133</sup>. Toutefois, lorsque stimulé avec une forme recombinante d'Ang3, le récepteur Tie2 murin est activé, induisant l'angiogenèse cornéenne<sup>130</sup> et la croissance de gliomes humains greffés chez la souris<sup>163</sup>. Une autre étude a démontré que la surexpression de l'Ang3 induit l'inhibition de l'angiogenèse et des métastases tumorales dans les modèles du carcinome du poumon de Lewis et le carcinome mammaire TA3<sup>164</sup>, ce qui permet de conclure que les actions de l'Ang3 sont contexte-dépendantes. L'Ang4 a été reconnue pour sa capacité à inhiber tant la migration des CE induite par le VEGF-A et le bFGF *in vitro*, que l'angiogenèse induite par ces deux cytokines dans un modèle de « *plug* » de Matrigel chez la souris<sup>165</sup>. Grâce à sa capacité à moduler l'angiogenèse *in vivo*, de nouvelles stratégies thérapeutiques impliquant l'Ang4 pourraient être considérées chez l'humain. En effet,

l'Ang4 a des effets semblables à l'Ang1, mais le potentiel thérapeutique de ce dernier est limité étant donné sa propension à s'agréger en multimères qui sont difficilement solubles, alors que l'Ang4 a une tendance à former des dimères solubles<sup>130</sup>.

### 1.3.3 La famille des récepteurs Tie

#### 1.3.3.1 Structure, localisation et propriétés de Tie1 et Tie2

Les deux récepteurs de la famille Tie (*tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor domains*), dénommés Tie1 et Tie2, ont des structures relativement semblables. Les récepteurs Tie1 et Tie2 ont un poids moléculaire de 135 et 150 kDa respectivement et sont localisés à la surface des CE vasculaires et lymphatiques. Les deux membres de la famille des récepteurs Tie ont été initialement caractérisés comme des récepteurs orphelins au début des années 1990. De plus, ces deux récepteurs ont des similarités quant à leur domaine cytoplasmique (76% de leur séquence est homologue), mais comportent de nombreuses différences dans leur domaine extracellulaire (seulement 33% de leur séquence est homologue)<sup>166</sup>. Tie1 et Tie2 font partie de la famille des récepteurs tyrosine kinase et sont constitués par des domaines homologues ressemblant aux immunoglobulines (Ig) et à l'EGF. Ainsi, leur région extracellulaire est formée à partir de trois domaines ressemblant à l'EGF, trois domaines ressemblant aux immunoglobulines (Ig) et trois domaines répétés composés de fibronectine de type III, alors que la région cytoplasmique comporte un domaine tyrosine kinase qui est capable de se lier à différentes molécules suite à son autophosphorylation<sup>166-169</sup>. Durant les premiers stades du développement, Tie1 est détecté sur les angioblastes provenant du haut du mésenchyme, dans l'aorte dorsale et aussi sur les CE migratoires du cœur en développement au jour embryonnaire E8.5<sup>170</sup>. Le récepteur Tie1 a été majoritairement identifié à la surface des CE, où il a la capacité de former des hétérodimères avec Tie2<sup>171</sup>. Certaines études ont également démontré que le domaine extracellulaire de Tie1 est clivé par protéolyse suite à une stimulation au VEGF, permettant ainsi au domaine cytoplasmique qui reste ancré à la membrane plasmique de pouvoir interagir avec Tie2 et moduler sa signalisation<sup>171-173</sup>. Le clivage de Tie1 est également observé après un traitement des CE avec le PMA ou

le TNF- $\alpha$ , ainsi qu'après l'induction de contraintes de cisaillement<sup>174-176</sup>. Toutefois, malgré de récents travaux suggérant qu'une forme pentamérique artificielle de l'Ang1 (COMP-Ang1) peut lier le récepteur Tie1 selon certaines conditions, ce récepteur est toujours considéré comme orphelin<sup>177</sup>.

Le récepteur Tie2 est exprimé à la surface des CE, cellules hématopoïétiques, cellules précurseurs des CE ainsi que des cellules tumorales<sup>156, 178-180</sup>. De plus, une sous-population de monocytes qui expriment Tie2 est associée avec l'angiogenèse induite par les macrophages associés aux tumeurs<sup>181</sup>. Notre laboratoire a également observé l'expression de Tie2 à la surface des neutrophiles circulants humains<sup>182, 183</sup>. Les CE des vaisseaux sanguins ayant un plus grand diamètre expriment Tie2 de façon plus abondante que les CE tapissant l'intérieur des vaisseaux de petite taille<sup>166, 178</sup>. L'expression de Tie2 est également augmentée durant l'angiogenèse tumorale<sup>184-186</sup>. Suite à la liaison de l'Ang1 au récepteur Tie2, ce dernier subit une dimérisation, suivie par son autophosphorylation et par l'activation de voies de signalisation spécifiques<sup>186, 187</sup>.

L'Ang1 a initialement été caractérisée comme le principal ligand du récepteur Tie2<sup>127</sup>. Même si l'Ang1 et l'Ang2 ont des actions divergentes suite à leur liaison au récepteur Tie2, ils ont néanmoins une affinité (Kd ~3 nM) et un domaine de liaison (première boucle semblable à l'Ig et les répétitions ressemblant à l'EGF) semblables pour ce récepteur<sup>129, 188, 189</sup>. De plus, Tie2 est reconnu comme étant le seul récepteur activé par l'Ang1, mais de récentes évidences suggèrent que Tie1 pourrait aussi être activé par les angiopoïétines<sup>177</sup>.

### **1.3.3.2 Signalisation intracellulaire induite par Tie2**

La migration des CE suite à l'activation du récepteur Tie2 est dépendante de la présence et l'orientation de ce dernier à la surface des CE<sup>190, 191</sup>. Tie2 est exprimé de manière polaire à la surface des CE activées, étant par la suite transloqué à la matrice extracellulaire (MEC) où il lie l'Ang1 qui s'y trouve immobilisée. Suite à la liaison du ligand, les récepteurs tyrosine kinase (RTK) se dissocient en formant normalement des dimères. Étant donné la nature « multimérique » des angiopoïétines, certaines études ont émis l'hypothèse de la formation de multimères par Tie2 suite à

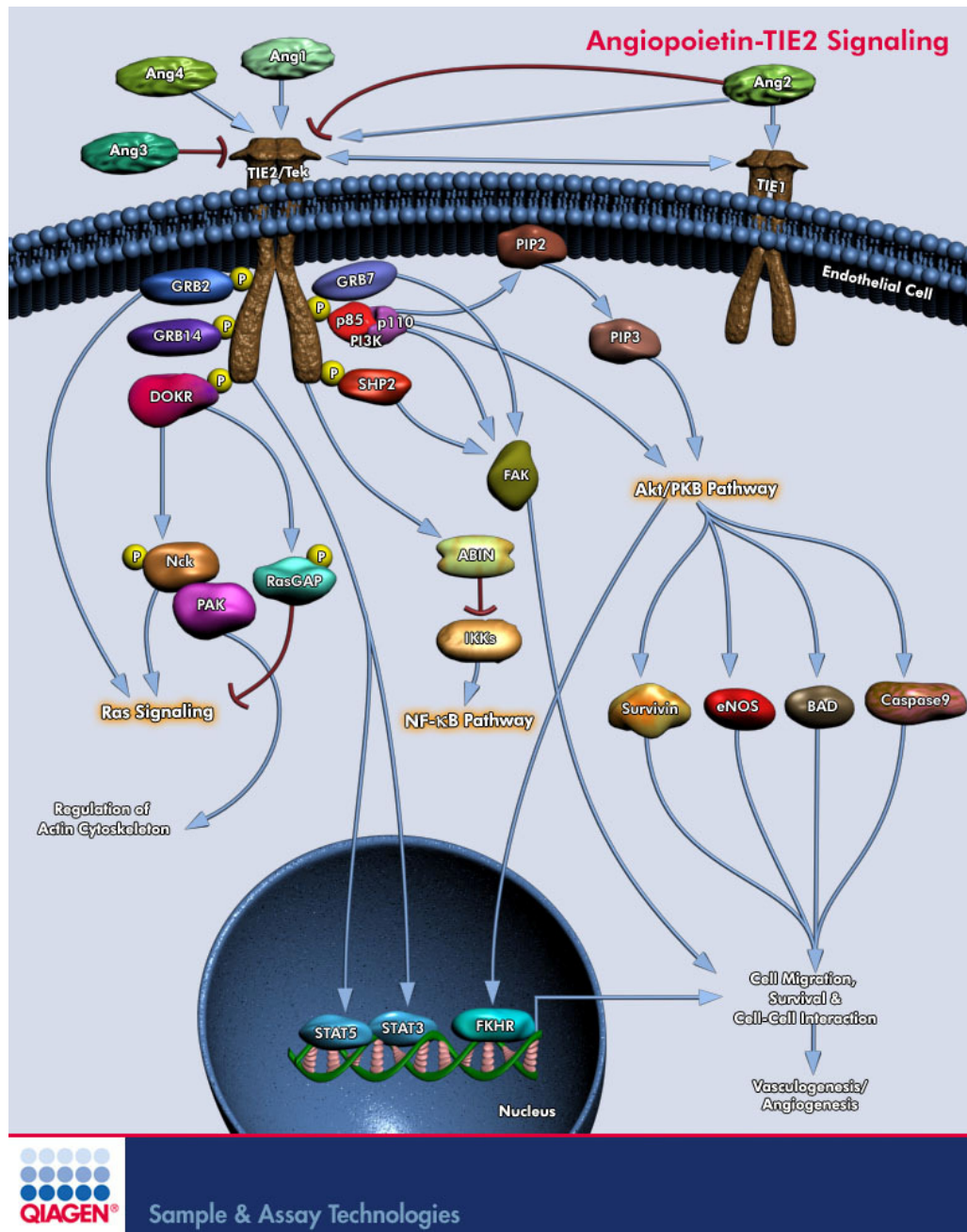
sa liaison par l'Ang1 ou l'Ang2<sup>134, 188</sup>. Comme de fait, le récepteur Tie2 requiert la forme multimérique soit de l'Ang1 ou de l'Ang2 afin que ces dernières se lient au récepteur et induisent son activation par l'autophosphorylation des résidus tyrosine kinase adjacents au domaine carboxyle-terminal<sup>134, 188</sup>.

Suite à l'autophosphorylation des domaines tyrosine kinase (TK) du récepteur Tie2, la protéine *tyrosine kinase-related protein* (Dok-R) est recrutée par le résidu p-Tyr1107 et phosphorylée suite à sa liaison avec ce dernier<sup>192, 193</sup>. Lorsque la Dok-R est activée, elle interagit avec les protéines ras-GAP, Nck et Pak, qui sont impliquées dans la migration et la prolifération cellulaire, ainsi que la réorganisation du cytosquelette et de la cascade de signalisation de la petite GTPase Ras<sup>187</sup>. L'activation de Tie2 induit également la phosphorylation de la *focal adhesion kinase* (FAK)<sup>194</sup>, suivie par la phosphorylation de la paxilline et de la p42/44 MAPK (ERK), qui participent à la régulation de la migration cellulaire<sup>195</sup>. Ainsi, lorsque l'activation de Tie2 est bloquée, la migration induite par l'Ang1 via l'activation de la ERK est aussi inhibée<sup>195</sup>. D'autres effecteurs sont recrutés par Tie2 lors de son activation, dont la protéine eNOS, la phosphatase contenant le domaine SH2 (SHP2), le *growth factor receptor bound-2* (Grb2), le Grb7, le ShcA et la sous-unité p85 $\alpha$  de la PI3K<sup>187, 192, 196</sup>. Ces molécules sont impliquées dans la régulation de la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire, ainsi que de l'apoptose<sup>197, 198</sup>. Le Grb2 et le domaine SHP2 s'associent au Tie2, lorsque ce dernier est phosphorylé, induisant l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire, dont celle des MAPK, qui contrairement au VEGFR2<sup>199</sup>, ne sont pas directement impliquées dans les processus de survie et de migration des CE induits par l'activation de la PI3K<sup>200-202</sup>. La protéine SHP2 n'est pas seulement impliquée dans la transduction du signal, mais peut aussi agir comme un régulateur négatif de la phosphorylation de Tie2<sup>192, 198</sup>. Quant à la sous-unité p85 $\alpha$  de la PI3K, elle interagit avec la protéine tyrosine kinase phosphorylée p-Tyr1101 située au niveau du domaine cytoplasmique de Tie2<sup>198</sup>.

Le VEGF est aussi impliqué dans ces processus, puisque la protéine Src est activée par ce dernier durant le processus angiogénique, menant à l'activation de la protéine *vav*, qui agit comme un facteur d'échange du nucléotide guanine (GEF) pour la protéine Rac. Cette dernière active en retour la *vascular endothelial-cadhérine*

(VE-cadhérine), qui est internalisée par un processus impliquant les vésicules de clathrine<sup>203, 204</sup>. Cet enchaînement fait partie du processus de régulation de la migration cellulaire et de la perméabilité vasculaire. L'activation de Tie2 par l'Ang1 inhibe ces voies de signalisation induites par le VEGF, en activant la protéine mDia. Cette activation mène à l'association de mDia avec Src, induisant la séquestration de ce dernier et ainsi l'empêchant d'induire l'activation et l'internalisation de la VE-cadhérine<sup>205</sup>. L'Ang1 est aussi capable de diminuer la perméabilité cellulaire induite par la thrombine en inhibant l'activation de la PKC $\zeta$ <sup>206</sup>. De plus, l'Ang1 est capable de prévenir la perméabilité vasculaire *in vitro* et *in vivo* en stimulant la sphingosine kinase-1<sup>207</sup>. L'activation de Tie2 induit aussi le recrutement de la protéine *A20-binding inhibitor of NF-kB activation-2* (ABIN-2), responsable de l'inhibition du facteur de transcription NF-kB<sup>208, 209</sup>. L'Ang1 a également la capacité d'induire l'hétérodimérisation de Tie2 avec Tie1<sup>177, 210, 211</sup> et subséquemment le recrutement par Tie2 de la protéine *vascular endothelial protein tyrosine phosphatase* (VE-PTP)<sup>212, 213</sup>. Ce processus induit une augmentation de la survie des CE et maintient l'intégrité de la barrière endothéliale, résultant en une quiescence vasculaire.

Dans les CE quiescentes, le récepteur Tie2 est transloqué aux jonctions cellule-cellule, où il forme des complexes *trans* avec d'autres récepteurs Tie2 localisés à la surface des cellules avoisinantes. Dans ce contexte, Tie2 interagit avec le VE-PTP, une molécule qui régule la fonction de la barrière endothéliale, provoquant la diminution de la perméabilité cellulaire. La liaison de l'Ang1 au récepteur Tie2 mène à la phosphorylation de la sous-unité p85 $\alpha$  de la PI3K. Cette dernière active la protéine Akt, qui phosphoryle et active le facteur de transcription FKHR-1, qui est un puissant inducteur de l'expression de l'Ang2, mais qui inhibe également sa relâche<sup>167, 214-217</sup>. L'activation de l'Akt stimule la phosphorylation des protéines proapoptotiques, incluant la protéine *Bcl-2-associated death protein* (BAD) et la procaspase-9, induisant ainsi leur inactivation<sup>214-218</sup>. De plus, l'Akt induit une augmentation de la protéine *survivin*, un inhibiteur classique de l'apoptose, augmentant ainsi la survie cellulaire<sup>219, 220</sup>.



**Figure 3. Voies de signalisation intracellulaires induites par l'activation de Tie2.** Suite à la phosphorylation du récepteur Tie2 par les angiopoïétines, de nombreuses protéines d'arrimage s'associent au domaine tyrosine kinase de Tie2 et activent des voies de signalisation variées. Ces nombreuses voies peuvent mener à la régulation du cytosquelette d'actine et à l'induction de la motilité, la migration, la différenciation et la survie cellulaire, induisant ultimement la régulation de l'angiogenèse et la vasculogenèse<sup>221, 222</sup>.

<https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=32&>

© 2009 QIAGEN, all rights reserved

### 1.3.4 Rôle des récepteurs Tie dans l'embryogenèse

Les embryons provenant de souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur Tie2 (Tie2<sup>-/-</sup>) décèdent au stade E10.5, notamment à cause d'anomalies sévères dans le remodelage vasculaire du plexus de la vitelline et du cerveau, ainsi que dans la croissance cardiaque. De plus, le nombre de CE observées chez ces souris aux stades E8.5 et 9.5 est de 30% et 75% respectivement plus faible que chez des souris normales. Leurs vaisseaux sanguins sont faiblement organisés, comportent moins d'embranchements et ont une couverture réduite par les péricytes<sup>20, 188, 223, 224</sup>. Le récepteur Tie2 est aussi impliqué dans l'hématopoïèse, puisque la perte fonctionnelle de Tie2 mène à l'apoptose des CE, provoquant ainsi l'apparition d'hémorragies<sup>225, 226</sup>. Ces observations suggèrent que le système Ang/Tie2 joue un rôle clé durant le remodelage vasculaire, ainsi que durant la maturation et la stabilisation du système cardiovasculaire chez l'embryon.

Les souris transgéniques Tie1<sup>-/-</sup> décèdent entre le stade E13.5 et P1 et cette mort prématurée est causée par la perte de l'intégrité structurelle des CE vasculaires, menant à la formation d'œdème sévère et à l'apparition d'hémorragies<sup>180</sup>. Malgré ces effets précoces, l'angiogenèse développementale n'est pas perturbée par l'absence de Tie1. À l'opposé de la souris Tie2<sup>-/-</sup>, l'hématopoïèse se déroule de manière normale chez la souris déficiente en Tie1<sup>227</sup>, suggérant que ce récepteur est important durant la différenciation des CE et la régulation de l'intégrité vasculaire.

Afin d'éclaircir le rôle de chaque récepteur dans le développement vasculaire, un *knockout* double murin (Tie1<sup>-/-</sup> et Tie2<sup>-/-</sup>) a été développé. Ces souris décèdent dans un laps de temps similaire aux souris Tie2<sup>-/-</sup> (stade E10.5), mais les causes de ces décès ne sont pas seulement dues aux défauts cardiovasculaires, mais également aux anomalies du système vasculaire, qui sont sévères malgré une vasculogenèse normale<sup>228</sup>. Cette étude permet ainsi de conclure que les récepteurs Tie1 et Tie2, malgré leurs rôles essentiels dans le maintien de l'intégrité vasculaire, ne sont pas indispensables au bourgeonnement angiogénique précoce<sup>228</sup>.

### 1.3.5 Effets biologiques régulés par Ang1 et Ang2

L'angiopoïétine-1 a été caractérisée comme un agoniste du récepteur Tie2 et ses effets biologiques sont principalement de nature anti-inflammatoire. Ainsi, l'Ang1 a la capacité d'augmenter la survie des CE et également d'inhiber l'activation de l'endothélium via la phosphorylation de Tie2 et l'activation de la PI3K/Akt<sup>194, 220, 229-232</sup>, mais aussi via l'inhibition de l'expression et de la sécrétion de l'Ang2, en bloquant l'activité du facteur de transcription *Forkhead box protein O1* (FOXO1)<sup>233, 234</sup>. De plus, l'Ang1 est capable de réduire l'apoptose chez les HUVEC par l'entremise d'un inhibiteur du facteur de transcription NF-κB, soit le *A20-binding inhibitor of NF-kappa-B activation-2* (ABIN-2)<sup>235</sup>.

L'Ang1 induit la migration et le bourgeonnement des CE de manière Tie2-dépendante<sup>194, 219, 236-238</sup> mais aussi de façon Tie2-indépendante, par l'entremise de l'activation de l'intégrine  $\alpha 5$ <sup>239</sup>. Selon certaines études, l'Ang1 a la capacité d'induire la prolifération des CE<sup>237, 240</sup>, alors que d'autres groupes de recherche ont été incapables de démontrer cette capacité de l'Ang1<sup>127, 200, 238</sup>.

L'Ang1 joue également un rôle dans la régulation des liaisons cellule-cellule et matrice-cellule<sup>239, 241-243</sup>. Les jonctions serrées des CE sont principalement composées de complexes formés par la VE-cadhérine. Ces complexes peuvent être séparés par l'action du VEGF, résultant en une augmentation de la perméabilité cellulaire<sup>244, 245</sup>, qui peut être antagonisée par l'action de l'Ang1<sup>205, 246</sup>. Lorsque l'Ang1 est présente en faible concentration, les intégrines et le récepteur Tie2 peuvent coopérer afin de stabiliser les CE<sup>247</sup>. L'Ang1 peut induire la translocation de Tie2 aux contacts cellule-cellule, qui va ultérieurement former des ponts intercellulaires Tie2-Tie2, et également activer les voies de signalisation menant à une diminution de la perméabilité vasculaire<sup>191</sup>. En conditions inflammatoires, l'Ang1 est aussi capable de diminuer la perméabilité des veinules en restreignant le nombre et la dimension des espaces formés aux interstices des CE<sup>248-250</sup>. De plus, l'Ang1 réduit l'exsudation vasculaire en fortifiant l'adhésion entre les CE, qui est régulée par la PECAM-1 et la VE-cadhérine<sup>251</sup>. L'Ang1 peut également inhiber la perméabilité vasculaire induite par le VEGF<sup>250</sup>, ce qui mène à l'abolition de l'inflammation induite par le VEGF<sup>251, 252</sup>. Tous ces effets sur la perméabilité vasculaire induits par l'Ang1 lui confèrent un



rôle dans la protection contre l'artériosclérose cardiaque de l'allogreffe et contre les dommages aux CE induits par les radiations, ainsi que dans la guérison de blessures<sup>208, 235, 250, 251, 253-255</sup>.

L'Ang1 est impliquée dans la régulation de l'adhérence de l'endothélium, puisque cette dernière a la capacité d'inhiber l'adhésion des leucocytes aux CE en bloquant l'expression des molécules d'adhésion endothéliales VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine<sup>201, 251, 256, 257</sup>. Dans un modèle *in vivo*, notamment chez la souris n'exprimant pas le gène de l'Ang2 (Ang2<sup>-/-</sup>), les leucocytes interagissent avec l'endothélium activé pendant la phase de roulement à sa surface, mais ne peuvent pas y adhérer afin de migrer plus tard dans les tissus grâce à l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion mentionnées ci-dessus par l'Ang1<sup>258</sup>. De plus, l'Ang1 a également la capacité d'inhiber l'expression des molécules d'adhésion endothéliales ainsi que la formation de vaisseaux sanguins induits par le VEGF, ce qui confère à l'Ang1 un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie vasculaire<sup>15, 256</sup>. Les effets biologiques engendrés par l'Ang1 protègent les vaisseaux sanguins contre les dommages qu'ils pourraient subir lors de l'inflammation.

L'Ang2 provoque d'une manière autocrine la déstabilisation de l'endothélium quiescent<sup>154, 259</sup>. Ainsi, l'Ang2 a la capacité d'induire l'apoptose des CE via le recrutement des macrophages<sup>260, 261</sup>, ce qui mène à la régression vasculaire, s'opposant ainsi aux signaux anti-apoptotiques induits par l'Ang1<sup>262</sup>. De plus, l'Ang2 a la capacité de remodeler la vascularisation en induisant le processus inflammatoire<sup>263, 264</sup>. Ainsi, cette réponse inflammatoire active l'endothélium en augmentant la perméabilité vasculaire<sup>183, 265</sup> et en augmentant la susceptibilité de l'endothélium à son activation par les cytokines inflammatoires<sup>258, 259</sup>. La stimulation à long terme des CE avec l'Ang2 active la signalisation de la PI3K/Akt et promeut la survie, le bourgeonnement et la migration des CE<sup>151, 153, 266, 267</sup>. De plus, la surexpression de l'Ang2 *in vivo* induit la guérison des blessures et protège contre la vasculopathie cardiaque de l'allogreffe<sup>253, 268</sup>.

Les souris transgéniques Ang2<sup>-/-</sup> sont incapables d'induire une réponse inflammatoire suite à une péritonite provoquée de manière artificielle ou suite à une invasion de staphylocoques, mais ils retrouvent leurs capacités inflammatoires lors

d'une inoculation aux pneumocoques, suggérant une disparité dans l'implication de l'Ang2 dans les réactions inflammatoires basée sur la nature de l'agent provoquant la réaction inflammatoire<sup>258</sup>. L'Ang2 a également la capacité de sensibiliser les CE au TNF- $\alpha$ , augmentant ainsi l'expression des molécules d'adhésion dont l'ICAM-1, le VCAM-1 et la E-sélectine<sup>258, 269, 270</sup>.

Dans la vascularisation mature, l'Ang1 agit de façon paracrine afin de maintenir un *statu quo* de la quiescence vasculaire, alors que l'Ang2 induit et/ou facilite la réponse autocrine des CE à l'inflammation<sup>259, 269, 271</sup>. Cependant, lors de circonstances bien définies, l'Ang1 et l'Ang2 sont capables d'induire les mêmes activités biologiques, principalement via la phosphorylation de leur récepteur Tie2. Ainsi, lorsque Tie2 est exprimé à la surface des cellules non endothéliales<sup>129</sup> ou lors d'une stimulation des CE avec une grande concentration d'Ang2<sup>151</sup>, cette dernière est capable d'induire la phosphorylation du récepteur Tie2. De plus, l'Ang2 peut induire la formation de structures vasculaires tubulaires dans un caillot de fibrine, la phosphorylation de Tie2 lors des temps de stimulation prolongés<sup>153</sup>, ainsi que la chimiotaxie et la formation de structures tubulaires formées à partir de CE baignant dans des gels de collagène<sup>267</sup>. La stimulation des CE avec l'Ang1 ou l'Ang2 induit l'expression de la MMP-9<sup>272</sup>, alors que la présence de l'Ang2 seule est capable de stimuler la migration et le bourgeonnement des CE cultivées sous forme de sphéroïdes tridimensionnels<sup>266</sup>.

Lors d'études effectuées dans notre laboratoire, nous avons démontré la capacité de l'Ang1 et de l'Ang2 à induire la synthèse du *platelet-activating factor* (PAF) dans les CE, qui a la capacité d'induire une réponse inflammatoire<sup>273</sup>. De plus, l'Ang1 et l'Ang2 ont également la capacité d'induire la translocation de la P-sélectine à la surface des CE<sup>274</sup>, la migration des neutrophiles ainsi que leur adhésion aux CE, en plus de potentialiser ces activités biologiques lorsque induites par la stimulation avec l'IL-8<sup>182, 183, 275</sup>.

L'Ang2 induit la migration des monocytes exprimant le récepteur Tie2 (*monocytes expressing Tie2; MET*) *in vitro* via l'activation de ce même récepteur<sup>276, 277</sup>. Étant donné que l'expression de l'Ang2 est augmentée dans les vaisseaux sanguins tumoraux, cette dernière pourrait recruter les MET à l'intérieur des tumeurs

par le processus de chimiotaxie<sup>139</sup>. Cette hypothèse pourrait expliquer la raison pour laquelle les MET sont retrouvés en grappes autour des vaisseaux angiogéniques dans certains modèles tumoraux<sup>181</sup>. L'Ang2 module également la sécrétion des cytokines par les MET, en inhibant leur relâche de TNF- $\alpha$ , qui est reconnu pour induire l'apoptose des CE et tumorales<sup>278</sup>. La diminution de l'expression du TNF- $\alpha$  suite à une augmentation de l'expression de l'Ang2 pourrait induire l'augmentation de la survie des CE et tumorales, activant ainsi le processus angiogénique et la formation de métastases. De plus, en conditions hypoxiques, l'Ang2 inhibe l'expression de l'IL-12, une cytokine ayant des propriétés anti-angiogéniques<sup>276</sup>.

D'autre part, des études effectuées dans notre laboratoire ont permis de démontrer l'expression du récepteur Tie2 à la surface des neutrophiles humains. Ainsi, nous avons observé qu'une stimulation des neutrophiles avec l'Ang1 ou l'Ang2 induit la synthèse du PAF, la translocation et l'activation de la  $\beta$ 2-intégrine (CD18), ainsi que l'adhésion des neutrophiles à la MEC<sup>183</sup>. De plus, nous avons récemment démontré que l'Ang1 mais pas l'Ang2 augmente la survie des neutrophiles via un mécanisme dépendant de la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles<sup>279</sup>.

### 1.3.6 Les angiopoïétines et l'angiogenèse physiologique

La liaison de l'Ang1 au récepteur Tie2 induit la phosphorylation de ce dernier, ce qui provoque l'activation de signaux en faveur de la survie des CE<sup>187, 220</sup>. L'Ang1 est impliquée dans le bourgeonnement vasculaire, étant donné que sa surexpression chez la souris induit une augmentation de la densité et de l'embranchement des vaisseaux sanguins<sup>280</sup>. Des études *in vitro* ont confirmé cette caractéristique de l'Ang1, démontrant, de plus, sa capacité à induire la migration des CE<sup>237, 281, 282</sup>. Après l'étape du bourgeonnement vasculaire, seule la présence de l'Ang1 permet la stabilisation des nouveaux vaisseaux sanguins, en renforçant l'interaction des CE avec les péricytes ou les CML, tel que démontré *in vivo* dans un modèle de souris transgénique Ang1<sup>-/-</sup> chez lequel une diminution de l'interaction des CE avec les cellules de support est observée<sup>20</sup>. À l'âge adulte, la liaison Ang1/Tie2 est constitutive et essentielle au maintien de la quiescence vasculaire<sup>186, 190, 191</sup>.

L'angiopoïétine-2 joue un rôle diamétralement opposé à l'Ang1 dans le processus angiogénique, puisque sa liaison avec le récepteur Tie2 inhibe la phosphorylation de ce dernier, ce qui entraîne une diminution de l'interaction des CE avec les cellules de support, tel que démontré par l'utilisation de souris transgéniques surexprimant l'Ang2<sup>129, 283</sup>. Des études *in vitro* ont démontré que la surexpression de l'Ang2 provoque la déstabilisation de l'interaction entre la monocouche de CE et celle des CML<sup>154</sup>. Grâce à sa fonction de déstabilisation des vaisseaux sanguins, l'Ang2 joue un rôle primordial dans l'initiation du bourgeonnement vasculaire mais également dans la régression vasculaire<sup>141, 284, 285</sup>.

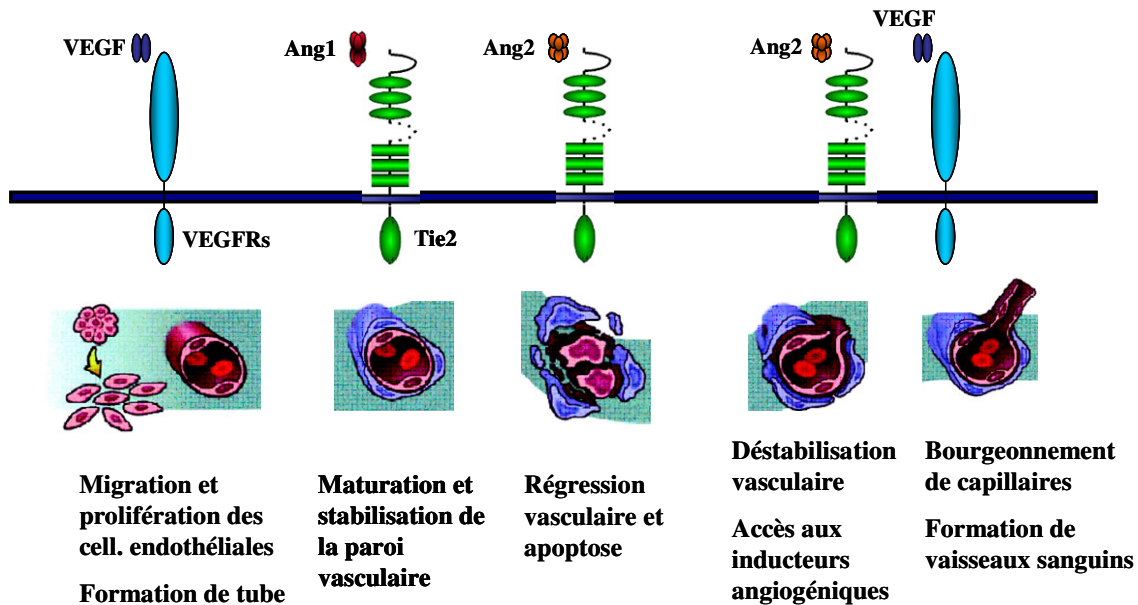
L'importance de l'activation du récepteur Tie2 par l'Ang1 a été mise en évidence avec la création de souris transgéniques Ang1<sup>-/-</sup> et Tie2<sup>-/-</sup>. Les embryons de ces souris présentent un développement vasculaire aberrant et décèdent au stade embryonnaire E11 à cause d'un faible remodelage du plexus vasculaire primaire provoqué par un manque d'interaction entre les CE et les cellules de support<sup>20, 180, 286</sup>. La surexpression ciblée du gène de l'Ang1 dans la peau de souris induit un phénomène qui contrairement à sa délétion, est caractérisé par la présence de vaisseaux sanguins plus larges et des branchements vasculaires plus nombreux, qui sont également résistants à l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF<sup>280</sup>.

Le système Ang/Tie2 joue donc un rôle important dans la régulation de l'interaction entre les CE et les cellules de support (péricytes/CML), étant donné que le remodelage vasculaire lors du processus angiogénique à l'âge adulte requiert un détachement progressif des CE à partir des cellules de support environnantes qui peut mener au bourgeonnement ou à la régression vasculaire. Le détachement progressif des CE requiert la présence de l'Ang2 qui empêche la stabilisation vasculaire induite par l'Ang1, tel que démontré par la découverte de l'expression distincte de l'Ang2 aux sites actifs de remodelage vasculaire et dans les tumeurs hyper-vascularisées<sup>129, 137, 287</sup>. De plus, la surexpression de l'Ang2 induite dans les CE de l'embryon crée un phénotype similaire à la délétion du gène de Tie2, ce qui confirme le rôle antagoniste de l'Ang2 dans l'angiogenèse<sup>129</sup>. Malgré le fait que l'Ang2 joue un rôle important dans l'angiogenèse, la délétion de son gène chez la souris induit un phénotype vivant,

présentant des défauts d'une sévérité moindre que le phénotype engendré par la souris transgénique  $Ang1^{-/}$ , ce qui démontre que l'Ang2 n'a pas de fonctions redondantes avec l'Ang1<sup>136</sup>. L'expression de l'Ang2 est augmentée de manière sélective dans les vaisseaux tumoraux, et ce, avant que le VEGF soit exprimé dans la tumeur, induisant ainsi le processus de néovascularisation en synergie avec le VEGF. L'Ang2 pourrait donc agir comme un antagoniste dans les environnements particuliers comme lors du remodelage vasculaire post-natal ou de l'angiogenèse pathologique<sup>136, 287</sup>.

Les nouveaux vaisseaux sanguins perdent le contact entre les CE et les CML voisines ainsi que leur intégrité vasculaire, lorsqu'ils sont encore au stade de bourgeonnement, en réponse à la présence de l'Ang2 dans leur environnement immédiat. Cet état de « plasticité », qui permet à l'endothélium de répondre activement aux signaux engendrés par les facteurs angiogéniques comme le VEGF, est différent de l'état quiescent de l'endothélium retrouvé dans les vaisseaux sanguins matures couverts par les CML, qui sont moins sensibles aux signaux du VEGF<sup>266, 288</sup>. Un exemple démontrant la notion de plasticité vasculaire est illustré par la capacité de l'Ang2 à promouvoir le bourgeonnement vasculaire en présence du VEGF, contrairement à sa capacité de rapidement induire la régression vasculaire en son absence<sup>287, 289</sup>. La phase de plasticité vasculaire pourrait permettre une fine modulation du nombre et de la grosseur des nouveaux vaisseaux requis par le VEGF et le PDGF-B, afin de favoriser leur adaptation au nouveau microenvironnement, étant donné que les CE sont plus enclines à l'apoptose pendant cette période<sup>290, 291</sup>. La régulation des CE par l'Ang1 durant cette phase d'instabilité vasculaire pourrait être effectuée grâce à son effet anti-apoptotique, ce qui conférerait à l'Ang1 un rôle indirect sur la maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins.

L'effet positif sur la survie des CE engendré par l'Ang1 seule ou en synergie avec le VEGF protège ces dernières contre leur entrée en apoptose<sup>231, 232, 282, 292-294</sup>. L'activation de la PI3K/Akt par l'Ang1 ainsi que l'attachement des CE à la MEC sont deux éléments primordiaux influençant la survie de ces dernières. De plus, les anomalies observées dans la couche de CE tapissant l'intérieur des vaisseaux sanguins chez les souris transgéniques  $Ang1^{-/}$  et  $Tie2^{-/}$  seraient dues à la diminution



Adaptée de Fam *et coll.* *Circulation*. 2003; 108: 2613-2618.

#### Figure 4. Implication des angiopoïétines dans la vasculogénèse et l'angiogénèse.

Le processus de vasculogénèse est caractérisé par la formation de tubes capillaires par l'entremise de la migration et la prolifération des CE induites par le VEGF<sup>2</sup>. Ces capillaires se transforment progressivement en vaisseaux sanguins de plus grand calibre en recrutant des péricytes et des CML (maturation de la paroi vasculaire) via l'activation du récepteur Tie2 par l'Ang1, et ce, de concert avec le VEGF<sup>20</sup>. L'Ang2 provoque la déstabilisation vasculaire afin de préparer les vaisseaux sanguins au processus angiogénique<sup>295, 296</sup>. En absence du VEGF, l'Ang2 provoque le désarrimage des cellules de support vasculaires, ainsi que la mort des CE par apoptose, résultant en une régression vasculaire, alors qu'en présence du VEGF, le processus angiogénique se poursuit et le bourgeonnement de nouveaux capillaires peut ainsi avoir lieu<sup>297</sup>.

de la survie des CE, plutôt qu'à l'induction de la maturation vasculaire<sup>215, 225</sup>. En effet, les CE manquant le récepteur Tie2 à leur surface entrent en apoptose malgré le recrutement continu des cellules péri-vasculaires par les nouveaux vaisseaux sanguins<sup>225, 228</sup>. De plus, malgré la surexpression de l'Ang1 au niveau de la peau et des poumons, le recrutement des cellules de support aux néovaisseaux n'a pas été augmenté<sup>280, 298, 299</sup>. En comparaison, les vaisseaux sanguins dilatés bénéficiant d'une faible couverture en péricytes observés dans les malformations veineuses associées avec la surexpression du récepteur Tie2 n'ont pas atteint la maturation vasculaire habituellement associée avec l'expression de l'Ang1<sup>300</sup>. De plus, l'inhibition fonctionnelle du récepteur Tie2 dans la rétine n'a pas influencé le recrutement des péricytes<sup>299</sup>, même que l'Ang1 a été capable de restaurer la hiérarchie du réseau vasculaire en plus de diminuer l'œdème et l'hémorragie de la rétine provoquées par l'absence de couverture par les CML<sup>301</sup>.

### 1.3.7 Les angiopoïétines et l'angiogenèse tumorale

#### 1.3.7.1 Rôle de l'Ang1 dans le développement vasculaire tumoral

L'angiopoïétine-1 est essentielle à la formation de réseaux vasculaires plus complexes lors de l'angiogenèse dans le cadre du développement physiologique<sup>20</sup>. De plus, l'Ang1 a la capacité d'induire l'angiogenèse dans les tissus ischémiques de façon robuste suite à sa surexpression résultant d'une transfection *in vitro* avec son gène<sup>18, 302, 303</sup>. Cependant, d'autres études ont démontré que l'Ang1 peut également diminuer l'angiogenèse pathologique grâce à son effet bénéfique sur la maturation vasculaire<sup>282, 304, 305</sup>. Ces observations contradictoires compliquent la compréhension du rôle que l'Ang1 peut jouer dans le développement tumoral, mais également pour le développement de nouvelles stratégies et cibles thérapeutiques contre le cancer.

L'angiogenèse tumorale est un processus essentiel à l'agrandissement des tumeurs solides, puisqu'au début de leur croissance ces tumeurs sont souvent dépourvues de vaisseaux sanguins et incapables de croître au-delà d'une certaine taille, n'ayant pas l'apport en nutriments et en oxygène nécessaires à leur survie<sup>74, 306, 307</sup>. La croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse qui initie le

bourgeoisement vasculaire à partir des vaisseaux sanguins situés dans les tissus environnants, en sécrétant des facteurs de croissance spécifiques pour les CE, tels l'Ang1 et le VEGF, à partir des cellules tumorales<sup>287</sup>. Lors de l'étape du développement, la majorité des CE expriment le récepteur Tie2 à leur surface, cette expression augmentant durant les processus d'angiogenèse physiologique ou pathologique chez l'adulte<sup>180, 286</sup>. De nombreuses études ont observé l'expression différentielle des deux angiopoïétines et de leur récepteur Tie2 dans les tumeurs, ainsi que l'apparition d'un phénotype anormal des vaisseaux sanguins tumoraux caractérisé par des changements d'assemblage et de composition qui mènent à l'augmentation de leur perméabilité<sup>308, 309</sup>. Cependant, jusqu'à présent, les études sont contradictoires, démontrant à la fois des activités tant pro- qu'anti-angiogéniques des angiopoïétines dans le développement tumoral.

La hausse de l'expression de l'Ang1 observée dans certains types de cancer, tels les gliomes de haut grade<sup>111, 310</sup>, les carcinomes non à petites cellules du poumon<sup>185</sup>, les plasmocytomes<sup>311</sup>, ainsi que les cancers de l'ovaire<sup>312</sup>, du sein<sup>313, 314</sup> et gastrique<sup>315</sup> a été fortement corrélée avec le degré de malignité de la tumeur. De plus, la surexpression de l'Ang1 dans certains types cellulaires (HeLa, GS9L, U87, U373 et U343), augmente la croissance tumorale de façon significative<sup>316-318</sup>. Toutefois, la surexpression de l'Ang1 a eu des effets anti-tumoraux significatifs dans plusieurs lignées cellulaires tumorales, telles que la lignée tumorale mammaire MCF-7<sup>319</sup>, la lignée de l'adénocarcinome de l'épithélium colique HT29<sup>305, 320</sup>, la lignée provenant des tumeurs d'ascites (TA3)<sup>321</sup>, la lignée tumorale des cellules squameuses (A431)<sup>304</sup> ainsi que dans le carcinome du poumon de Lewis<sup>321</sup>. L'effet négatif sur la croissance tumorale de l'Ang1 a notamment été attribué à sa capacité de recruter les cellules de support vasculaires, diminuant par le fait même l'expansion du réseau vasculaire tumoral. Les effets contradictoires de l'Ang1 sur la croissance tumorale pourraient s'expliquer par l'expression différentielle de certains facteurs de croissance dans les tumeurs analysées. Toutefois, même si les effets de l'Ang1 sur la croissance tumorale n'ont pas encore été complètement élucidés, l'observation la plus fréquente est l'amélioration de l'architecture vasculaire due à une plus grande couverture de



péricytes/CML, ce qui favorise la stabilité des vaisseaux sanguins et bloque par le fait même l'initiation du processus angiogénique<sup>322</sup>.

### **1.3.7.2 Rôle de l'Ang2 dans le développement vasculaire tumoral**

Dans le processus angiogénique, l'Ang2 est caractérisée par son ambivalence quant à son action sur le récepteur Tie2, étant capable d'agir soit comme agoniste ou antagoniste de ce même récepteur<sup>151, 153, 238</sup>. L'expression de l'Ang2 est finement modulée au niveau de la transcription, étant augmentée dans les CE localisées dans un environnement proangiogénique, tel que dans les sites tumoraux<sup>137, 287, 323</sup>. L'Ang2 est reconnue pour son rôle dans l'initiation du bourgeonnement vasculaire et ce, en induisant la déstabilisation vasculaire par le détachement progressif des péricytes. Cet effet a été observé dans les vaisseaux sanguins tumoraux lorsque l'expression de l'Ang2 est fortement augmentée<sup>142, 145, 320, 321, 324-327</sup>. De plus, la présence de l'Ang2 au niveau des tumeurs associée à une augmentation des métastases à l'intérieur des nœuds lymphatiques va de pair avec un faible pronostic de rémission, ce qui permet de considérer de façon importante l'Ang2 comme cible thérapeutique de choix pour le traitement de ces types de cancers<sup>325, 326, 328, 329</sup>. Des études ont également démontré que lors d'un déséquilibre de l'expression de l'Ang1 en faveur de l'Ang2 dans les tumeurs, ceci mène ultimement à l'instabilité des vaisseaux sanguins, les rendant malformés et non fonctionnels<sup>327, 330</sup>. Ainsi, lorsque l'Ang2 est surexprimée dans les carcinomes mammaires et pulmonaires ou son expression est induite dans certains types de gliomes, un retard dans le développement de la tumeur et la formation des métastases est observé<sup>316, 321</sup>. Cependant, lorsque l'Ang2 est surexprimée dans les carcinomes colorectaux et gastriques, ainsi que dans les hépatomes et d'autres types de gliomes, une augmentation de l'angiogenèse est observée, augmentant ainsi la malignité de ces tumeurs<sup>142, 287, 320, 325, 331</sup>. De plus, une corrélation positive entre l'Ang2 et l'Ang1 est associée à une augmentation de l'agressivité de la croissance tumorale dans de nombreux cancers, comme dans les neuroblastomes<sup>332</sup>, les gliomes<sup>310, 333</sup>, les carcinomes hépatocellulaires, mammaires, pulmonaires et non à petites cellules du poumon<sup>143, 334-336</sup>, ainsi que les adénocarcinomes gastriques<sup>337</sup>.

### 1.3.7.3 Régulation de l'homéostasie vasculaire tumorale par le récepteur Tie2 et les intégrines

La découverte de l'expression du récepteur Tie2 à la surface des cellules de différents types de tumeurs<sup>313, 317, 338-340</sup> a augmenté le niveau de complexité quant au rôle des angiopoïétines dans le développement tumoral. Les mécanismes activés par les angiopoïétines qui modulent à la fois le remodelage, la régression ou l'intégrité vasculaire dans le développement tumoral, n'ont pas encore été parfaitement élucidés. Il est clairement établi que le réseau vasculaire tumoral est très perméable, toutefois seulement quelques études ont mis l'emphase sur les mécanismes intracellulaires régulant cette hyperperméabilité<sup>308, 341, 342</sup>. L'Ang1 a la capacité de diminuer la perméabilité vasculaire alors que l'Ang2 est capable, au contraire, de l'augmenter au niveau des tumeurs, mais les deux angiopoïétines ont une influence, bien qu'opposée, sur les mêmes mécanismes, soit les interactions cellule-cellule et la stabilité des protéines de la jonction cellulaire<sup>154, 251</sup>. Récemment, deux études ont démontré que l'activation du récepteur Tie2 par sa liaison à l'Ang1 active des voies de signalisation différentes selon la présence ou l'absence de contacts cellule-cellule, ce qui influence l'emplacement du récepteur Tie2 ainsi que l'environnement dans lequel il lie son agoniste, l'Ang1<sup>190, 191</sup>. De plus, un autre groupe de recherche a étudié les changements sur la morphologie vasculaire tumorale dans deux modèles murins de carcinome mammaire ayant des profils Ang/Tie2 distincts, suite à la surexpression de chacune des angiopoïétines, indépendamment de sa contrepartie. Le complexe Ang1/Tie2 est essentiel à l'organisation et à la stabilité vasculaire de la tumeur, alors que l'activité du complexe Ang2/Tie2 va à l'encontre du phénotype vasculaire tumoral engendré par l'Ang1<sup>327</sup>. La dynamique des contacts entre les CE est aussi modulée de manière opposée par l'Ang1 et l'Ang2. De plus, il est bien connu que le VEGF régule cette dynamique des contacts cellule-cellule en dissociant la  $\beta$ -caténine des VE-cadhérines<sup>246</sup>. Ainsi, l'expression de l'Ang1 dans la tumeur couplée à sa liaison au récepteur Tie2 va contrecarrer l'internalisation de la VE-cadhérine induite par le VEGF, restaurant ainsi la barrière endothéliale<sup>205</sup>.

L'Ang1 et l'Ang2 peuvent également induire des activités biologiques indépendamment de leur liaison au récepteur Tie2, en formant des complexes avec les intégrines. Ainsi, l'activation des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 5$  suite à un traitement avec l'Ang1 ou l'Ang2 peut induire tant la migration que la prolifération des CE<sup>239</sup>. La liaison de l'Ang1 avec les intégrines influence l'activité d'autres types cellulaires, étant notamment capable d'induire la survie des myocytes et moduler les structures neuronales<sup>241, 343</sup>. L'expression des intégrines à la surface des cellules tumorales pourrait apporter un autre niveau de complexité quant à la modulation de la croissance tumorale induite par les deux angiopoïétines, qui serait indépendante des effets suite à leur liaison avec le récepteur Tie2. Les récepteurs du VEGF sont également exprimés à la membrane des cellules tumorales, cependant leur implication dans l'angiogenèse tumorale reste indéfinie<sup>344</sup>. De plus, le VEGF possède aussi la capacité de lier et d'activer les intégrines à la surface des cellules endothéliales et tumorales et promouvoir ainsi l'angiogenèse tumorale<sup>345, 346</sup>.

### **1.3.8 Les implications thérapeutiques des angiopoïétines**

La famille des angiopoïétines et le récepteur Tie2 sont des cibles privilégiées dans le développement de nouvelles thérapies contre le cancer, notamment à cause de leurs implications dans l'angiogenèse et l'homéostasie vasculaire, mais également par leur capacité de modulation de l'inflammation, qui établit un lien très étroit avec l'angiogenèse. De nombreux agents pharmacologiques ciblant cette famille de cytokines sont présentement en cours de développement et démontrent, dans plusieurs études cliniques, des résultats encourageants, ainsi que des profils de toxicité différents des autres études impliquant des molécules anti-VEGF-A<sup>347</sup>.

De nombreuses études impliquant des souris transgéniques ciblant l'Ang1, l'Ang2 ou le récepteur Tie2 ont engendré des résultats pouvant évoquer la possibilité de nouvelles avenues thérapeutiques contre le cancer en utilisant les membres de la famille des angiopoïétines. Les nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer sont testées au stade préclinique, en utilisant des modèles murins d'angiogenèse. Ces essais précliniques étudient les effets de la neutralisation de l'interaction Ang2-Tie2, mais également ceux de la surexpression de l'Ang2 sur l'inhibition de l'angiogenèse

et de la croissance tumorale<sup>144, 324</sup>. De plus, lorsque la balance de l'expression entre l'Ang1 et l'Ang2 est altérée vers une diminution de l'expression de l'Ang2, celle-ci va favoriser une hausse du niveau d'expression de l'Ang1, ce qui pourrait induire une augmentation de la largeur des vaisseaux sanguins tumoraux, résultant en une hausse de la dispersion des cellules cancéreuses et de la formation de métastases, ce qui éclipserait le bénéfice thérapeutique<sup>348</sup>. La concentration de l'Ang1 utilisée au niveau de la tumeur influence grandement le résultat net de l'angiogenèse, devenant ainsi d'une importance primordiale pour le développement de futures thérapies. Les thérapies anti-cancer utilisant les membres de la famille des angiopoïétines nouvellement étudiées en phase clinique ciblent soit le récepteur Tie2 (inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase) ou les angiopoïétines (surexpression systémique ou inhibition par piège moléculaire).

#### **1.3.8.1 Les inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase ciblant Tie2**

Étant donné que la majorité des voies de signalisation activées par le récepteur Tie2 sont conséquentes à sa liaison avec l'Ang1, les inhibiteurs de tyrosine-kinase spécifiques contre ce récepteur pourraient représenter l'équivalent pharmacologique d'un piège moléculaire sélectif contre l'Ang1. Jusqu'à présent, il n'existe pas à ma connaissance un type de tumeur qui serait exclusivement dépendant de l'activation du récepteur Tie2 pour sa progression et donc, la justification clinique de l'usage d'un tel inhibiteur reste à valider. Des nombreuses études qui ont testé une panoplie d'inhibiteurs de tyrosine-kinase sélectifs pour le récepteur Tie2, seulement un nombre restreint a été assez efficaces pour être étudiés au stade clinique. Le CE-245677, un inhibiteur sélectif du récepteur Tie2 et du récepteur tyrosine kinase A (TRKA) utilisé dans une étude clinique de phase I, a été discontinué après que des effets secondaires majeurs ont été observés, possiblement associés à l'inhibition du TRKA<sup>349</sup>. Une étude clinique de phase I portant sur l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur Tie2 et des récepteurs du VEGF, le CEP-11981, est actuellement en cours. La présente étude a pour but de déterminer la dose maximale tolérée chez les patients ayant développé des tumeurs solides au stade avancé (Essai clinique #NCT00875264, États-Unis).

### 1.3.8.2 Les pièges moléculaires contre les angiopoïétines

Le système Ang-Tie possède une caractéristique unique parmi les familles des RTK, étant donné qu'il possède un récepteur ayant deux ligands qui ont la capacité d'agir soit en tant qu'agoniste ou antagoniste du récepteur Tie2. De plus, l'Ang1 et l'Ang2 peuvent induire des activités biologiques différentes dépendamment de l'environnement dans lequel ils sont exprimés. Malgré sa complexité, ce système peut fournir une cible unique pour la modulation du microenvironnement tumoral, ainsi que des nombreux processus impliqués dans la croissance tumorale.

L'Ang1 joue un rôle crucial dans le maintien de la stabilité vasculaire, empêchant ainsi le développement de l'inflammation. L'Ang1 a la capacité d'induire la stabilisation des vaisseaux sanguins tumoraux, mais ce phénomène pourrait être autant bénéfique que néfaste pour la croissance tumorale lorsque les vaisseaux sanguins sont préexistants ou en phase de croissance. La surexpression de l'Ang1 par transfection stable dans des lignées cellulaires tumorales (MCF-7, HT-29, A431) a inhibé la croissance tumorale suite à l'augmentation de la couverture en péricytes des vaisseaux sanguins tumoraux<sup>304, 305, 319, 350</sup>. Cependant, lorsque l'Ang1 a été administrée de façon systémique dans un modèle murin ayant des cellules tumorales du poumon sous-cutané, la formation de métastases aux poumons, ainsi qu'un élargissement significatif des vaisseaux sanguins tumoraux ont été observés, sans toutefois affecter la densité de ces vaisseaux<sup>348</sup>. L'Ang1 peut moduler de façon différente les CE dépendamment de leur état soit quiescent ou de migration et de prolifération, expliquant ainsi l'induction de la prolifération de CE isolées et la création des foyers métastatiques suite à sa surexpression systémique dans ce modèle murin<sup>190, 191, 351</sup>. Les observations faites durant ces études font en sorte que l'administration de l'Ang1 de manière systémique ne peut encore être considérée pour le développement d'une thérapie anti-tumorale, puisque ce type d'administration pourrait induire des métastases, malgré une augmentation de la stabilisation vasculaire et du potentiel d'inhibition de la croissance tumorale.

## 1.4 L'inflammation et l'angiogénèse

Les vaisseaux sanguins doivent constamment s'accommoder afin de répondre aux besoins en nutriments et oxygène des tissus environnants. Cette adaptation est nécessaire tant lors de processus physiologiques, tels la réparation tissulaire suivant une blessure ou le remodelage musculaire pendant l'exercice physique, que lors des pathologies, telles la croissance tumorale ou l'athérosclérose<sup>352, 353</sup>. Ces événements requièrent une modulation subtile du remodelage de la paroi vasculaire, qui mène à l'induction de l'angiogénèse dans les lits vasculaires concernés. L'angiogénèse est souvent précédée par le processus inflammatoire, qui induit le remodelage de la MEC et l'infiltration des leucocytes au site angiogénique<sup>353</sup>.

### 1.4.1 La réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est la réaction biologique rapide des vaisseaux sanguins suite à la perte de l'intégrité des tissus causée par des lésions physiques, chimiques ou organiques. Cette réaction débute par l'inflammation aiguë, qui peut soit éliminer l'agent pathogène et se résorber au bout de quelques heures/jours (guérison) ou bien se prolonger au-delà de quelques jours/mois/années et provoquer la destruction tissulaire, devenant ainsi de l'inflammation chronique, qui est par définition un dérèglement de l'inflammation aiguë.

#### 1.4.1.1 L'inflammation aiguë

Les principaux éléments déclencheurs de la réponse inflammatoire aiguë sont les infections, les lésions tissulaires ou bien le stress et la dysfonction tissulaire. L'inflammation aiguë joue un rôle bénéfique, étant impliquée dans la défense contre l'invasion de pathogènes et la réparation tissulaire, en plus de promouvoir un retour à l'homéostasie vasculaire<sup>354</sup>.

Les premières manifestations perceptibles de l'inflammation aiguë sont la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. Parallèlement à ces événements, l'activation des leucocytes tissulaires (mastocytes et macrophages) cause la relâche locale d'agents proinflammatoires, tels le VEGF, l'oxyde nitrique, les angiopoïétines, l'IL-8, le PAF et le NO qui induisent une réponse vasculaire caractérisée par une

brève période de vasoconstriction, suivie par une hyperperméabilité des vaisseaux sanguins au site de l'inflammation accompagnée par l'œdème et la transmigration des cellules inflammatoires vers les tissus. Suite à cette extravasation, la suite de la réponse inflammatoire aiguë est dépendante de la formation d'une MEC provisoire à partir de protéines plasmatiques ainsi que de l'infiltration des leucocytes dans l'espace sous-endothélial. Ces événements permettent le recrutement des neutrophiles et des monocytes au site inflammatoire et la surexpression de médiateurs systémiques de l'inflammation, comme les membres de la cascade du complément, la bradykinine, les membres de la cascade de coagulation et le fibrinogène<sup>355</sup>. Les différents types de leucocytes recrutés sont activés au site inflammatoire et procèdent à la destruction et à l'élimination des agents pathogènes, pour ensuite laisser la place à la réparation tissulaire<sup>354</sup>. De plus, l'inflammation aiguë peut à son tour induire l'angiogenèse, comme dans le cas de la guérison d'une blessure cutanée, caractérisée par une augmentation de la néovascularisation<sup>356</sup>. Finalement, la réparation tissulaire va engendrer une régression des vaisseaux sanguins nouvellement formés, faisant disparaître progressivement l'inflammation et favorisant un retour à l'homéostasie.

#### **1.4.1.2 La résolution de l'inflammation aiguë**

Suite à l'élimination des pathogènes ayant causé de l'inflammation aiguë, des mécanismes provoquant la résolution de cet état inflammatoire sont mis en place au site de l'inflammation. Le processus par lequel l'état inflammatoire fait place à l'homéostasie vasculaire est un processus actif et ce sont les neutrophiles qui jouent un rôle primordial dans la réparation tissulaire et la guérison suite à une agression pathogénique, chimique ou physique<sup>357</sup>. Trois principaux médiateurs pouvant être synthétisés par les neutrophiles sont impliqués dans la résolution de l'inflammation aiguë, soit les lipoxines, les résolvines et les protectines<sup>357</sup>.

Les lipoxines sont des médiateurs lipidiques ayant la capacité d'inhiber l'infiltration des neutrophiles au site inflammatoire et d'augmenter l'infiltration des monocytes sans toutefois induire la relâche de chimiokines<sup>357</sup>. De plus, les lipoxines peuvent également augmenter la destruction des neutrophiles apoptotiques<sup>358</sup>, induire les mécanismes de défense antibactériens<sup>359, 360</sup> et la phagocytose des fragments

cellulaires par les macrophages<sup>361</sup>. L'expression des lipoxines est induite par des agents proinflammatoires, tels l'INF- $\gamma$ , l'IL-4 et l'IL-1 $\beta$ <sup>362</sup>. L'action globale des lipoxines s'observe surtout par la diminution du recrutement des neutrophiles, en bloquant la chimiotaxie et l'adhésion aux CE de ces derniers<sup>362</sup>.

Les résolvines sont des molécules possédant des propriétés anti-inflammatoires, étant capables de bloquer la synthèse de médiateurs proinflammatoires<sup>363</sup>. Ces agents sont dérivés soit de l'acide eicosapentanoïque (RvE) ou de l'acide docosahexanoïque (RvD)<sup>363</sup>. Ils sont également capables de réguler le recrutement des leucocytes au site inflammatoire, d'inhiber la migration et l'infiltration des neutrophiles<sup>363, 364</sup> et de réduire l'expression des cytokines dans les cellules de la microglie<sup>365</sup>.

Finalement, les protectines sont également des dérivées de l'acide docohexanoïque et ont un rôle anti-inflammatoire et protecteur dans le tissu neuronal. Ces molécules sont principalement synthétisées par les cellules gliales, agissant de manière autocrine sur ces mêmes cellules en diminuant l'expression des cytokines<sup>365</sup>. Parmi les autres actions des protectines, nous pouvons dénoter leur capacité d'inhiber l'infiltration des neutrophiles<sup>359, 365</sup>, de diminuer le dommage de la rétine et de la cornée<sup>366</sup>, ainsi que le dommage provoqué par un accident vasculaire cérébral<sup>367</sup>. De plus, il a été démontré que les protectines peuvent accélérer la guérison de blessures dans un modèle murin<sup>368</sup>.

### **1.4.1.3 L'inflammation chronique**

Lorsque la régression vasculaire qui met normalement fin à l'inflammation aiguë n'est pas induite, des mécanismes de rétroaction positive vont être activés entre les nouveaux vaisseaux sanguins et les leucocytes infiltrés dans les tissus, promouvant une prolongation et exacerbation de la réponse inflammatoire, qui va être caractérisée comme de l'inflammation chronique<sup>369</sup>.

La réponse inflammatoire chronique peut être déclenchée suite à une inflammation aiguë, à la persistance d'un virus ou d'une bactérie dans les tissus, à l'exposition prolongée à des agents toxique ou suite à l'induction d'une réponse autoimmune<sup>370</sup>. Les cellules participant à l'inflammation chronique sont



principalement les macrophages, les lymphocytes et les plasmocytes. Ces cellules induisent à long terme une boucle de rétroaction positive de l'état inflammatoire, menant à sa persistance et à la destruction tissulaire pendant des mois, voire des années. Étant donné que l'état inflammatoire chronique persiste aussi longtemps, il n'y a pas de réparation tissulaire au site de l'inflammation, toutefois nous assistons à une « pseudo-réparation » des tissus endommagés qui consiste en une prolifération de fibroblastes et collagène parsemée de néovaisseaux assurant leur survie à long terme. Ce phénomène est néfaste lorsque l'inflammation chronique subsiste dans un organe du corps humain, étant donné que l'on assiste ultimement à la perte fonctionnelle de cet organe, ces cellules fonctionnelles étant détruites et remplacées par du tissu conjonctif et fibreux. Des exemples de perte fonctionnelle d'un organe sont retrouvés dans des pathologies comme l'insuffisance rénale chronique, la cirrhose du foie et la fibrose pulmonaire. D'autres pathologies inflammatoires chroniques, telles que l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis sont également causées par un déséquilibre entre la réparation tissulaire et la réponse inflammatoire soutenue, deux activités influencées par la composition et la fréquence de renouvellement de la MEC<sup>371</sup>.

#### **1.4.2 Cellules impliquées dans la réponse inflammatoire**

L'inflammation est un processus qui agit selon l'interaction entre les cellules présentes au site inflammatoire, modulée par des signaux biochimiques qui initient et maintiennent la réponse de l'hôte aux diverses blessures des tissus. Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées au site de l'inflammation grâce à l'activation de leurs récepteurs membranaires par des cytokines chimiotactiques, qui induisent leur migration dans les tissus inflammés<sup>372, 373</sup>. Les mastocytes, qui sont des cellules inflammatoires présentes dans les tissus conjonctifs et les muqueuses, ont également un rôle significatif au début du processus inflammatoire, ayant la capacité d'induire la relâche d'histamine, de cytokines, de protéases et d'eicosanoïdes dans l'environnement inflammatoire<sup>374</sup>. L'importance de ces médiateurs est sans équivoque, puisqu'ils induisent la vasodilatation et l'œdème, promouvant davantage le recrutement des cellules inflammatoires ainsi que leur adhésion à l'endothélium<sup>375</sup>.

De nombreuses cytokines et chemokines proinflammatoires, incluant les membres de la famille des interleukines (IL), de l'interféron (IFN), ainsi que le TNF- $\alpha$ , sont synthétisées et relâchées en grande quantité par différentes cellules présentes au site inflammatoire, activant ainsi leurs récepteurs respectifs situés à la surface membranaire des cellules immunitaires<sup>372, 373</sup>. L'activation de ces récepteurs induit les voies de signalisation intracellulaire qui ont la capacité de réguler la morphologie et la migration cellulaire. Ensuite, les monocytes guidés par des signaux chimiotactiques migrent aux sites inflammatoires et se différencient en cellules dendritiques et en macrophages<sup>376</sup>. Les cellules dendritiques et les macrophages synthétisent à leur tour des facteurs de croissance et cytokines qui sont capables de moduler l'activité de plusieurs types de cellules situées dans l'environnement inflammatoire local, telles les CE, les cellules épithéliales et les cellules originaires du mésenchyme<sup>371</sup>. Lorsqu'un dommage tissulaire ou une infection survient, les macrophages et les mastocytes relâchent des cytokines qui participent au remodelage tissulaire et au recrutement de leucocytes additionnels. Les cellules dendritiques captent ensuite les antigènes des organismes intrusifs, entrent dans leur phase de maturation et se retrouvent dans les ganglions lymphatiques pour induire la production des cellules de l'immunité adaptative. La maturation des cellules dendritiques est accélérée par les cellules *Natural Killer* (NK), qui font la liaison entre l'immunité innée et adaptative<sup>371</sup>. Contrairement aux cellules dendritiques, les cellules B, les cellules T CD4+ *helper* et CD8+ cytotoxiques sont activées suite à la liaison d'un seul antigène, étant par la suite clonées et multipliées afin de synthétiser des anticorps qui vont contribuer à la réponse immunitaire spécifique<sup>377</sup>. Le processus inflammatoire est régulé par la balance de l'expression des facteurs pro- et anti-inflammatoires, qui coexistent au site du dommage tissulaire. Le passage de la réponse inflammatoire vers le processus de guérison est modulé par des signaux anti-inflammatoires locaux, qui sont cependant redondants, rapides et réversibles<sup>378</sup>. Ainsi, lorsque la concentration de molécules proinflammatoires excède celle de leur contrepartie anti-inflammatoire, l'inflammation est exacerbée. Le déséquilibre ainsi créé induit une augmentation de la synthèse de protéases, protéoglycans,

médiateurs lipidiques et prostaglandines, qui redonnent plus de vigueur au processus inflammatoire<sup>379, 380</sup>.

### 1.4.3 Médiateurs impliqués dans l'inflammation

Les processus inflammatoire et angiogénique sont deux processus complémentaires et interdépendants, puisque chacun des processus ne peut être viable de façon indépendante. L'hypoxie, un stimulus commun pour ces deux processus, induit l'accumulation de leucocytes, tels les neutrophiles, les monocytes et les macrophages<sup>381</sup> et augmente la production de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines<sup>12, 14, 29, 74, 382, 383</sup>. Les leucocytes modulent le processus inflammatoire en relâchant des agents proinflammatoires qui agissent de manière directe ou indirecte sur les CE<sup>14, 374-376, 380, 382, 384, 385</sup>. De plus, l'angiogenèse favorise la continuité du processus inflammatoire, en permettant l'augmentation de la concentration d'oxygène et de nutriments nécessaires aux besoins métaboliques des cellules présentes au site de l'inflammation.

Au niveau moléculaire, l'interaction entre l'inflammation et l'angiogenèse est modulée en premier lieu par la production de l'oxyde nitrique via l'activation de la iNOS dans les cellules inflammatoires, induisant la dilatation et la perméabilité vasculaire, qui sont des processus favorisant l'extravasation des leucocytes<sup>373</sup>. Les cytokines et chimiokines proinflammatoires relâchées pendant l'inflammation activent également les CE avoisinantes dans le but de recruter les leucocytes circulants et d'amplifier le processus inflammatoire.

Un des premiers médiateurs synthétisés par les CE, les monocytes<sup>386, 387</sup> et les neutrophiles<sup>183, 388, 389</sup> durant l'inflammation est le PAF. Ce dernier est un lipide ayant la capacité d'induire la perméabilité vasculaire, l'agrégation plaquettaire et la survie cellulaire<sup>390, 391</sup>, en plus de stimuler la synthèse de l'interleukine-8 par les neutrophiles humains<sup>392</sup>. Ces activités biologiques proinflammatoires et angiogéniques sont induites via l'activation des récepteurs intra- et extracellulaires du PAF, retrouvés au niveau des CE et des neutrophiles<sup>393-395</sup>. Globalement, le PAF joue un rôle primordial dans l'inflammation, étant un des principaux inducteurs de la perméabilité vasculaire, ayant la capacité d'induire la synthèse et la relâche de l'IL-8

par les neutrophiles et augmentant la survie des neutrophiles au site inflammatoire<sup>390, 396</sup>.

Le *Tumor Necrosis Factor –  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) est une cytokine proinflammatoire synthétisée et relâchée principalement par les macrophages, mais également par les CE et les fibroblastes<sup>397-400</sup>. Le TNF- $\alpha$  induit la migration des neutrophiles<sup>401, 402</sup>, augmente l'expression des molécules d'adhésion à la surface des CE, tels l'ICAM, le VCAM et la E-sélectine<sup>403</sup> et possède la capacité de promouvoir la phagocytose chez les macrophages<sup>404</sup>. Ainsi, le rôle du TNF- $\alpha$  dans l'inflammation est de faciliter la migration des neutrophiles, ainsi que de promouvoir leur adhésion et transmigration à travers la couche endothéliale. De plus, le TNF- $\alpha$  augmente la perméabilité vasculaire et facilite l'agrégation plaquettaire, ce qui aide à contenir l'inflammation<sup>405, 406</sup>.

La famille de l'interleukine-1 (IL-1) est impliquée fortement dans la régulation de l'inflammation. Le membre le plus caractérisé de cette famille est l'IL-1 $\beta$ , qui est synthétisée et relâchée principalement par les monocytes, les macrophages tissulaires et les cellules dendritiques<sup>407</sup>. La particularité de l'IL-1 $\beta$  est son unique capacité de stimuler la synthèse de sa protéine via la liaison à son propre récepteur de type Toll (TLR)<sup>407</sup>. Toutefois, des stimuli aussi variés que l'hypoxie, le facteur du complément C5a et l'adhésion des leucocytes peuvent induire la synthèse d'ARNm de l'IL-1 $\beta$ , sans que sa protéine soit synthétisée<sup>408</sup>. L'IL-1 $\beta$  a la capacité d'induire la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, du PAF et du NO<sup>407</sup>, provoquant une vasodilatation locale. De plus, l'IL-1 $\beta$  augmente également l'expression de VCAM-1 à la surface des CE, favorisant l'adhésion des neutrophiles, en plus d'être un facteur proangiogénique, induisant la formation de métastases<sup>409</sup>. Cette interleukine promeut aussi la différenciation des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et stimule la synthèse de l'IL-6<sup>410, 411</sup>. Ainsi, l'IL-1 $\beta$  joue un rôle dans la perméabilité vasculaire et l'adhésion des leucocytes aux CE en plus d'induire la différenciation des cellules myéloïdes.

## 1.4.4 L'interleukine-8

### 1.4.4.1 Découverte et expression de l'IL-8

L'interleukine-8 (IL-8 ou CXCL-8) a été identifiée en 1987 comme une chimiokine (cytokine chimiotactique possédant un poids moléculaire compris entre 8 et 14 kDa) de la famille des CXC (chimiokines possédant un acide aminé entre les deux premières cystéines) ayant la capacité d'activer les neutrophiles en les dirigeant et en augmentant leur mobilité, ainsi que la production d'espèces réactives oxygénées (ROS) et l'expression de molécules d'adhésion membranaires, de même qu'en provoquant leur dégranulation<sup>412, 413</sup>. L'IL-8 est synthétisée sous forme d'un précurseur de la forme finale composé de 99 acides aminés, étant sécrétée comme un peptide de 79 acides aminés après le clivage de la partie N-terminale de la forme mature. Ensuite, le clivage extracellulaire de l'IL-8 donne naissance à plusieurs isoformes biologiquement actifs contenant quatre résidus cystéine qui forment deux ponts disulfide, dont le plus puissant et prédominant est constitué de 72 acides aminés<sup>412, 414, 415</sup>. Finalement, l'IL-8 forme un dimère résistant aux peptidases plasmatiques, à des températures au-delà de 37°C, aux pH extrêmes et autres traitements dénaturants, mais qui est rapidement inactivé lors de la réduction des ponts disulfide<sup>412</sup>.

Plusieurs types cellulaires synthétisent et emmagasinent l'IL-8, dont les monocytes et les macrophages. En relâchant l'IL-8 emmagasinée, les macrophages induisent le recrutement des monocytes et des neutrophiles, deux des principaux leucocytes impliqués dans la réponse inflammatoire aiguë<sup>416-418</sup>. Le recrutement des neutrophiles se produit à partir d'une concentration élevée en chemokines qui crée ainsi un gradient chimiotactique, causant le mouvement des cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes) vers le site de l'inflammation<sup>419</sup>. *In vivo*, le gradient chimiotactique peut être développé par la liaison et l'ancrage de l'IL-8 aux protéines de la membrane basale, aidant également à orienter les cellules vers le site inflammatoire et à les retenir sur place<sup>416-419</sup>. Les neutrophiles, les lymphocytes, les fibroblastes et les kératinocytes ont également la capacité de synthétiser et relâcher l'IL-8 dans des environnements inflammatoires<sup>420-422</sup>.

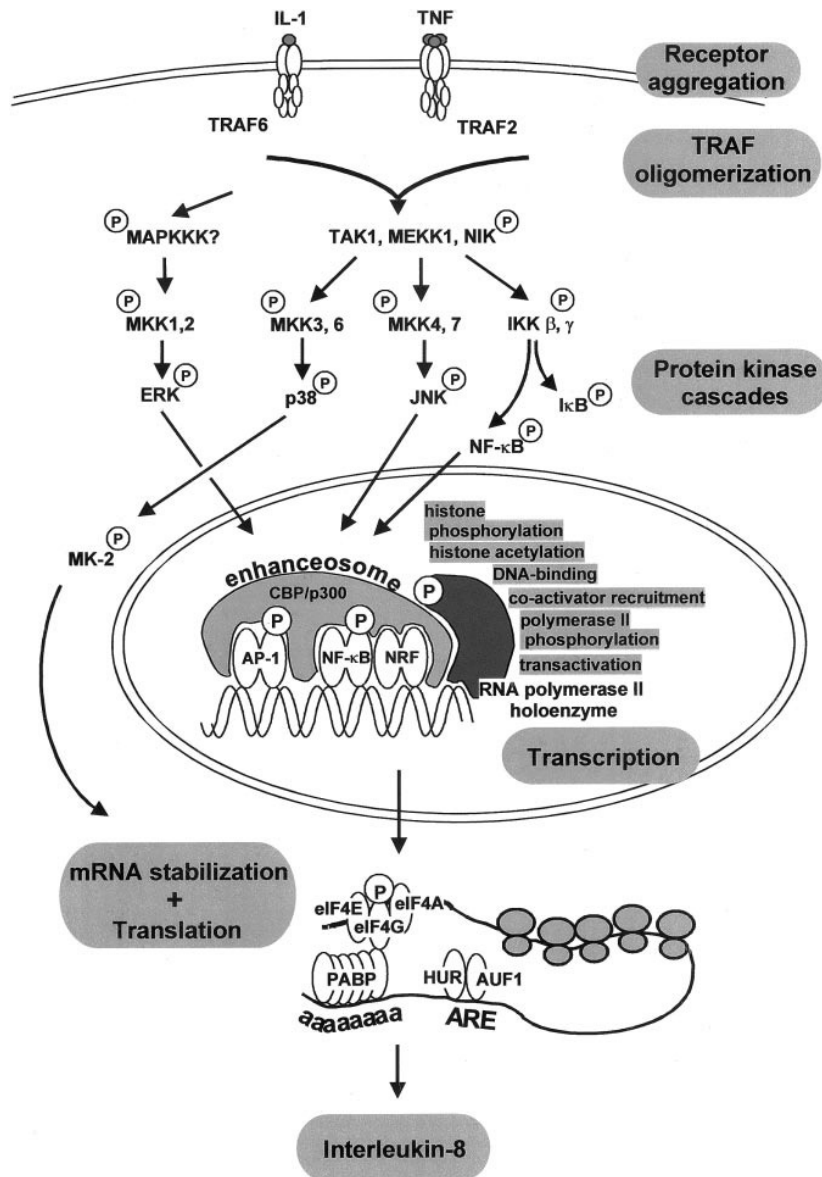
#### 1.4.4.2 Régulation génique de la synthèse de l'IL-8

La synthèse protéique de l'IL-8 est dépendante de la capacité des différents stimuli à induire la synthèse de son ARNm au niveau génique. En conditions physiologiques, l'IL-8 est faiblement secrétée par des cellules non stimulées, cependant sa synthèse et sa relâche sont rapidement augmentées par différents agents, telles des cytokines proinflammatoires comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1<sup>423, 424</sup>, des fragments de bactéries<sup>425, 426</sup> ou de virus<sup>427, 428</sup> et quelquefois par le stress cellulaire<sup>429-431</sup>. De façon remarquable, certaines cytokines tel le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 sont capables d'augmenter la synthèse de l'IL-8 à des niveaux 100 fois supérieurs aux valeurs basales<sup>423, 424, 428, 431</sup>, alors que l'EGF ou certaines bactéries induisent des augmentations plus modestes de la relâche de l'IL-8<sup>425, 426, 432</sup>.

L'induction de la transcription génique de l'IL-8 suite à un stimulus a été démontrée en effectuant des *nuclear run-on*, une technique pour mesurer les changements dans le taux de transcription d'un gène donné<sup>423, 424</sup>. La transcription du gène de l'IL-8 est régulée par un promoteur localisé dans la région 5' de l'ADN qui contient des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription, dont le NF- $\kappa$ B qui est un facteur important, mais pas essentiel<sup>433-437</sup>, dans l'induction du gène de l'IL-8 dans différents types cellulaires. Le NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription dimérique qui comprend 5 sous-unités, soit NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, c-REL, REL A et REL B<sup>438</sup>. Le NF- $\kappa$ B est immobilisé au niveau du cytoplasme via sa liaison avec la famille de protéines inhibitrices I $\kappa$ B. Toutefois, la phosphorylation de l'I $\kappa$ B mène à son ubiquitination et ultérieurement à sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi le facteur NF- $\kappa$ B et lui permettant de transloquer au noyau et de se lier au site du promoteur transcriptionnel de l'IL-8. Ce processus est essentiel à l'activation du NF- $\kappa$ B, mais son activité transcriptionnelle maximale requiert également la phosphorylation de ses sous-unités, ainsi que leur liaison à des coactivateurs<sup>438, 439</sup>. Le promoteur de l'IL-8 contient également des sites de liaison pour deux autres facteurs de transcription dont l'*activating protein - 1* (AP-1) et le *CAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP). Ces deux facteurs ont la capacité de potentialiser la transcription du gène de l'IL-8, maximisant ainsi la synthèse de l'ARNm et de sa protéine dans plusieurs types cellulaires<sup>423-428, 440-444</sup>.

Les agents proinflammatoires induisant la synthèse de l'IL-8 peuvent activer certaines protéines kinases qui ont la capacité de moduler l'activité des facteurs de transcriptions NF- $\kappa$ B ou AP-1. L'étape limitante dans l'activation du NF- $\kappa$ B, soit la dégradation protéique du I $\kappa$ B, est régulée par les I $\kappa$ B kinases (IKK $\alpha/\beta$  et IKK $\gamma$ ) qui phosphorylent spécifiquement deux sérines (Ser 32/36) adjacentes sur l'I $\kappa$ B<sup>445</sup>. Les voies de signalisation de la *c-JUN N-terminal kinase* (JNK) et du NF- $\kappa$ B jouent un rôle primordial dans la régulation de l'IL-8 inductible, puisque l'inhibition de l'une de ces voies parallèlement à l'activation de l'autre, induit une inhibition presque complète de la sécrétion de l'IL-8<sup>432, 446</sup>.

Les sites de liaison pour les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 sont localisés à proximité (moins de 200 paires de bases) du promoteur de l'IL-8<sup>443, 446</sup>, suggérant la présence d'un complexe nucléoprotéique multiple. L'analyse de ce complexe, dénommé *enhanceosome*, a été tout d'abord effectuée de façon détaillée pour l'interféron (IFN)- $\beta$ <sup>447, 448</sup>. Le but de ce complexe est de fournir une surface composée de plusieurs protéines qui va promouvoir un contact optimal avec la machinerie transcriptionnelle située du côté de l'ADN, menant ainsi à une transcription génique maximale<sup>449</sup>. En conditions physiologiques, la synthèse et la relâche de l'IL-8 par les leucocytes sont très faibles, dues notamment à la présence du site de liaison *NF- $\kappa$ B repressor element* (NRE), localisé à l'intérieur du site de liaison génique du NF- $\kappa$ B, qui permet au facteur de répression *NF- $\kappa$ B repressor factor* (NRF) de s'y lier et d'inhiber ainsi la transcription génique de l'IL-8 en absence de stimulation. Cependant, lorsque les cellules sont stimulées par l'IL-1, ce même NRF augmente la transcription de l'IL-8, tel que démontré par l'utilisation d'un ARN antisens contre le NRF dans les cellules HeLa<sup>446</sup>. Ces données suggèrent que le NRF joue un rôle ambivalent dans la transcription de l'IL-8.



**Figure 5. Voies de signalisation intracellulaires régulant le gène de l'IL-8.** En conditions quiescentes, l'expression de l'IL-8 est faible, grâce à la présence du facteur de répression NRF qui empêche la transcription du gène de l'IL-8 en son ARNm<sup>446</sup>. Lorsque les cellules sont stimulées par des cytokines telle l'IL-1 ou le TNF- $\alpha$ , les voies de signalisation telles que ERK, JNK et MEKK1 sont activées, ce qui résulte en une activation de plusieurs facteurs de transcription nucléaires (CBP/p300, AP-1, NF- $\kappa$ B) qui sont transloqués au noyau et induisent la transcription du gène de l'IL-8<sup>439, 446, 450</sup>. De plus, l'activation en parallèle de la p38 MAPK mène à la stabilisation de l'ARNm de l'IL-8 nouvellement synthétisée et induit sa traduction en protéine<sup>451</sup>. (D'après Hoffmann et al., J Leukoc Biol. 2002 Nov;72(5):847-55.)



### 1.4.4.3 Récepteurs et signalisation de l'IL-8 : rôle dans l'inflammation

L'interleukine-8 régule de nombreuses activités biologiques via sa liaison à un de ses deux récepteurs extracellulaires couplés aux protéines G, soit le CXCR1 ou le CXCR2<sup>452, 453</sup>. L'activité chimiotactique des récepteurs de l'IL-8 est modulée par leur couplage à la protéine G $\alpha$ <sup>454, 455</sup>, toutefois d'autres protéines de la famille G $\alpha$  peuvent réguler d'autres réponses biologiques induites par les récepteurs de l'IL-8<sup>456</sup>. Le CXCR1 et le CXCR2 démontrent des propriétés pharmacologiques distinctes quant à leur association au ligand. Le CXCR1 est activé uniquement suite à sa liaison avec l'IL-8 ou la protéine chimiotactique des granulocytes-2 (GCP-2). D'un autre côté, le CXCR2 est activé par de multiples chemokines de la famille CXC, incluant les oncogènes reliés à la croissance (GRO $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), le *neutrophil activating peptide* et le GCP-2<sup>457</sup>.

La phosphatidyl-inositol-3 kinase (PI3K) est une des principales cibles des sous-unités hétéro-trimériques G $\alpha$ i et  $\beta\gamma$ . De plus, la PI3K a été caractérisée comme une voie majeure impliquée dans l'induction de la chimiotaxie des neutrophiles par l'IL-8, grâce à sa capacité d'induire une augmentation de la phosphorylation de son substrat sérine/thréonine kinase, l'Akt/PKB<sup>458</sup>. L'IL-8 a également la capacité d'activer la voie de signalisation des MAPK, qui englobe des sérine/thréonine kinases colocalisées suite à leur interaction avec des protéines d'échafaudage à proximité des récepteurs de la surface membranaire. Les substrats spécifiques à ces kinases activent des cascades signalétiques distinctes, dont la voie Raf-1/MAP/ERK. La stimulation avec l'IL-8 induit la phosphorylation de la « *Extracellular Regulated Kinase* » (ERK) 1/2 dans les neutrophiles<sup>459</sup> et les cellules tumorales<sup>460-462</sup>. Chez les neutrophiles, l'activation de la PI3K est considérée comme une étape intermédiaire clé dans l'induction de la voie de signalisation de la MAPK par les récepteurs de l'IL-8<sup>459</sup>. L'activation de la MAPK par l'IL-8 augmente la survie des neutrophiles<sup>463</sup> et induit également la prolifération des CE<sup>464</sup> et des cellules provenant de lignées tumorales<sup>460-462, 465-467</sup>. De plus, la phosphorylation de la ERK suite à l'activation des récepteurs de l'IL-8 augmente l'activité des facteurs de transcription E2F et AP-1, reconnus pour induire la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. La stimulation des cellules PC3 avec l'IL-8 *in vitro* a également permis de démontrer

la capacité de cette interleukine à induire la phosphorylation de la p38 MAPK, qui semble induire la prolifération de ces cellules<sup>468</sup>.

Le couplage aux protéines G $\alpha$ i chez les récepteurs CXCR induit l'activation de la phospholipase C (PLC) suite à une stimulation par l'IL-8<sup>469</sup>. Une fois activée, la PLC fragmente les lipides membranaires en diacylglycérol (DG) et en inositol triphosphate (IP3), induisant ainsi la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC)<sup>469</sup>. De plus, la stimulation des neutrophiles avec l'IL-8 induit la phosphorylation de plusieurs isoformes de la PKC, incluant le PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I et PKC $\beta$ II, qui participent à la régulation de la sécrétion cellulaire, du métabolisme oxydatif et de l'adhésion cellulaire dépendante du récepteur Mac-1 (CD11b/CD18), localisé à la surface des neutrophiles<sup>470, 471</sup>.

L'interleukine-8 possède la capacité de lier et d'activer les récepteurs tyrosine kinase présents à la surface des cellules cancéreuses et endothéliales, menant ainsi à l'induction de plusieurs voies signalétiques. La stimulation avec l'IL-8 peut ainsi activer le récepteur de l'EGF dans le cancer de l'ovaire et les CE vasculaires, induisant la signalisation de la MAPK<sup>472</sup>. Récemment, un groupe de chercheurs a démontré que l'IL-8 induit la phosphorylation du VEGFR2 dans les CE par l'intermédiaire de l'association physique du VEGFR2 avec les récepteurs CXCR-1 ou CXCR-2 activés préalablement par l'IL-8, régulant ainsi la perméabilité de la barrière endothéliale<sup>473</sup>. Les protéines tyrosine kinase qui ne sont pas associées à un récepteur peuvent également agir comme intermédiaires des voies de signalisation activées par l'IL-8. Les membres de la famille des kinases Src et *focal adhesion kinase* (FAK) sont activés en amont suite à l'induction des diverses voies de signalisation par l'IL-8 dans les cellules tumorales<sup>474-477</sup>. Les petites GTP-ases de la famille Rho jouent un rôle clé dans la régulation du cytosquelette d'actine. Les récepteurs de l'IL-8, CXCR1 et CXCR2, peuvent activer de manière différente deux GTP-ases, membres de la famille Rho. Le récepteur CXCR1 induit de manière rapide l'activité de la Rho-GTP-ase, tandis que le CXCR2 induit l'activation plus tardive de la Rac-GTP-ase<sup>456</sup>. L'IL-8 induit ainsi la migration cellulaire via la polymérisation du cytosquelette d'actine qui provoque la rétraction du cytosquelette cellulaire<sup>456, 475</sup>.

L'activité de plusieurs facteurs de transcription est augmentée en réponse à l'activation des récepteurs CXCR. La signalisation induite par l'IL-8 et GRO $\alpha$  augmente l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans le mélanome<sup>478</sup>. De plus, suite à sa liaison au CXCR2, l'IL-8 peut également induire la phosphorylation de la protéine JNK-2, un activateur de la transcription<sup>479</sup>. Les voies signalétiques activées par le complexe IL-8/CXCR peuvent ainsi induire des changements rapides dans l'expression protéique, par l'entremise de la régulation des protéines associées à la traduction.

L'expression des récepteurs de l'IL-8 à la surface des CE, cellules tumorales, neutrophiles et macrophages associés aux tumeurs pourrait suggérer que la sécrétion de l'IL-8 à partir des cellules tumorales aurait un effet marqué sur le microenvironnement tumoral. L'activation des récepteurs de l'IL-8 endothéliaux induit une réponse angiogénique en augmentant la survie et en induisant la prolifération et la migration des CE<sup>457, 464</sup>. De plus, l'expression intra-tumorale de l'IL-8 joue un rôle clé dans l'infiltration des neutrophiles dans l'environnement tumoral, qui peut ultimement mener à la formation de métastases<sup>480</sup>. Les lignées cellulaires tumorales et les biopsies de certains cancers peuvent exprimer le récepteur CXCR1 ou CXCR2, ce qui suggère que les cellules tumorales sont soumises à une activation autocrine ou paracrine des récepteurs de l'IL-8, qui a été associée avec la prolifération<sup>465-467</sup>, la migration et la transmigration cellulaire<sup>481-483</sup> ainsi qu'avec une contribution dans l'évasion des cellules tumorales au processus d'apoptose induit par les stress<sup>484</sup>. L'expression de l'IL-8 corrèle avec l'angiogénèse, la formation de tumeurs et le potentiel métastatique de plusieurs cancers solides dans plusieurs modèles *in vivo*<sup>485-490</sup>.

## 1.5 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules qui jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense contre l'invasion et la prolifération des bactéries ou des virus dans notre organisme<sup>491</sup>. Les neutrophiles, dont leur genèse et leur différenciation sont localisées dans la moelle osseuse, ont une demi-vie dans la circulation sanguine qui avait initialement été établie à quelques heures<sup>492</sup>, toutefois, une étude récente a démontré que l'espérance de vie des neutrophiles circulants peut s'échelonner jusqu'à 5 jours<sup>493</sup>. Lorsque les micro-organismes arrivent à percer la première barrière physique, telle la peau ou les muqueuses, et ainsi gagner l'accès aux tissus sous-jacents, ils activent localement, de pair avec les macrophages résidants aux sites de l'infection, les CE qui vont favoriser l'adhésion des neutrophiles circulants, via l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales, pour que ultimement ces derniers transmigrent à travers la monocouche endothéliale<sup>494, 495</sup>. Les molécules exprimées à la surface de ces micro-organismes interagissent avec différents récepteurs localisés à la surface membranaire des neutrophiles, tels les récepteurs Fc et  $\beta$ 2-intégrine, ce qui permet aux neutrophiles de phagocyter et éliminer la plupart des organismes par l'exposition à de fortes concentrations de substances bactéricides dans la vacuole phagocytaire<sup>496, 497</sup>. De plus, les neutrophiles localisés dans les tissus vont synthétiser et relâcher d'autres agents chimiotactiques afin de recruter davantage de neutrophiles, macrophages et cellules T au site inflammatoire<sup>498</sup>.

### 1.5.1 Genèse des neutrophiles : la myélopoïèse

La myélopoïèse, se définissant comme étant la production de monocytes et de granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), est un processus qui englobe les deux tiers de la synthèse de cellules sanguines (l'hématopoïèse) dans la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques sont localisées dans les ostéoblastes, surtout dans les endroits caractérisés par un flot sanguin faible et une tension d'oxygène réduite, tandis que les cellules souches matures en phase de division se retrouvent du côté abluminal des sinusoides, qui sont des capillaires fenestrés perméables retrouvés au niveau de la moelle osseuse<sup>499</sup>. Le récepteur CXCR4, dont le

ligand est le *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1), joue un rôle crucial dans le maintien des neutrophiles au niveau de la moelle osseuse<sup>500</sup>. Ainsi, une délétion du récepteur CXCR4 a pour effet d'induire la migration des neutrophiles matures localisés dans la moelle osseuse vers la circulation sanguine, sans toutefois influencer la durée de vie des neutrophiles circulants<sup>501</sup>. À l'opposé, la délétion du récepteur CXCR2 exprimé à la surface des cellules myéloïdes induit l'immobilisation des neutrophiles au niveau de la moelle osseuse, alors que lors de la délétion de ces deux récepteurs simultanément (CXCR4 et CXCR2), un phénotype similaire à la délétion du CXCR4 seul est observé, soit la migration des neutrophiles de la moelle osseuse vers le sang<sup>502</sup>. Cette migration des neutrophiles vers la circulation sanguine est modulée via la signalisation induite par les récepteurs CXCR2, G-CSFR ou de type Toll (*Toll-like receptor*), qui sont exprimés tardivement, durant le processus de maturation des neutrophiles à l'intérieur de la moelle osseuse<sup>503</sup>. L'activation de ces récepteurs n'induit pas une augmentation de la migration des neutrophiles vers la circulation sanguine, même en absence du récepteur CXCR4, ce qui démontre que la signalisation induite suite à l'activation du CXCR4 est essentielle à la régulation de la localisation (moelle osseuse/circulation sanguine) des neutrophiles matures et immatures<sup>501</sup>.

### 1.5.2 Régulation des neutrophiles dans la circulation sanguine

Chez l'adulte, la production de neutrophiles en conditions physiologiques est de 1 à 2 x 10<sup>11</sup> cellules par jour. Le *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF) est une cytokine essentielle pour la production de neutrophiles lorsque ces derniers sont requis de façon rapide et en grand nombre, comme lors d'une infection. Toutefois, le G-CSF ne semble pas essentiel au processus de production de neutrophiles en conditions physiologiques, puisque malgré le fait que la souris mutante G-CSF<sup>-/-</sup> souffre de neutropénie, on retrouve quand même 25% de la production des neutrophiles telle qu'observée chez la souris G-CSF<sup>+/+</sup>, de plus, ces neutrophiles arrivent à maturité et sont fonctionnels<sup>504</sup>. La production de neutrophiles dans la moelle osseuse est influencée par le taux de neutrophiles apoptotiques retrouvés dans les tissus. Lors de la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les

macrophages et les cellules dendritiques dans les tissus, la synthèse et la relâche de l'IL-23 par ces derniers sont diminuées<sup>505-507</sup>. De plus, en présence de l'interféron- $\gamma$  ou du GM-CSF, les neutrophiles augmentent l'expression de nouveaux récepteurs de surface membranaire tel l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité-II, le CD80, CD83 et le CD86, ce qui leur permet de se différencier en cellules dendritiques, permettant ainsi de faire le lien avec la réponse immunitaire adaptative via leur interaction avec les cellules T<sup>508-510</sup>.

### **1.5.3 Les granules chez les neutrophiles**

Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contrant l'invasion tissulaire par des bactéries et des champignons. Les neutrophiles sont les principaux effecteurs dans le processus inflammatoire induit par la présence intra-tissulaire de ces micro-organismes, suivant des étapes précises et bien définies. Lors de la première étape, les neutrophiles adhèrent à l'endothélium activé et migrent ensuite vers le site inflammatoire où ils participent à l'élimination des micro-organismes par divers mécanismes, telles la phagocytose, la génération d'espèces réactives oxygénées et la relâche d'enzymes microbicides. Ces mécanismes requièrent la mobilisation des granules cytoplasmiques et des vésicules sécréteuses contenues à l'intérieur des neutrophiles. Les différentes granules localisées dans les neutrophiles sont constituées d'agents antimicrobiens, de protéases et d'espèces réactives oxygénées, mais également d'une multitude de récepteurs membranaires pouvant lier des molécules d'adhésion endothéliales, des protéines de la MEC, des produits bactériens et des médiateurs solubles de l'inflammation. La sécrétion contrôlée de ces granules permet aux neutrophiles d'être des acteurs importants pour l'immunité innée, délivrant la majorité de leur contenu en protéines cytotoxiques de façon ciblée, afin de ne pas nuire aux tissus environnants<sup>496, 511-516</sup>.

#### **1.5.3.1 La granulopoïèse : formation des granules chez les neutrophiles**

Les granules localisés à l'intérieur des neutrophiles sont synthétisés de manière séquentielle durant la différenciation cellulaire myéloïde. Pas moins de 11,300 gènes sont activés à un différent moment pendant les différentes étapes de la

maturation des neutrophiles, tandis que le profil de ces gènes change continuellement tout au long de la myélopoïèse<sup>514</sup>. La granulopoïèse débute au stade des promyélocytes précoces avec le bourgeonnement des vésicules de transport immatures à partir de l'appareil de Golgi, suivi par leur fusion afin d'augmenter en taille<sup>517-519</sup>. Les granules résultant de ce processus ont été initialement caractérisés par leur contenu élevé en myéloperoxydase (MPO) et ainsi dénommés granules « positifs à la peroxydase », cependant ils peuvent être identifiés comme les « granules azurophiles » à cause de leur affinité pour le colorant azure A<sup>520</sup>, mais également comme les « granules primaires », étant les premiers à être formés chez les neutrophiles. Pendant la transition entre les stades promyélocyte et myélocyte, la synthèse de MPO est bloquée, caractérisant ainsi les granules formés durant cette étape de la myélopoïèse comme négatifs à la peroxydase. Cette famille de granules est séparée en granules spécifiques (secondaires) et de gélatinase (tertiaires) selon le temps durant lequel ils sont synthétisés et leur contenu en protéines.

Les granules spécifiques sont synthétisés dans les myélocytes et les métamyélocytes, contenant d'importantes quantités de lactoferrine et de faibles quantités de gélatinase, alors que les granules tertiaires, ayant un contenu élevé en gélatinase et faible en lactoferrine, sont formés dans les cellules granuleuses immatures (*band cells*) et les neutrophiles segmentés, qui sont à l'avant-dernier stade de maturation des neutrophiles<sup>518, 521, 522</sup>. Les vésicules sécréteuses sont caractérisées par leur capacité d'exocytose rapide et sont localisées à l'intérieur des neutrophiles segmentés<sup>523, 524</sup>. Ces vésicules se forment par un processus d'endocytose, puisqu'elles contiennent des protéines plasmatiques<sup>513</sup>. Tous les sous-ensembles des granules partagent des caractéristiques structurales communes, telle une double couche lipidique formant leur membrane, ainsi qu'une matrice intra-granulaire contenant des protéines destinées à l'exocytose ou à être transloquées au phagosome. Toutefois, le contenu protéique est très variable parmi les différents sous-ensembles de ces granules. Certaines études ont ainsi démontré que les protéines synthétisées à un stade donné du développement des cellules myéloïdes sont localisées dans les mêmes types de granules formés durant ce stade de développement précis<sup>511, 522, 525</sup>. De plus, si la fenêtre temporelle de synthèse protéique est déplacée

expérimentalement du stade de myélocyte à celui de promyélocyte, les protéines normalement retrouvées dans les granules spécifiques vont être localisées dans les granules azurophiles<sup>526</sup>. Le contenu protéique des différents types de granules est donc déterminé par la période de temps durant laquelle ces protéines sont synthétisées<sup>522, 526</sup>. L'hétérogénéité des granules dans les neutrophiles est due à une régulation subtile de leur contenu protéique par l'activation de différents facteurs de transcription qui sont exprimés aux différents stades de la granulopoïèse<sup>524, 527</sup>. De plus, le ciblage des protéines pour l'emmagasinage dans leurs granules respectifs dépend du stade de développement des neutrophiles auquel ces protéines ont été synthétisées<sup>511</sup>.

### 1.5.3.2 Les granules azurophiles

L'intérieur des granules azurophiles contient des hydrolases acides et des protéines antimicrobiennes, ces granules étant initialement considérés comme des lysosomes primaires puisqu'ils expriment la granulophysine (CD63) à leur surface membranaire<sup>528</sup>. Toutefois, ces granules n'expriment pas les protéines membranaires normalement retrouvées au niveau des lysosomes, soit LAMP-1 et LAMP-2<sup>529</sup> et l'incorporation des protéines dans ces granules ne requiert pas la présence ou l'implication du récepteur mannose-6-phosphate, qui est essentiel au ciblage enzymatique vers le lysosome<sup>530-532</sup>. Les granules azurophiles sont divisés en différentes sous-populations ayant des caractéristiques physiques, chimiques et morphologiques distinctes, à cause de l'hétérogénéité de leur forme et de leur taille<sup>518, 533-535</sup>. Ainsi, ces granules peuvent se diviser en deux catégories : les granules précoces formés au début du stade promyélocytique, qui se caractérisent par une faible expression de défensines et les granules tardifs formés lors de la transition promyélocyte/myélocyte, qui sont caractérisés par une forte expression de défensines<sup>511</sup>. Durant le processus inflammatoire, les granules azurophiles sont limités quant à leur capacité d'exocytose<sup>515, 536</sup>, contribuant surtout à la destruction et la dégradation des micro-organismes phagocytés qui sont localisés dans le phagolysosome<sup>537</sup>. Certaines protéines exprimées dans les granules azurophiles sont synthétisées sous forme de précurseurs et sont emmagasinées sous leur forme mature



et active suite au clivage de leurs propeptides situés à leur extrémité aminoterminal<sup>538-540</sup>. Les propeptides ne jouent cependant aucun rôle dans le ciblage des protéines matures vers les différents granules, servant uniquement à prévenir d'éventuels défauts dans le repliement protéique, le risque d'auto-toxicité ou l'immobilisation des protéines matures dans la machine de biosynthèse cellulaire<sup>531, 538, 541</sup>.

La myéloperoxydase (MPO), une hémoprotéine ayant des propriétés microbicides, est la protéine exprimée de façon prédominante dans les granules positifs à la peroxydase et relâchée soit dans le phagosome ou dans le milieu extracellulaire, suite à l'activation des neutrophiles<sup>517, 518</sup>. La MPO réagit avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> engendré par la NADPH oxydase, augmentant ainsi le potentiel toxique du peroxyde d'hydrogène. De plus, le complexe peroxyde-MPO induit la formation d'acide hypochloreux (HOCl) et de certains autres dérivés du chlore, des radicaux de tyrosine et d'intermédiaires d'espèces réactives nitrogénées, qui sont tous des substances capables d'attaquer la surface membranaire des micro-organismes<sup>542</sup>. Les  $\alpha$ -défensines, de petits peptides cationiques, jouant un rôle antimicrobien et cytotoxique, sont également exprimées dans les granules azurophiles, représentant au moins 5% du contenu protéique total des neutrophiles<sup>543</sup>. Les neutrophiles peuvent contenir quatre défensines alpha étroitement reliées (*human neutrophil peptide*; HNP 1-4) et emmagasinées dans les granules azurophiles<sup>535</sup>. Les  $\alpha$ -défensines exprimées au niveau des neutrophiles humains sont antimicrobiennes pour un large éventail de bactéries, champignons, virus à capsule et protozoaires<sup>543-545</sup> et ce, par l'induction de la formation de pores multimériques transmembranaires<sup>546</sup>. De plus, suite à leur exocytose, les défensines sont chimiotactiques pour les monocytes et les cellules T CD4+ et CD8+<sup>547-549</sup>. La *Bactericidal/permeability-increasing protein* (BPI) est un autre peptide cationique localisé dans les granules azurophiles, ayant la capacité de détruire les bactéries Gram-négatives<sup>550, 551</sup>. La BPI se lie aux résidus de lipopolysaccharide (LPS) chargés négativement dans la membrane externe des bactéries Gram-négatives via sa région N-terminale, induisant un réarrangement des lipides situés au niveau de la membrane externe, ainsi que l'inhibition de la

croissance bactérienne<sup>552</sup>. De plus, le domaine C-terminal de la BPI favorise l'attachement des bactéries aux neutrophiles et leur phagocytose<sup>553</sup>.

### 1.5.3.3 Les granules négatifs à la peroxydase

Les granules négatifs à la peroxydase sont subdivisés en granules spécifiques (secondaires) et granules à gélatinase (tertiaires)<sup>554</sup>. Cette séparation est arbitraire, puisque les granules négatifs à la peroxydase sont synthétisés tout au long de la genèse des neutrophiles, soit dans les myélocytes, les métamyélocytes, les cellules granuleuses immatures et les neutrophiles eux-mêmes. Cependant, du point de vue physiologique, cette distinction entre les granules spécifiques et tertiaires est nécessaire afin de différencier leur contenu protéique ainsi que leur mécanisme de sécrétion. Les granules spécifiques sont volumineux et contiennent majoritairement des substances antibiotiques, tandis que les granules tertiaires sont plus petits et contiennent peu de substances antimicrobiennes. Toutefois, le contenu des granules tertiaires est secrété plus facilement que celui des granules spécifiques<sup>516</sup>. Les granules tertiaires sont donc considérés comme un réservoir d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et de récepteurs membranaires impliqués dans l'extravasation et la diapédèse des neutrophiles, alors que les granules spécifiques sont plus impliqués dans les activités antimicrobiennes des neutrophiles, via la mobilisation des substances antibiotiques au phagosome ou dans le milieu extracellulaire<sup>537, 555, 556</sup>. Les principales protéines à caractère antimicrobien localisées dans les granules négatifs à la peroxydase sont la lactoferrine, la hCAP-18, le NGAL, le lysozyme et le Nramp-1. Ces granules emmagasinent également trois métalloprotéases impliquées dans la régulation de l'inflammation, soit la MMP-8, la MMP-9 (gélatinase) et la leukolysine (MMP-25).

La lactoferrine, un membre des transferrines, est une glycoprotéine emmagasinée majoritairement dans les granules spécifiques possédant des propriétés antibactériennes tant pour les Gram-négatives que les Gram-positives<sup>557, 558</sup>. Son effet bactériostatique est causé par sa capacité de séquestrer le fer, minimisant ainsi l'accès des bactéries à ce minéral essentiel<sup>559</sup>. Le hCAP-18, un peptide antibactérien pour les bactéries Gram-négatives et Gram-positives<sup>560, 561</sup>, ainsi qu'un

chimioattractant pour les neutrophiles, les cellules T et les monocytes<sup>549</sup> est synthétisé par les kératinocytes, uniquement lors de pathologies cutanées, tels le psoriasis, le lupus érythémateux et la dermatite atopique<sup>562</sup>. La lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles (NGAL) est exprimée dans les granules spécifiques<sup>563, 564</sup>. La majorité de la NGAL n'est pas associée à la gélatinase, se retrouvant seulement sous forme de monomères ou hétérodimères<sup>565</sup>. La NGAL est produite par les tissus en conditions physiologiques, inflammatoires et néoplasiques<sup>566, 567</sup> et possède des propriétés bactériostatiques grâce à sa capacité de diminuer la quantité de fer disponible aux bactéries<sup>568</sup>. Le lysozyme est une enzyme localisée dans tous les types de granules, toutefois se retrouvant à la concentration la plus élevée dans les granules spécifiques<sup>524, 569</sup>. Ce peptide cationique antimicrobien possède la capacité de cliver les polymères de peptidoglycane de la paroi bactérienne<sup>570</sup>, de lier le LPS<sup>571</sup> et de réduire la production de cytokines ainsi que la mortalité causée par ce même LPS dans un modèle murin de choc septique<sup>572</sup>. Finalement, la protéine du macrophage associée à la résistance naturelle-1 (Nramp1) a initialement été identifiée dans les macrophages, mais son expression a aussi été observée dans les granules tertiaires des neutrophiles<sup>573</sup>. Suite à la dégranulation des neutrophiles, la Nramp1 est transloquée à la membrane du phagosome<sup>574</sup> et peut agir comme un transporteur de cations divalents, un processus essentiel pour la destruction des micro-organismes présents dans la vacuole phagocytique qui réduit la concentration de  $\text{Fe}^{2+}$ , le  $\text{Mn}^{2+}$  et le  $\text{Zn}^{2+}$ , des métaux essentiels à la survie bactérienne<sup>575</sup>.

Trois métalloprotéinases (MMP) ont été identifiées et localisées dans les neutrophiles : la collagénase (MMP-8), située dans les granules spécifiques<sup>576, 577</sup>, la gélatinase (MMP-9), localisée majoritairement dans les granules tertiaires<sup>554, 578</sup> et la leukolysine (MMP-25), qui est distribuée parmi les différents sous-types de granules et la membrane plasmique<sup>579, 580</sup>. Les MMP sont emmagasinées sous leur forme inactive, étant activées par protéolyse suite à leur exocytose. Ces enzymes ont la capacité d'induire la dégradation du collagène, de la fibronectine, des protéoglycans, de la laminine et de la gélatine, en plus de jouer un rôle important dans la dégradation des membranes basales vasculaires et des matrices interstitielles durant l'extravasation et la transmigration des neutrophiles à travers la couche

endothéliale<sup>512, 579, 581</sup>. D'un autre côté, un groupe d'inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP1-4) peuvent agir en tant qu'antagonistes des activités protéolytiques de la collagénase et de la gélatinase<sup>581</sup>. Le débalancement entre les TIMP et les MMP, qui survient dans les neutrophiles est caractéristique à plusieurs maladies inflammatoires du poumon, tels le syndrome de la détresse respiratoire aiguë, l'asthme et la fibrose pulmonaire<sup>582</sup>.

#### 1.5.3.4 Les vésicules sécrétoires

En conditions physiologiques non inflammatoires, les neutrophiles circulants sont caractérisés par une faible expression de récepteurs à leur surface membranaire, ne répondant que très peu aux signaux extérieurs<sup>583, 584</sup>. Lors de stimuli proinflammatoires, les vésicules sécrétoires qui possèdent des récepteurs membranaires ayant la capacité de réguler l'inflammation sont sécrétées par les neutrophiles, exposant ainsi ces récepteurs à leur surface membranaire afin qu'ils soient activés et qu'ils puissent amplifier la réponse inflammatoire<sup>523, 536, 585</sup>. Ainsi, la membrane des vésicules sécrétoires exprime à sa surface la  $\beta$ 2-intégrine (CD11b/CD18)<sup>536</sup>, le récepteur du complément-1 (CR1)<sup>586</sup>, les récepteurs du fMLP<sup>587</sup>, le récepteur CD14 du LPS (acide lipotéichoïque)<sup>588</sup>, le récepteur CD16 du Fc $\gamma$ III et le récepteur de la leuklysine<sup>579</sup>, qui seront exposés du côté du milieu extracellulaire de la membrane plasmique suite à l'exocytose de ces vésicules. Cette mobilisation des vésicules sécrétoires est accompagnée par le « shedding » de la L-sélectine à la surface des neutrophiles<sup>589</sup>. Les changements induits lors de la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane extracellulaire des neutrophiles permettent à ces derniers d'établir un contact ferme et durable avec l'endothélium vasculaire activé *in vivo*.

#### 1.5.3.5 Les mécanismes de dégranulation

Les granules et les vésicules des neutrophiles ont des différences quant à leur disponibilité pour l'exocytose. Les vésicules sécrétoires sont les premières à être mobilisées à la surface membranaire, suivi par les granules tertiaires, les granules spécifiques, et ultimement les granules azurophiles<sup>516, 585</sup>. La stimulation des

neutrophiles *in vitro* avec le fMLP à une faible concentration est capable d'induire une relâche immédiate et presque complète des vésicules sécrétoires, sans stimuler la relâche des granules<sup>536</sup>. Cependant, une stimulation avec le PMA peut induire l'exocytose complète des granules tertiaires, la relâche modérée du contenu des granules spécifiques et seulement une faible exocytose des granules azurophiles<sup>515, 554</sup>. Une hiérarchie de l'exocytose similaire a été observée suite à la migration des neutrophiles *in vivo* dans des micro-chambres sous-cutanées chez la souris<sup>516</sup>.

Les voies de signalisation qui modulent la dégranulation des neutrophiles suite à un stimulus inflammatoire ont été partiellement identifiées. La mobilisation hiérarchique des granules peut être reproduite *in vitro* en augmentant graduellement la concentration du calcium intracellulaire<sup>585</sup>. De nombreux stimuli, dont l'activation de la L-sélectine, du récepteur CD11b/CD18 et du récepteur du fMLP, augmentent la concentration du calcium dans le cytosol. L'activation de la  $\beta$ 2-intégrine induit la phosphorylation des protéines tyrosine kinase cytoplasmiques<sup>590, 591</sup>, qui phosphorylent et activent à leur tour la PLC $\gamma$ 2 et la phospholipase D<sup>592, 593</sup>. Ces phospholipases activées catalysent la fragmentation du phosphatidyl inositol (PI) et de la phosphatidylcholine en inositol-3-phosphate (IP3), diacylglycérol et acide phosphatidique. À leur tour, ces métabolites activent la PKC, induisant ainsi la relâche de calcium provenant des réserves intracellulaires et de l'influx calcique extracellulaire<sup>592-596</sup>. La stimulation du récepteur du fMLP (récepteur couplé aux protéines G) induit une augmentation suffisante de la concentration cytosolique de l'IP3 pour mobiliser uniquement le calcium intracellulaire<sup>597</sup>.

Les mécanismes impliqués dans la dégranulation des neutrophiles provoquée par le renouvellement des lipides et l'augmentation de la concentration calcique ne sont pas totalement élucidés. Les annexines sont des protéines de liaison aux phospholipides qui activent l'agrégation et la fusion membranaire des vésicules lorsqu'exposées à des concentrations élevées de calcium<sup>598</sup>. Plusieurs annexines exprimées chez les neutrophiles, dont l'annexine I et XI ainsi que la lipocortine III, ont la capacité de moduler les processus calcium-dépendants de fusion membranaire des granules et des vésicules *in vitro*<sup>599-601</sup>. Le calcium est également capable par lui-même d'initier la dégranulation, régulant les interactions entre les récepteurs des

SNAP, les SNARE<sup>602</sup>. Ces récepteurs font partie d'un complexe protéique ubiquitaire impliqué dans la formation et le bourgeonnement des vésicules. Ce complexe est composé par les protéines SNARE, classifiées en protéines vésicules-spécifiques (v-SNARE) ou ciblées à la membrane (t-SNARE), par le facteur soluble sensible au N-éthylmaléimide (NSF) et par les protéines solubles de liaison au NSF (SNAP). Les vésicules ou granules destinés à l'exocytose fusionnent avec la membrane extracellulaire lorsque les v-SNARE forment un complexe avec les t-SNARE, par un processus impliquant le NSF, SNAP et le calcium intracellulaire ainsi que les protéines liées au calcium<sup>602</sup>. Plusieurs protéines SNARE ont été caractérisées dans les neutrophiles, telles la protéine membranaire associée aux vésicules-2 (VAMP-2) et la protéine membranaire de transport sécrétoire (SCAMP), qui sont exprimés à la surface membranaire des vésicules sécrétoires, et des granules spécifiques et tertiaires<sup>603</sup>. De plus, l'expression de la VAMP-2 au niveau des vésicules sécrétoires et des granules est proportionnelle avec leur propension à l'exocytose<sup>603</sup>.

### **1.5.3.6 Rôles de la dégranulation dans la réponse inflammatoire**

Le recrutement des neutrophiles dans les tissus inflammatoires est un processus rapide, s'étalant de quelques minutes à quelques heures, qui est essentiel pour la réponse inflammatoire aiguë lors de l'invasion de divers pathogènes. Cette étape est caractérisée par une coordination et une régulation précise de l'exocytose des granules et des vésicules sécrétoires. L'exocytose de ces vésicules provoque une transition rapide du nombre de récepteurs à la surface des neutrophiles, qui passe d'un nombre faible démontrant une incapacité de répondre aux stimuli des médiateurs inflammatoires à un nombre élevé, ce qui rend les neutrophiles hautement réceptifs aux nombreux médiateurs grâce à la fusion des vésicules sécrétoires avec la membrane extracellulaire, exposant ainsi les nombreux récepteurs à sa surface<sup>512, 516, 523, 585, 604</sup>. Suite à leur activation par les médiateurs inflammatoires, les CE adjacentes au site inflammatoire induisent la translocation de la P-sélectine à partir des corps de Weibel-Palade sur la membrane extracellulaire<sup>605</sup>. La P-sélectine est ensuite liée par le récepteur à haute affinité PSGL-1 exprimé à la surface des neutrophiles, ce qui permet le roulement de ces derniers sur l'endothélium<sup>606</sup>. La stimulation des CE avec

des cytokines induit également une augmentation de l'expression de la E-sélectine, des ligands de la L-sélectine et de la synthèse d'agents proinflammatoires comme le PAF et l'IL-8<sup>607-610</sup>. L'interaction des neutrophiles avec les CE activées déclenche l'exocytose des vésicules sécrétoires par les neutrophiles<sup>589</sup>, induisant l'expression de la  $\beta$ 2-intégrine (CD11b/CD18) à la surface membranaire et le « shedding » de la L-sélectine<sup>536, 589</sup>. La  $\beta$ 2-intégrine membranaire a la capacité de se lier à l'ICAM-1, ce qui provoque l'adhésion des neutrophiles aux CE, ainsi que l'initiation de leur transmigration vers les tissus inflammatoires<sup>611</sup>. Le contenu de l'exocytose des vésicules sécrétoires n'est pas cytotoxique, puisqu'il provient du cytosol des neutrophiles<sup>513</sup>, tandis que l'exocytose des granules tertiaires relâche les métalloprotéases, qui induisent la dégradation de la membrane basale vasculaire, permettant ainsi l'extravasation des neutrophiles<sup>612</sup>. Toutefois, ce n'est que lors de la migration des neutrophiles vers les tissus interstitiels que l'exocytose partielle des granules spécifiques et azurophiles a été observée<sup>516</sup>, induisant la mobilisation des récepteurs pour les composantes de la MEC<sup>613</sup> et libérant des enzymes de dégradation de la matrice supplémentaires, telles la collagénase et les sérines-protéases, qui vont faciliter la migration cellulaire. Lorsque les neutrophiles rencontrent des bactéries dans les tissus infectés, ils activent leur système antimicrobien en induisant la relâche des granules spécifiques et azurophiles vers le phagosome ou dans le milieu extracellulaire<sup>537</sup>. La diversité du contenu des granules et des vésicules permet aux neutrophiles de cibler et attaquer les bactéries en employant différents moyens, comme la fragmentation de la membrane bactérienne<sup>546, 552, 561, 571, 614</sup>, l'inhibition des voies métaboliques bactériennes dépendantes du fer<sup>559, 568, 575</sup> et la génération d'espèces réactives oxygénées (ROS)<sup>542</sup>. De plus, certaines molécules contenues dans les granules peuvent également induire la chimiotaxie des cellules T CD4+ et CD8+<sup>547, 549, 615</sup>. Ces actions amplifient la réponse inflammatoire et créent un pont entre l'immunité innée et adaptative.

## 1.6 Thèmes de recherche

L'inflammation est impliquée dans la majorité des pathologies connues jusqu'à ce jour. De plus, la morbidité et la mortalité associées avec les maladies cardiovasculaires et le cancer engendrent des coûts très élevés à notre société, en plus d'être les pathologies les plus répandues. Depuis plus d'une décennie, suite à la découverte de nouvelles molécules jouant un rôle dans l'inflammation et l'angiogenèse, soit les angiopoïétines, plusieurs groupes de recherche tentent d'élucider les mécanismes par lesquels ces agents induisent des effets néfastes, tant à la naissance que durant le maintien de ces pathologies. Notre laboratoire a concentré ses recherches sur le rôle des angiopoïétines dans l'homéostasie vasculaire<sup>273, 274</sup> et plus récemment, dans la régulation des neutrophiles<sup>182, 183</sup>, qui sont reconnus pour participer à la réponse inflammatoire aiguë, et parfois, dans l'inflammation chronique<sup>616</sup>.

### 1.6.1 Hypothèse du premier projet de recherche

L'expression du récepteur des angiopoïétines, Tie2, a initialement été découverte à la surface des CE<sup>167</sup>. Toutefois, notre laboratoire a été le premier à démontrer son expression à la surface des neutrophiles, ainsi que sa capacité d'induire des activités biologiques proinflammatoires via sa liaison à l'Ang1 ou l'Ang2<sup>182, 183</sup>. Durant la même période de temps, d'autres groupes de recherche ont observé l'expression du récepteur Tie2 à la surface des monocytes, éosinophiles et neutrophiles, accompagnée par une induction d'activités inflammatoires suite à son activation par l'Ang1 et l'Ang2<sup>276, 617, 618</sup>. L'angiopoïétine-1 est majoritairement localisée dans les cellules de la paroi vasculaire (péricytes, CML), les plaquettes et certaines cellules tumorales, alors que l'Ang2 est généralement retrouvée à l'intérieur des CE<sup>137, 319, 619, 620</sup>. Les neutrophiles synthétisent et relâchent également des agents proinflammatoires, tels l'IL-8 et le VEGF, exprimant également leurs récepteurs respectifs sur leur membrane extracellulaire qui peuvent être activés de manière autocrine par ces cytokines<sup>621-624</sup>. Par conséquent, le but de notre première étude était de déterminer la présence de l'Ang1 et/ou l'Ang2 dans les neutrophiles, leur



localisation intracellulaire, ainsi que leur capacité d'être relâchées par différents stimuli.

### **1.6.2 Hypothèse du deuxième projet de recherche**

La migration cellulaire joue un rôle primordial dans la réponse inflammatoire puisqu'elle permet l'infiltration des leucocytes (neutrophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes) au site de l'inflammation, ce qui induit ultimement sa résorption ou son amplification. Il existe plusieurs agents proinflammatoires ayant la capacité d'induire la chimiotaxie, tels le VEGF, le fMLP et l'IL-8. Lors d'une étude effectuée dans notre laboratoire, nous avons démontré la capacité des angiopoïétines à induire la chimiotaxie des neutrophiles<sup>182</sup>. De plus, la migration des neutrophiles induite par l'IL-8 a été potentialisée par un prétraitement des neutrophiles avec l'Ang1 ou l'Ang2. Étant donné que les neutrophiles sont capables de synthétiser et relâcher l'IL-8 suite à des stimuli proinflammatoires, nous avons voulu déterminer la capacité des angiopoïétines à induire la synthèse et/ou la relâche de l'IL-8 dans les neutrophiles humains circulants, ainsi que les mécanismes impliqués dans ces processus.

## **2.0 Article #1**

Neagoe, P.E., A. Brkovic, F. Hajjar, and M.G. Sirois, *Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms*. Growth Factors, 2009. 27(6): p. 335-44.

**Expression and release of angiotensin-1 from human neutrophils:  
intracellular mechanisms**

PAUL-EDUARD NEAGOE, ALEXANDRE BRKOVIC, FADI HAJJAR  
and MARTIN G. SIROIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, Department of Pharmacology,  
Université de Montréal, Montreal (QC), Canada

Running title : Expression of Ang1 in neutrophils

## 2.1 ABSTRACT

We recently demonstrated that Tie2 receptor activation on human neutrophils by both angiopoietins (Ang1 and Ang2) promoted platelet-activating factor synthesis,  $\beta_2$ -integrin activation, and cell migration. Herein, we wanted to assess if human neutrophils express angiopoietins and further delineate their mechanisms of release. Employing RT-PCR, RT-qPCR, FACScan analysis and ELISA approaches, we observed that neutrophils express Ang1 but not Ang2. For each condition, VEGF detection was performed as positive control. Using nitrogen cavitation, we observed that Ang1 is localized in the cytosolic fraction whereas VEGF is found in  $\beta$ -granules. Treatment of neutrophils with PMA, fMLP and TNF- $\alpha$  induced VEGF release. Maximal effect was observed with PMA (80 nM) stimulation inducing a complete release of VEGF content ( $565 \pm 100$  pg/ml;  $6 \times 10^6$  neutrophils), corresponding to a 18.9-fold increase as compared to PBS-treated neutrophils. By contrast, only a treatment with PMA (80 nM) induced Ang1 release. PMA treatment induced also a complete release of Ang1 ( $661 \pm 148$  pg/ml;  $6 \times 10^6$  neutrophils), corresponding to 2.8-fold increase as compared to PBS-treated neutrophils. In both cases, PMA-mediated release of VEGF and Ang1 was nearly maximal by 15 minutes. Finally, we observed that the induction of Ang1 release was calcium-independent whereas VEGF release was not. These data demonstrate the capacity of human neutrophils to synthesize Ang1, which is stored and released differently as compared to VEGF. These data suggest a different cascade of events regarding the distribution of selected growth factors during inflammation and angiogenesis.

**Keywords:** Human, neutrophils, cytokines, cell activation, inflammation

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

## 2.2 INTRODUCTION

Recent discoveries including the identification and characterization of selective vascular growth factors capable of supporting blood vessel growth, led to high therapeutic expectations (Carmeliet 2000; Jones and al. 2001; Yancopoulos and al. 2000). At the same time, these angiogenic growth factors, their corresponding receptors and cell signaling events may serve as targets for preventing vessel growth in diseases plagued by pathological angiogenesis (Carmeliet 2000; Carmeliet 2003; Carmeliet and Jain 2000; Folkman 2002; Jones and al. 2001; Kerbel and Folkman 2002; Tait and Jones 2004). Because of its promising proangiogenic activities, the use of vascular endothelial growth factor (VEGF) led to several preclinical and clinical trials. However, in most if not all studies, the new vessels were highly permeable, failed to mature properly and ultimately regressed (Carmeliet 2000; Carmeliet and Jain 2000; de Muinck and Simons 2004; Dor and al. 2002; Jones and al. 2001; Shyu and al. 2003; Yancopoulos and al. 2000). The discovery of a novel class of endothelial cell-specific ligands termed angiopoietins (Ang1 and Ang2) led to new promising expectations in vessel stability and maturation. Namely, Ang1 has been characterized as a Tie2 agonist, promoting the maturation of unstable vessels in the presence of VEGF (Thurston and al. 1999). On the other hand, Ang2 was initially described as a natural endogenous Tie2 antagonist, thereby destabilizing existing vessels prior to VEGF-induced angiogenesis (Maisonpierre and al. 1997). However, recent findings indicate that Ang2 may behave as Tie2 agonist (Brkovic and al. 2007; Maliba and al. 2008; Maliba and al. 2006; Mochizuki and al. 2002; Teichert-Kuliszewska and al. 2001), and thus, complicating the simplistic interpretation of

how the spatiotemporal regulation of VEGF and angiopoietins might regulate the formation and the maturation of neovessels.

Inflammation precedes and accompanies angiogenesis as evidenced by increased vascular permeability, as well as macrophage and neutrophil recruitment at angiogenic sites. Since angiopoietins act in concert with VEGF during neovascularization (Brkovic and al. 2007; Davis and al. 1996; de Muinck and Simons 2004; Dor and al. 2002; Senger and al. 1983; Shalaby and al. 1995; Shyu and al. 2003; Suri and al. 1998; Tait and Jones 2004) we initiated studies to assess the proinflammatory potential of Ang1 and Ang2. Namely, we report that Ang1 and Ang2, acting upon endothelial Tie2 receptors activation, can induce platelet activating factor (PAF) synthesis and P-selectin translocation, which support neutrophil adhesion to activated endothelial cells (ECs) (Lemieux and al. 2005; Maliba and al. 2008; Maliba and al. 2006).

Although Tie2 is considered as an endothelial-specific receptor, it has also been reported to be expressed in endothelial precursor cells and hematopoietic stem cells (Shaw and al. 2004). Work from our laboratory demonstrated for the first time Tie2 expression on the surface of human neutrophils, and its activation by Ang1 and Ang2 led to PAF synthesis, a rapid functional upregulation of  $\beta_2$ -integrin complex (CD11/CD18) and neutrophil adhesiveness (Lemieux and al. 2005). More recently, we demonstrated that both angiopoietins mediate neutrophil migration through phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) activation (Brkovic and al. 2007). Meanwhile, independent groups reported the expression of Tie2 on neutrophils, eosinophils and monocytes, and the capacity of Tie2 to mediate proinflammatory activities upon

activation by either Ang1 and/or Ang2 (Feistritzer and al. 2004; Murdoch and al. 2007; Sturn and al. 2005).

Other studies reported that VEGF and Ang2 are constitutively expressed in ECs and released upon stimulation by various agonists, whereas the expression of Ang1 has been detected in non-endothelial cells such as perivascular smooth muscle cells, pericytes, platelets and various tumor cells (Hayes and al. 2000; Li and al. 2001; Nishishita and Lin 2004; Stratmann and al. 1998; Sundberg and al. 2002). In addition, ECs do express corresponding receptors, thus, providing the capacity to VEGF and Ang2 to promote autocrine activities.

Previous studies have reported that neutrophils have intracellular pools of VEGF which can be released upon stimulation with proinflammatory mediators (Gaudry and al. 1997) and that VEGF can mediate neutrophil migration through the activation of VEGFR-1 (Ancelin and al. 2004). Since we observed that both angiopoietins can activate Tie2 expressed on neutrophils and mediate proinflammatory activities, we then examined whether angiopoietins are expressed in neutrophils, and subsequently, their subcellular localization and the underlying mechanisms implicated in angiopoietins release.



## 2.3 MATERIAL AND METHODS

*Neutrophil isolation and purification:* Venous blood was obtained from healthy donors free from medication for at least 10 days prior to the experiments and in accordance with the guidelines of the Montreal Heart Institute's ethical committee. Neutrophils were isolated as described previously (Brkovic and al. 2007). Ninety-eight percent of the isolated cells were polymorphonuclear cells, as determined with a Coulter counter, and viability was found to be greater than 98%, as assessed by Trypan blue dye exclusion assay.

*Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses:* Total RNAs were obtained from neutrophils ( $2 \times 10^7$ /ml) by using RNeasy extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). One microgram of RNAs was reverse transcribed using random hexamers and the Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) as described by the manufacturer. PCR reactions were performed as follows: cDNA were denatured (94°C for 5 minutes), submitted to 27 cycles of amplification for Ang1, Ang2 (94°C for 30 seconds, 51°C for 30 seconds, and 68°C for 30 seconds) and to 37 cycles of amplification, for VEGF (94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds). Primers were used to amplify a 256-base pair (bp) fragment of Ang1 cDNA (GenBank no. NM\_001146; forward: 5'-GATGGCAACTGTCGTGAGAG-3', and reverse: 5'-AGAGGAGGCTGGTTCCTATC-3'), Ang2 cDNA (GenBank no. NM\_001147; forward: 5'-GCAGCAACATGATCTCAT-GG-3' and reverse: 5'-CATCCTCACGTCGCTGAATA-3'), VEGF cDNA (GenBank no. DQ229900;

forward: 5'-GCCTTGCCTTGCTGCTCTAC-3' and reverse: 5'-CCTATGT-GCTGGCCTTGGTG-3') and GAPDH cDNA as positive control (forward: 5'-GGAGT-CCACTGGCGTCTTCA -3' and reverse: 5'-AGCAGTTGGTGGTGCAGGAG-3').

*Real time quantitative transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses:*

Total RNAs isolated from above were for RT-qPCR experiments. The expression levels of genes of interest were determined using a Brilliant SYBR Green qPCR master mix (Invitrogen) and a Mx3000P real-time PCR system (Stratagene). Primers were used to amplify a 208-base pair (bp) fragment of VEGF cDNA (GenBank no. DQ229900; forward: 5'-TCAGCGCAGCTACTGCCATC -3' and reverse: 5'-GTGCTGGCCTTGGTGAGGTT -3'), 256 bp fragment of Ang1 cDNA (GenBank no. NM\_001146; forward: 5'-GATGGCAACTGTCGTGAGAG -3', and reverse: 5'-AGAGGAGGCTGGTTCCTATC -3') and 220 bp fragment of Ang2 cDNA (GenBank no. NM\_001147; forward: 5'-CAGCATCAGCCAACCAGGAA -3', and reverse: 5'-TGTGGCCTTGAGCGAATAGC -3'). HUVEC were used as a positive control for the quantification of Ang2 mRNA. To confirm the specificity of the PCR products, the melting profile of each sample was determined by heating from 55°C to 95°C while measuring the fluorescence emitted. Analysis of the melting curve showed that each pair of primers amplified a single product. Each run consisted of an initial denaturation time of 10 min at 95°C and 50 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 60 s, and 72°C for 60 s. Absolute quantification for each gene was determined from a standard curve using a serial dilution of specific amplicon (cDNA) from  $10^6$  to  $10^3$

copies. One nanogram (1 ng) of total RNA was used for all samples. Efficiencies of generated standard curves were between 90% and 100%.

*FACS analysis:* Neutrophils ( $10^7$  cells/ml) were rinsed and resuspended in PBS, normal sheep IgG (5  $\mu$ g/ml) was added and the cells incubated for 30 minutes at 4°C in order to prevent nonspecific binding via FcRs. Cells were rinsed and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes at 4°C. Neutrophils were rinsed and permeabilized in the Perm/Wash buffer of the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, Mississauga, ON) for 15 minutes at 4°C. The cells were then incubated with rabbit polyclonal anti-human VEGF IgG (10-20  $\mu$ g/ml), goat polyclonal anti-human Ang1 IgG (10-20  $\mu$ g/ml), goat polyclonal anti-human Ang2 IgG (10-20  $\mu$ g/ml) and with rabbit or goat IgG isotype controls (10-20  $\mu$ g/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 30 minutes at 4°C. Following additional rinses, neutrophils were incubated with secondary donkey anti-goat, FITC-conjugated IgG (1:600) or goat anti-rabbit FITC-conjugated IgG (1:200). Cells were rinsed and resuspended in Perm/Wash buffer. Flow cytometric analysis (10 000 events) was performed using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

*Subcellular fractionation:* Since VEGF is known to be stored and released from specific granules (Gaudry and al. 1997), we wanted to assess the localization of Ang1 in neutrophils. Azurophilic, specific and secretory granules were purified as previously described (Gaudry and al. 1997; Kjeldsen and al. 1999). Specifically, purified neutrophils ( $2.5 \times 10^8$ /10 ml of relaxation buffer; 100 mM KCl, 3 mM NaCl,

1 mM ATPNa<sub>2</sub>, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Piperazine N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid], pH 7.2 containing 0.5 mM PMSF) were pressurized under nitrogen for 20 minutes at 450 psi with constant stirring in a nitrogen bomb (Parr Instrument, Moline, IL). The cavitate was then collected into a PBS-EGTA (150 mM) solution to a final concentration of 1.5 mM. Nuclei and unbroken cells were pelleted by centrifugation of the cavitate. The supernatant was decanted, loaded on Percoll gradients and spun at 4°C for 20 minutes at 37 000 g. Percoll was removed from pooled fractions by centrifugation at 100 000 g for 60 minutes at 4°C. The cavitate, azurophilic, specific and secretory fractions were further incubated with 1% Triton for 60 minutes on a shaker, thus releasing the contents of the aforementioned granules. The fractions were centrifuged at 15 000 g for 10 minutes and the supernatant stored at -80°C for further quantification of Ang1 and VEGF.

*Quantification of VEGF, Ang1 and Ang2 in neutrophils by ELISA:* To assess total VEGF, Ang1 and Ang2 cell content, neutrophils were disrupted by pulse sonication with a Vibra Cell™ (Sonics and Materials Inc, St Louis, MO) set at 35% amplitude for 4 cycles of 15 seconds each. The homogenates were centrifuged at 15 000 g for 10 minutes at 4°C. Supernatants were stored at -80°C for further VEGF, Ang1 and Ang2 quantification by ELISA development kits (R&D Systems, Minneapolis, MN), accordingly to manufacturer's instructions and performed on high-binding specific Immulon® 4 HBX 96-well plates.

*Neutrophil culture and stimulation:* Purified neutrophils were cultured in 24-well plates without extracellular matrix coating as previously described (Gaudry and al. 1997). Briefly, neutrophils ( $6 \times 10^6$ /ml) were incubated in RPMI-1640 (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) supplemented with 5% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Etobicoke, ON), 1% penicillin/streptomycin/GlutaMAX (GIBCO, Grand Island, NY) and 25 mM HEPES (Sigma, Oakville, ON) and stimulated from 15 to 240 minutes with phorbol myristate acetate (PMA), N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), interleukin-8 (IL-8), Ang1 and Ang2 (R&D Systems), VEGF (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ), or tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ; Cedarlane Laboratories, Burlington, ON) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. In another set of experiments, neutrophils ( $6 \times 10^6$ /ml) were pretreated either with a calcium chelator (BAPTA-AM; Calbiochem, La Jolla, CA) or with pentoxifyllin ((3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthine); PTX, Sigma), an inhibitor of neutrophil degranulation for 30 minutes prior to PMA stimulation as described above. Upon neutrophil stimulation, supernatants were centrifuged at 900 g for 7 minutes at 4°C, and stored at -80°C for VEGF and Ang1 quantification by ELISA as detailed above.

*Statistics:* Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM. A paired Student t-test was performed and differences were considered significant at P values less than .05.

## 2.4 RESULTS

*Expression of angiopoietins and VEGF in human neutrophils.* In order to investigate the expression of angiopoietins in neutrophils, we performed a RT-PCR assay showing Ang1 but not Ang2 mRNA expression (Figure 1A). To confirm that the absence of Ang2 mRNA detection in neutrophils was not due to inadequate experimental conditions, we performed the same experiment under the same conditions in HUVEC and detected Ang2 mRNA (Figure 1A), as previously reported (Hegen and al. 2004). An RT-PCR assay to detect VEGF mRNA in neutrophils was also performed as a positive control (Figure 1A). The specificity of the PCR reaction was further validated by sequencing the Ang1 product amplified in the neutrophils (data not shown).

We then quantified Ang1, Ang2 and VEGF mRNA expression in neutrophils by determining their respective number of mRNA copies. The copy number for Ang1 and VEGF mRNA was  $52\,500 \pm 6500$  and  $678\,000 \pm 110\,000$  respectively. We could not detect Ang2 mRNA. To insure the specificity of Ang2 primers, we performed a RT-qPCR under the same conditions, using mRNAs from HUVEC, and detected  $440\,000 \pm 68\,000$  copies of Ang2 mRNA (Figure 1B).

We then performed FACS analysis on a population of purified polymorphonuclear cells containing over 98% neutrophils to assess Ang1, Ang2 and VEGF protein expression. In the FACS analysis, whole permeabilized neutrophils from various donors stained positively with a primary human Ang1 IgG (10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ) / secondary FITC-coupled IgG complex, and human VEGF IgG (10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ) / secondary FITC-coupled IgG complex (positive control), providing a right

shift of fluorescein detection as compared to equivalent concentration of control isotypic IgG (Figure 2). By contrast, the neutrophils from these donors stained negatively with a primary human Ang2 IgG (10 and 20  $\mu\text{g/ml}$ ) / secondary FITC-coupled IgG complex (Figure 2).

*Quantification, localization and mechanisms regulating VEGF and Ang1 release:*

Stimulation of neutrophils by agonists can promote the release of numerous inflammatory mediators, including IL-8, TNF- $\alpha$  and VEGF. The secretion of the latter from human neutrophils was shown to be induced by agonists such as PMA, TNF- $\alpha$  and fMLP (Gaudry and al. 1997). As our current data demonstrate the presence of Ang1 in neutrophils, we assessed the capacity of these agonists to induce Ang1 release and VEGF (as positive control) from neutrophils. In resting neutrophils ( $6 \times 10^6/\text{ml}$ ), basal levels of Ang1 and VEGF release did not fluctuate significantly from 0 to 120 minutes. The basal levels of Ang1 and VEGF at 15 minutes were  $153 \pm 35$  pg/ml and  $24 \pm 8$  pg/ml respectively (Figure 3A and B). Treatment of neutrophils with PMA (80 nM) (Gaudry and al. 1997) induced a rapid and sustained release of Ang1 and VEGF. Ang1 release was nearly maximal within 15 minutes and reached a 2.8-fold increase at 60 minutes post-treatment as compared to control PBS-treated neutrophils (Figure 3A). Similarly, PMA induced a rapid VEGF release which was maximal within 30 minutes post-treatment and corresponding to 18.9-fold increase as compared to its own control-PBS treated cells (Figure 3B). In addition, by performing neutrophil sonication, which leads to complete disruption of the cell membrane and intracellular granules, we observed that PMA treatment provided an

almost complete depletion (>98%) of Ang1 and VEGF from the neutrophils (data not shown). Using the same sonication approach, we did not detect Ang2 protein in neutrophil exudates (data not shown).

It has previously been reported that VEGF is predominantly stored in the specific granules ( $\beta$ -granules) of the neutrophils (Gaudry and al. 1997). In addition, fMLP and TNF- $\alpha$  are known to be weak secretagogues of neutrophil specific granules (Faurischou and Borregaard 2003; Klebanoff and al. 1986; Richter and al. 1989). As previously reported (Gaudry and al. 1997), treatment with fMLP (10 nM) or TNF- $\alpha$  (10 nM) induced a rapid (maximal within 60 minutes) but partial release of VEGF that was increased by 3.1- and 3.9-fold respectively as compared to control PBS levels. However, similar treatment with fMLP or TNF- $\alpha$  did not promote the release of Ang1 (Figure 3A and B).

We have previously reported that Ang1 and Ang2 potentiated CXC8/IL-8 chemotactic activities in neutrophils (Brkovic and al. 2007). Thus, we assessed the capacity of IL-8 to induce Ang1 and VEGF release from neutrophils. IL-8 (10 nM) (Brkovic and al. 2007) did not promote the release of either Ang1 or VEGF (Figure 3A and B). In addition, we assessed the capacity of VEGF and Ang2 (0.1, 1 and 10 nM) to promote Ang1 release and the capacity of both angiopoietins (Ang1, Ang2; 0.1, 1 and 10 nM) to promote VEGF release. We did not detect Ang1 or VEGF release under these conditions (data not shown).

Depending upon the agonists used, our data demonstrate a different releasing pattern between VEGF and Ang1, suggesting a possible difference in their subcellular localization in neutrophils. For instance, it has been reported that VEGF is



predominantly stored in  $\beta$ -granules (specific granules), with minor amounts detected in either  $\alpha$ - and  $\gamma$ -granules (azurophilic and secretory granules) or in the cytosolic fraction (Gaudry and al. 1997) thus, its localization in the current study was used as a comparative positive control. Briefly, using the nitrogen cavitation technique, neutrophils ( $2.5 \times 10^8$ ) were pressurized to provide extracellular membrane disruption, keeping nuclei and granules intact (Chibber and Castle 1983). The contents of VEGF and Ang1 from the purified cavitate, the cytosolic and the  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -granule fractions were extracted using 1% Triton X-100 and quantified by ELISA. As shown previously, VEGF was mainly recovered from the specific granules (63.1%) (Gaudry and al. 1997). However, we observed that Ang1 was almost exclusively localized in the cytosolic fraction (91.3%), with minor levels being detected in  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -granules (Figure 4A and B).

To confirm that Ang1 localized to the cytosolic fraction whereas VEGF was in  $\beta$ -granules, we pretreated neutrophils with Pentoxifylline, a well known inhibitor of degranulation (Currie and al. 1990). Pretreatment of neutrophils with Pentoxifylline (500  $\mu$ M) (Gaudry and al. 1997), 30 minutes prior to stimulation with PMA (80 nM) from 15 to 120 minutes reduced VEGF release by up to 78% (Figure 5B). Pentoxifylline did not interfere with Ang1 release (Figure 5A).

Neutrophil degranulation requires an increase in intracellular calcium. Since Ang1 appears to be localized in the cytosol and inhibition of neutrophil degranulation does not affect its release, we thus wanted to determine if its exocytosis is calcium dependent. Neutrophils were pretreated with a cell-permeable calcium chelator (BAPTA-AM; 50  $\mu$ M) 30 minutes prior to stimulation with PMA (80 nM).

Pretreatment with BAPTA-AM reduced PMA-mediated VEGF release by 75 to 88% (Figure 6B), whereas Ang1 release was unaffected (Figure 6A).

## 2.5 DISCUSSION

In the current study, we examined the expression of angiopoietins and VEGF in human neutrophils. Our data highlight the novel observation that Ang1 is expressed in human neutrophils and stored almost exclusively in the cytosolic fraction. By contrast, VEGF was predominantly located in the specific ( $\beta$ )-granules (Gaudry and al. 1997). Using selective agonists, we observed a differential display in the capacity of neutrophils to promote Ang1 and VEGF secretion. Finally, we observed that Ang2 is not expressed in human neutrophils.

The finding that neutrophils constitutively express Ang1 but not Ang2, whereas endothelial cells express Ang2 but not Ang1 and that both angiopoietins can be rapidly secreted upon specific stimulation provides novel insight regarding the complexity of the interactions between neutrophils and endothelial cells. The observation that Ang1 is selectively localized in the cytosol whereas VEGF is localized in the specific ( $\beta$ )-granules is not unique. Other studies reported the localization of proteins and growth factors in the cytosol, independently from granule subsets in neutrophils and other cell types, and that these proteins can be secreted upon cell stimulation by selective agonists (Renko and al. 1990; Sallenave and al. 1997). To further support our current observation regarding the localization of Ang1 in the cytosol and VEGF in the specific ( $\beta$ )-granules, neutrophils were pretreated with a selective degranulation inhibitor (Pentoxifylline), which prevented PMA-mediated VEGF release, without interfering with Ang1 secretion. Finally, using an extra- and intracellular calcium chelator, we observed that the release of Ang1 was calcium-

independent as opposed to VEGF-exocytosis. This latter observation is in agreement with the requirement of an increase of intracellular calcium to facilitate the degranulation process (Sengelov and al. 1993). By contrast, Ang1 is localized in the cytosol, independent of neutrophil granule subsets, and its release is apparently calcium independent. Interestingly, only PMA, which is well established to promote a powerful release of intracellular neutrophil contents (Wright and al. 1977) has been able to induce Ang1 release. Treatment with various agonists including TNF- $\alpha$ , LPS, IL-8, PAF, thrombin and histamine which are known to promote partial or complete degranulation and release of proteins from neutrophils (Baranes and al. 1986; Gaudry and al. 1997; O'Flaherty 1985; Seligmann and al. 1983; Shen and al. 2007) were unable to promote Ang1 release. This latter observation suggests that the release of proteins stored in the cytosol might require the contribution of other physiological agonists, a selective environment or specific cell interactions, either under physiological or patho-physiological conditions, which remain to be identified.

For instance, neutrophils are involved in tissue injury associated with a number of inflammatory diseases including rheumatoid arthritis (Kitsis and Weissmann 1991), ischemia-reperfusion injury (Zimmerman and Granger 1994) and adult respiratory distress syndrome (Boxer and al. 1990). In addition, the expression of Ang1 and Tie2 are up regulated in inflammatory cells associated to rheumatoid arthritis (DeBusk and al. 2003), Tie2 receptors are also expressed on synovial lining cells, endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts in synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis (Makinde and Agrawal 2008; Takahara and al. 2004; Uchida and al. 2000), whereas in normal individuals, Tie2 expression is limited

to the capillary endothelium (Makinde and Agrawal 2008; Shahrara and al. 2002; Uchida and al. 2000). It was recently reported that Ang1 and matrix metalloproteinase-3 (MMP3) were strongly expressed at the invasive front of the active rheumatoid pannus extensively invading and degrading the cartilaginous matrix (Hashiramoto and al. 2007).

In addition to its expression in proinflammatory cells, Tie2 and both angiopoietins were observed in various tumor cell types (Kukk and al. 1997; Lee and al. 2006; Nakayama and al. 2005). There is also evidence of a direct correlation between Tie2 activation and upregulation of integrin  $\beta_1$ , the latter being directly involved in the escape of cancer cells from immune surveillance (Lee and al. 2006; Yasuda and al. 2001). Work from our laboratory demonstrated the capacity of both angiopoietins to promote endothelial P-selectin translocation and a rapid functional upregulation of neutrophil  $\beta_2$ -integrin complex (CD11/CD18), which together contribute to increased neutrophil adhesiveness to activated endothelial cells (Lemieux and al. 2005; Maliba and al. 2008). By modulating the adhesive properties of endothelial, inflammatory and tumor cells, the autocrine and/or paracrine interaction between Ang1/Ang2 and Tie2 can contribute to tumor angiogenesis and metastasis and other diseases associated with pathological angiogenesis (Hu and al. 2006; Makinde and Agrawal 2008).

In conclusion, neutrophils represent a constitutive pool of Ang1 which can be rapidly released upon selective stimulation whereas endothelial cells provide a complementary pool of Ang2. Thus, the capacity of both cell types to selectively synthesize and release selectively the angiopoietins may support interweaving

biological activities during the interaction process between neutrophils and endothelial cells.

## 2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

**Grant Support:** This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-43919) and from the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr. Sirois. Mr. Neagoe is recipient of Ph.D. studentship from the CIHR, Dr. Sirois is recipient of a senior scientist scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ).

## 2.7 REFERENCES

- Ancelin M, Chollet-Martin S, Herve MA, Legrand C, El Benna J, Perrot-Applanat M. 2004. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest* 84(4):502-12.
- Baranes D, Matzner J, Razin E. 1986. Thrombin-induced calcium-independent degranulation of human neutrophils. *Inflammation* 10(4):455-61.
- Boxer LA, Axtell R, Suchard S. 1990. The role of the neutrophil in inflammatory diseases of the lung. *Blood Cells* 16(1):25-40; discussion 41-2.
- Brkovic A, Pelletier M, Girard D, Sirois MG. 2007. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *J Leukoc Biol* 81(4):1093-101.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(4):389-95.
- Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9(6):653-60.
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801):249-57.
- Chibber R, Castle AG. 1983. Subcellular fractionation of porcine neutrophils by nitrogen cavitation and sucrose-density-gradient centrifugation. *Eur J Biochem* 136(2):383-9.
- Currie MS, Rao KM, Padmanabhan J, Jones A, Crawford J, Cohen HJ. 1990. Stimulus-specific effects of pentoxifylline on neutrophil CR3 expression, degranulation, and superoxide production. *J Leukoc Biol* 47(3):244-50.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87(7):1161-9.
- de Muinck ED, Simons M. 2004. Re-evaluating therapeutic neovascularization. *J Mol Cell Cardiol* 36(1):25-32.



- DeBusk LM, Chen Y, Nishishita T, Chen J, Thomas JW, Lin PC. 2003. Tie2 receptor tyrosine kinase, a major mediator of tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(9):2461-71.
- Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E. 2002. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* 21(8):1939-47.
- Faurschou M, Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 5(14):1317-27.
- Feistritz C, Mosheimer BA, Sturn DH, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. 2004. Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 114(5):1077-84.
- Folkman J. 2002. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 29(6 Suppl 16):15-8.
- Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidal MA, Hakim J. 1997. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 90(10):4153-61.
- Hashiramoto A, Sakai C, Yoshida K, Tsumiyama K, Miura Y, Shiozawa K, Nose M, Komai K, Shiozawa S. 2007. Angiopoietin 1 directly induces destruction of the rheumatoid joint by cooperative, but independent, signaling via ERK/MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *Arthritis Rheum* 56(7):2170-9.
- Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Kern FG, Lippman ME, McLeskey SW, Li LY. 2000. Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 83(9):1154-60.
- Hegen A, Koidl S, Weindel K, Marme D, Augustin HG, Fiedler U. 2004. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(10):1803-9.
- Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, Imanishi Y, Schlaepfer DD, Cheng SY. 2006. Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the alphavbeta1 integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. *Cancer Res* 66(2):775-83.

- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. 2001. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4):257-67.
- Kerbel R, Folkman J. 2002. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2(10):727-39.
- Kitsis E, Weissmann G. 1991. The role of the neutrophil in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res*(265):63-72.
- Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. 1999. Subcellular fractionation of human neutrophils on Percoll density gradients. *J Immunol Methods* 232(1-2):131-43.
- Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. 1986. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 136(11):4220-5.
- Kukk E, Wartiovaara U, Gunji Y, Kaukonen J, Buhring HJ, Rappold I, Matikainen MT, Vihko P, Partanen J, Palotie A, Alitalo K, Alitalo R. 1997. Analysis of Tie receptor tyrosine kinase in haemopoietic progenitor and leukaemia cells. *Br J Haematol* 98(1):195-203.
- Lee OH, Xu J, Fueyo J, Fuller GN, Aldape KD, Alonso MM, Piao Y, Liu TJ, Lang FF, Bekele BN, Gomez-Manzano C. 2006. Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Mol Cancer Res* 4(12):915-26.
- Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. 2005. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 105(4):1523-30.
- Li JJ, Huang YQ, Basch R, Karparkin S. 2001. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost* 85(2):204-6.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277(5322):55-60.

- Makinde T, Agrawal DK. 2008. Intra and extra-vascular trans-membrane signaling of angiotensin-1-Tie2 receptor in health and disease. *J Cell Mol Med*.
- Maliba R, Brkovic A, Neagoe PE, Villeneuve LR, Sirois MG. 2008. Angiotensin-mediated endothelial P-selectin translocation: cell signaling mechanisms. *J Leukoc Biol* 83(2):352-60.
- Maliba R, Lapointe S, Neagoe PE, Brkovic A, Sirois MG. 2006. Angiotensins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways. *Cell Signal* 18(11):1947-57.
- Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. 2002. Angiotensin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci* 115(Pt 1):175-83.
- Murdoch C, Tazzyman S, Webster S, Lewis CE. 2007. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiotensin-2. *J Immunol* 178(11):7405-11.
- Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, Yoshizaki A, Yamazumi K, Niino D, Sekine I. 2005. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiotensins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol* 11(7):964-9.
- Nishishita T, Lin PC. 2004. Angiotensin 1, PDGF-B, and TGF-beta gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction. *J Cell Biochem* 91(3):584-93.
- O'Flaherty JT. 1985. Neutrophil degranulation: evidence pertaining to its mediation by the combined effects of leukotriene B<sub>4</sub>, platelet-activating factor, and 5-HETE. *J Cell Physiol* 122(2):229-39.
- Renko M, Quarto N, Morimoto T, Rifkin DB. 1990. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J Cell Physiol* 144(1):108-14.
- Richter J, Andersson T, Olsson I. 1989. Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J Immunol* 142(9):3199-205.

- Sallenne JM, Si Tahar M, Cox G, Chignard M, Gauldie J. 1997. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 61(6):695-702.
- Seligmann BE, Fletcher MP, Gallin JI. 1983. Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion, degranulation, and membrane potential changes. *J Immunol* 130(4):1902-9.
- Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N. 1993. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol* 150(4):1535-43.
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219(4587):983-5.
- Shahrara S, Volin MV, Connors MA, Haines GK, Koch AE. 2002. Differential expression of the angiogenic Tie receptor family in arthritic and normal synovial tissue. *Arthritis Res* 4(3):201-8.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376(6535):62-6.
- Shaw JP, Basch R, Shamamian P. 2004. Hematopoietic stem cells and endothelial cell precursors express Tie-2, CD31 and CD45. *Blood Cells Mol Dis* 32(1):168-75.
- Shen L, Smith JM, Shen Z, Eriksson M, Sentman C, Wira CR. 2007. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol* 149(1):155-61.
- Shyu KG, Chang H, Isner JM. 2003. Synergistic effect of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor on neoangiogenesis in hypercholesterolemic rabbit model with acute hindlimb ischemia. *Life Sci* 73(5):563-79.
- Stratmann A, Risau W, Plate KH. 1998. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 153(5):1459-66.

- Sturn DH, Feistritzer C, Mosheimer BA, Djanani A, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. 2005. Angiopoietin affects neutrophil migration. *Microcirculation* 12(5):393-403.
- Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF. 2002. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 82(4):387-401.
- Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. 1998. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282(5388):468-71.
- Tait CR, Jones PF. 2004. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol* 204(1):1-10.
- Takahara K, Iioka T, Furukawa K, Uchida T, Nakashima M, Tsukazaki T, Shindo H. 2004. Autocrine/paracrine role of the angiopoietin-1 and -2/Tie2 system in cell proliferation and chemotaxis of cultured fibroblastic synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Hum Pathol* 35(2):150-8.
- Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. 2001. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 49(3):659-70.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286(5449):2511-4.
- Uchida T, Nakashima M, Hirota Y, Miyazaki Y, Tsukazaki T, Shindo H. 2000. Immunohistochemical localisation of protein tyrosine kinase receptors Tie-1 and Tie-2 in synovial tissue of rheumatoid arthritis: correlation with angiogenesis and synovial proliferation. *Ann Rheum Dis* 59(8):607-14.
- Wright DG, Bralove DA, Gallin JI. 1977. The differential mobilization of human neutrophil granules. Effects of phorbol myristate acetate and ionophore A23187. *Am J Pathol* 87(2):237-84.

- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407(6801):242-8.
- Yasuda M, Tanaka Y, Tamura M, Fujii K, Sugaya M, So T, Takenoyama M, Yasumoto K. 2001. Stimulation of beta1 integrin down-regulates ICAM-1 expression and ICAM-1-dependent adhesion of lung cancer cells through focal adhesion kinase. *Cancer Res* 61(5):2022-30.
- Zimmerman BJ, Granger DN. 1994. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci* 307(4):284-92.

## 2.8 FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Expression and quantification of angiopoietins and VEGF mRNA in neutrophils.** Total RNAs were obtained from human neutrophils using RNeasy extraction kit. Primers were used to amplify Ang1, Ang2, VEGF and GAPDH mRNA fragments. Ang1 and VEGF mRNA was localized in neutrophils, whereas Ang2 mRNA was absent in neutrophils but present in HUVEC as positive control (A). The expression levels of aforementioned genes were determined by real-time quantitative PCR (B) using a standard curve of specific amplicons (cDNA) from  $10^3$  to  $10^6$  copies (N/D : Not detectable).

**Figure 2: Detection of Ang1, Ang2 and VEGF protein expression in neutrophils by FACS analysis.** Permeabilized neutrophils ( $10^7$  cells) were incubated with rabbit polyclonal anti-human VEGF IgG (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) (A) goat polyclonal Ang1 anti-human IgG (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) (B), goat polyclonal Ang2 anti-human IgG (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) (C) or with rabbit and goat IgG isotype controls (10-20  $\mu\text{g/ml}$ ) for 30 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . Neutrophils were then incubated with secondary donkey anti-goat FITC-conjugated IgG (1:600) or goat anti-rabbit FITC-conjugated IgG (1:200). Flow cytometric analysis (10 000 events) was performed using a FACScan.

**Figure 3: Agonists-mediated VEGF and Ang1 neutrophil secretion.** Neutrophils ( $6 \times 10^6$ ) were treated with various agonists (PMA 80 nM, fMLP 10 nM, TNF- $\alpha$  10 nM and IL-8 10 nM) for 15 to 120 minutes. VEGF and Ang1 release was measured in the supernatant by ELISA. The values were compared to corresponding control

PBS-treated cells. Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of experiments performed in triplicate. Statistical comparisons were performed by a paired Student t-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  as compared to PBS treated neutrophils.

**Figure 4: Localization of Ang1 and VEGF in neutrophils.** Neutrophils ( $2.5 \times 10^8$ ) were pressurized under nitrogen for 20 minutes at 450 psi with constant stirring in a nitrogen bomb. The cavitate was collected, nuclei and unbroken cells were pelleted by centrifugation of the cavitate. The supernatant was loaded on Percoll gradients and centrifuged in order to fractionate the azurophilic ( $\alpha$ ), specific ( $\beta$ ), secretory ( $\gamma$ )-granules and the cytosolic content. These fractions were lysed using 1% Triton-PBS solution for 60 minutes. Ang1 (A) and VEGF (B) protein content in each fraction was analyzed by ELISA. VEGF is mainly stored in the specific ( $\beta$ ) granules, whereas Ang1 is found in the cytosolic fraction of the neutrophils.

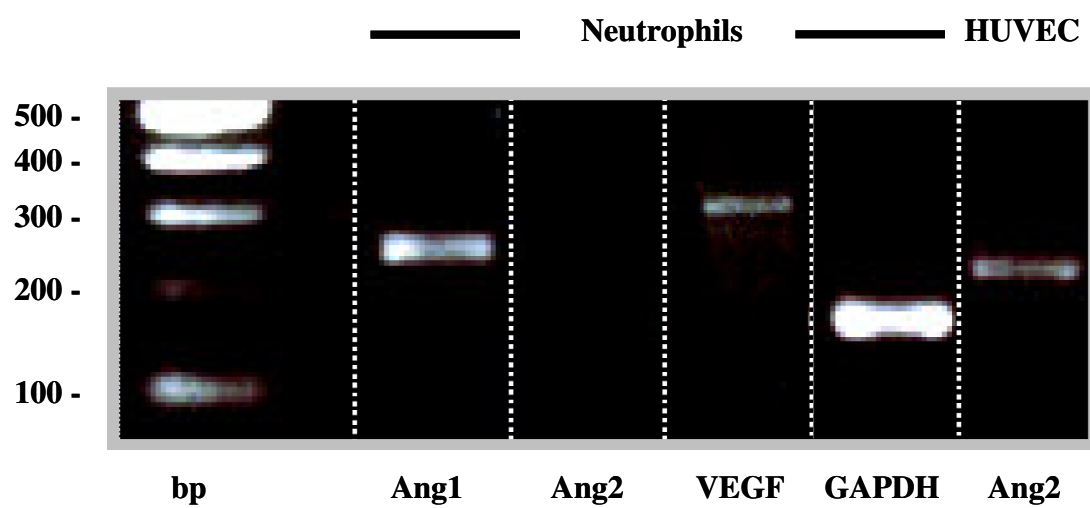
**Figure 5: Pentoxifylline inhibits VEGF but not Ang1 release from PMA-treated neutrophils.** Neutrophils ( $6 \times 10^6$  cells) were pretreated with a selective degranulation inhibitor (Pentoxifylline; 500  $\mu$ M) for 30 minutes prior to stimulation. Neutrophils were then stimulated with PMA (80 nM) for 15 to 120 minutes. Ang1 (A) and VEGF (B) release was measured in the supernatant by ELISA. Basal levels of Ang1 and VEGF release mediated by PBS after 15 minutes of stimulation were used as controls and the values set to one (1). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$



as compared to PBS treated neutrophils, <sup>†††</sup>p < 0.001 as compared to PMA-treated neutrophils.

**Figure 6: BAPTA-AM inhibits VEGF but not Ang1 release from PMA-treated neutrophils.** Neutrophils ( $6 \times 10^6$  cells) were pretreated with a cell-permeable calcium chelator (BAPTA-AM; 50  $\mu$ M) for 30 minutes prior to stimulation. Neutrophils were then stimulated with PMA (80 nM) for 15 to 120 minutes. Ang1 (A) and VEGF (B) release was measured in the supernatant by ELISA. Basal levels of Ang1 and VEGF release mediated by PBS after 15 minutes of stimulation were used as controls and the values set to one (1). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of experiments performed in triplicate. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 as compared to PBS treated neutrophils, <sup>†††</sup>p < 0.001 as compared to PMA-treated neutrophils.

## **2.9 FIGURES**

**Figure 1A**

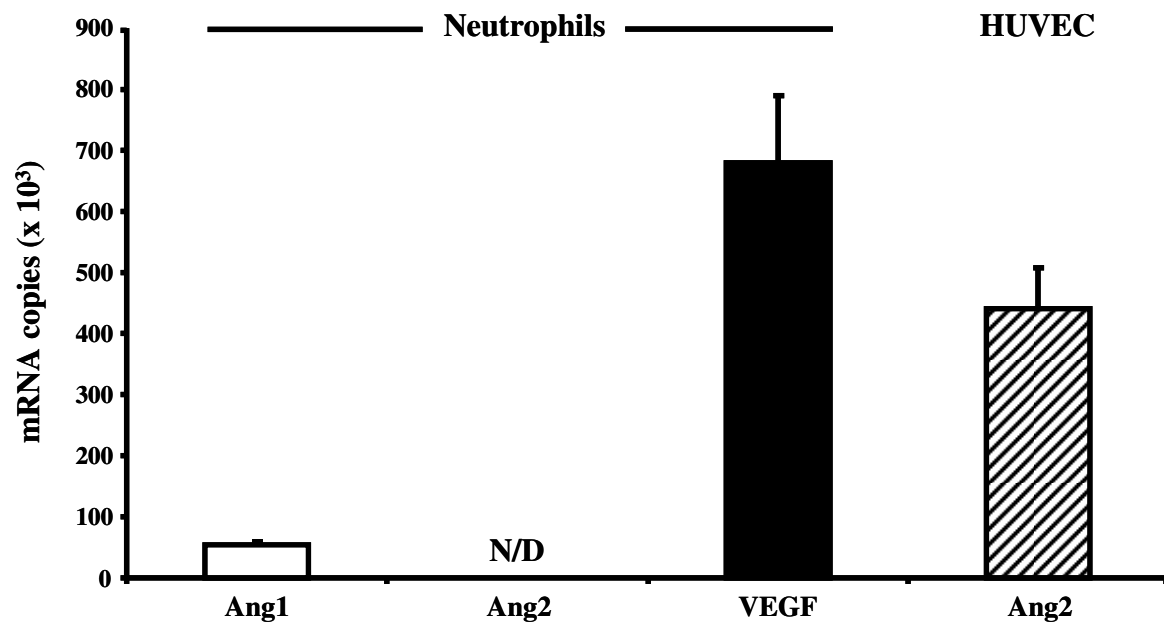
**Figure 1B**

Figure 2

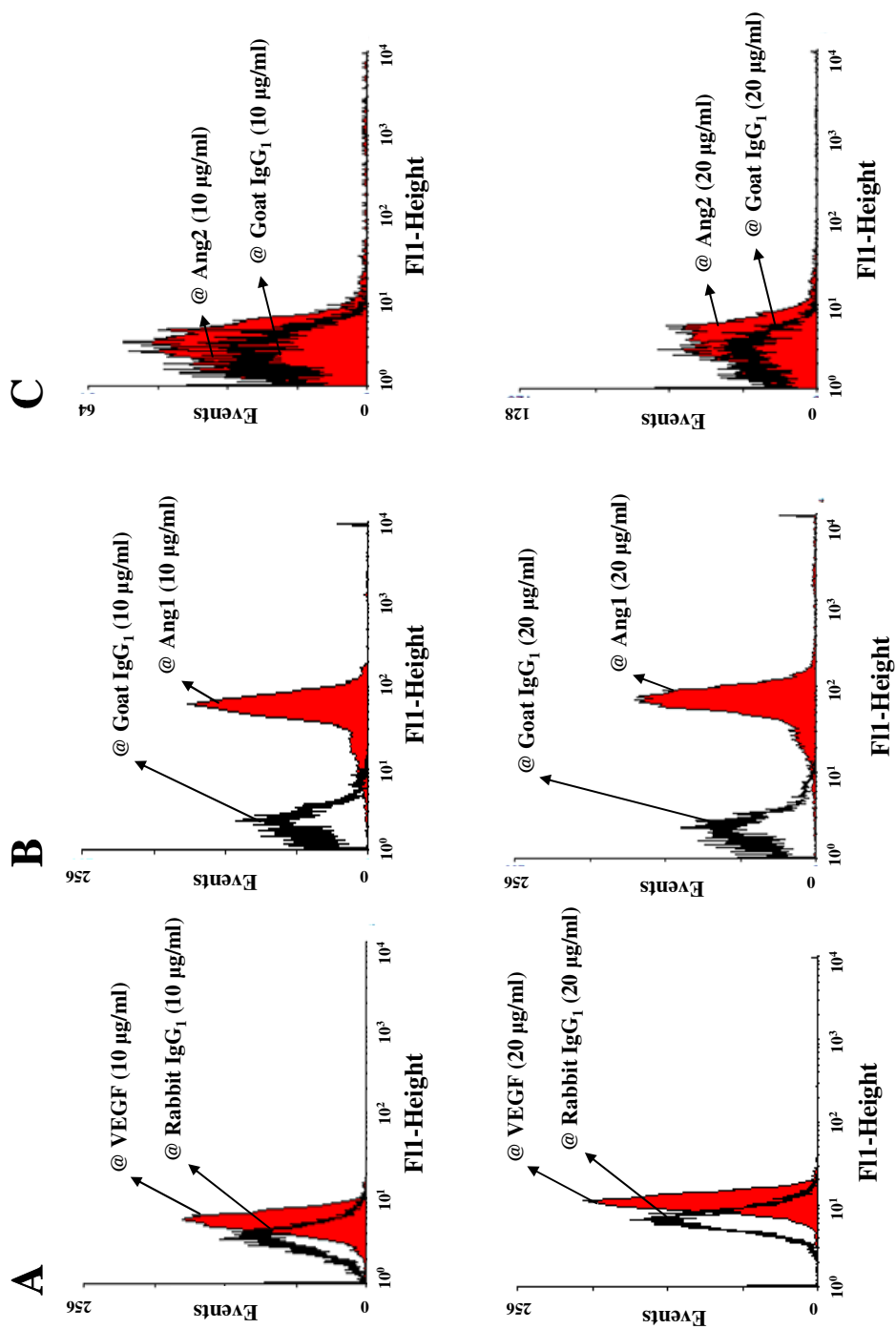
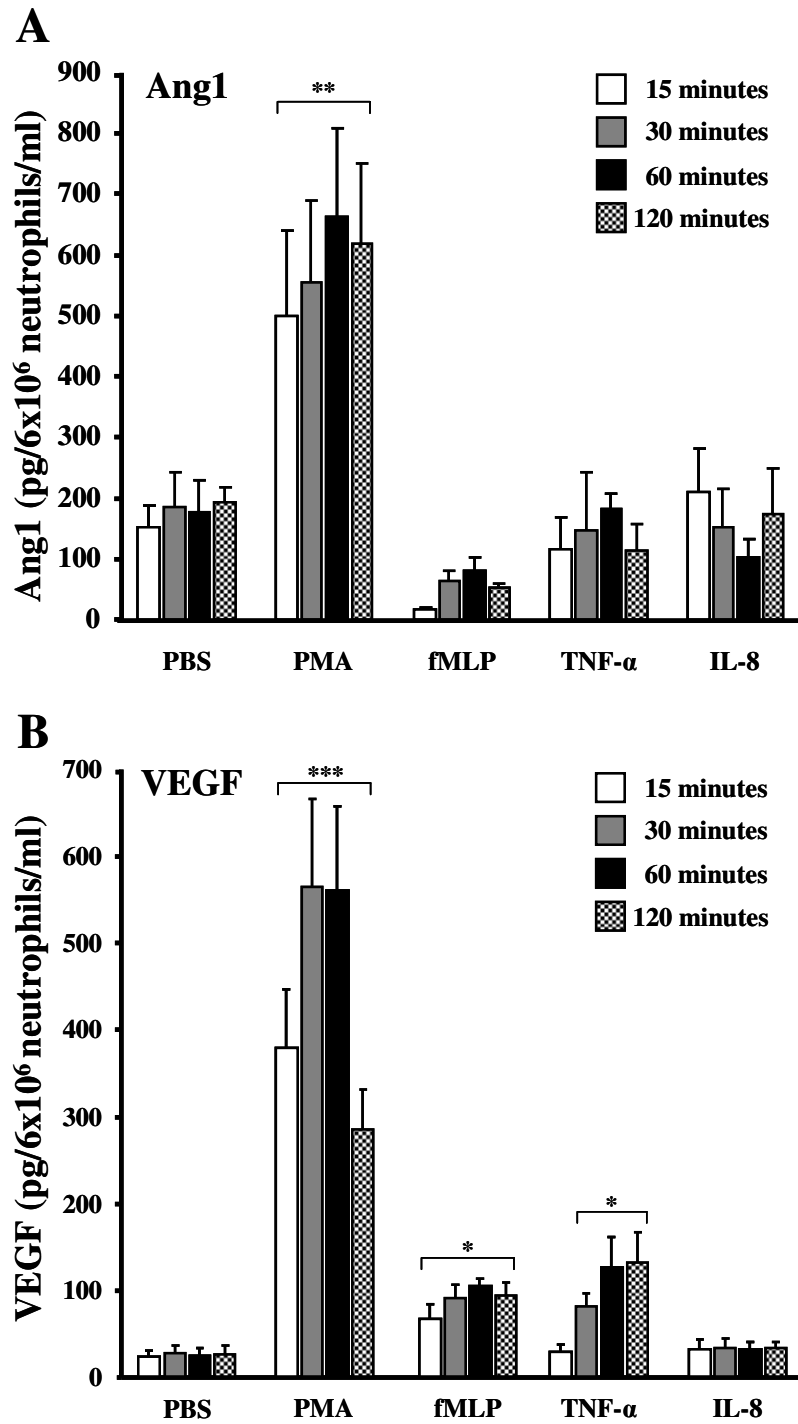
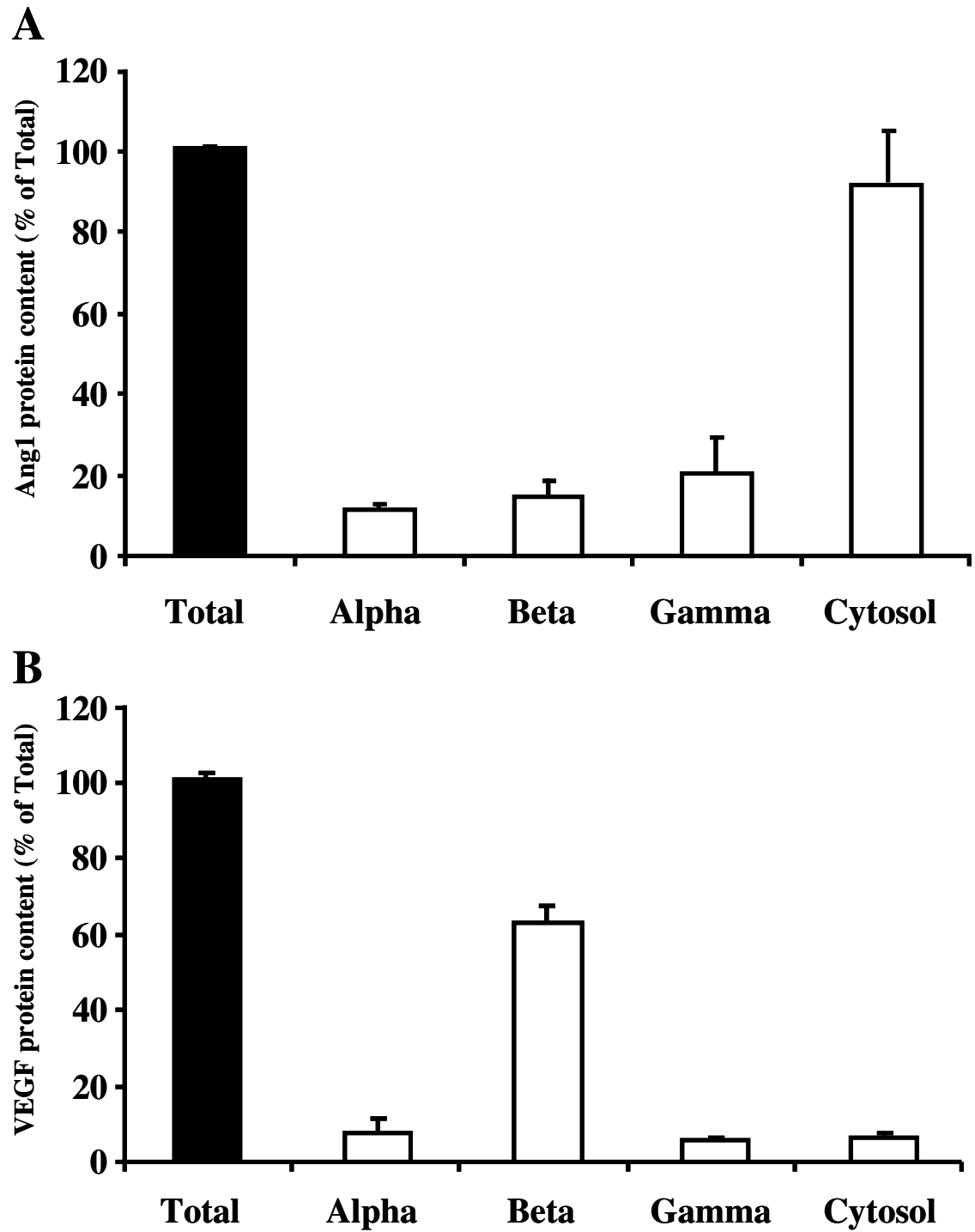


Figure 3



**Figure 4**

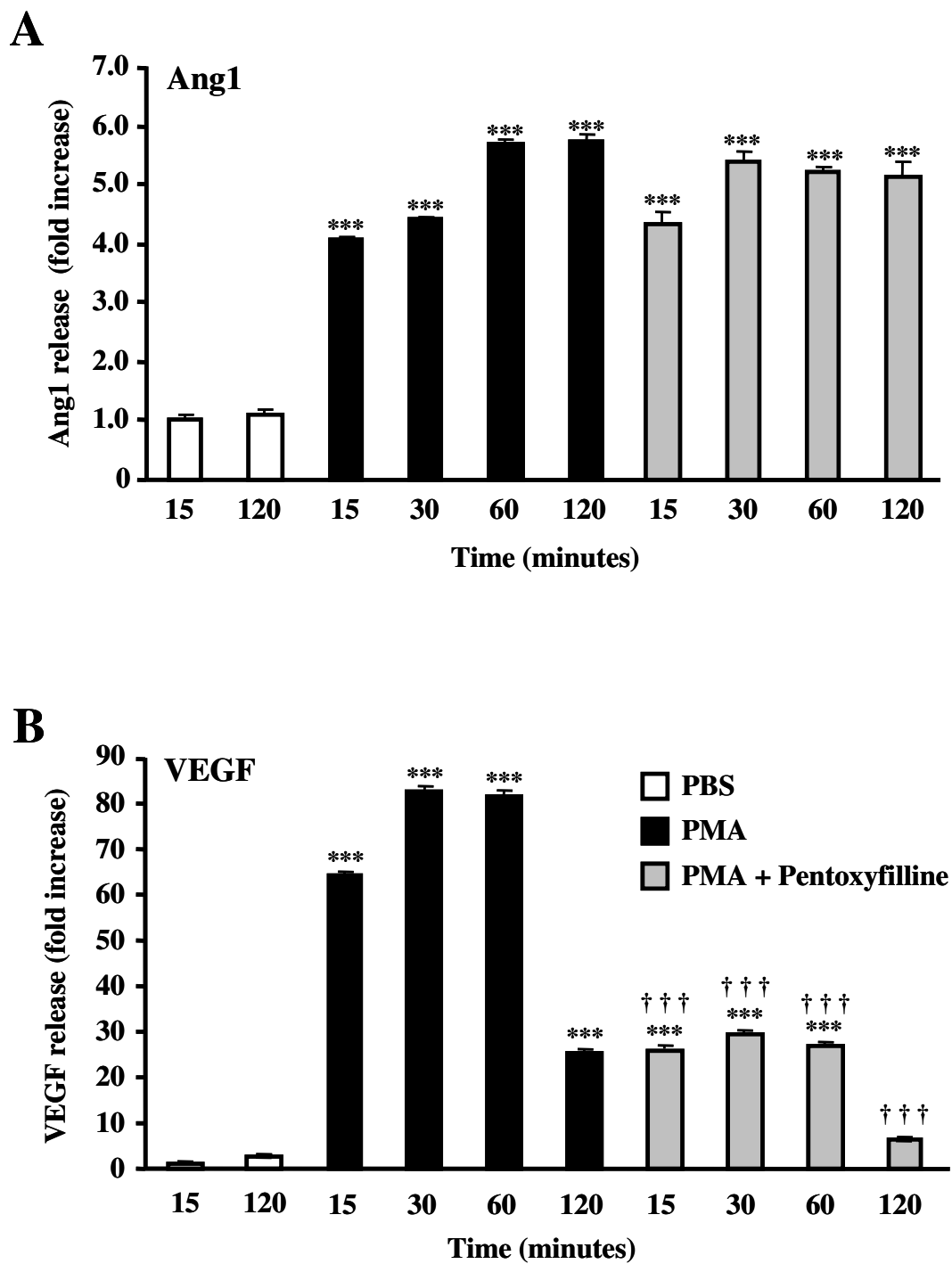
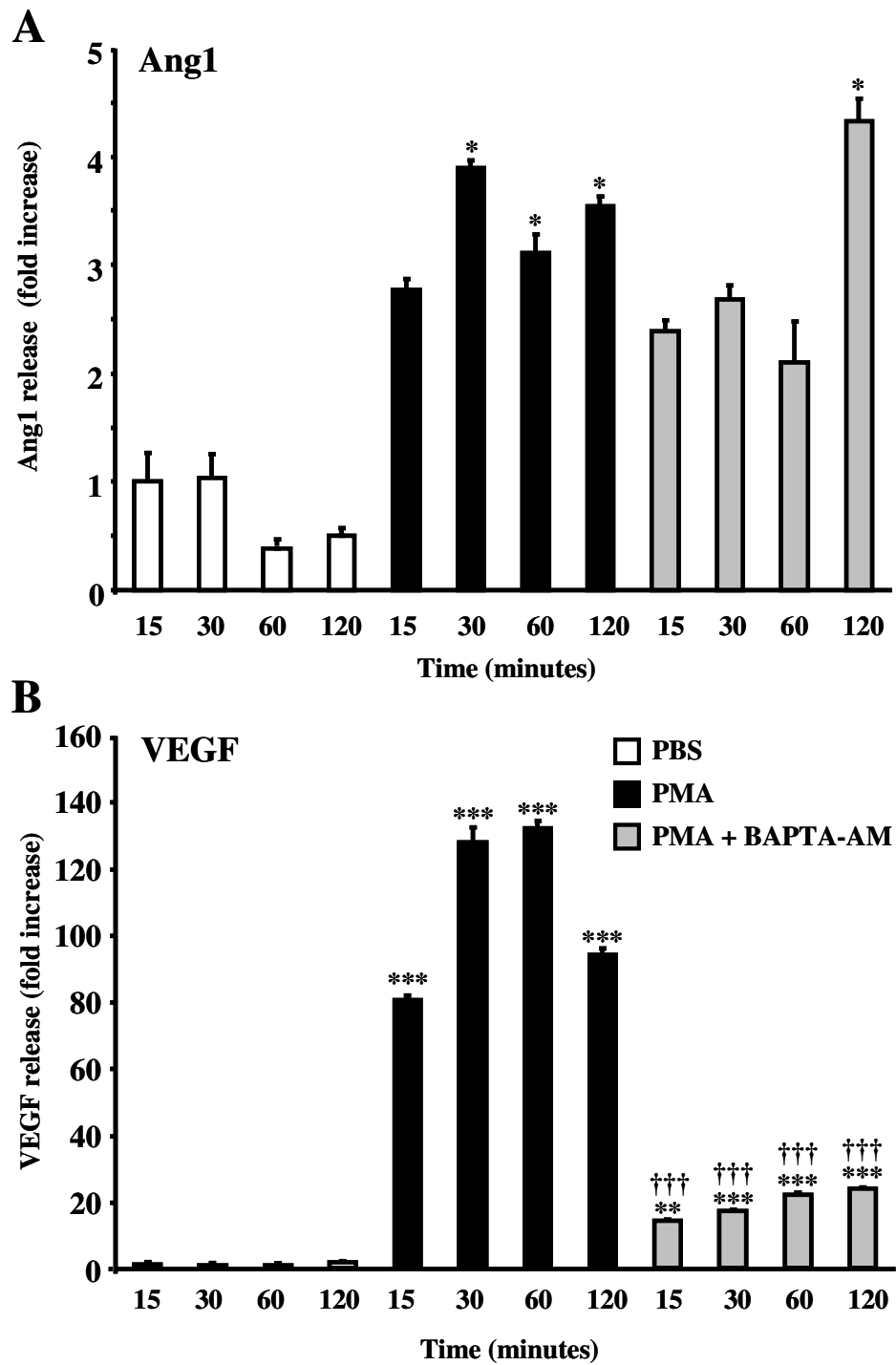
**Figure 5**



Figure 6



### **3.0 Article #2**

Neagoe, P.E., E. Dumas, F. Hajjar, and M.G. Sirois, *Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils*. J Cell Physiol, 2011.

**Angiotensin-1 but not angiotensin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils**

Paul-Eduard Neagoe<sup>1,2</sup>, Elizabeth Dumas<sup>1,2</sup>, Fadi Hajjar<sup>1</sup> and Martin G. Sirois<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Research center, Montreal Heart Institute, <sup>2</sup>Department of pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal (Quebec), Canada

\*Corresponding author:

Martin G. Sirois

Research Center

Montreal Heart Institute

5000 Belanger Street

Montreal, Qc, Canada

H1T 1C8

Phone #: 514-376-3330 ext.3583

Fax #: 514-376-1355

Running head: Ang1-mediated IL-8 release by neutrophils

**Key words: cytokines, inflammation, growth factors, p42/44 MAPK**

6 figures, 1 table

Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-97943)

### 3.1 ABSTRACT

We previously reported Tie2 receptor expression on human neutrophils, which promotes chemotactic activities upon activation by both angiopoietins (Ang1 and Ang2). Moreover, we observed that neutrophil pretreatment with Ang1 or Ang2 enhances IL-8 chemotactic effect. Therefore, we assessed the capacity of Ang1 and/or Ang2 to modulate neutrophil IL-8 synthesis and release. Neutrophils isolated from healthy donors were stimulated in a time- (1-6 hours) and concentration- ( $10^{-10}$ - $10^{-8}$  M) dependent manner with both angiopoietins. IL-8 mRNA production was measured by RT-qPCR, whereas its protein synthesis and release from neutrophils was assessed by ELISA. Ang1 ( $10^{-8}$  M) induced a significant and maximal increase of IL-8 mRNA (4.7-fold) within 1 hour, and promoted maximal IL-8 protein synthesis (3.6-fold) and release (5.5-fold) within 2 hours as compared to control PBS-treated neutrophils. Treatment with Ang2 alone did not modulate IL-8 synthesis or release, and its combination to Ang1 did not affect Ang1 activity. Neutrophil pretreatment with a protein synthesis inhibitor (CHX) increased IL-8 mRNA synthesis by 18-fold, and reduced Ang1-mediated IL-8 protein synthesis and release by 96 and 92% respectively. Pretreatment with a transcription inhibitor (ActD) reduced IL-8 mRNA synthesis by 54% and IL-8 protein synthesis and release by 52 and 79% respectively. Using specific kinase inhibitors, we observed that Ang1-driven IL-8 mRNA and protein synthesis is p42/44 MAPK-dependent and - independent from p38 MAPK and PI3K activity. Our study is the first to report the capacity of Ang1 (as opposed to Ang2) to promote neutrophil IL-8 synthesis and release through the p42/44 MAPK pathway activation.

## 3.2 INTRODUCTION

Angiogenesis is the process by which new blood vessels are developing from pre-existing vasculature. This process is timely regulated by the coordinated participation of selective growth factors, such as VEGF and both angiopoietins (Ang1 and Ang2) (Carmeliet, 2000; Jones et al., 2001; Yancopoulos et al., 2000). In addition, these growth factors are also involved in the regulation of inflammatory processes (Fiedler et al., 2006; Kanazawa, 2007; Kim et al., 2001; Roviezzo et al., 2005). The principal members of the angiopoietins, Ang1 and Ang2, were found to activate Tie2 receptor, initially reported for being expressed on endothelial cell (EC) surface. Ang1 has been characterized as Tie2 agonist, promoting the maturation of unstable vessels in the presence of VEGF (Thurston et al., 1999), whereas Ang2 was initially described as natural endogenous Tie2 antagonist for its capacity to destabilize preexisting vessels prior to VEGF-induced angiogenesis (Maisonpierre et al., 1997). However, over the last decade, mounting evidences indicated that Ang2 can also behave as Tie2 agonist, as demonstrated by its capacity to promote EC tube-like structure formation and migration (Mochizuki et al., 2002; Teichert-Kuliszewska et al., 2001) and EC survival (Harfouche and Hussain, 2006). Recent studies also revealed that angiopoietins can modulate EC behaviour toward proinflammatory cytokines. For instance, Ang2 was shown to serve as a priming factor for tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (Fiedler et al., 2006). Moreover, Ang1 and Ang2 were shown to potentiate VEGF-mediated angiogenesis in a mouse cornea model (Asahara et al., 1998).

Pathological angiogenesis is proactive in the development of diseases such as tumor growth metastasis, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, psoriasis and vascular

retinopathy (Carmeliet, 2005). One common trait between these pathological conditions is the presence of an inflammatory environment, which precedes and accompanies angiogenesis, as evidenced by a vascular permeability increase and the recruitment of inflammatory cells (Dvorak et al., 1995; Jackson et al., 1997).

Amongst inflammatory cells, neutrophils are the first ones to be recruited to the inflammatory site, which participate in the development of a pro-angiogenic environment by their capacity to synthesize and release pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines such as Ang1, VEGF, TNF- $\alpha$ , interleukins (ILs; IL-1, IL-6 and IL-8) and matrix metalloproteinase degrading enzymes (MMPs) which are all contributing to orchestrated sequences associated to blood vessels formation (McCourt et al., 1999; Shaw et al., 2003).

Interleukin-8 (IL-8) is one of the major pro-inflammatory mediators released by the neutrophils inducing numerous inflammatory activities such as respiratory burst (Schroder et al., 1987), generation of superoxide and hydrogen peroxide (Thelen et al., 1988), cellular reorganization (Thelen et al., 1988), secretion of catalytic enzymes (metalloproteinases, lysosymes) (Peveri et al., 1988), synthesis of bioactive lipids (Schroder, 1989), translocation and activation of adhesion molecules (Paccaud et al., 1990), chemotaxis (Huber et al., 1991) and pro-survival activity (Goodman et al., 1998). In addition, in function of the stimuli the release of IL-8 by the neutrophils is dependent on the activation of p38 and/or p42/44 MAPK pathways (Lee et al., 2009; Marie et al., 1999). On our side, we observed that Ang1 and Ang2 mediate neutrophil migration in a concentration-dependent manner, and that a pre-treatment of the neutrophils either with Ang1 or Ang2 increase IL-8 chemotactic

activity. These latter effects were mediated through the activation of the PI3K/Akt pathway and independently from p38 and p42/44 MAPK (Brkovic et al., 2007).

Since neutrophils express IL-8 constitutively, and that its release can be triggered upon stimulation by selective pro-inflammatory mediators, we wanted to assess the capacity of both angiopoietins to promote IL-8 synthesis and release from the neutrophils, and if so, to delineate the signalling pathways involved in these processes.

### 3.3 MATERIAL AND METHODS

#### *Neutrophil isolation and purification*

Venous blood was obtained from healthy donors free from medication for at least 10 days before the start of the experiments. The study has been approved by the human ethical committee of the Montreal Heart Institute, and all subjects provided written informed consent. Neutrophils were isolated as described previously (Brkovic et al., 2007). Ninety-eight percent of the isolated cells were polymorphonuclear cells, as determined with a Coulter counter, and viability was found to be greater than 98%, as assessed by Trypan blue dye exclusion assay.

#### *Neutrophil stimulation for IL-8 quantification*

Purified neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml; 500  $\mu$ l) were incubated in RPMI-1640 solution (Cambrex BioScience, Walkersville, MD) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories, Etobicoke, ON), 1% penicillin/streptomycin/GlutaMAX (P/S) (GIBCO, Grand Island, NY) and 25 mM HEPES (Sigma, Oakville, ON) and termed RPMI\* (for complete RPMI-1640 solution).

In a first series of experiments, neutrophils were stimulated from 1 to 6 hours with N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), bacterial lipopolysaccharide (LPS; *E. Coli* 0111:B4), (Sigma), Ang1 and Ang2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Upon neutrophil stimulation, cells were centrifuged at 900 g for 7 minutes and supernatants stored at -80°C for future IL-8 quantification by ELISA development kits (R&D Systems) accordingly to manufacturer's instructions and performed on high-binding specific Immulon® 4 HBX 96-well plates. In another set of



experiments, neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml; 500  $\mu$ l) were pretreated with either an mRNA transcription inhibitor (Actinomycin D; Sigma) or a protein synthesis inhibitor (Cycloheximide; Calbiochem, La Jolla, CA) for 30 minutes prior to agonist stimulation for 1 to 6 hours as described above. Upon neutrophil stimulation, cells were centrifuged at 900 g for 7 minutes and supernatants were stored at  $-80^\circ\text{C}$  for IL-8 quantification as aforementioned. Neutrophil pellets were vortexed for 30 seconds after being resuspended in RPMI\*- containing 1% Triton (J.T. Baker; Phillipsburg, NJ) and a protease inhibitor (Pefabloc, 1 mM; Sigma) -solution in order to collect intracellular neutrophil content. Cells were then centrifuged at 15000 g for 7 minutes at  $4^\circ\text{C}$ , and supernatants stored at  $-80^\circ\text{C}$  for IL-8 quantification by ELISA.

In the last series of experiments, neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml; 500  $\mu$ l) were pretreated with specific inhibitors of p38 MAPK (SB203580; Calbiochem), MEK-1/2 (U0126; Millipore, Billerica, MA), Akt (Triciribine; Calbiochem) for 30 minutes prior to agonist stimulation. Upon neutrophil stimulation, cells were centrifuged at 900 g for 7 minutes. Supernatants were stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further IL-8 quantification by ELISA. In order to collect neutrophil intracellular content, cell pellets were vortexed for 30 seconds after being resuspended in RPMI-1640\*- containing 1% Triton and Pefabloc. Cells were then centrifuged at 15000 g for 7 minutes at  $4^\circ\text{C}$ , and supernatants stored at  $-80^\circ\text{C}$  for further IL-8 quantification by ELISA.

*ERK-1/2 phosphorylation analyses*

Neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml) were stimulated with fMLP, LPS and Ang1 at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 5 to 60 minutes as described above. In parallel, a series of experiments were carried by pretreating the neutrophils with the MEK-1/2 inhibitor (U0126) for 30 minutes prior to agonist stimulation for an additional 30 minutes. At the end of each incubation time period, neutrophils were centrifuged at 900g for 7 minutes at 4°C and the supernatant discarded. Neutrophil pellets were vortexed for 30 seconds after being resuspended in lysis buffer (1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 5 mM NaF, 6 M urea, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin, 100 µM PMSF, 3 µg/ml Aprotinin, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM activated sodium orthovanadate in PBS, pH 7.4) and incubated for 15 minutes on ice. Cells were then centrifuged at 15000 g for 7 minutes at 4°C and supernatants stored at -80°C for further quantification of ERK phosphorylation by the human/mouse/rat phospho-ERK1 (T202/Y204)/ERK2 (T185/Y187) ELISA kit (R&D Systems) accordingly to manufacturer's instructions.

*Real time quantitative transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses*

Neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml;  $1 \times 10^7$  total) were stimulated (1 to 6 hours) as described above. Total RNAs were isolated by using RNeasy extraction kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Seventy-five nanogram of RNAs was reverse transcribed using random hexamers and the Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) as described by the manufacturer. Primers were used to amplify a 143-base pair (bp) fragment of IL-8 cDNA (GenBank no. NM\_000584.2; forward: 5'-GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGT-3', and

reverse 5'-GTGTTGGCGCAGTGTGGTCC -3') and a 93-bp fragment of  $\beta$ -microglobulin cDNA (GenBank no. MIM109700; forward: 5'-TAGCTGTGCTCGCGCTACTC -3', and reverse: 5'-TTCCATTCTCTGCTGGATGACG-3'). The expression level of IL-8 was determined using a Brilliant SYBR Green qPCR master mix (Invitrogen) and a Mx3000P real-time PCR system (Stratagene). To confirm the specificity of the PCR products, the melting profile of each sample was determined by heating from 55°C to 95°C while measuring the fluorescence emitted. Analysis of the melting curve showed that each pair of primers amplified a single product. Each run consisted of an initial denaturation time of 10 min at 95°C and 40 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 60 s, and 72°C for 60 s.

#### *Statistical analysis*

Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM. Comparisons were made by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. Differences were considered significant at  $p$  values  $\leq 0.05$ .

## 3.4 RESULTS

### *Angiopoietins effect on IL-8 release by the neutrophils*

In a first series of experiments we assessed the capacity of angiopoietins to induce IL-8 release from the neutrophils in a concentration- ( $10^{-10}$  –  $10^{-8}$  M) and time- (1 – 6 hours) dependent manner. We also used positive controls known for their capacity to promote neutrophil IL-8 release, such as fMLP ( $10^{-7}$  M) and LPS (10  $\mu$ g/ml) (Cassatella et al., 1992; Fujishima et al., 1993). Treatment with Ang1 at  $10^{-10}$  and  $10^{-9}$  M for up to 6 hours did not mediate IL-8 release from neutrophils (**Fig. 1**). However, a treatment with Ang1 at  $10^{-8}$  M increased significantly IL-8 release within 1 hour and the maximal effect (5.6-fold increase) was achieved within 2 hours as compared to PBS-treated cells. Treatment with Ang2 ( $10^{-10}$  –  $10^{-8}$  M) for up to 6 hours did not mediate IL-8 release from neutrophils. To address whether the addition of Ang2 might affect Ang1-mediated IL-8 release, we combined both angiopoietins ( $10^{-10}$  –  $10^{-8}$  M), and the results were similar to those mediated by Ang1 alone. All the positive controls tested did induce a significant increase of IL-8 release as compared to PBS-treated cells from 1 to 6 hours post-treatment. The most powerful agonist being LPS, which increased IL-8 release by up to 33-fold within 6 hours as compared to PBS-treated cells whereas the fMLP-treated cells induced a 13-fold increase of IL-8 release after 4 hours of stimulation (**Fig. 1**).

### *Ang1 effect on IL-8 protein and mRNA synthesis in the neutrophils*

Although small concentrations of IL-8 protein are found in resting post-isolated neutrophils, the majority of IL-8 released comes from *de novo* synthesis (Kuhns and

Gallin, 1995; Lund and Øesterud, 2004). Therefore, we assessed the capability of Ang1 to induce neutrophil IL-8 synthesis. Upon neutrophil isolation, the constitutive endogenous concentration of IL-8 was  $0.25 \pm 0.04 \text{ ng}/5 \times 10^6$  neutrophils. Neutrophils were then stimulated as aforementioned to address the kinetic (0-6 hours) of IL-8 synthesis (**Fig. 2A**). Under physiological condition (PBS treatment), neutrophils had a constitutive IL-8 protein synthesis rate ranging from 1.06 to 1.99  $\text{ng}/5 \times 10^6$  neutrophils/hour from 1 to 6 hours post-isolation (**Fig. 2A**). Neutrophil incubation with fMLP and LPS promoted a rapid and transient rise in IL-8 protein synthesis. For both positive agonists, the maximal kinetic of IL-8 synthesis rate was observed within the first hour (10.15 and 9.80  $\text{ng}/5 \times 10^6$  neutrophils/hour for fMLP and LPS), corresponding to a significant 9.6- and 9.2-fold increase respectively as compared to PBS-treated neutrophils. The induction of IL-8 protein expression mediated by fMLP and LPS returned to the basal *de novo* synthesis rate values within 2 and 6 hours respectively (**Fig. 2A**). In fact, following the peak of IL-8 protein synthesis rate observed under fMLP stimulation, the synthesis rate of IL-8 was significantly decreased and even below the basal rate observed in PBS-treated neutrophils. Treatment with Ang1 ( $10^{-9}$  M) presented a similar pattern of IL-8 synthesis rate as observed under PBS-treated neutrophils. However, at the higher concentration, Ang1 ( $10^{-8}$  M) increased the kinetic rate of IL-8 protein synthesis, by a maximum of 5.87  $\text{ng}/5 \times 10^6$  neutrophils/hour within the first hour, corresponding to a significant 5.5-fold increase as compared to PBS-treated neutrophils (**Fig. 2A**).

Since IL-8 protein synthesis can derive from the translation of constitutive and/or *de novo* IL-8 mRNA, we measured the effect of positive controls and Ang1 on

IL-8 mRNA synthesis in neutrophils. The basal level of IL-8 mRNA was quantified at each time point, the neutrophils treated with PBS were used as basal internal control and its relative value was set to 1 for each time point. Treatment with fMLP, LPS and Ang1 ( $10^{-8}$  M) promoted a rapid and significant increase (within the first hour) of IL-8 mRNA content by 4.7-, 4.6- and 4.1-fold respectively as compared to PBS-treated neutrophils (**Fig. 2B**). Upon the first hour of stimulation, fMLP and Ang1 ( $10^{-8}$  M) were no longer capable to modulate positively the DNA transcription into IL-8 mRNA. On the other hand, under LPS challenge, we observed up to 4 hours, a sustained high level of IL-8 mRNA expression (**Fig. 2B**).

Within the same series of experiments, we also addressed the capacity of Ang2 ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) to promote IL-8 protein and mRNA synthesis, and the latter had no significant effect as compared to control PBS-treated cells (data not shown). By integrating the data from figures 1 and 2A, we observed that under basal conditions, about 0.5% of total IL-8 synthesized was released by the neutrophils within a 6-hour time period, whereas neutrophils stimulation either with fMLP, LPS or Ang1 ( $10^{-8}$  M) provided a significant increase of IL-8 release by 9.0-, 12.4-, and 5.3-fold respectively as compared to PBS-treated cells (Table I).

### ***Effect of CHX on IL-8 mRNA and protein expression in neutrophils***

Ang1 ( $10^{-8}$  M) and the positive controls induce a rapid and maximal IL-8 mRNA and protein synthesis within the first hour post-stimulation, which can be sustained for up to 4 hours under LPS stimulation. Thus, we wanted to verify if this rapid *de novo* IL-8 protein synthesis affects the outcome of IL-8 mRNA and protein synthesis. To do

so, we used cycloheximide (CHX; 10  $\mu\text{g/ml}$ ), a broad eukaryotic translation elongation inhibitor, which prevents protein synthesis deriving from mRNA (Schneider-Poetsch et al., 2010).

Pretreatment with CHX increased significantly IL-8 mRNA synthesis, up to 3.8-fold in control PBS-treated neutrophils from 1 to 6 hours (**Fig. 3A**). The addition of CHX significantly upregulated IL-8 mRNA synthesis up to 2 hours after fMLP, LPS and Ang1 ( $10^{-8}$  M) treatment by a maximum of 7.3-, 5.1- and 8.6-fold compared to vehicle-DMSO treated neutrophils, and this latter effect faded with time towards basal levels (**Fig. 3A**).

Pretreatment with CHX inhibited the basal rate of IL-8 protein synthesis (PBS-treated cells) by up to 74% for the 6-hour period and was efficient to abrogate by 94, 94 and 91% the acute synthesis rate of IL-8 protein observed within the first hour upon stimulation with fMLP, LPS and Ang1 ( $10^{-8}$  M) respectively (**Fig. 3B**). Since no significant IL-8 protein synthesis rate occurred following the one-hour peak, CHX did not further modulate the IL-8 protein synthesis rate from 2 to 6 hours post-stimulation (**Fig. 3B**).

In addition, we observed that a pretreatment with CHX, reduced the basal IL-8 release by up to 92% after 1 hour incubation. Similarly, CHX inhibited IL-8 release mediated by fMLP, LPS or Ang1 ( $10^{-8}$  M) with maximal inhibitions of 93, 93 and 92% respectively, at one hour post-treatment and the inhibitory capacity of CHX was maintained across the 6-hour time period of the experiment (**Fig. 3C**).

***Effect of ActD on IL-8 mRNA and protein expression in neutrophils***

Since we observed that Ang1 ( $10^{-8}$  M) and both positive controls (fMLP and LPS) can induce the synthesis of IL-8 mRNA and its protein in the neutrophils, we addressed the capacity of Ang1 to modulate IL-8 mRNA stability and delineate the origin of its protein (constitutive or *de novo* synthesis). Thus, we investigated the effects of an mRNA synthesis inhibitor, namely actinomycin D (ActD; 5  $\mu$ g/ml) on Ang1-induced IL-8 mRNA and protein synthesis.

Pretreatment with ActD reduced gradually the basal IL-8 mRNA synthesis over time, reaching a maximal inhibition of 82% after 6 hours (**Fig. 4A**). Pretreatment with ActD decreased the IL-8 mRNA synthesis induced by fMLP and LPS (1-6 hours), with a maximal inhibition of 85 and 93 % upon a 6 hour-incubation time period. However, ActD was efficient to decrease Ang1 ( $10^{-8}$  M)-mediated IL-8 mRNA synthesis by 67% and only within the first hour post-stimulation (**Fig. 4A**).

Pretreatment with ActD inhibited in a time-dependent manner (1 to 6 hours) the basal rate of IL-8 protein synthesis by up to 100% (**Fig. 4B**). The incubation with ActD inhibited IL-8 synthesis rate induced by fMLP, LPS and Ang1 ( $10^{-8}$  M) between 0-1 hour by 38, 41 and 39% respectively. As previously described in the CHX study, following the initial peak of IL-8 protein synthesis (from 0-1 hour), the IL-8 synthesis rate decreased over time and the pretreatment with ActD was no longer or less effective at decreasing the rate of IL-8 protein synthesis (**Fig. 4B**).

Using the supernatant collected from the neutrophils treated for the quantification of IL-8 protein synthesis, we tested the capacity of ActD to modulate IL-8 release. Pretreatment with ActD, reduced the basal IL-8 release by up to 62%



after 6 hours post-incubation (**Fig. 4C**). Similarly, ActD inhibited IL-8 release mediated by fMLP and LPS with maximal inhibitions of 79 and 73% at 6 hours post-stimulation, and the inhibitory capacity of ActD was maintained across the 6-hour time period of the experiment. In addition, ActD pretreatment reduced Ang1 ( $10^{-8}$  M)-mediated IL-8 protein release at 1 hour post-treatment by 72% respectively (**Fig. 4C**).

*Effect of selective kinase inhibitors on IL-8 mRNA and protein modulation in neutrophils*

In order to delineate the pathways involved in Ang1-induced IL-8 mRNA and protein synthesis, we targeted the contribution of selective protein kinases (PI3K, p38 and p42/44 MAPK) involved in these processes. Since IL-8 mRNA synthesis was maximal within 1 hour of stimulation with Ang1 ( $10^{-8}$  M), we used the same time period to determine if the aforementioned kinases play a role in Ang1-induced IL-8 mRNA synthesis. Neutrophils were incubated with the vehicle (DMSO), a p38 MAPK inhibitor (SB203580; 10  $\mu$ M) (Cuenda A Fau - Rouse et al.), a MEK-1/2 inhibitor (U0126; 20  $\mu$ M) (Favata et al., 1998) or a PI3K inhibitor (tricitiribine; 5  $\mu$ M) (Sun et al., 2009) 30 minutes prior to agonist stimulation for one hour. Neutrophil treatment with all kinase inhibitors alone did not modulate the basal IL-8 mRNA synthesis (**Fig. 5A**). Incubation with SB203580 increased significantly the synthesis of IL-8 mRNA induced by fMLP and Ang1 ( $10^{-8}$  M) by 102 and 94% respectively, whereas LPS-induced IL-8 mRNA synthesis was reduced by 61%. On the other hand, treatment with U0126 completely abrogated IL-8 mRNA synthesis stimulated

by fMLP and Ang1 ( $10^{-8}$  M), without affecting LPS-induced IL-8 mRNA synthesis. Finally, the blockade of PI3K pathway with triciribine did not modulate significantly the expression of IL-8 mRNA induced by both positive agonists and Ang1 ( $10^{-8}$  M) (**Fig. 5A**).

Pretreatment with each kinase inhibitor did not modulate the basal IL-8 protein synthesis after one hour of incubation. Moreover, pretreatment with the p38 MAPK inhibitor (SB203580) at the highest concentration (10  $\mu$ M), only inhibited significantly LPS-induced IL-8 protein synthesis by 53%, without affecting IL-8 protein synthesis mediated by fMLP and Ang1 ( $10^{-8}$  M) (**Fig. 5B**). On the other hand, a 30 minutes incubation period with U0126 (20  $\mu$ M) prior to agonist stimulation inhibited significantly fMLP and Ang1 ( $10^{-8}$  M)-driven IL-8 protein synthesis by 83 and 94% respectively, while U0126 had no effect on IL-8 protein synthesis mediated by LPS stimulation. Pretreatment with the Akt inhibitor (triciribine) did not provide significant effect on IL-8 protein synthesis mediated by all the agonists including Ang1 (**Fig. 5B**).

Finally, we assessed the contribution of these protein kinases on IL-8 release by the neutrophils upon stimulation by both controls and Ang1. As the plateau of IL-8 release mediated by Ang1 is observed within 2 hours post-stimulation, we elected this time period in the current series of experiments. Individual pretreatment of neutrophils with the kinase inhibitors did not modulate the basal release of IL-8 upon 2 hours of incubation. A pretreatment for 30 minutes with SB203580 (10  $\mu$ M) prior to agonists stimulation reduced significantly LPS-induced IL-8 release by 83% while having no effect on fMLP and Ang1 ( $10^{-8}$  M)-mediated IL-8 release (**Fig. 5C**).

Pretreatment with the MEK-1/2 inhibitor U0126 (20  $\mu\text{M}$ ) inhibited fMLP- and Ang1-induced neutrophil IL-8 release by 83 and 95% respectively, without affecting LPS-mediated IL-8 release by the neutrophils. Finally, the blockade of the PI3K pathway with the Akt inhibitor triciribine (5  $\mu\text{M}$ ) did not interfere with IL-8 release mediated by fMLP, LPS and Ang1 ( $10^{-8}$  M) (**Fig. 5C**).

#### ***Ang1 mediated ERK-1/2 phosphorylation in neutrophils***

In order to confirm that the inhibitory effect of U0126 on IL-8 mRNA and protein synthesis mediated by fMLP and Ang1 in the neutrophils is due to its capacity to block ERK-1/2 phosphorylation (p-ERK-1/2), we investigated the capacity of fMLP ( $10^{-7}$  M) and Ang1 ( $10^{-8}$  M) to phosphorylate ERK-1/2 from 5 to 60 minutes (**Fig. 6A**). The basal level (PBS-treatment) of p-ERK-1/2 was used as basal internal control and its relative value was set to 1 for each time point. Treatment with fMLP induced a significant rapid and sustained phosphorylation of ERK-1/2 (from 5 to 60 minutes), which was maximal (7.9-fold increase) within 30 minutes post-stimulation, whereas Ang1 was capable to significantly increase ERK-1/2 phosphorylation at 30 minutes post-stimulation, providing a 2.6-fold increase as compared to PBS-treated neutrophils (**Fig. 6A**).

Since the most efficient ERK-1/2 phosphorylation increase was achieved after 30 minutes for fMLP and Ang1, we selected this time period to determine the efficiency of the MEK-1/2 inhibitor (U0126) to prevent ERK-1/2 phosphorylation. Herein, we pretreated the neutrophils with U0126 (2 and 20  $\mu\text{M}$ ) or the vehicle (DMSO) for 30 minutes before their incubation with both agonists for an additional

30 minutes. Firstly, we observed that a pretreatment with the vehicle (DMSO) did not affect the phosphorylation of ERK-1/2 mediated by PBS, fMLP and Ang1 (**Fig. 6B**). However, a pretreatment with U0126 at the lowest concentration (2  $\mu$ M) inhibited ERK-1/2 phosphorylation induced by fMLP and Ang1 by 86 and 87% respectively, and at the highest concentration, U0126 (20  $\mu$ M) completely abrogated fMLP- and Ang1-induced ERK-1/2 phosphorylation (**Fig. 6B**).

### 3.5 DISCUSSION

This study addresses for the first time the capacity of angiopoietins to induce the expression of IL-8 mRNA, its protein synthesis and release by the neutrophils. Interestingly, these effects are only mediated by Ang1, thus, suggesting a distinct agonistic capacity between Ang1 and Ang2 on neutrophils. Using selective inhibitors we observed that Ang1 induces these events through the activation of p42/44 MAPK pathway.

#### *Differential effects of Ang1 and Ang2 on IL-8 protein synthesis and release*

First, we assayed the capacity of the angiopoietins to induce the release of IL-8 by the neutrophils and we observed that only Ang1 at the highest concentration was capable to induce a rapid and transient IL-8 release. Interestingly, Ang2 had no effect on neutrophil IL-8 protein synthesis and release. This observation is in line with a parallel study in which we observed that neutrophil survival is enhanced by Ang1 but not Ang2, and through its capacity to promote IL-8 release (Dumas et al., personal communication). These data are providing novel insight on the mounting evidences that Ang1 is capable to provide pro-inflammatory activities (Abdel-Malak et al., 2008; Ahmad et al., 2010; Brkovic et al., 2007; Harfouche et al., 2003; Lemieux et al., 2005; Maliba et al., 2006).

Protein synthesis in the neutrophils is occurring during different stages of their maturation (Borregaard et al., 2001), thus conferring them the capacity to support a rapid constitutive release of cytokines upon their recruitment to inflammatory sites. However, in some specific cases, inflammatory stimuli can

induce an acute protein synthesis of selective cytokines in mature neutrophils (Kuhns et al., 2001; Kuhns et al., 1998; McColl et al., 1992). Upon neutrophil isolation, the basal constitutive content of IL-8 protein was marginal. However, under basal condition during the 6-hour incubation period, we observed a constant and sustained rate of IL-8 protein synthesis, and despite this marked increase of IL-8 protein content, there was only a very small fraction (<0.5%) of *de novo* synthesized IL-8 being released by the neutrophils (Table I). This phenomenon can be explained by the fact that upon their isolation, neutrophils are lacking their physiological interaction with endothelial cells, which is known to increase basal IL-8 protein synthesis without promoting its release (Kuhns and Gallin, 1995). In our study, we observed that a treatment with Ang1 ( $10^{-8}$  M) and fMLP induced a very rapid (within 1 hour) and robust IL-8 protein synthesis, whereas a treatment with LPS promoted an acute and sustained rate of IL-8 protein synthesis. These latter observations are in agreement with previous studies (Arnold R Fau - Werner et al.; Cassatella et al., 1992; Fujishima et al., 1993; Marie et al., 1999; Taieb et al., 2002).

### ***Ang1 induces IL-8 mRNA expression and stability in the neutrophils***

Cytokine synthesis and release by neutrophils depend on preformed intracellular pools that are ready to be released upon inflammatory stimuli. However, in some specific cases, neutrophils are capable to induce mRNA transcription (Fessler et al., 2002; Kobayashi et al., 2002; Lindemann et al., 2004). Herein, stimulation of neutrophils by Ang1 and the positive controls enhanced IL-8 mRNA expression in a rapid and acute manner similarly to IL-8 protein synthesis and release. Following

this rapid onset, IL-8 mRNA expression induced by Ang1 and fMLP was rapidly degraded, declining to basal levels. However, a treatment with LPS provided a sustained high level of mRNA expression throughout the 6-hour period, which correlates with its sustained capacity to promote IL-8 protein synthesis. Together, these observations confer to Ang1 similar agonistic properties as fMLP (moderate agonist) as compared to LPS (strong agonist) to support IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release.

The IL-8 gene transcription regulation in various cell types is modulated by DNA-binding transcription factors that are acting as inducers (NF- $\kappa$ B, AP-1, CBP/p300) (Schmitz et al., 2001; Vanden Berghie et al., 1999; Whitmarsh and Davis, 1996) or repressors (NRF, OCT-1) (Nourbakhsh et al., 2001; Wu et al., 1997) of IL-8 mRNA synthesis. Moreover, IL-8 mRNA expression is maximal when a multiple complex including both types of regulators is formed (Carey, 1998). Under basal conditions, the role of NRF is to silence IL-8 transcription, thus keeping its protein synthesis and release to low levels (Nourbakhsh et al., 1993). In our study, we observed an induction of IL-8 mRNA expression in PBS-treated neutrophils incubated with a protein synthesis inhibitor (CHX). Moreover, treatment with Ang1 and the positive controls in presence of CHX induced an even more robust overexpression of IL-8 mRNA by the neutrophils. The mRNA overexpression by protein synthesis inhibitors in presence or absence of agonists is known as superinduction (Herschman, 1991). The latter, can be triggered by various mechanisms including the stabilization of mRNA, stimulation of intracellular signaling, increased gene transcription and by modifying transcription factors activity

(Edwards and Mahadevan, 1992). In our study, the IL-8 mRNA superinduction could be explained by the capacity of CHX to prevent *de novo* NRF protein synthesis, thus, preventing its capacity to silence IL-8 DNA transcription.

By incubating the neutrophils with a transcription inhibitor (ActD), we were capable to determine if the IL-8 mRNA synthesized is either degraded or stabilized during the 6-hour period. Treatment with ActD led during the 6-hour time period to the decay of IL-8 mRNA overexpressed under fMLP and LPS regimen. At the opposite, the overexpression of Ang1-induced IL-8 mRNA synthesis in presence of ActD was reduced only during the first hour post-stimulation, while during the remaining time period, the IL-8 mRNA content remained stable. This latter observation, demonstrate that Ang1 possesses the capacity to induce IL-8 mRNA stabilization in neutrophils.

### ***Ang1 modulates IL-8 protein synthesis and release through enhanced translational activity***

In order to determine if Ang1-induced IL-8 protein synthesis and release is modulated through transcriptional and/or translational mechanisms, we addressed the effects of CHX and ActD on IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils. As expected, a pretreatment with protein synthesis inhibitor (CHX) completely abrogated the acute peak of IL-8 protein synthesis induced by Ang1 and positive agonists, subsequently leading to a significant reduction of the cumulative IL-8 protein content upon the 6-hour stimulation period. In addition, we observed that CHX not only did prevent IL-8 protein synthesis but also reduced significantly the release of



IL-8 by the neutrophils. These data demonstrate that IL-8 release by the neutrophils does not only originate from the depletion of endogenous pools of IL-8 but also requires *de novo* IL-8 protein synthesis.

Neutrophil treatment with a transcription inhibitor (ActD) partially reduced the initial peak of IL-8 protein synthesis induced by positive controls (fMLP and LPS). However, ActD pretreatment followed by Ang1 stimulation, modulated the initial IL-8 protein synthesis peak similarly to the positive agonists. Our data show that the initial peak IL-8 protein synthesis observed upon stimulation by Ang1 and positive agonists is driven by a combination of *de novo* IL-8 DNA to mRNA transcription and mRNA to protein translation. However, since a treatment with Ang1 as opposed to fMLP and LPS is capable to maintain IL-8 mRNA stability, this could explain why we observed a maintained synthesis of IL-8 protein in presence of ActD.

***Ang1-mediated IL-8 mRNA and protein synthesis is driven by p42/44 MAPK activation***

In function of the cells and agonists used, IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release can be induced through the activation of p38 MAPK (Hashimoto et al., 1999; Islam et al., 2006), p42/44 MAPK (Neff et al., 2003; Shinkai et al., 2006) or PI3K/Akt (Tanaka et al., 2008; Tong et al., 2008). In a recent study, we observed that Ang1 induces neutrophil chemotaxis through the activation of PI3K/Akt pathway, and independently from p38 and p42/44 MAPKs (Brkovic et al., 2007). Herein, we observed that upon Ang1 or fMLP treatment, the IL-8 mRNA expression, protein

synthesis and release were completely blocked by U0126, a MEK-1/2 inhibitor which prevents p42/44 MAPK phosphorylation (Favata et al., 1998), while it had no effect on LPS-treated neutrophils. Inversely, pretreatment with SB203580, a p38 MAPK inhibitor, did inhibit IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release induced by LPS, while it had no inhibitory effect on Ang1 and fMLP-treated neutrophils. Finally, pretreatment with triciribine, an inhibitor known to completely abrogate Akt phosphorylation even at concentrations lower than 5  $\mu$ M (Miyamoto et al., 2008; Sun et al., 2009) had no effect on neutrophil IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release induced by Ang1 and the positive agonists.

These data suggest that Ang1 and fMLP share a similar capacity to promote IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release through the activation of p42/44 MAPK pathway, whereas LPS, a stronger inducer, appears to promote its activity through the activation of p38 MAPK. Interestingly, the blockade of p38 MAPK activation promoted the overexpression of IL-8 mRNA mediated by Ang1 and fMLP-treated neutrophils, suggesting a seesaw crosstalk between p38 and p42/44 MAPK, a well known phenomenon which has been observed to play a role in numerous biological activities and in a variety of cell types (Bellei et al., 2010; Kim et al., 2004; Shimo et al., 2007)

In summary, this study is the first one to demonstrate that Ang1 induces IL-8 mRNA expression, protein synthesis and release, as opposed to Ang2 which has no effect on these activities. Moreover, Ang1-induced IL-8 protein synthesis and release in the neutrophils is dependent on IL-8 mRNA expression followed by its stabilization and these latter phenomenons are regulated through p42/44 MAPK

activation. Our study is supporting a recent finding in which we observed that Ang1 (but not Ang2) promotes neutrophil survival through the contribution of IL-8 release, which can contribute to prolong neutrophil pro-inflammatory activities.

### **3.6 ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-97943) and from the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr. Sirois. Mr. Neagoe was recipient of a graduate studentship from the Université de Montréal, Dr. Sirois was recipient of a senior scientist scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ). We are thankful to all our volunteers for providing us so kindly with blood samples. We would like to thank Dr. Guy Rousseau for his scientific advice regarding the statistical analyses of our data.

### 3.7 FIGURE LEGENDS

**Figure 1: Effect of angiopoietins on IL-8 release by the neutrophils.** Neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml) were incubated for 1 to 6 hours with the vehicle (PBS) or various known IL-8 release inducers, namely fMLP ( $10^{-7}$  M) and LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ). Stimulation with Ang1 ( $10^{-10} - 10^{-8}$  M), Ang2 ( $10^{-10} - 10^{-8}$  M) or Ang1 + Ang2 ( $10^{-10} - 10^{-8}$  M) was also performed and the IL-8 released in the supernatant was quantified by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  as compared to PBS-treated neutrophils at corresponding time points.

**Figure 2: Effect of angiopoietins on IL-8 protein and mRNA synthesis by the neutrophils.** Neutrophils ( $5 \times 10^6$ /ml;  $500 \mu\text{l}$ ) (A) and ( $10^7$ /ml; 1 ml) (B) were stimulated with the vehicle (PBS), fMLP ( $10^{-7}$  M), LPS ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) and Ang1 ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) from 1 to 6 hours. Cell supernatant was removed and the neutrophil pellet was lysed in RPMI\* + 1% Triton X100. Synthesized IL-8 in the neutrophils was quantified by ELISA. Synthesis rate represents the quantity of IL-8 protein synthesized per hour by the neutrophils between each time point (A). Total mRNA was isolated using the RNeasy extraction kit and converted to cDNA by RT, while IL-8 mRNA was quantified by RT-qPCR. The PBS value at each time point was set to one and IL-8 mRNA fold of increase was compared to the normalized PBS at corresponding time points (B). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical comparisons were performed by analysis of

variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \**p*< 0.05 and \*\*\**p*< 0.001 as compared to the respective PBS.

**Figure 3: Effect of CHX on IL-8 mRNA expression, IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils.** Neutrophils were incubated either with the vehicle (DMSO) or CHX (10 µg/ml) for 30 minutes before the addition of PBS, fMLP ( $10^{-7}$  M), LPS (10 µg/ml) and Ang1 ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) for a period of 1 to 6 hours. IL-8 mRNA was quantified by RT-qPCR, whereas IL-8 protein quantification was performed as described in figures 1 and 2. For the IL-8 mRNA study, the PBS value at each time point was set to one and IL-8 mRNA fold of increase was compared to the normalized PBS at corresponding time points (A). Synthesis rate represents the quantity of IL-8 protein synthesized per hour by the neutrophil between each time point (B). IL-8 protein release is the quantity of IL-8 released at corresponding time points (C). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical comparisons were performed by an analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \**p*< 0.05, \*\**p*< 0.01 and \*\*\**p*< 0.001 as compared to the respective PBS  $\pm$  CHX pretreated neutrophils and †*p*< 0.05, ††*p*< 0.01 and †††*p*< 0.001 as compared to the respective vehicle (DMSO) pretreated neutrophils.

**Figure 4: Effect of ActD on IL-8 mRNA expression, IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils.** Neutrophils were incubated either with the vehicle (DMSO) or ActD (5 µg/ml) for 30 minutes before the addition of PBS, fMLP ( $10^{-7}$

M), LPS (10 µg/ml) and Ang1 ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) for a period of 1 to 6 hours. IL-8 mRNA was quantified by RT-qPCR, whereas IL-8 protein quantification was performed as described in figures 1 and 2. For the IL-8 mRNA study, the PBS value at each time point was set to one and IL-8 mRNA fold of increase was compared to the normalized PBS at corresponding time points (A). Synthesis rate represents the quantity of IL-8 protein synthesized per hour by the neutrophil between each time point (B). IL-8 protein release is the quantity of IL-8 released at corresponding time points (C). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  as compared to the respective PBS  $\pm$  ActD pretreated neutrophils and † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  and ††† $p < 0.001$  as compared to the respective vehicle (DMSO) pretreated neutrophils.

**Figure 5: Effect of SB203580, U0126 and Triciribine on IL-8 mRNA expression, IL-8 protein synthesis and release by the neutrophils.** Neutrophils were incubated either with the vehicle (DMSO), SB203580 (1 or 10 µM), U0126 (2 or 20 µM) or Triciribine (1 or 5 µM) for 30 minutes before the addition of PBS, fMLP ( $10^{-7}$  M), LPS (10 µg/ml) and Ang1 ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) for a period of 1 or 2 hours. IL-8 mRNA was quantified by RT-qPCR, whereas IL-8 protein quantification was performed as described in figures 1 and 2. For the IL-8 mRNA study, the PBS value after 1 hour was set to one and the modulation of IL-8 mRNA expression (fold of increase) was compared to the normalized PBS-treated neutrophils (A). Cumulative IL-8 protein

represents the total quantity of IL-8 protein synthesized by the neutrophils (B), whereas IL-8 protein release is the quantity of IL-8 released at 2 hours (C). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 as compared to the respective PBS-treated cells and †*p* < 0.05, ††*p* < 0.01 and †††*p* < 0.001 as compared to the respective vehicle (DMSO) pretreated neutrophils.

**Figure 6: Effect of U0126 on ERK-1/2 phosphorylation by the neutrophils.**

Neutrophils were incubated either with PBS, fMLP ( $10^{-7}$  M) and Ang1 ( $10^{-8}$  M) for a period of 5 to 60 minutes. The PBS value was set to one at each time point and the modulation of p-ERK-1/2 (fold of increase) was compared to the normalized PBS-treated neutrophils (A). Neutrophils were pretreated for 30 minutes with PBS, DMSO or U0126 (2 or 20  $\mu$ M) before the addition of PBS, fMLP ( $10^{-7}$  M) and Ang1 ( $10^{-8}$  M) for an additional 30 minutes. The PBS-treated neutrophils value was set to one and the modulation of p-ERK-1/2 (fold of increase) was compared to this normalized value (B). Results were expressed as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. Statistical comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001 as compared to the respective PBS-treated cells and †††*p* < 0.001 as compared to the respective vehicle (DMSO) pretreated neutrophils.



### 3.7 REFERENCES

- Abdel-Malak NA, Srikant CB, Kristof AS, Magder SA, Di Battista JA, Hussain SN. 2008. Angiopoietin-1 promotes endothelial cell proliferation and migration through AP-1-dependent autocrine production of interleukin-8. *Blood* 111(8):4145-4154.
- Ahmad S, Cudmore MJ, Wang K, Hewett P, Potluri R, Fujisawa T, Ahmed A. 2010. Angiopoietin-1 induces migration of monocytes in a tie-2 and integrin-independent manner. *Hypertension* 56(3):477-483.
- Arnold R Fau - Werner F, Werner F Fau - Humbert B, Humbert B Fau - Werchau H, Werchau H Fau - Konig W, Konig W. Effect of respiratory syncytial virus-antibody complexes on cytokine (IL-8, IL-6, TNF-alpha) release and respiratory burst in human granulocytes. (0019-2805 (Print)).
- Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. 1998. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 83(3):233-240.
- Bellei B, Maresca V, Flori E, Pitisci A, Larue L, Picardo M. 2010. p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase. *J Biol Chem* 285(10):7288-7299.
- Borregaard N, Theilgaard-Monch K, Sorensen OE, Cowland JB. 2001. Regulation of human neutrophil granule protein expression. *Curr Opin Hematol* 8(1):23-27.
- Brkovic A, Pelletier M, Girard D, Sirois MG. 2007. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *J Leukoc Biol* 81(4):1093-1101.
- Carey M. 1998. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* 92(1):5-8.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(4):389-395.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438(7070):932-936.
- Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berton G. 1992. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant

formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* 148(10):3216-3220.

Cuenda A Fau - Rouse J, Rouse J Fau - Doza YN, Doza Yn Fau - Meier R, Meier R Fau - Cohen P, Cohen P Fau - Gallagher TF, Gallagher Tf Fau - Young PR, Young Pr Fau - Lee JC, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. (0014-5793 (Print)).

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146(5):1029-1039.

Edwards DR, Mahadevan LC. 1992. Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J* 11(7):2415-2424.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273(29):18623-18632.

Fessler MB, Malcolm KC, Duncan MW, Worthen GS. 2002. A genomic and proteomic analysis of activation of the human neutrophil by lipopolysaccharide and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277(35):31291-31302.

Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witznath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. 2006. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12(2):235-239.

Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim KJ, Zheng H, Daniel D, Kim Y, Wallace EF, Larrick JW, Raffin TA. 1993. Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J Cell Physiol* 154(3):478-485.

- Goodman ER, Kleinstein E, Fusco AM, Quinlan DP, Lavery R, Livingston DH, Deitch EA, Hauser CJ. 1998. Role of interleukin 8 in the genesis of acute respiratory distress syndrome through an effect on neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 133(11):1234-1239.
- Harfouche R, Gratton JP, Yancopoulos GD, Nosedá M, Karsan A, Hussain SN. 2003. Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *FASEB J* 17(11):1523-1525.
- Harfouche R, Hussain SN. 2006. Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(4):H1635-1645.
- Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Maruoka S, Takeshita I, Hayashi S, Koura T, Kujime K, Horie T. 1999. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells. *Eur Respir J* 13(6):1357-1364.
- Herschman HR. 1991. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60:281-319.
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, 3rd, Weiss SJ. 1991. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254(5028):99-102.
- Islam Z, Gray JS, Pestka JJ. 2006. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates IL-8 induction by the ribotoxin deoxynivalenol in human monocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 213(3):235-244.
- Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. 1997. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 11(6):457-465.
- Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. 2001. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4):257-267.
- Kanazawa H. 2007. VEGF, angiopoietin-1 and -2 in bronchial asthma: new molecular targets in airway angiogenesis and microvascular remodeling. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 1(1):1-8.

- Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. 2001. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res* 89(6):477-479.
- Kim SH, Kim J, Sharma RP. 2004. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol Res* 49(5):433-439.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Buhl CL, Stahl RM, DeLeo FR. 2002. Global changes in gene expression by human polymorphonuclear leukocytes during receptor-mediated phagocytosis: cell fate is regulated at the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(10):6901-6906.
- Kuhns DB, Gallin JI. 1995. Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 154(12):6556-6562.
- Kuhns DB, Nelson EL, Alvord WG, Gallin JI. 2001. Fibrinogen induces IL-8 synthesis in human neutrophils stimulated with formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or leukotriene B(4). *J Immunol* 167(5):2869-2878.
- Kuhns DB, Young HA, Gallin EK, Gallin JI. 1998. Ca<sup>2+</sup>-dependent production and release of IL-8 in human neutrophils. *J Immunol* 161(8):4332-4339.
- Lee HY, Kim SD, Shim JW, Lee SY, Yun J, Bae YS. 2009. LL-37 inhibits serum amyloid A-induced IL-8 production in human neutrophils. *Exp Mol Med* 41(5):325-333.
- Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. 2005. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 105(4):1523-1530.
- Lindemann SW, Yost CC, Denis MM, McIntyre TM, Weyrich AS, Zimmerman GA. 2004. Neutrophils alter the inflammatory milieu by signal-dependent translation of constitutive messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18):7076-7081.
- Lund T, Østerud B. 2004. The effect of TNF-[alpha], PMA, and LPS on plasma and cell-associated IL-8 in human leukocytes. *Thrombosis Research* 113(1):75-83.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato

- TN, Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277(5322):55-60.
- Maliba R, Lapointe S, Neagoe PE, Brkovic A, Sirois MG. 2006. Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways. *Cell Signal* 18(11):1947-1957.
- Marie C, Roman-Roman S, Rawadi G. 1999. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in interleukin-8 production by human monocytes and polymorphonuclear cells stimulated with lipopolysaccharide or Mycoplasma fermentans membrane lipoproteins. *Infect Immun* 67(2):688-693.
- McColl SR, Paquin R, Menard C, Beaulieu AD. 1992. Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 176(2):593-598.
- McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. 1999. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 134(12):1325-1331; discussion 1331-1322.
- Miyamoto S, Murphy AN, Brown JH. 2008. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ* 15(3):521-529.
- Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. 2002. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci* 115(Pt 1):175-183.
- Neff L, Zeisel M, Druet V, Takeda K, Klein JP, Sibia J, Wachsmann D. 2003. ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278(30):27721-27728.
- Nourbakhsh M, Hoffmann K, Hauser H. 1993. Interferon-beta promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF-kappa B site. *EMBO J* 12(2):451-459.
- Nourbakhsh M, Kalble S, Dorrie A, Hauser H, Resch K, Kracht M. 2001. The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-

- 1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. *J Biol Chem* 276(6):4501-4508.
- Paccaud JP, Schifferli JA, Baggiolini M. 1990. NAP-1/IL-8 induces up-regulation of CR1 receptors in human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 166(1):187-192.
- Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. 1988. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 167(5):1547-1559.
- Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancaleone V, Cirino G, Papapetropoulos A. 2005. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Ther* 314(2):738-744.
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M. 2001. I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* 26(3):186-190.
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO. 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6(3):209-217.
- Schroder JM. 1989. The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP/interleukin 8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate. *J Exp Med* 170(3):847-863.
- Schroder JM, Mrowietz U, Morita E, Christophers E. 1987. Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived, neutrophil-activating peptide that lacks interleukin 1 activity. *J Immunol* 139(10):3474-3483.
- Shaw JP, Chuang N, Yee H, Shamamian P. 2003. Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res* 109(1):37-42.
- Shimo T, Matsumura S, Ibaragi S, Isowa S, Kishimoto K, Mese H, Nishiyama A, Sasaki A. 2007. Specific inhibitor of MEK-mediated cross-talk between ERK and p38 MAPK during differentiation of human osteosarcoma cells. *J Cell Commun Signal* 1(2):103-111.

- Shinkai M, Foster GH, Rubin BK. 2006. Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(1):L75-85.
- Sun J, Ramnath RD, Tamizhselvi R, Bhatia M. 2009. Role of protein kinase C and phosphoinositide 3-kinase-Akt in substance P-induced proinflammatory pathways in mouse macrophages. *FASEB J* 23(4):997-1010.
- Taieb J, Delarche C, Ethuin F, Selloum S, Poynard T, Gougerot-Pocidallo MA, Chollet-Martin S. 2002. Ethanol-induced inhibition of cytokine release and protein degranulation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 72(6):1142-1147.
- Tanaka Y, Sekiguchi F, Hong H, Kawabata A. 2008. PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 377(2):622-626.
- Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ. 2001. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 49(3):659-670.
- Thelen M, Peveri P, Kernen P, von Tscharnen V, Walz A, Baggiolini M. 1988. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. *FASEB J* 2(11):2702-2706.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286(5449):2511-2514.
- Tong KM, Shieh DC, Chen CP, Tzeng CY, Wang SP, Huang KC, Chiu YC, Fong YC, Tang CH. 2008. Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal* 20(8):1478-1488.
- Vanden Berghe W, De Bosscher K, Boone E, Plaisance S, Haegeman G. 1999. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J Biol Chem* 274(45):32091-32098.

- Whitmarsh AJ, Davis RJ. 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med* 74(10):589-607.
- Wu GD, Lai EJ, Huang N, Wen X. 1997. Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J Biol Chem* 272(4):2396-2403.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407(6801):242-248.



## **3.8 FIGURES**

Figure 1

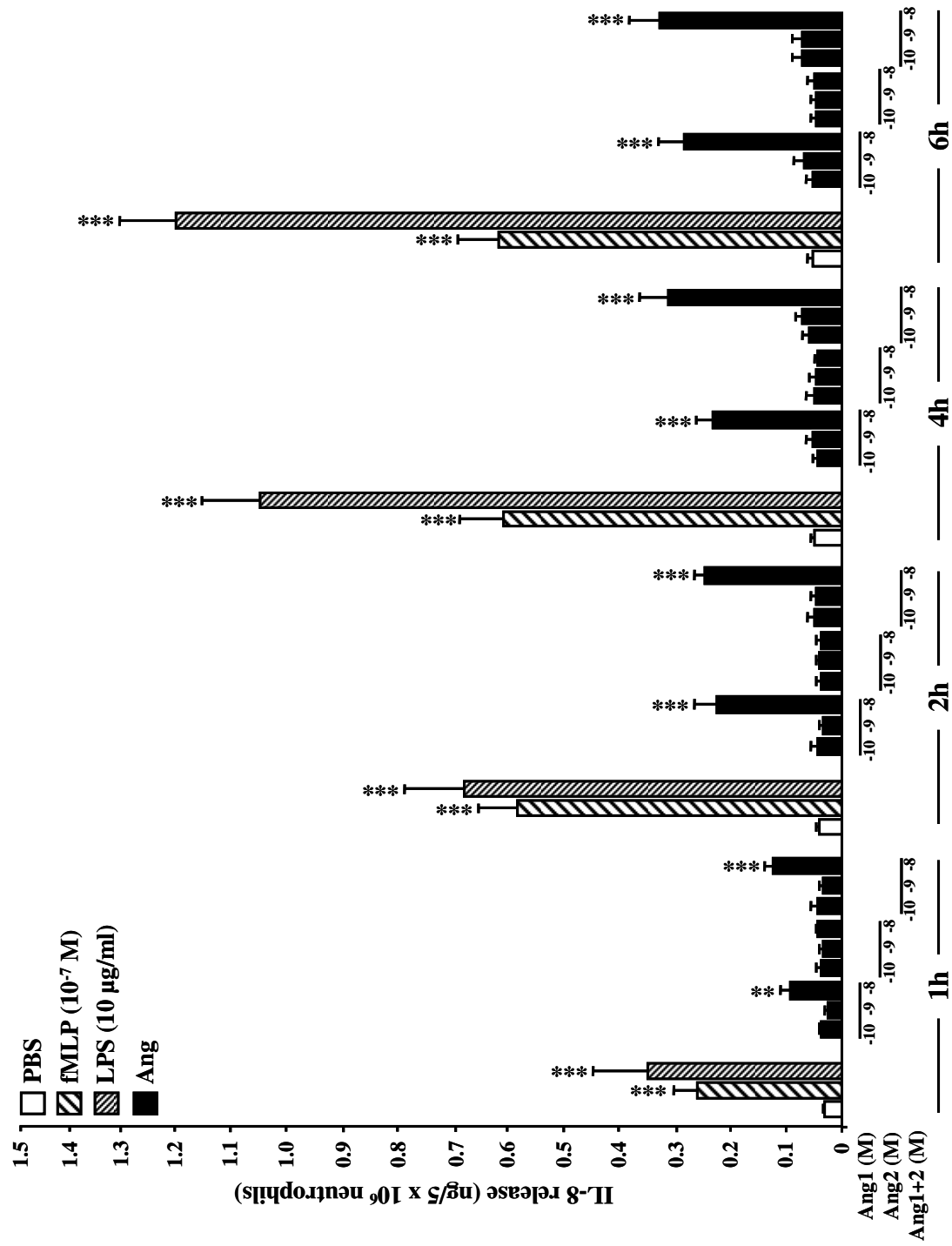


Figure 2A

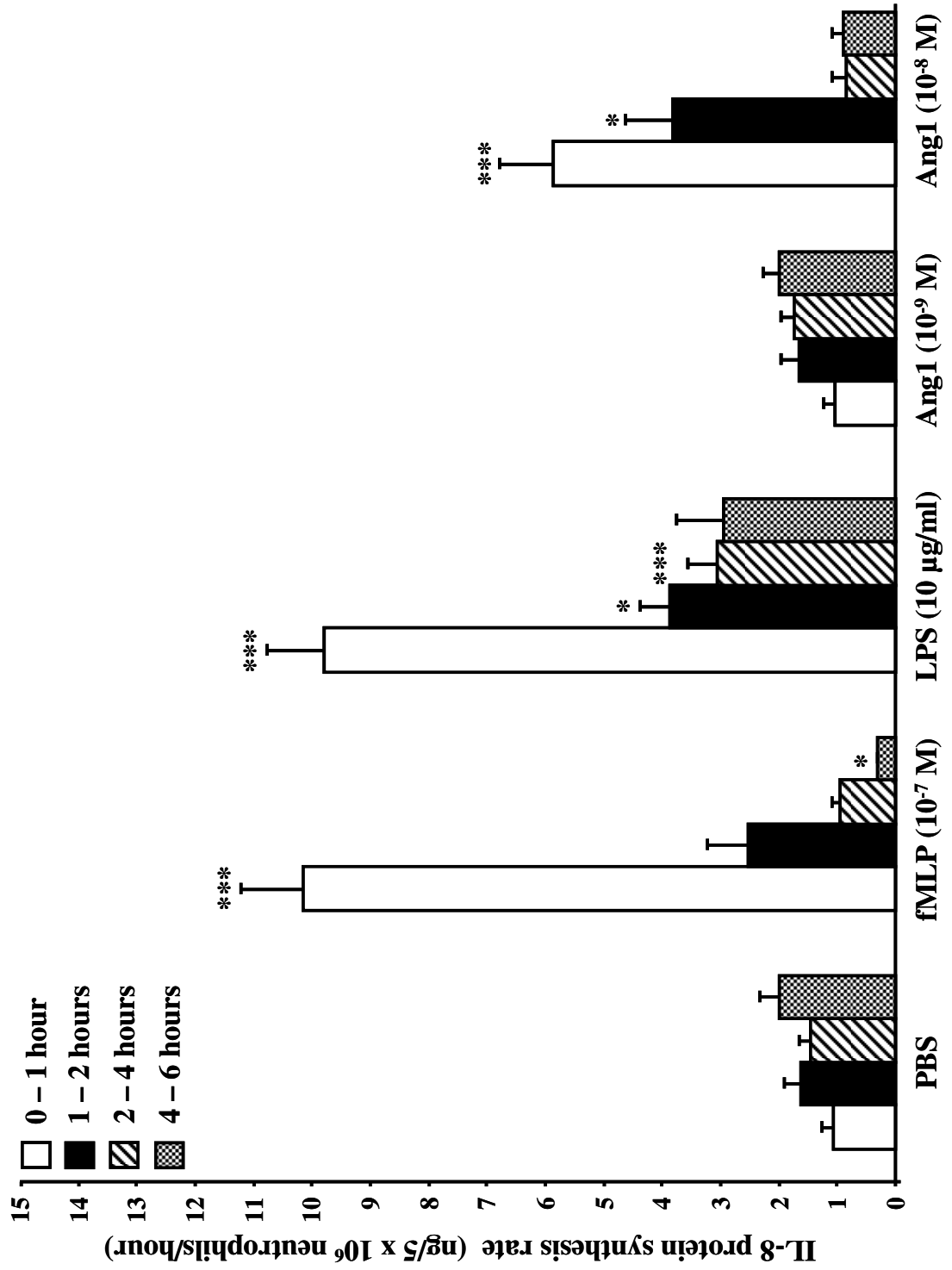


Figure 2B

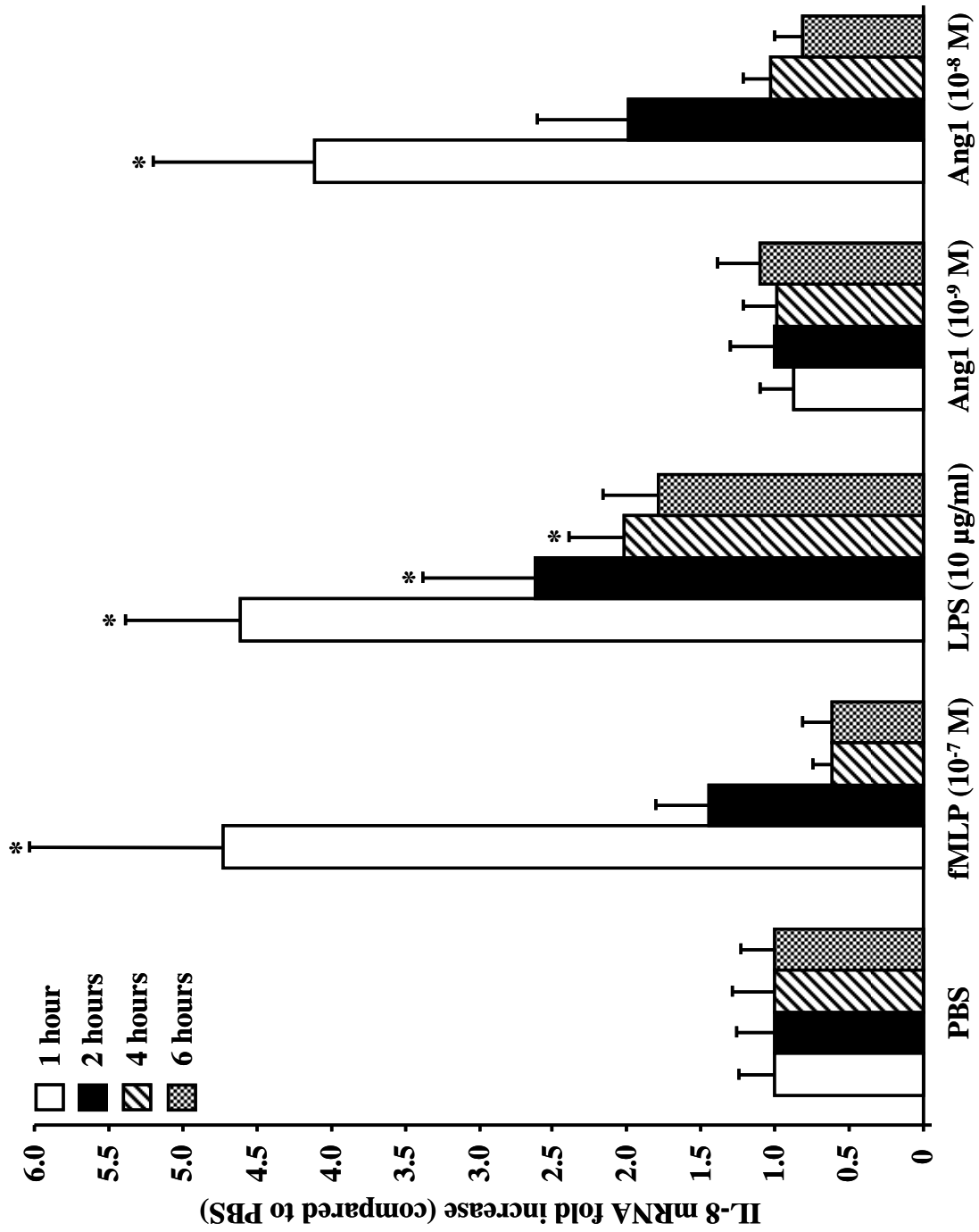


Figure 3A

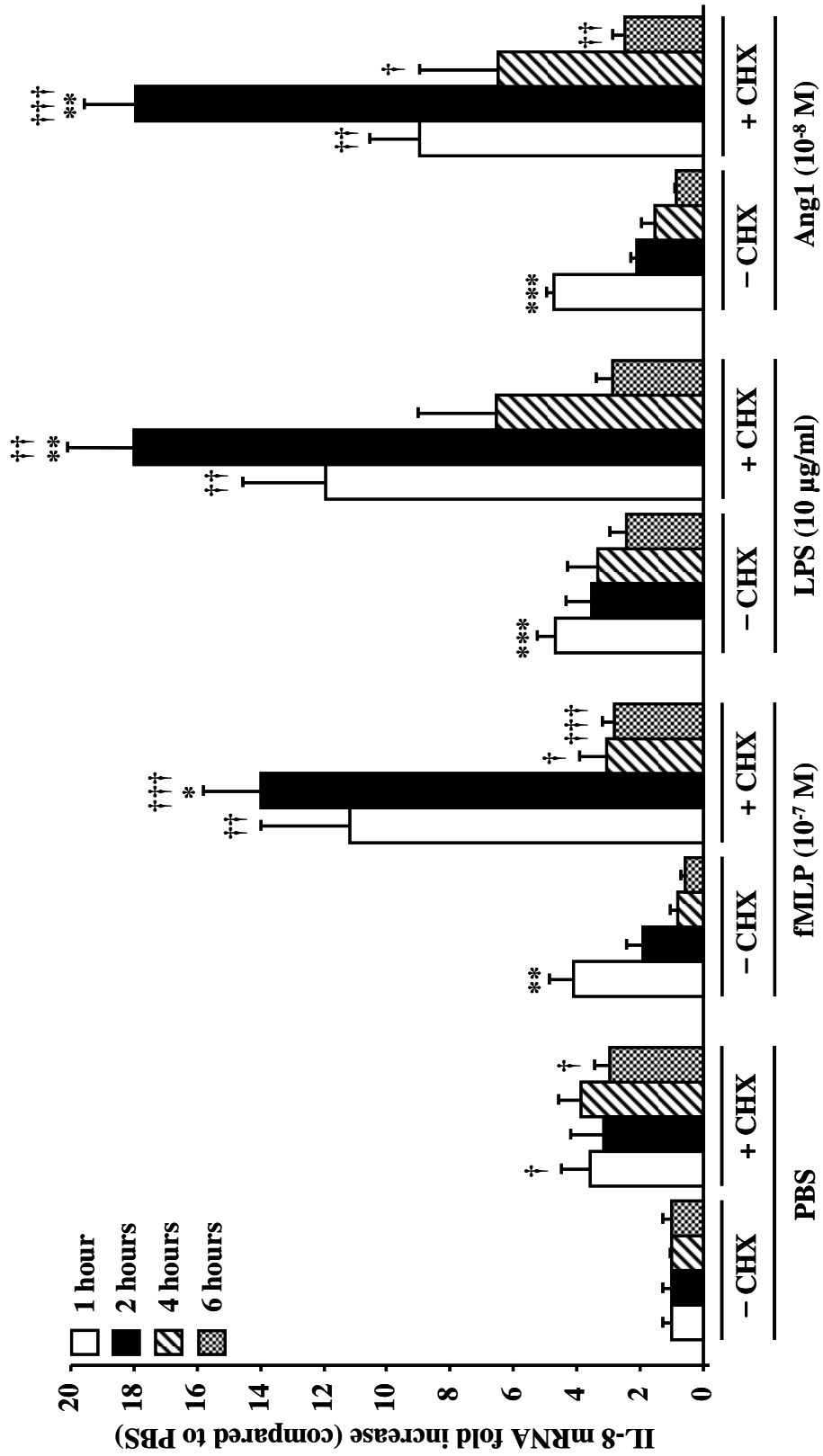


Figure 3B

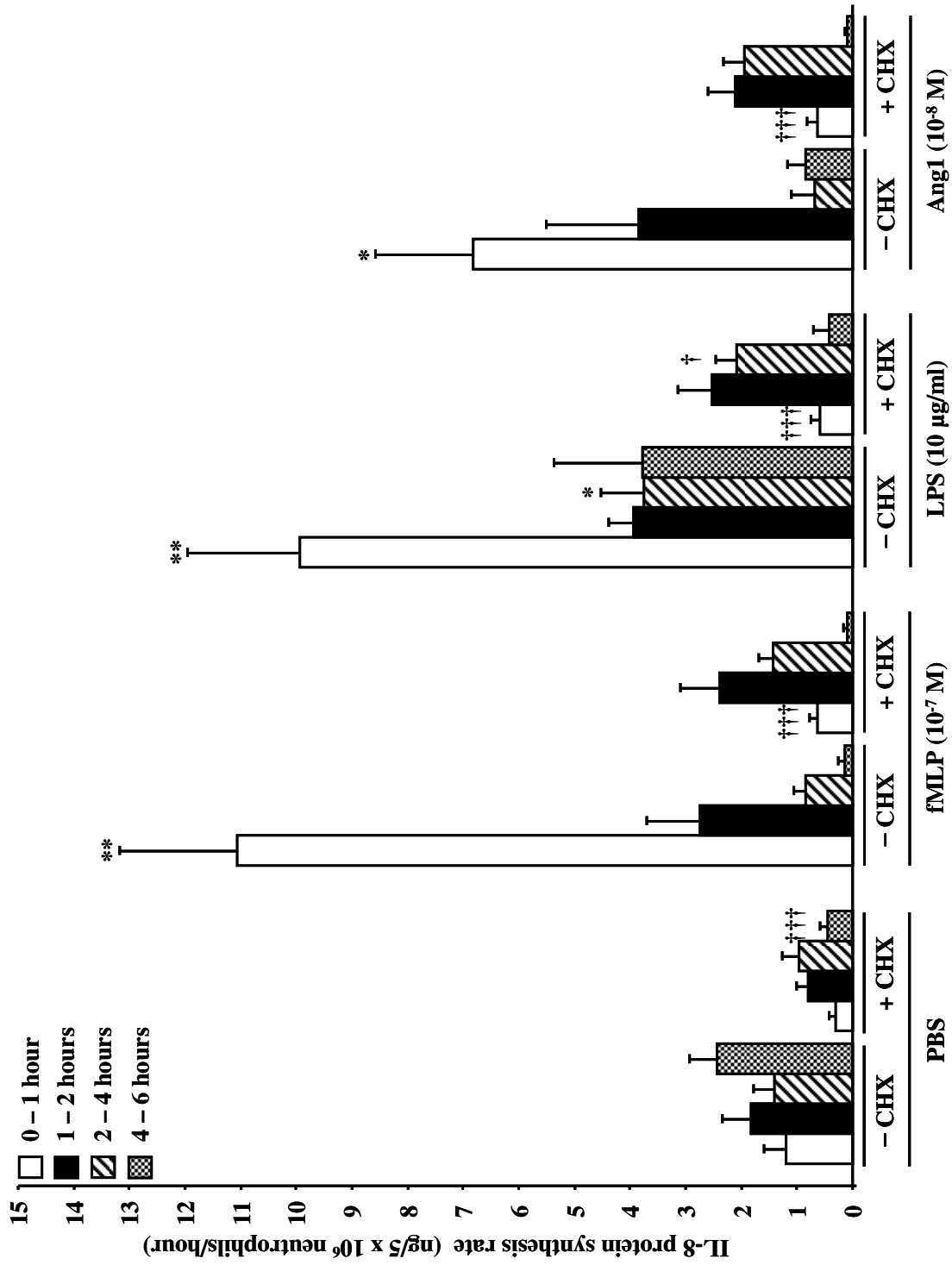


Figure 3C

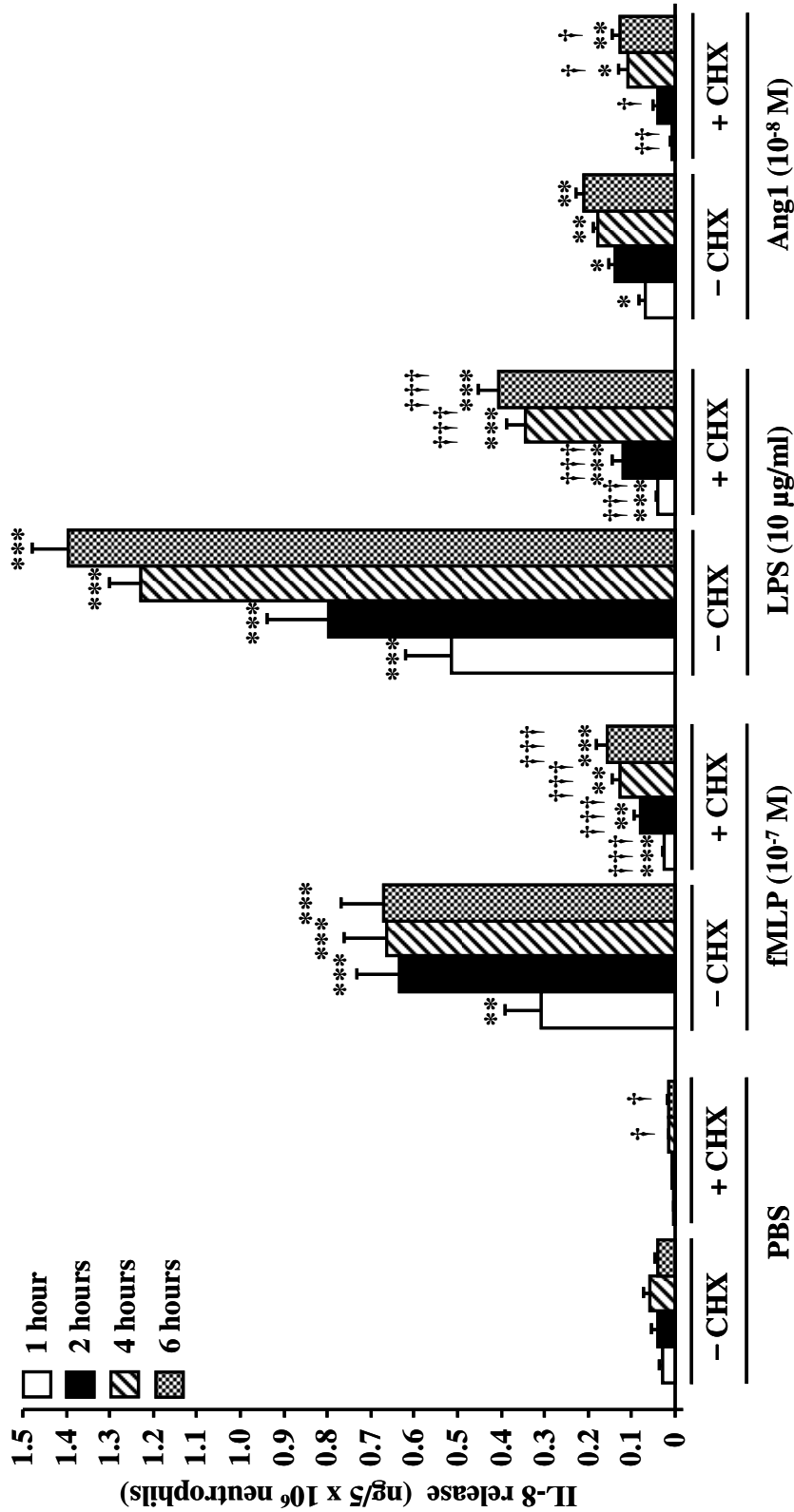


Figure 4A

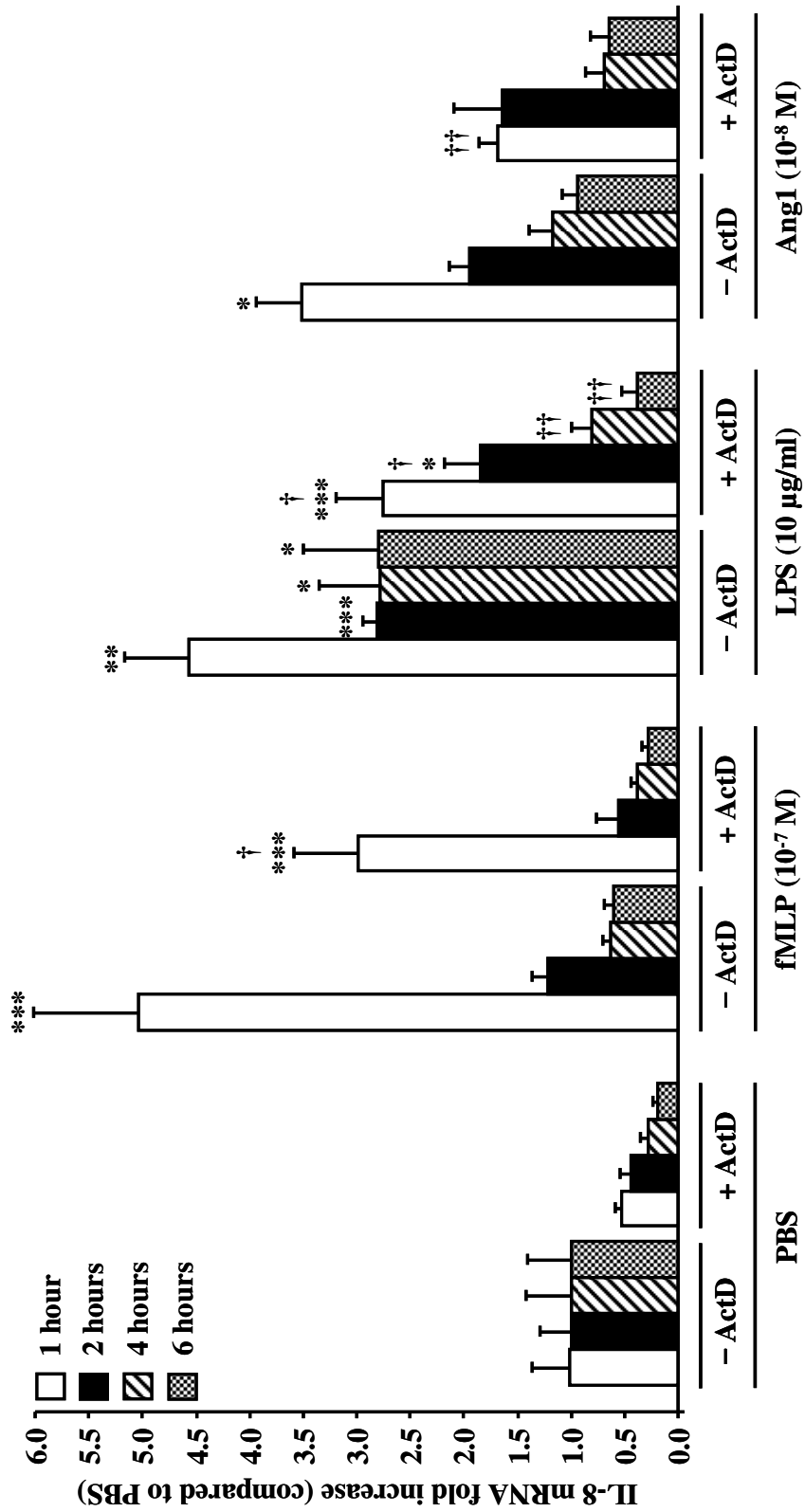




Figure 4B

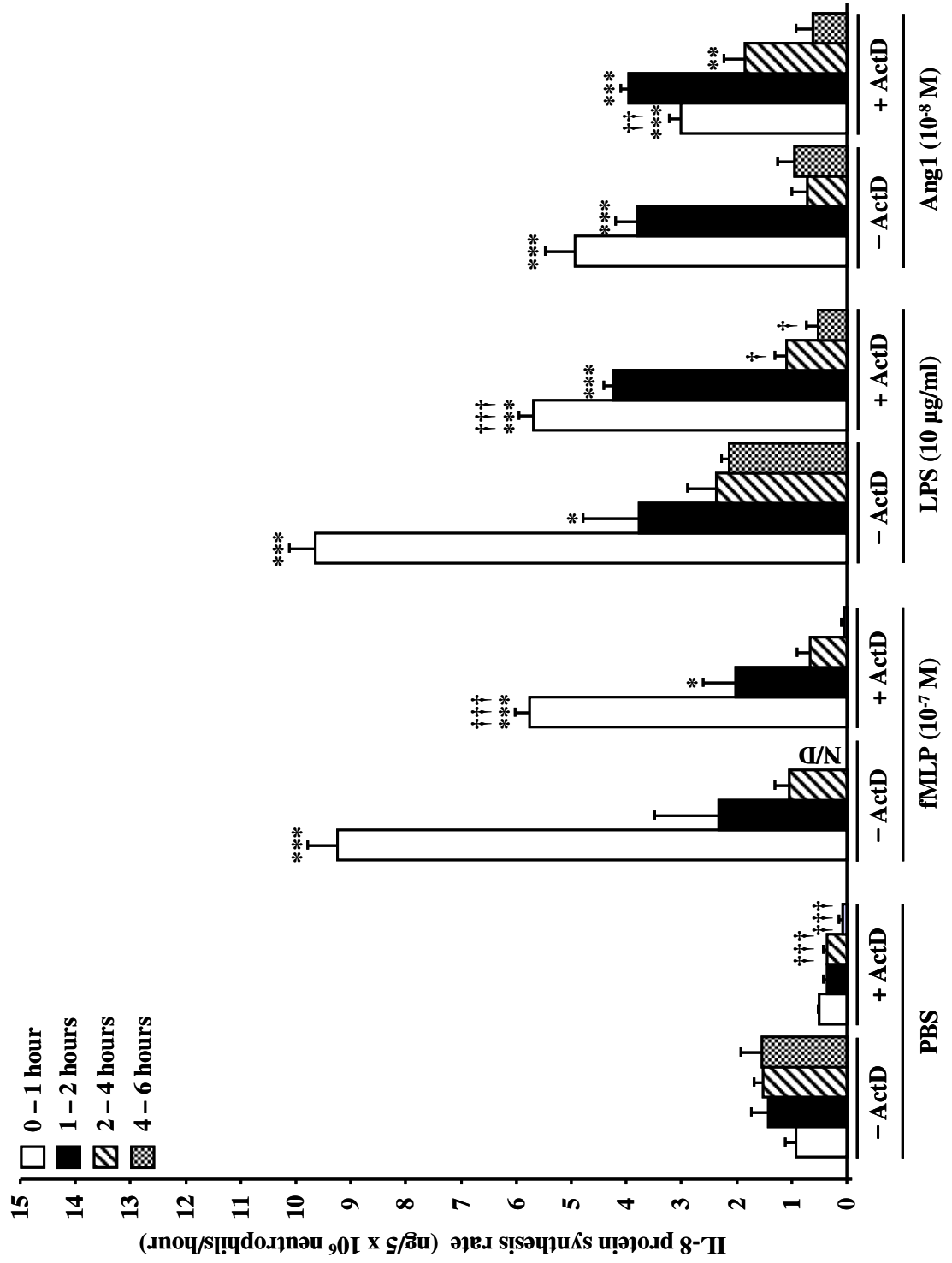


Figure 4C

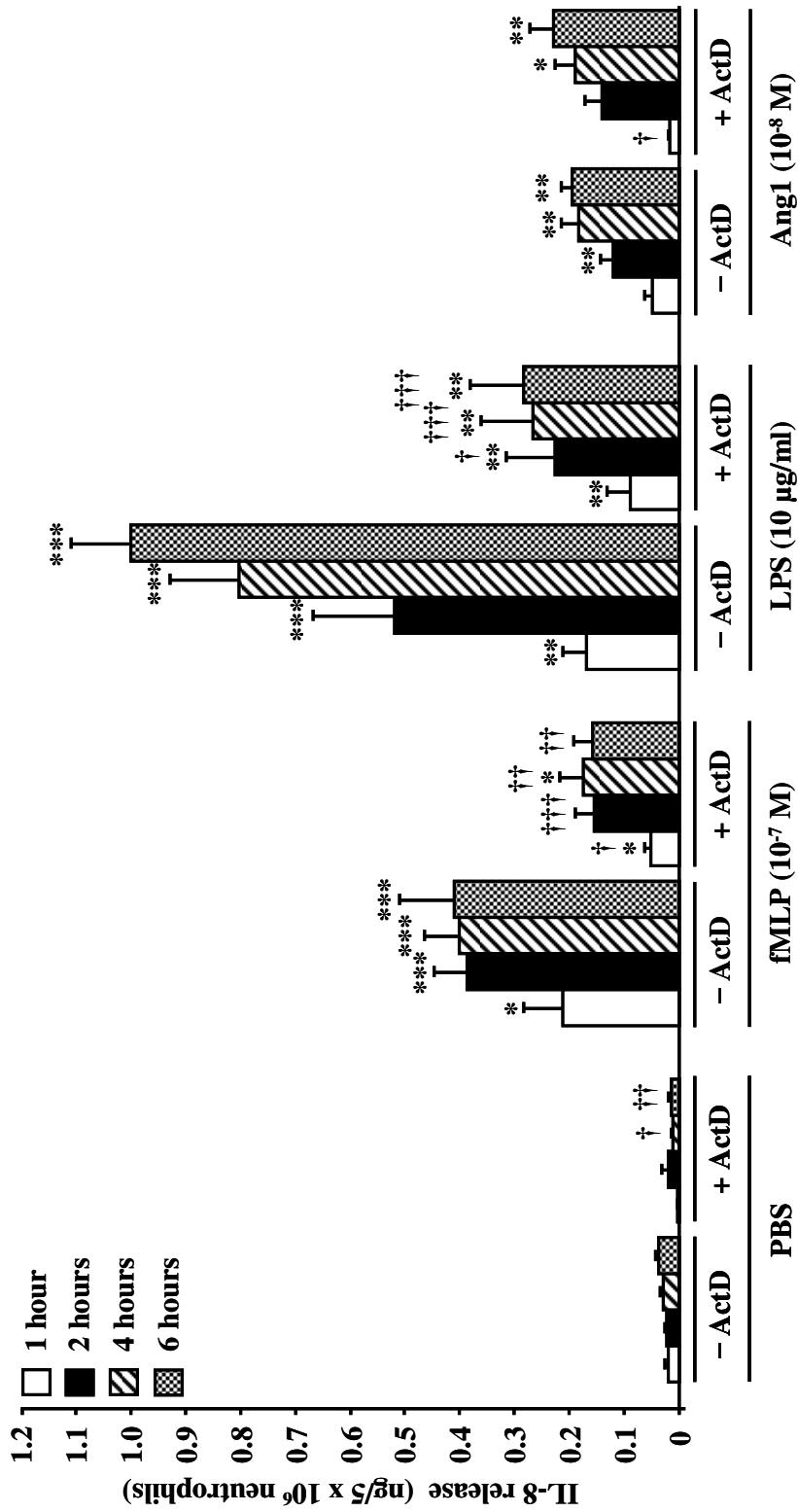


Figure 5A

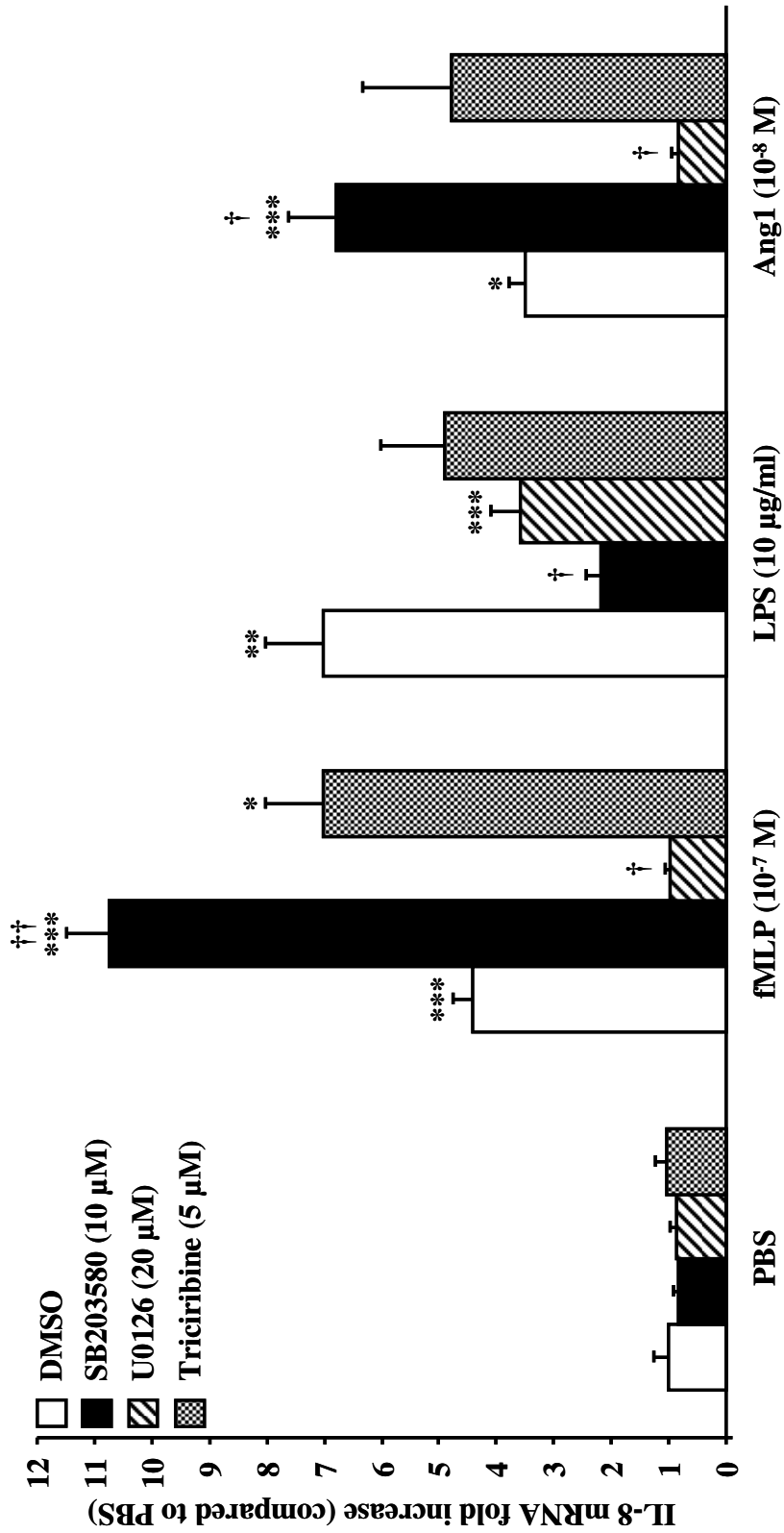


Figure 5B

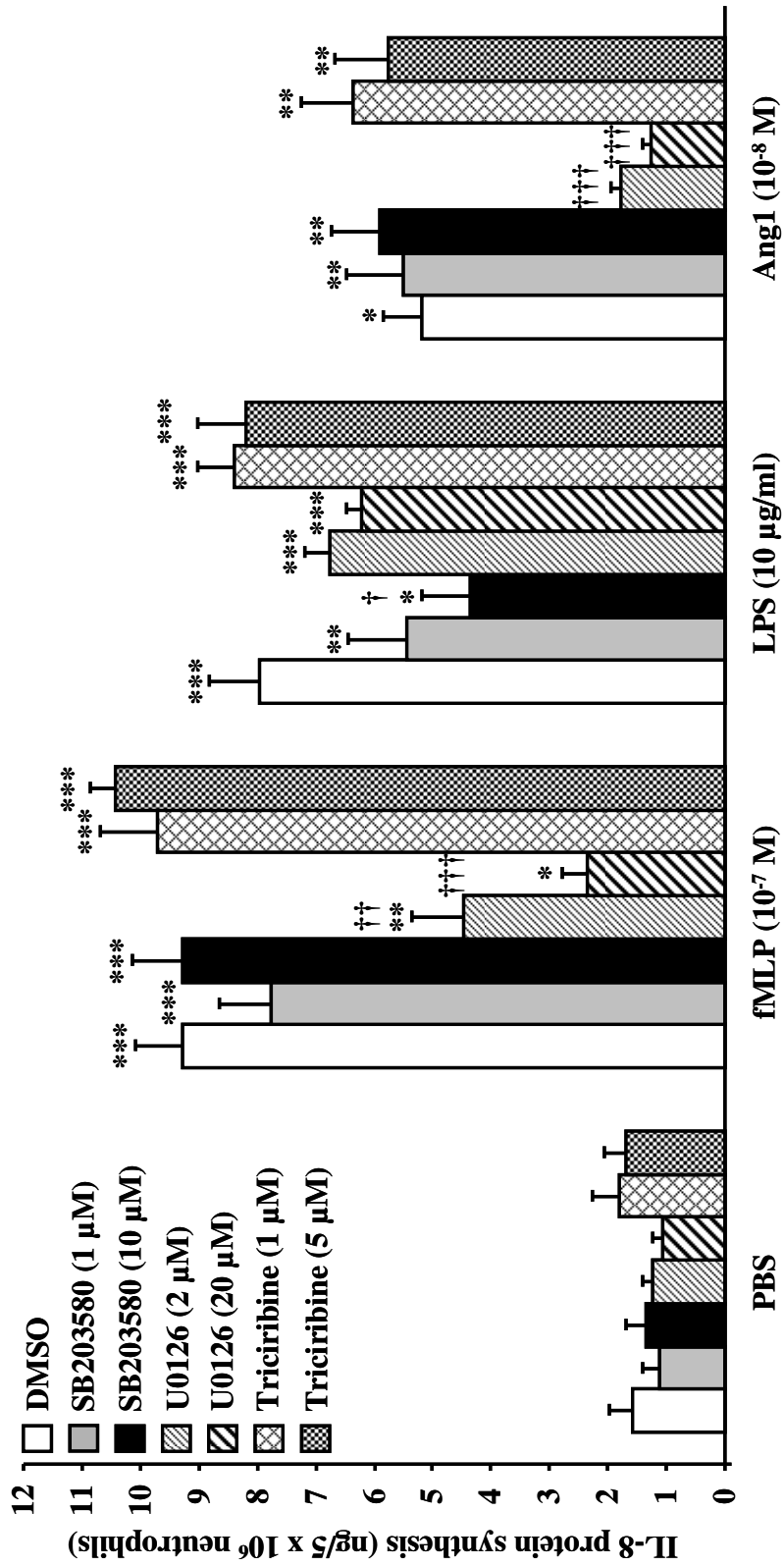


Figure 5C

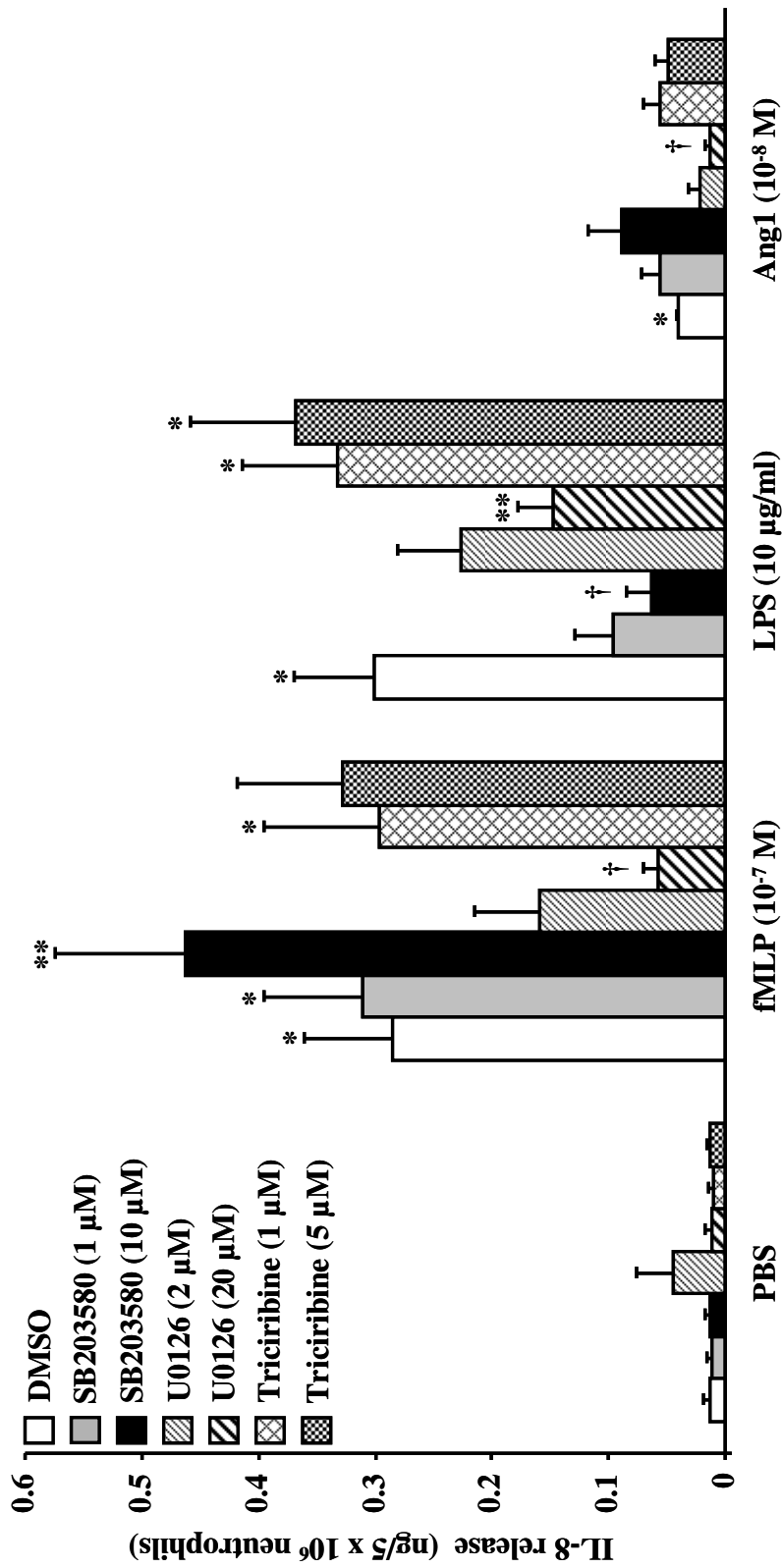


Figure 6A

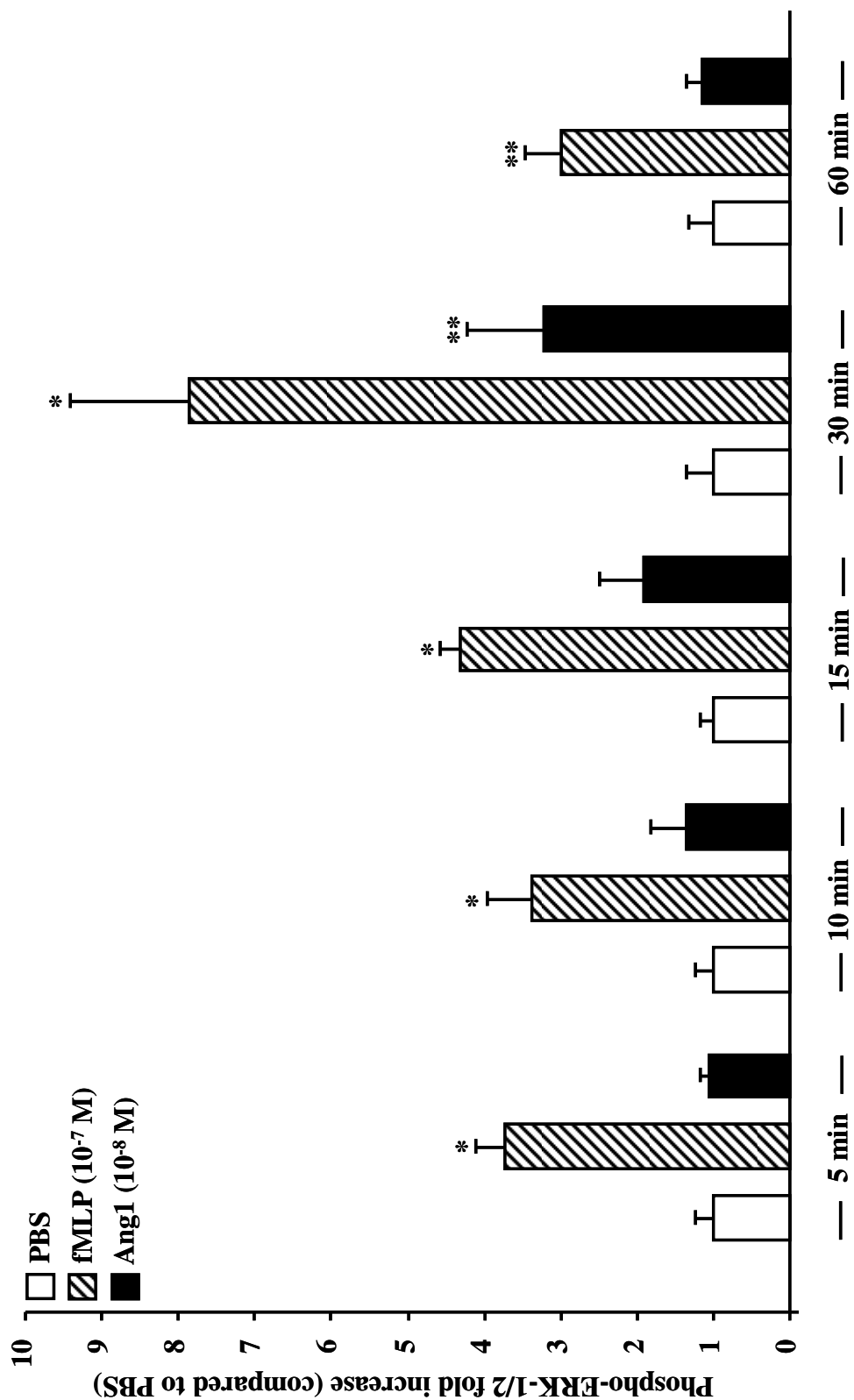
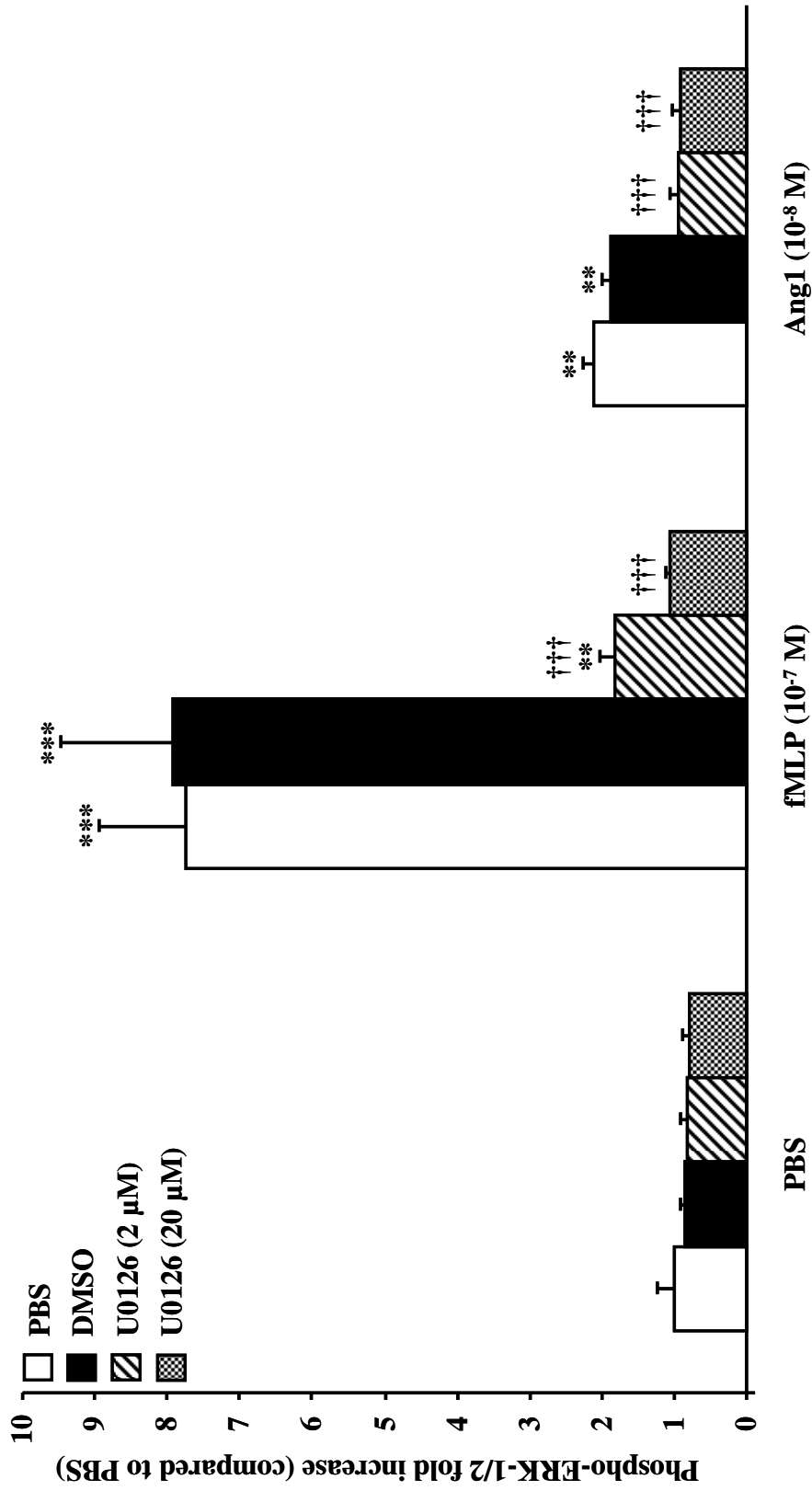


Figure 6B



**Table I: Percentage of IL-8 released by neutrophils**

Treatment	Cumulative IL-8 released (ng/5x10 <sup>6</sup> neutrophils)	Cumulative IL-8 synthesized (ng/5x10 <sup>6</sup> neutrophils)	IL-8 released (%)
PBS	0.05 ± 0.02	9.83 ± 1.18	0.46 ± 0.08
fMLP (10 <sup>-7</sup> M)	0.57 ± 0.11 <sup>***</sup>	14.72 ± 1.63 <sup>*</sup>	4.15 ± 0.84 <sup>**</sup>
LPS (10 μg/ml)	1.60 ± 0.46 <sup>***</sup>	25.93 ± 2.05 <sup>***</sup>	5.70 ± 1.05 <sup>**</sup>
Ang1 (10 <sup>-9</sup> M)	0.08 ± 0.03	10.41 ± 1.04	0.78 ± 0.29
Ang1 (10 <sup>-8</sup> M)	0.33 ± 0.09 <sup>***</sup>	13.10 ± 1.06 <sup>**</sup>	2.45 ± 0.55 <sup>**</sup>

Cumulative IL-8 released represents the IL-8 measured by ELISA from the supernatant, whereas cumulative IL-8 synthesized represents the IL-8 collected from the supernatant and inside neutrophils after the 6-hour treatment. IL-8 released (%) represents the fraction of the cumulative IL-8 released divided by the cumulative IL-8 synthesized. Data is expressed as mean ± SEM. Statistical comparisons were performed by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. \**p*< 0.05, \*\**p*< 0.01 and \*\*\**p*< 0.001 as compared to PBS treatment.



## 4.0 DISCUSSION

### 4.1 Les neutrophiles contiennent et relâchent l'Ang1

Notre laboratoire a été le premier à rapporter l'expression du récepteur Tie2 à la surface des neutrophiles<sup>183</sup>, observation qui a été corroborée par d'autres groupes de recherche indépendants<sup>276, 618</sup>. De plus, nous avons également associé l'expression et l'activation de Tie2 sur les neutrophiles à des activités proinflammatoires, telles que la migration et l'adhésion des neutrophiles à la surface des CE et que ces activités peuvent être induites tant par l'Ang1 que l'Ang2<sup>139, 620</sup>. L'Ang1 est synthétisée et relâchée par les péricytes ou les CML<sup>20, 129, 136</sup>, tandis que l'Ang2 a été localisée dans les corps de Weibel-Palade à l'intérieur des CE, étant relâchée par ces dernières en conditions inflammatoires<sup>139</sup>. Pour leur part, les neutrophiles synthétisent et relâchent le VEGF, qui agit de façon paracrine sur les CE en stimulant le récepteur VEGFR2<sup>623</sup>. À la lumière de ces observations et puisque les neutrophiles et les CE sont à proximité au site inflammatoire, nous avons voulu investiguer la présence des angiopoïétines dans les neutrophiles humains. Ainsi, nous avons démontré pour la première fois l'expression d'Ang1 dans le cytosol des neutrophiles humains, alors que l'Ang2 est absente dans les neutrophiles. De plus, seule une stimulation au PMA, un puissant activateur de la PKC, a induit rapidement la relâche d'Ang1 par les neutrophiles isolés, alors que d'autres agonistes reconnus pour leur capacité d'activer les neutrophiles n'ont eu aucun effet sur la relâche d'Ang1. Finalement, nous avons déterminé que la relâche de l'Ang1 induite par le PMA est un processus calcium-indépendant, contrairement à la relâche du VEGF qui requiert la présence de calcium intracellulaire lorsqu'induite par le PMA.

### 4.2 L'expression génique du VEGF et des angiopoïétines dans les neutrophiles

Tout au long de notre étude, les observations sur l'expression, la localisation et la relâche d'Ang1 chez les neutrophiles ont été parallèlement comparées au VEGF (contrôle interne), étant donné que les études impliquant ce dernier ont déjà été effectuées par d'autres groupes de recherche<sup>623, 625, 626</sup>. Le choix du VEGF était

logique, puisqu'en compagnie d'Ang1, il devient son partenaire complémentaire dans la modulation des processus inflammatoire, angiogénique et de maturation vasculaire<sup>627</sup>.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier si l'ARNm des angiopoïétines était exprimé chez les neutrophiles par RT-PCR. Nous avons observé que seulement l'ARNm de l'Ang1 était présent, alors que nous n'avons pas détecté l'expression de l'ARNm de l'Ang2 dans les neutrophiles. À l'aide de cellules endothéliales veineuses de cordon ombilical humaines (HUVEC), nous avons été en mesure de confirmer l'exactitude de nos paramètres expérimentaux. En effet, l'expression de l'ARNm de notre contrôle interne, le VEGF, a été observée tant chez les neutrophiles que dans les HUVEC, ce qui est en accord avec une étude antérieure effectuée par un groupe de recherche indépendant<sup>628</sup>.

Dans la littérature, la majorité des études ont démontré l'expression de l'ARNm de l'Ang2 et du VEGF dans les CE et les neutrophiles respectivement, par la méthode de RT-PCR qui est une approche semi-quantitative<sup>323, 628</sup>. Pour notre part, nous avons également déterminé de façon quantitative, par la méthode de RT-qPCR, le nombre de copies de l'ARNm du VEGF et de l'Ang1 retrouvées dans les neutrophiles, ainsi que celui de l'Ang2 exprimé chez les neutrophiles et dans les CE. Nous avons ainsi constaté que le nombre de copies de l'ARNm de l'Ang1 dans les neutrophiles est significativement plus bas que celui du VEGF. Ce phénomène est probablement dû au fait qu'à l'état basal, soit en absence de stimulation, les neutrophiles sont reconnus pour l'absence ou la faible expression de l'ARNm codant pour les protéines destinées à l'exocytose, puisque la majorité de ces protéines sont déjà synthétisées lors du processus de myélopoïèse<sup>514, 522</sup>. L'absence d'expression de l'ARNm de l'Ang2 ne signifie pas pour autant l'absence de sa forme protéique, puisque même en absence de son ARNm en conditions basales, la protéine peut être déjà emmagasinée dans les granules des neutrophiles comme dans le cas de l'IL-8, pour lequel son ARNm est exprimé très faiblement ou même absent dans les neutrophiles circulants non stimulés, alors que la présence de la protéine est détectée<sup>629, 630</sup>. De plus, la détection d'un grand nombre de copies de l'ARNm de l'Ang2 dans les CE valide la spécificité des amorces utilisées.

### **4.3 Ang1 est localisée dans le cytosol du neutrophile humain**

En se basant sur la prémisse concernant l'absence de l'ARNm de l'Ang2, nous avons vérifié l'expression protéique des deux angiopoïétines dans les neutrophiles par une méthode semi-quantitative, soit par cytométrie en flux et une méthode quantitative, soit par ELISA. L'utilisation de ces deux approches nous a permis de déterminer la présence protéique de l'Ang1, et l'absence de l'Ang2 dans les neutrophiles humains circulants en conditions basales. L'expression du VEGF dans les neutrophiles a également été détectée par ces deux méthodes. Fait intéressant, nous avons observé, en utilisant la technique de cytométrie en flux, que l'augmentation de la fluorescence émise par l'anticorps spécifique contre l'Ang1 par rapport à l'anticorps contrôle (IgG) est plus grande que l'augmentation de la fluorescence émise par l'anticorps contre le VEGF comparé au même IgG. Deux hypothèses pouvaient être émises suite à ces observations : la première étant que l'Ang1 et le VEGF sont exprimés en quantité significativement différente dans les neutrophiles et la deuxième hypothèse étant la possibilité de la localisation dans différents compartiments cellulaires de ces deux protéines. La dernière hypothèse pourrait s'expliquer par le fait que dans les neutrophiles perméabilisés, les sous-types de granules sont moins efficacement perméabilisés, ce qui a pour effet de diminuer l'efficacité des anticorps spécifiques contre le VEGF à se lier à leur cible, et ainsi nous donner un résultat qui pourrait être interprété uniquement comme une quantité moindre de VEGF comparée à l'Ang1. Pour répondre à ces deux hypothèses, nous avons, dans un premier lieu, quantifié l'expression du VEGF et de l'Ang1 par la méthode de l'ELISA et avons trouvé que l'expression de l'Ang1 par rapport à celle du VEGF était 3 à 4 fois plus élevée dans les neutrophiles non stimulés, validant ainsi notre première hypothèse.

Afin de valider la deuxième hypothèse émise concernant la localisation de l'Ang1 et du VEGF, nous avons utilisé une « bombe » à l'azote afin de recueillir les différents types de granules contenues dans les neutrophiles. Le principe de cette « bombe » est le suivant : les neutrophiles sont incubés avec une pression de l'ordre de 450 PSI d'azote pour une durée de 20 minutes, durant laquelle le gaz pressurisé se dissout et entre dans les cellules. À la fin de l'incubation, la pression est rapidement

diminuée et l'azote forme alors des bulles qui sont relâchées de l'intérieur des cellules afin de s'équilibrer à la pression atmosphérique, détruisant ainsi la membrane cellulaire externe et permettant la relâche du contenu cellulaire, mais en maintenant intact les granules intracellulaires. Cette méthode, suivie d'une centrifugation sur gradient de densité, nous a permis d'isoler chacun des sous-types de granules selon leur densité et ainsi, de déterminer que l'Ang1 est présente dans la fraction cytosolique, et absente des différents granules isolés des neutrophiles. D'autre part, notre étude nous a permis d'observer que le VEGF est localisé dans les granules spécifiques, tel que démontré par un autre groupe de recherche<sup>623</sup>. Ces observations valident également notre deuxième hypothèse, à l'effet que l'Ang1 et le VEGF sont localisés dans des compartiments cellulaires distincts.

La localisation de l'Ang1 dans le cytosol peut paraître surprenante, étant donné que la majorité des protéines régulatrices de l'inflammation se retrouvent dans les vésicules sécrétoires et les granules spécifiques chez les neutrophiles. Cependant, plusieurs protéines de la famille des inhibiteurs d'élastase sont retrouvées dans le cytoplasme des neutrophiles, dont la *Secretory leukocyte proteinase inhibitor* (SLPI)<sup>631</sup>, l'*elastase inhibitor* (EI)<sup>632, 633</sup> et l'*elafin*<sup>631, 634</sup>. L'Ang1 pourrait soit emprunter un chemin différent du VEGF et des autres cytokines inflammatoires lors de sa synthèse durant la myélopoïèse, n'étant pas incorporée dans un des sous-types de granules dans les neutrophiles, ou bien être synthétisée après la formation des granules, ce qui entraîne son absence à l'intérieur de celles-ci dans les neutrophiles.

#### **4.4 Seul le PMA est capable d'induire la relâche d'Ang1 par les neutrophiles**

L'Ang1 est un agoniste du récepteur Tie2, alors que ce dernier est exprimé tant à la surface des CE que des neutrophiles<sup>183, 186</sup>. Afin que l'Ang1 contenue dans les neutrophiles puisse induire un effet biologique, elle doit être relâchée pour stimuler le récepteur Tie2, de façon paracrine ou autocrine. Étant donné que l'Ang1 induit des effets proinflammatoires sur les neutrophiles *in vitro*, tels que la migration et leur adhésion aux CE, nous avons voulu vérifier la capacité des neutrophiles à relâcher l'Ang1 à l'aide de différents agonistes capables de promouvoir un état inflammatoire. Nous avons donc utilisé des agonistes proinflammatoires tels le

fMLP, le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, la thrombine et l'histamine, ainsi qu'un composé organique artificiel reconnu pour être un puissant activateur de la PKC, soit le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)<sup>635</sup>. Le fMLP et le TNF- $\alpha$  sont reconnus pour leur capacité à promouvoir la relâche du VEGF par les neutrophiles, alors que l'IL-8 est un puissant inducteur de la chimiotaxie des neutrophiles, activité qui peut être potentialisée par un prétraitement avec l'Ang1 ou l'Ang2<sup>182, 623</sup>. Tous ces agonistes physiologiques sont reconnus pour induire une dégranulation partielle des neutrophiles, tandis que le PMA est un puissant médiateur capable d'induire une dégranulation majeure (sinon complète) par les neutrophiles<sup>623, 636</sup>.

Seul un traitement avec le PMA a été capable d'induire la relâche de l'Ang1 par les neutrophiles, et ce à partir de seulement 15 minutes post-stimulation, alors que le traitement avec les agonistes physiologiques n'a pas induit sa relâche. Nous avons également stimulé les neutrophiles avec l'histamine, un puissant agent inflammatoire et la thrombine, une molécule reconnue pour sa capacité de recruter les neutrophiles au site inflammatoire<sup>637, 638</sup>. Toutefois, ces puissants agonistes ont également été inefficaces à induire la relâche de l'Ang1 par les neutrophiles. Puisque le VEGF est capable d'induire la relâche de l'Ang2 par les CE, alors qu'un prétraitement avec l'Ang1 bloque cette activité, nous avons émis l'hypothèse que le traitement des neutrophiles avec le VEGF pourrait induire la relâche d'Ang1. Toutefois, cette hypothèse s'est également avérée négative. Cette réponse négative pourrait s'expliquer par l'absence de l'expression du récepteur VEGFR2, par rapport à la présence du VEGFR1 à la surface des neutrophiles, et en tenant compte que le VEGFR2 serait possiblement responsable de la relâche d'Ang2 induite par le VEGF dans les CE<sup>234</sup>. En dernier lieu, puisque le récepteur Tie2 est présent à la surface des neutrophiles et que l'Ang2 est capable d'activer ce récepteur et d'induire des activités proinflammatoires<sup>182, 183</sup>, nous avons stimulé les neutrophiles avec des concentrations croissantes d'Ang2 (0,1 – 10 nM) dans le but d'induire la relâche d'Ang1, mais les résultats ont été similaires à ceux décrits auparavant, soit l'incapacité de l'Ang2 à induire la relâche de l'Ang1.

De son côté, le VEGF a été relâché par les neutrophiles suite à la stimulation avec le PMA, le fMLP et le TNF- $\alpha$ . Fait intéressant, le PMA a été l'agoniste le plus

puissant, induisant une relâche de VEGF cinq fois plus puissante que les deux agonistes physiologiques. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que le fMLP et le TNF- $\alpha$  soient uniquement capables d'induire la relâche de protéines localisées uniquement dans les granules des neutrophiles<sup>515, 542, 639</sup>, tandis que l'Ang1 serait insensible à leurs signaux d'exocytose, puisqu'elle est localisée uniquement dans le cytosol.

Afin de démontrer hors de tout doute la localisation de l'Ang1 dans le cytosol ainsi que son absence dans les granules des neutrophiles, nous avons utilisé deux approches. Dans un premier temps, nous avons utilisé une approche directe et qui implique l'incubation des neutrophiles avec la pentoxifylline, un inhibiteur spécifique de l'exocytose des granules<sup>640</sup>, avant la stimulation avec le PMA. L'inhibition significative de la relâche du VEGF et l'absence d'inhibition de la relâche de l'Ang1 induite par le PMA a permis de confirmer la présence du VEGF et l'absence de l'Ang1 dans les granules des neutrophiles. Dans un deuxième temps, puisque la mobilisation des granules pour le processus d'exocytose est calcium-dépendante, nous avons utilisé une méthode indirecte qui portait sur l'utilisation d'un chélateur calcique (BAPTA-AM), qui prévient l'augmentation du calcium intracellulaire et qui empêche la relâche du contenu des granules dans le milieu extracellulaire. Les résultats obtenus ont été semblables à ceux observés avec la pentoxifylline, soit l'absence d'inhibition de relâche de l'Ang1 par les neutrophiles, tout en bloquant la relâche du VEGF. Cette approche nous a permis de confirmer l'absence de l'Ang1 dans les granules des neutrophiles.

#### **4.5 Implications dans l'inflammation de l'Ang1 contenue dans les neutrophiles**

L'angiopoïétine-1 a été caractérisée en premier lieu comme une molécule ayant des activités anti-inflammatoires suite à l'activation de son récepteur Tie2 exprimé sur les CE<sup>220, 229-231, 235</sup>. L'Ang1 est surtout synthétisée et exprimée dans les cellules de la paroi vasculaire, soit les péricytes et les CML, mais également dans les cellules tumorales et maintenant chez les neutrophiles<sup>139, 620</sup>. De son côté, le récepteur Tie2 est exprimé majoritairement à la surface des CE, mais également sur

certaines cellules tumorales, les neutrophiles et les monocytes<sup>178, 179, 182, 183, 191, 260</sup>. Ainsi, à la lumière de ces observations, la majorité des activités engendrées par l'Ang1 surviendraient lorsque cette dernière serait relâchée pour activer le récepteur Tie2 de manière autocrine et/ou paracrine.

Notre laboratoire a démontré des activités proinflammatoires de l'Ang1, notamment sur sa capacité d'induire la synthèse du PAF et la translocation de la P-sélectine dans les CE, mais également sur la translocation de la  $\beta 2$  intégrine à la surface des neutrophiles, ainsi que leur migration et adhésion aux CE<sup>182, 183, 273, 274</sup>. À la lumière de tous ces phénomènes mentionnés ci-haut, la présence de l'Ang1 dans les neutrophiles pourrait jouer un rôle proinflammatoire et proangiogénique, lors de leur migration et infiltration dans les tissus environnants, ou bien induire la résolution de l'inflammation lors de leur mort par apoptose ou nécrose. Deux hypothèses seraient ainsi envisageables et se baseraient sur la présence ou l'absence actuelle de l'exocytose de l'Ang1 induite par des agonistes physiologiques, suivie par leur séquestration, soit à la MEC ou à la membrane plasmique des neutrophiles par les intégrines et le récepteur Tie2.

Dans la première hypothèse, l'Ang1 ne serait pas relâchée dans le milieu extracellulaire, mais resterait séquestrée à la surface de la membrane cellulaire grâce à sa liaison aux intégrines et/ou à son récepteur Tie2. Récemment, de nouvelles études ont démontré l'implication de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  dans l'activation optimale de Tie2 par l'Ang1. Ainsi, lorsque l'Ang1 est présente en grande concentration, elle peut soit activer le récepteur Tie2 et l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  de façon indépendante, ou activer le complexe Tie2/ $\alpha_5\beta_1$  lorsque l'Ang1 est présente en plus faible concentration<sup>242</sup>. L'activation de ce complexe survient lorsque l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  est activée au préalable par la fibronectine et promeut un *cross-talk* entre la signalisation de Tie2 et de l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$ , prolongeant ainsi la durée d'activation du récepteur Tie2 par l'Ang1. Dans notre cas, l'Ang1 pourrait induire des signaux proinflammatoires, comme l'augmentation de la survie et la migration des neutrophiles, possiblement via sa capacité d'activer la PI3K<sup>182</sup>.

Dans la deuxième hypothèse, l'Ang1 serait relâchée de façon exhaustive dans le milieu extracellulaire par les neutrophiles comme dans le cas d'une stimulation au

PMA ou lors d'une mort cellulaire (apoptose ou nécrose). Dans ce cas, l'Ang1 relâchée serait immédiatement séquestrée à la MEC, tel que démontré par deux groupes de recherche indépendants<sup>351, 641</sup>. En effet, les groupes du Dr Alitalo et du Dr Mochizuki ont démontré que lorsque les CE sont en contact, comme dans le cas de vaisseaux sanguins quiescents, le complexe Ang1/Tie2 est localisé à la membrane cellulaire, alors qu'en absence de contact cellule-cellule entre les CE, comme lors de l'inflammation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le complexe Ang1/Tie2 se retrouve à l'interface des contacts cellule-MEC<sup>351, 641</sup>. Ceci est possible grâce à la séquestration de l'Ang1 à la MEC, qui est due à une grande affinité de l'Ang1 pour cette dernière<sup>641</sup>. Fait intéressant, ces deux groupes ont également démontré que l'activité de Tie2 suite à la stimulation avec l'Ang1 est anti-inflammatoire, lorsque les CE sont dans un état quiescent et présentent des contacts cellule-cellule fermes, grâce notamment à l'induction de la survie des CE alors que l'activité de cette même Ang1 est proinflammatoire lorsque les contacts cellule-cellule disparaissent promouvant, de concert avec le VEGF, ainsi que l'angiogenèse, la migration et la prolifération des CE<sup>351, 641</sup>.

Dans notre cas, la séquestration de l'Ang1 à la MEC des neutrophiles induite par différentes protéines inflammatoires aurait pour but de moduler finement la disponibilité d'Ang1 au cours du processus inflammatoire. De plus, lorsque les neutrophiles entrent en processus d'apoptose lors de la résorption de l'inflammation, la totalité de l'Ang1 serait libérée dans le microenvironnement de l'inflammation suite à la mort programmée des neutrophiles et pourrait ainsi contribuer à la stabilisation et à la diminution de la perméabilité des vaisseaux sanguins à la fin du processus inflammatoire, via l'activation du récepteur Tie2 sur les CE.

#### **4.6 Perspectives**

Plusieurs interrogations persistent suite à la complétion de cette étude, ainsi, plusieurs hypothèses pourraient être étudiées afin de mieux comprendre la nature de l'implication de l'Ang1 dans les processus inflammatoires.

Premièrement, étant donné qu'il n'est pas clairement établi si l'Ang1 présent dans les neutrophiles est séquestré à la membrane cellulaire suite à la stimulation



avec des agonistes physiologiques qui peuvent induire une dégranulation partielle à complète des neutrophiles, il serait intéressant de vérifier cette hypothèse. De plus, si elle s'avère vraie, la démonstration de l'association avec les intégrines et/ou le récepteur Tie2 devrait être effectuée.

Par la suite, il serait approprié de déterminer les mécanismes d'action menant à la relâche de l'Ang1 par le PMA ainsi que ceux menant à la séquestration de l'Ang1 à la membrane des neutrophiles si cela est le cas. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait mener à la découverte de nouvelles cibles pharmacologiques pour la modulation de l'inflammation dans les pathologies chroniques.

Finalement, dans un contexte de compréhension des effets systémiques engendrés par la présence de l'Ang1 dans les neutrophiles humains, il a déjà été bien établi que chez la souris on retrouve l'orthologue de l'Ang1, soit l'Ang3<sup>133</sup>. Il serait donc pertinent de vérifier l'expression de l'Ang3 dans les neutrophiles de souris et, le cas échéant, déterminer la possibilité de sa relâche par des médiateurs inflammatoires *in vitro*. Des études *in vivo* utilisant des modèles de souris KO et transgéniques pourraient également être effectuées afin de déterminer spécifiquement le rôle dans les processus inflammatoires et angiogéniques de l'Ang3 présent dans les neutrophiles murins et ainsi pouvoir le transposer à l'Ang1 humaine.

#### **4.7 Conclusions de la première étude**

Lors de cette étude nous avons été les premiers à démontrer :

- 1) L'expression génique et protéique de l'Ang1 et l'absence de l'expression de l'Ang2 dans les neutrophiles humains.
- 2) La localisation de l'Ang1 dans le cytosol des neutrophiles humains.
- 3) L'induction de la relâche de l'Ang1 par les neutrophiles seulement suite à une stimulation avec le PMA, et ce, de façon calcium-indépendante.

Ces résultats s'alignent avec les autres observations sur la dualité entre l'Ang1 et l'Ang2 pour ce qui est des types cellulaires dans lesquels elles sont exprimées. Ainsi,

l'expression et la relâche d'Ang1 par les neutrophiles est complémentaire à celle de l'Ang2 exprimée et relâchée par les CE. Ceci représente le franchissement d'une étape supplémentaire dans la compréhension de l'interaction entre les neutrophiles et les CE au début du processus inflammatoire et ouvre la voie à de nouvelles études qui devraient permettre d'élucider les mécanismes impliqués dans ces processus.

#### **4.8 Implication des angiopoïétines dans la synthèse et la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles**

Notre laboratoire a démontré la capacité des angiopoïétines (Ang1 et Ang2) à induire la migration des neutrophiles<sup>182</sup>. De plus, un prétraitement des neutrophiles avec l'Ang1 ou l'Ang2 a potentialisé la migration des neutrophiles induite par l'IL-8, qui est reconnue comme étant un médiateur chimiotactique puissant<sup>414</sup>. Dans la deuxième étude, nous avons démontré la capacité de l'Ang1, contrairement à l'Ang2, à induire une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8, ainsi que de la synthèse et la relâche de sa protéine d'une manière rapide et transitoire. De plus, la relâche de l'IL-8 suite à la stimulation avec l'Ang1 est due à une augmentation de la synthèse protéique *de novo* à partir de l'ARNm de l'IL-8 préexistant dans les neutrophiles, ainsi qu'à une augmentation transitoire de la transcription de l'ADN en ARNm de l'IL-8. Finalement, toutes ces activités sont régulées via l'activation de la p42/44 MAPK et indépendamment de l'activation de la p38 MAPK et de la PI3K/Akt.

#### **4.9 Seule l'Ang1 a la capacité d'induire la relâche et la synthèse de l'IL-8**

Plusieurs agents inflammatoires ont la capacité d'induire la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles et ce, soit de façon rapide et transitoire, soit de manière soutenue et prolongée durant un temps variant de quelques minutes jusqu'à 24 heures post-stimulation<sup>629, 642</sup>. Nous avons donc choisi parmi ces nombreuses molécules capables d'induire la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles, le fMLP et le LPS comme témoins positifs afin de comparer les caractéristiques de l'induction de la relâche et la synthèse de l'IL-8 par ces deux molécules avec celles induites par les angiopoïétines. Le fMLP a été choisi pour sa caractérisation antérieure comme un inducteur rapide et

transitoire de la relâche de l'IL-8, ainsi qu'à cause de sa capacité à induire la chimiotaxie des neutrophiles<sup>642, 643</sup>. Pour ce qui est du LPS, ce dernier a été caractérisé pour sa capacité à induire la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles humains de façon robuste et soutenue, le différenciant ainsi du fMLP, capable seulement d'induire la relâche de l'IL-8 de façon transitoire<sup>629</sup>.

Nous avons donc commencé à étudier les effets de l'Ang1 et de l'Ang2 ( $10^{-10}$  –  $10^{-8}$  M), en parallèle avec le fMLP comme témoin positif, sur la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles, et nous avons constaté l'absence de relâche de l'IL-8 dans le milieu extracellulaire jusqu'à 45 minutes, alors qu'à partir d'une heure post-stimulation, cette relâche a augmenté significativement seulement après stimulation avec l'Ang1, et ce à la plus grande concentration testée ( $10^{-8}$  M). Comme attendu, la relâche de l'IL-8 a également augmenté de façon significative suite au traitement avec le fMLP. Étant donné que nous n'avions pas atteint l'effet maximal de la relâche de l'IL-8, et que l'Ang2 ne semblait pas promouvoir la relâche de l'IL-8 aux temps les plus courts, nous avons prolongé la durée de stimulation jusqu'à 24 heures et nous avons constaté que l'Ang2 à toutes les concentrations testées et l'Ang1 aux concentrations les plus faibles ( $10^{-9}$  et  $10^{-10}$  M) étaient incapables d'induire une augmentation de la relâche de l'IL-8 par les neutrophiles, alors que celle induite par l'Ang1 à  $10^{-8}$  et le fMLP ont atteint un plateau après 2 heures de stimulation. La relâche basale de l'IL-8 en absence de stimulation était négligeable à tous les temps étudiés, n'augmentant que très peu durant la période de 24 heures. Nous avons alors choisi pour le restant de l'étude des temps de stimulation commençant à 1 heure et se terminant 6 heures post-traitement. De plus, nous avons aussi inclus le LPS comme le témoin positif le plus robuste, puisque la relâche de l'IL-8 induite par ce dernier n'avait pas plafonné à 6 heures post-stimulation.

Malgré le fait que la majorité des cytokines et agents inflammatoires emmagasinés dans les granules des neutrophiles soient synthétisés durant la myélopoïèse, certaines cytokines, dont l'IL-8, peuvent être synthétisées *de novo* dans les neutrophiles matures suite à des stimuli inflammatoires<sup>644-646</sup>. Nous avons démontré dans cette étude que l'Ang1 ( $10^{-8}$  M) est non seulement capable d'induire la relâche de l'IL-8, mais également sa synthèse, qui est robuste et transitoire, étant

achevée dans les deux heures suivant la stimulation. Nous avons également observé que la quantité de l'IL-8 synthétisée par les neutrophiles suite à la stimulation avec l'Ang1 durant la première heure de stimulation est d'environ 50% plus faible que celle induite par le fMLP, qui a induit une synthèse de l'IL-8 plus robuste. Cependant, si nous analysons la quantité totale de l'IL-8 ayant été synthétisée après les 6 heures de stimulation avec l'Ang1, celle-ci est comparable à la quantité synthétisée par le fMLP. Ces données démontrent ainsi que l'Ang1 induit la synthèse de l'IL-8 par les neutrophiles de façon moins rapide, mais plus soutenue, comparée à la synthèse d'IL-8 induite par le fMLP.

Fait intéressant, la synthèse de l'IL-8 *de novo* en absence d'agoniste a été constante et a augmenté à chaque heure durant le temps de stimulation, au point où après 6 heures d'incubation les neutrophiles avaient synthétisé une quantité d'IL-8 très peu inférieure à celle induite par le fMLP et l'Ang1. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les neutrophiles circulants ont été isolés de leur environnement naturel, soit les vaisseaux sanguins, et ont été incubés dans un milieu artificiel qui pourrait mimer leur infiltration dans les tissus. De plus, nous avons observé que l'IL-8 relâchée par les neutrophiles après 6 heures de traitement avec les différents agonistes utilisés représente seulement un pourcentage infime de la quantité de l'IL-8 synthétisée durant la même période. Ceci est en lien avec une autre étude, dans laquelle les auteurs ont observé que seulement le tiers de l'IL-8 synthétisée *de novo* par les neutrophiles est aussi relâché suite à un traitement des neutrophiles au LPS et au fMLP<sup>647</sup>. Ce phénomène particulier est expliqué par le fait que la perte du contact cellule-cellule des neutrophiles avec les CE induit la synthèse de l'IL-8, mais rend ces derniers moins aptes à relâcher l'IL-8 nouvellement synthétisée<sup>644</sup>.

#### **4.10 L'Ang1 module l'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans les neutrophiles**

Les neutrophiles fraîchement isolés du sang humain de volontaires sains contiennent une faible quantité d'IL-8 protéique, et serait insuffisante pour expliquer la quantité d'IL-8 relâchée par les neutrophiles suite à une stimulation par les agonistes après une heure de stimulation. Il existe alors deux sources potentielles de synthèse *de novo* de l'IL-8. La première source d'IL-8 protéique serait

l'augmentation de la traduction de l'ARNm de l'IL-8 préexistant en sa protéine et la deuxième source de synthèse d'IL-8 impliquerait une augmentation de la transcription de l'ADN en ARNm de l'IL-8 suivie de la traduction de ce dernier en sa protéine. Des études antérieures ont démontré la capacité du fMLP et du LPS à induire l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 chez les neutrophiles<sup>642, 648</sup>. Nous avons donc voulu investiguer la capacité de l'Ang1 à induire l'augmentation de la transcription de l'ADN en ARNm de l'IL-8 dans les neutrophiles. Nous avons ainsi observé que l'Ang1 ( $10^{-8}$  M) induit une augmentation significative mais transitoire (seulement après une heure post-traitement) de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 des neutrophiles, similaire à l'augmentation induite par le fMLP. La stimulation avec le LPS, notre agoniste le plus puissant, a induit une augmentation rapide mais soutenue (jusqu'à 4 heures post-traitement) de l'expression de l'ARNm de l'IL-8, ce qui corrèle avec sa capacité d'induire la synthèse et la relâche de l'IL-8 protéique également de manière prolongée dans le temps. Ces observations peuvent suggérer que la synthèse protéique de l'IL-8 induite par l'Ang1 et les agonistes positifs est dépendante de l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8.

Afin de déterminer si la synthèse *de novo* d'ARNm de l'IL-8 est responsable de l'augmentation de la synthèse de sa protéine, nous avons prétraité les neutrophiles avec un inhibiteur non spécifique de la transcription de l'ADN en ARNm, soit l'actinomycine D (ActD). Ce composé chimique est aussi largement utilisé afin de déterminer si un agoniste est capable d'augmenter la stabilité de l'ARNm, sans nécessairement augmenter son expression. Comme nous l'avons observé auparavant, la synthèse de l'ARNm de l'IL-8 suivant l'ajout des agonistes (fMLP et Ang1) est rapide, mais l'ARNm nouvellement synthétisé est également dégradé de façon concise. La hausse soutenue de l'expression de l'ARNm induite par le LPS pourrait être expliquée soit par une stimulation continue de la transcription de l'ADN en ARNm de l'IL-8, par l'augmentation de la stabilité de l'ARNm initialement synthétisé ou par la combinaison de ces deux derniers phénomènes.

Afin de conclure à une induction de la stabilité de l'ARNm de l'IL-8 par les agonistes, il est nécessaire d'observer la même expression d'ARNm exprimé à un

temps donné, et ce soit en absence ou en présence de l'ActD. Premièrement, nous avons observé que l'ActD a été en mesure d'inhiber de façon significative l'expression de l'ARNm en conditions basales, ce qui démontre que l'ARNm de l'IL-8 est synthétisé *de novo* en absence de stimulation, rejoignant l'observation faite précédemment à l'effet que dans les mêmes conditions, une importante synthèse d'IL-8 protéique est effectuée par les neutrophiles. Le traitement avec l'ActD a provoqué une inhibition significative, bien que partielle, de l'augmentation rapide et robuste de l'expression de l'ARNm de l'IL-8, durant la première heure de traitement, induite par tous les agonistes, incluant l'Ang1, ce qui signifie que l'ARNm de l'IL-8 n'est pas stabilisé à court terme, ce qui n'est pas étonnant puisque l'ARNm est déjà synthétisé de façon robuste. Cependant, suite à cette synthèse initiale, la diminution de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 en présence de l'ActD s'est poursuivie jusqu'à la fin de la durée du traitement pour tous les agonistes, exception faite de l'Ang1 qui, même en présence d'ActD a réussi à maintenir les mêmes niveaux d'expression d'ARNm que ceux observés en absence d'ActD. Ce dernier résultat démontre que l'Ang1 est capable d'induire la stabilisation de l'ARNm de l'IL-8 après une heure de traitement. Quant à l'augmentation soutenue de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 induite par le LPS, seule la synthèse en continu de l'ARNm peut expliquer ce phénomène, puisque nous avons déterminé que le LPS était incapable de stabiliser cet ARNm.

#### **4.11 La synthèse et la relâche de l'IL-8 induite par l'Ang1 sont régulées par l'activité transcriptionnelle et traductionnelle des neutrophiles**

L'augmentation rapide de la synthèse de l'IL-8 qui est induite par la stimulation avec chacun des agonistes testés peut être expliquée par la contribution de la traduction de l'ARNm de l'IL-8 déjà existant et/ou synthétisé *de novo* durant la première heure de traitement. Lors du traitement des neutrophiles avec l'ActD, nous avons observé une baisse significative du pic de la synthèse protéique initiale après la stimulation avec tous les agonistes, ce qui confirme la contribution de l'ARNm nouvellement synthétisé de l'IL-8 à l'augmentation de son expression protéique. Cependant, tandis que la synthèse protéique de l'IL-8 induite par les témoins positifs

était inhibée de façon significative par l'ActD, celle induite par l'Ang1 n'était plus influencée par l'inhibiteur de transcription. Ce résultat s'explique par le fait que l'ARNm de l'IL-8 est stabilisé par l'action de l'Ang1, permettant ainsi à ce dernier d'être traduit en sa protéine, alors que les agonistes positifs n'induisent pas ce phénomène et ainsi la synthèse de l'IL-8 s'en trouve diminuée. Le même phénomène est observé lors de la relâche de l'IL-8 sous les mêmes conditions. Nous pouvons ainsi conclure que la synthèse et la relâche de l'IL-8 induites par l'Ang1 requièrent tant la transcription de l'ADN de l'IL-8 en son ARNm, que la traduction de ce dernier en sa protéine pour la première heure d'incubation, tandis que seulement la traduction de l'ARNm de l'IL-8 stabilisé est requise par la suite, et ce jusqu'à la fin du traitement de six heures.

Tel que discuté auparavant, nous avons retrouvé une très faible quantité d'IL-8 dans les neutrophiles suite à leur isolation, et ceci n'est pas surprenant étant donné qu'il s'agit de neutrophiles circulants quiescents, n'étant pas extraits d'un milieu hautement inflammatoire, contrairement aux neutrophiles exsudatifs, qui sont caractérisés par leur concentration élevée en IL-8 post-isolation<sup>644</sup>. La faible concentration endogène d'IL-8 retrouvée dans les neutrophiles circulants est insuffisante pour être considérée comme la seule source contribuant à la relâche induite par le fMLP et le LPS. Dès lors, la synthèse *de novo* de l'IL-8 est requise pour sa relâche induite par ces agonistes. Cependant, le contenu initial de l'IL-8 pourrait être suffisant pour contribuer à la totalité de la concentration de l'IL-8 relâchée par les neutrophiles, lorsque stimulés avec l'Ang1. Afin de déterminer si la relâche de l'IL-8 induite par l'Ang1 était dépendante de sa synthèse *de novo*, nous avons prétraité les neutrophiles avec un inhibiteur de la synthèse protéique, soit la cycloheximide (CHX). Nous avons premièrement testé son efficacité quant à sa capacité de bloquer la synthèse de l'IL-8 et nous avons déterminé que la CHX est capable d'inhiber en quasi-totalité le pic de synthèse de l'IL-8 induite par tous les agonistes, incluant l'Ang1 dans les neutrophiles. En parallèle, nous avons observé le même phénomène induit par la CHX sur la relâche d'IL-8, ce qui démontre que cette relâche est dépendante de l'induction de la synthèse de l'IL-8 *de novo* par l'Ang1 dans les neutrophiles.

#### **4.12 La surexpression de l'ARNm de l'IL-8 induite par l'Ang1 pourrait être modulée par divers facteurs de transcriptions, dont le NF- $\kappa$ B**

Étant donné la complexité et la longueur de la présente étude, nous n'avons pas déterminé le ou les facteurs de transcriptions impliqués dans l'augmentation de la transcription de l'ARNm de l'IL-8 induite par l'Ang1. Cependant, dans la littérature, plusieurs études ont démontré que le gène de l'IL-8 est modulé, dans différents types cellulaires, par une multitude de facteurs de transcription, qui peuvent soit être des activateurs de la transcription de l'ADN en ARNm de l'IL-8, comme le NF- $\kappa$ B, l'AP-1 et le C/EBP<sup>439, 649, 650</sup>, soit des répresseurs de cette transcription, comme le *NF- $\kappa$ B Repressor Factor* (NRF) ou l'OCT-1<sup>444, 446</sup>.

Dans les neutrophiles, la transcription du gène de l'IL-8 peut être augmentée par l'activation du NF- $\kappa$ B suite à sa translocation au noyau et à sa liaison à l'ADN codant pour le gène de l'IL-8<sup>651-655</sup>. Récemment, une étude a démontré l'implication du facteur de transcription C/EBP dans la modulation de la transcription de l'ARNm de l'IL-8 chez les neutrophiles humains<sup>656</sup>. Ainsi, les isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\epsilon$  se lient constitutivement au promoteur de l'IL-8 chez les neutrophiles et seul l'isoforme C/EBP $\beta$  phosphorylé est mobilisé au site du promoteur suite à une stimulation des neutrophiles, provoquant une augmentation de la transcription du gène de l'IL-8. Pour ce qui est du facteur de transcription AP-1, il n'est pas impliqué dans la régulation transcriptionnelle de l'IL-8 dans les neutrophiles, tel que démontré par plusieurs études<sup>657-659</sup>.

Le facteur de transcription NRF a été caractérisé comme un répresseur de l'activation du NF- $\kappa$ B via sa liaison à une région de l'ADN de l'IL-8 appelée « élément de régulation négative », qui s'intercale avec la région de ce même ADN liant le NF- $\kappa$ B, soit « l'élément de réponse au NF- $\kappa$ B », qui permet la transcription du gène de l'IL-8<sup>660, 661</sup>. Lorsque la constitution de l'élément de régulation négative est altérée, la transcription de l'IL-8 basale dans certains types cellulaires est augmentée, alors que l'on retrouve le même phénomène lorsque l'on traite les cellules avec un antisens contre le NRF, démontrant sa capacité de réprimer la transcription basale de l'IL-8<sup>446</sup>. Cependant, il n'y a aucune étude faisant état de la régulation de la



transcription de l'ADN en ARNm de l'IL-8 par le NRF chez les neutrophiles, donc dans notre étude, l'induction génique de l'IL-8 suite à la stimulation par l'Ang1 ne serait pas régulée par le NRF.

Nous avons également observé dans notre étude que le prétraitement avec la CHX induit une augmentation substantielle de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 tant en conditions basales que suite à une stimulation avec les témoins positifs et l'Ang1. Ce phénomène, qui a déjà été bien documenté dans la littérature pour plusieurs gènes de réponse primaire (*early response genes*) se nomme une « super-induction »<sup>662-665</sup>. Plusieurs mécanismes régissant ce phénomène ont été décrits dans la littérature, dont le plus répandu est celui impliquant la diminution de l'expression d'un facteur de répression régulant la transcription de l'IL-8 suite à l'inhibition de la synthèse protéique par la CHX<sup>412, 648, 666-668</sup>. Cependant, tel que mentionné auparavant, aucune étude n'a démontré l'implication d'un facteur de répression dans la régulation génique de l'IL-8 chez les neutrophiles, donc ce mécanisme ne serait pas impliqué dans notre étude. La CHX peut également augmenter la stabilité de l'ARNm de l'IL-8<sup>669</sup> et de plusieurs autres protéines<sup>670, 671</sup>, phénomène qui contribue de façon significative à la super-induction de l'expression de l'ARNm de l'IL-8. Finalement, le prétraitement des cellules avec la CHX pourrait réduire l'expression de certaines protéines ayant un cycle de renouvellement rapide, qui seraient responsables de la dégradation des principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation génique de l'IL-8, tels le NF- $\kappa$ B, l'AP-1 ou le C/EBP<sup>669, 672, 673</sup>, entraînant ainsi une hausse de la transcription de l'ARNm. De plus, la CHX peut aussi augmenter l'activité du NF- $\kappa$ B, en inhibant l'expression du cofacteur I $\kappa$ B- $\alpha$ , ce qui va entraîner la dissociation du NF- $\kappa$ B avec ce dernier et permettre ainsi sa translocation vers le noyau<sup>674</sup>. Il serait donc intéressant, suite à notre présente étude, d'élucider le ou les mécanismes régissant cette super-induction du gène de l'IL-8 chez les neutrophiles.

#### **4.13 L'Ang1 induit l'expression de l'ARNm de l'IL-8 ainsi que la synthèse et la relâche de sa protéine via l'activation de la p42/44 MAPK**

Notre laboratoire a démontré la capacité des angiopoïétines à induire l'activation de la p38 MAPK, la p42/44 MAPK et l'Akt dans les CE<sup>273</sup>. De plus, dans une récente étude, nous avons démontré la capacité de l'Ang1 et de l'Ang2 à induire la phosphorylation de l'Akt dans les neutrophiles humains<sup>182</sup>. Selon le type cellulaire étudié et les agonistes utilisés, l'expression de l'ARNm de l'IL-8, ainsi que sa synthèse protéique et sa relâche sont des activités régulées par l'une des trois voies de signalisation mentionnées ci-haut<sup>675-680</sup>. Dans notre étude, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques pour ces voies de signalisation afin de déterminer leur implication dans la régulation génique, ainsi que la synthèse et la relâche de l'IL-8 induits par l'Ang1 chez les neutrophiles.

Nous avons premièrement observé que la p38 MAPK est impliquée dans les trois volets de l'induction de l'IL-8 dans les neutrophiles par le LPS, soit l'expression de l'ARNm de l'IL-8, sa synthèse ainsi que sa relâche par les neutrophiles, ce qui rejoint les résultats d'autres études impliquant cependant des types cellulaires différents<sup>681, 682</sup>. L'activation de la p38 MAPK n'est cependant pas requise pour ces activités biologiques induites par le fMLP ou l'Ang1. Ces agonistes ont cependant besoin de l'activation de la p42/44 MAPK, comme démontré par une inhibition presque totale de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 ainsi que sa synthèse et sa relâche par un inhibiteur de la MEK, une kinase qui active directement la p42/44 MAPK située en aval de la cascade de signalisation. Malgré l'implication de la PI3K dans la migration des neutrophiles induite par l'Ang1, cette kinase n'est pas impliquée dans l'induction de l'expression de l'ARNm, ni de la synthèse et la relâche protéique de l'IL-8 induites par chacun des agonistes.

Nous avons également observé que l'inhibition de la p38 MAPK a induit une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 dans les neutrophiles, sans toutefois affecter la synthèse et la relâche subséquente de sa protéine. Ceci peut s'expliquer par le fait que la cascade de signalisation de la p42/44 MAPK est régulée négativement par la voie de la p38 MAPK. Ce type de régulation négative entre ces deux kinases a été caractérisé par de nombreux groupes de

recherche et joue un rôle majeur dans diverses activités biologiques<sup>683-685</sup>, comme dans l'étude de l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et de l'IL-12 induite par le LPS chez les macrophages, qui est également augmentée par l'inhibition de la voie de la p38 MAPK<sup>684</sup>.

#### **4.14 L'Ang1 induit la survie des neutrophiles via la relâche de l'IL-8**

Lors d'une étude dans notre laboratoire réalisée en parallèle avec les présents travaux, nous avons démontré la capacité de l'Ang1, mais pas de l'Ang2 à augmenter la survie des neutrophiles *in vitro*, et ce par l'entremise de la relâche de l'IL-8 dans le milieu extracellulaire<sup>279</sup>. De plus, l'augmentation de la survie des neutrophiles a seulement été observée lors de la stimulation avec l'Ang1 à la plus grande concentration, soit à  $10^{-8}$  M, ce qui est similaire à la concentration fonctionnelle de l'Ang1 observée dans notre présente étude. L'effet positif de l'Ang1 sur la survie des neutrophiles est optimal après 24 heures de stimulation et lorsque les neutrophiles sont traités avec un anticorps dirigé contre l'IL-8, l'effet bénéfique de l'Ang1 sur la survie est aboli. L'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8 ainsi que de sa synthèse et sa relâche induites seulement par l'Ang1 et non par l'Ang2 cadre avec le dogme caractérisant l'Ang1 et de l'Ang2 respectivement comme un agoniste et un antagoniste du récepteur Tie2, mais est à l'encontre des observations qui caractérisent l'Ang1 comme un agent ayant des actions anti-inflammatoires. Cependant, depuis une dizaine d'années, notre laboratoire ainsi que de nombreux autres groupes indépendants ont démontré que l'Ang1 pouvait agir comme une molécule proinflammatoire, et ce dans plusieurs types cellulaires<sup>182, 183, 273, 274</sup>. Les présents travaux, ainsi que l'étude complémentaire démontrant l'augmentation de la survie des neutrophiles induite par l'Ang1 nous incitent à continuer d'explorer davantage le rôle des angiopoïétines dans les processus inflammatoires afin de mieux comprendre leur comportement dans de nombreuses pathologies, telles les maladies inflammatoires chroniques et le développement tumoral.

#### 4.15 Conclusions de la deuxième étude

Lors de cette deuxième étude, nous avons démontré pour la première fois :

- 1) La capacité de l'Ang1, mais pas de l'Ang2, à induire une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8, de la synthèse et la relâche de sa protéine par les neutrophiles humains.
- 2) La synthèse et la relâche de l'IL-8 induite par l'Ang1 est dépendante sur la contribution de la transcription de son ADN en ARNm et de la traduction de cet ARNm en sa protéine à court terme (0-1 heure).
- 3) L'Ang1 induit la stabilisation de l'ARNm de l'IL-8 à moyen terme (1-6 heures) et la synthèse et la relâche de l'IL-8 subséquentes par les neutrophiles proviennent de la traduction de cet ARNm.
- 4) L'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-8, ainsi que de la synthèse et la relâche de sa protéine est dépendante de l'activation de la p42/44 MAPK et indépendante de la p38 MAPK et l'Akt.

La deuxième étude vient d'ajouter un nouvel élément aux nombreuses découvertes récentes à l'effet que l'angiopoïétine-1 peut être caractérisée comme une molécule proinflammatoire, dépendamment de sa concentration utilisée, du type cellulaire et de l'activité inflammatoire étudiés et du temps de stimulation auquel elle est soumise. Cependant, l'Ang1 garde pleinement ses capacités proinflammatoires, puisque l'ensemble des travaux réalisés à ce jour démontrent en majorité cette caractéristique. Toutes ces études démontrent que l'Ang1 est une molécule complexe, qui participe activement dans de nombreuses pathologies à caractère proinflammatoire et proangiogénique. Dorénavant, il sera impératif que le comportement pro- ou anti-inflammatoire de l'Ang1 soit caractérisé de façon précise dans chacune des pathologies dans lesquelles elle est impliquée afin de déterminer si nous allons devoir bloquer son activité ou bien l'augmenter selon ses actions pro- ou anti-inflammatoires respectivement.

#### 4.16 Perspectives

La majorité des pathologies vasculaires connues se développent suite à l'angiogenèse non contrôlée qui est également précédée et accompagnée par de l'inflammation chronique<sup>250, 686, 687</sup>. De plus, les tumeurs cancéreuses juvéniles sont également caractérisées par de l'inflammation persistante et une vascularisation désorganisée<sup>212, 222, 688</sup>. Le VEGF, les angiopoïétines et les interleukines sont les principales molécules impliquées dans la régulation de l'angiogenèse et l'inflammation pathologique, tant dans le cancer que dans les maladies vasculaires telles l'athérosclérose ou la rétinopathie<sup>101, 221, 372, 373</sup>. Le défi de la médecine d'aujourd'hui est de trouver des cibles moléculaires thérapeutiques précises à moduler, soit en les inhibant ou en les activant, tout en considérant les effets collatéraux que ces traitements pourraient avoir sur les patients à court et à long terme. Dans le cas des angiopoïétines, étant donné que les deux membres les plus importants de cette famille, soit l'Ang1 et l'Ang2, ont démontré, selon les études *in vitro* ou *in vivo* et selon le type cellulaire étudié des propriétés pro- et anti-inflammatoires, il devient très difficile de cibler une de ces deux molécules, afin de réduire son potentiel inflammatoire dans les diverses pathologies. Dans notre dernière étude, l'Ang1 a démontré des effets proinflammatoires *in vitro* sur les neutrophiles, en induisant la relâche et la synthèse de l'IL-8 par ces derniers, tandis que l'Ang2 n'a pas eu d'effet sur cette activité biologique<sup>689</sup>. De plus, dans une étude parallèle, nous avons également démontré que l'Ang1, mais pas l'Ang2, démontre également des activités proinflammatoires, en induisant une augmentation de la survie des neutrophiles, via leur relâche d'IL-8<sup>279</sup>. Du point de vue clinique, ces deux études fondamentales nous inciteraient à fortement considérer l'Ang1 comme une cible potentielle à antagoniser, puisque la surexpression de l'IL-8, combinée à l'augmentation de la survie des neutrophiles sont deux phénomènes qui peuvent amplifier la réponse inflammatoire. Cependant, l'Ang1 a également été caractérisée comme une molécule anti-inflammatoire, dans plusieurs études *in vitro* et *in vivo*, ayant la capacité d'induire la stabilisation et la maturation des vaisseaux sanguins<sup>220, 232, 250, 305</sup>. Nous constatons ainsi, par l'entremise de la dichotomie de ces nombreuses études sur les angiopoïétines, la difficulté à établir un traitement ciblant, par exemple,

l'Ang1 ou l'Ang2 de façon systémique ou même de façon ciblée. En effet, tel que mentionné dans l'introduction, des études cliniques portant sur l'inhibition ou la surexpression des angiopoïétines, mais également sur l'inhibition de leur récepteur Tie2 ont été menés ou sont en cours<sup>109, 214, 347, 690</sup>, mais aucune de ces études n'a donné des résultats probants, qui auraient permis l'établissement d'une thérapie pouvant réduire l'inflammation dans les cancers ou les maladies inflammatoires chroniques. Fait intéressant, dans plusieurs études caractérisant l'implication des deux angiopoïétines dans la régulation de la croissance tumorale, la balance de l'expression de l'Ang1 par rapport à l'Ang2 pouvait souvent déterminer si la tumeur régressait ou sa croissance augmentait<sup>15, 320, 324, 691</sup>. La mesure de l'expression des angiopoïétines au site tumoral afin de cibler l'angiopoïétine d'intérêt pour ensuite l'inhiber à l'aide, par exemple, des pièges moléculaires serait une bonne approche thérapeutique dans un avenir immédiat. De plus, les avancées scientifiques concernant les nanotechnologies pourraient représenter la venue d'un véhicule idéal, non invasif, contrairement à une procédure chirurgicale, pour le transport de ces pièges moléculaires au site tumoral et aux différentes métastases<sup>692-696</sup>.

En conclusion, notre étude permettra d'ajouter une pièce du casse-tête que représentent les effets différentiels des angiopoïétines dans l'inflammation et l'angiogenèse pathologique, tant dans les tumeurs que dans les maladies vasculaires.

## 5.0 RÉFÉRENCES

1. Fishman, A.P., *Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities*. Ann N Y Acad Sci, 1982. **401**: p. 1-8.
2. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: p. 73-91.
3. Klagsbrun, M. and M.A. Moses, *Molecular angiogenesis*. Chem Biol, 1999. **6**(8): p. R217-24.
4. Moses, M.A., *The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Stem Cells, 1997. **15**(3): p. 180-9.
5. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
6. Folkman, J., *Tumor angiogenesis*. Adv Cancer Res, 1985. **43**: p. 175-203.
7. 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.
8. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
9. Rogers, P.A. and C.E. Gargett, *Endometrial angiogenesis*. Angiogenesis, 1998. **2**(4): p. 287-94.
10. 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.
11. Gospodarowicz, D., *Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary*. J Biol Chem, 1975. **250**(7): p. 2515-20.
12. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-6.
13. Benjamin, L.E., D. Golijanin, A. Itin, D. Pode, and E. Keshet, *Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 159-65.
14. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
15. Asahara, T., D. Chen, T. Takahashi, K. Fujikawa, M. Kearney, M. Magner, G.D. Yancopoulos, and J.M. Isner, *Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization*. Circ Res, 1998. **83**(3): p. 233-40.
16. Brown, L.F., M. Detmar, K. Claffey, J.A. Nagy, D. Feng, A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine*. EXS, 1997. **79**: p. 233-69.
17. Carmeliet, P., Y.S. Ng, D. Nuyens, G. Theilmeier, K. Brusselmans, I. Cornelissen, E. Ehler, V.V. Kakkar, I. Stalmans, V. Mattot, J.C. Perriard, M. Dewerchin, W. Flameng, A. Nagy, F. Lupu, L. Moons, D. Collen, P.A. D'Amore, and D.T. Shima, *Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 495-502.

18. Chae, J.K., I. Kim, S.T. Lim, M.J. Chung, W.H. Kim, H.G. Kim, J.K. Ko, and G.Y. Koh, *Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(12): p. 2573-8.
19. Dvorak, H.F., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(21): p. 4368-80.
20. Suri, C., P.F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P.C. Maisonpierre, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos, *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*. *Cell*, 1996. **87**(7): p. 1171-80.
21. Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, and H.F. Dvorak, *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. *Science*, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
22. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **161**(2): p. 851-8.
23. Leung, D.W., G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. *Science*, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.
24. Houck, K.A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D.W. Leung, *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*. *Mol Endocrinol*, 1991. **5**(12): p. 1806-14.
25. Tischer, E., D. Gospodarowicz, R. Mitchell, M. Silva, J. Schilling, K. Lau, T. Crisp, J.C. Fiddes, and J.A. Abraham, *Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **165**(3): p. 1198-206.
26. Houck, K.A., D.W. Leung, A.M. Rowland, J. Winer, and N. Ferrara, *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(36): p. 26031-7.
27. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(12): p. 1317-26.
28. Keyt, B.A., L.T. Berleau, H.V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen, and N. Ferrara, *The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(13): p. 7788-95.
29. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 669-76.
30. Chilov, D., E. Kukk, S. Taira, M. Jeltsch, J. Kaukonen, A. Palotie, V. Joukov, and K. Alitalo, *Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 25176-83.



31. Lyttle, D.J., K.M. Fraser, S.B. Fleming, A.A. Mercer, and A.J. Robinson, *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 84-92.
32. Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M.G. Persico, *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.
33. Olofsson, B., M. Jeltsch, U. Eriksson, and K. Alitalo, *Current biology of VEGF-B and VEGF-C*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(6): p. 528-35.
34. Olofsson, B., K. Pajusola, A. Kaipainen, G. von Euler, V. Joukov, O. Saksela, A. Orpana, R.F. Pettersson, K. Alitalo, and U. Eriksson, *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2576-81.
35. Dor, Y., R. Porat, and E. Keshet, *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(6): p. C1367-74.
36. Semenza, G., *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(5-6): p. 993-8.
37. Maxwell, P.H., M.S. Wiesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, and P.J. Ratcliffe, *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.
38. Mole, D.R., P.H. Maxwell, C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe, *Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing*. IUBMB Life, 2001. **52**(1-2): p. 43-7.
39. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
40. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
41. Grugel, S., G. Finkenzeller, K. Weindel, B. Barleon, and D. Marme, *Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25915-9.
42. Okada, F., J.W. Rak, B.S. Croix, B. Lieubeau, M. Kaya, L. Roncari, S. Shirasawa, T. Sasazuki, and R.S. Kerbel, *Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3609-14.
43. Shibuya, M., S. Yamaguchi, A. Yamane, T. Ikeda, A. Tojo, H. Matsushime, and M. Sato, *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family*. Oncogene, 1990. **5**(4): p. 519-24.
44. Terman, B.I., M.E. Carrion, E. Kovacs, B.A. Rasmussen, R.L. Eddy, and T.B. Shows, *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*. Oncogene, 1991. **6**(9): p. 1677-83.

45. Belgore, F., A. Blann, D. Neil, A.S. Ahmed, and G.Y. Lip, *Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries*. J Clin Pathol, 2004. **57**(3): p. 266-72.
46. Enholm, B., L. Jussila, M. Karkkainen, and K. Alitalo, *Vascular endothelial growth factor-C; a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells*. Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**(7): p. 292-7.
47. Karkkainen, M.J., T. Makinen, and K. Alitalo, *Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(1): p. E2-5.
48. Soker, S., S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun, *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
49. Bernatchez, P.N., S. Rollin, S. Soker, and M.G. Sirois, *Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1*. J Cell Biochem, 2002. **85**(3): p. 629-39.
50. Neagoe, P.E., C. Lemieux, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9904-12.
51. 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, *VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3789-97.
52. Olofsson, B., E. Korpelainen, M.S. Pepper, S.J. Mandriota, K. Aase, V. Kumar, Y. Gunji, M.M. Jeltsch, M. Shibuya, K. Alitalo, and U. Eriksson, *Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11709-14.
53. Park, J.E., H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck, and N. Ferrara, *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25646-54.
54. Shibuya, M., *Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis*. Cell Struct Funct, 2001. **26**(1): p. 25-35.
55. de Vries, C., J.A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L.T. Williams, *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992. **255**(5047): p. 989-91.
56. Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C.H. Heldin, *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26988-95.
57. Hiratsuka, S., O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya, *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9349-54.

58. Maru, Y., S. Yamaguchi, and M. Shibuya, *Flt-1, a receptor for vascular endothelial growth factor, has transforming and morphogenic potentials.* *Oncogene*, 1998. **16**(20): p. 2585-95.
59. Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H.A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme, *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1.* *Blood*, 1996. **87**(8): p. 3336-43.
60. Hiratsuka, S., K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J.M. Shipley, R.M. Senior, and M. Shibuya, *MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis.* *Cancer Cell*, 2002. **2**(4): p. 289-300.
61. LeCouter, J., D.R. Moritz, B. Li, G.L. Phillips, X.H. Liang, H.P. Gerber, K.J. Hillan, and N. Ferrara, *Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1.* *Science*, 2003. **299**(5608): p. 890-3.
62. Mani, N., A. Khaibullina, J.M. Krum, and J.M. Rosenstein, *Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways.* *Exp Neurol*, 2005. **192**(2): p. 394-406.
63. Choi, J.S., H.Y. Kim, J.H. Cha, J.Y. Choi, S.I. Park, C.H. Jeong, S.S. Jeun, and M.Y. Lee, *Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1 following acute spinal cord contusion in rats.* *J Histochem Cytochem*, 2007. **55**(8): p. 821-30.
64. Forstreuter, F., R. Lucius, and R. Mentlein, *Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells.* *J Neuroimmunol*, 2002. **132**(1-2): p. 93-8.
65. Autiero, M., A. Lutun, M. Tjwa, and P. Carmeliet, *Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders.* *J Thromb Haemost*, 2003. **1**(7): p. 1356-70.
66. Olsson, A.K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor signalling - in control of vascular function.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(5): p. 359-71.
67. Li, X., M. Tjwa, I. Van Hove, B. Enholm, E. Neven, K. Paavonen, M. Jeltsch, T.D. Juan, R.E. Sievers, E. Chorianopoulos, H. Wada, M. Vanwildemeersch, A. Noel, J.M. Foidart, M.L. Springer, G. von Degenfeld, M. Dewerchin, H.M. Blau, K. Alitalo, U. Eriksson, P. Carmeliet, and L. Moons, *Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(9): p. 1614-20.
68. Tirziu, D., E. Chorianopoulos, K.L. Moodie, R.T. Palac, Z.W. Zhuang, M. Tjwa, C. Roncal, U. Eriksson, Q. Fu, A. Elfenbein, A.E. Hall, P. Carmeliet, L. Moons, and M. Simons, *Myocardial hypertrophy in the absence of external stimuli is induced by angiogenesis in mice.* *J Clin Invest*, 2007. **117**(11): p. 3188-97.

69. Poesen, K., D. Lambrechts, P. Van Damme, J. Dhondt, F. Bender, N. Frank, E. Bogaert, B. Claes, L. Heylen, A. Verheyen, K. Raes, M. Tjwa, U. Eriksson, M. Shibuya, R. Nuydens, L. Van Den Bosch, T. Meert, R. D'Hooge, M. Sendtner, W. Robberecht, and P. Carmeliet, *Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration*. J Neurosci, 2008. **28**(42): p. 10451-9.
70. Hornig, C., B. Barleon, S. Ahmad, P. Vuorela, A. Ahmed, and H.A. Weich, *Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids*. Lab Invest, 2000. **80**(4): p. 443-54.
71. Kendall, R.L. and K.A. Thomas, *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10705-9.
72. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
73. Shima, D.T. and C. Mailhos, *Vascular developmental biology: getting nervous*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(5): p. 536-42.
74. Yancopoulos, G.D., S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand, and J. Holash, *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
75. Terman, B.I., M. Dougher-Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, and P. Bohlen, *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(3): p. 1579-86.
76. Makinen, T., T. Veikkola, S. Mustjoki, T. Karpanen, B. Catimel, E.C. Nice, L. Wise, A. Mercer, H. Kowalski, D. Kerjaschki, S.A. Stacker, M.G. Achen, and K. Alitalo, *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. Embo J, 2001. **20**(17): p. 4762-73.
77. Hidaka, M., W.L. Stanford, and A. Bernstein, *Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7370-5.
78. Shalaby, F., J. Ho, W.L. Stanford, K.D. Fischer, A.C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein, and J. Rossant, *A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis*. Cell, 1997. **89**(6): p. 981-90.
79. Eliceiri, B.P., R. Paul, P.L. Schwartzberg, J.D. Hood, J. Leng, and D.A. Cheresh, *Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 915-24.
80. Guo, D., Q. Jia, H.Y. Song, R.S. Warren, and D.B. Donner, *Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6729-33.
81. Takahashi, T., H. Ueno, and M. Shibuya, *VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells*. Oncogene, 1999. **18**(13): p. 2221-30.

82. Gerber, H.P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30336-43.
83. Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy, *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
84. Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K.S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K.J. Hillan, and M.W. Moore, *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
85. Gerber, H.P., K.J. Hillan, A.M. Ryan, J. Kowalski, G.A. Keller, L. Rangell, B.D. Wright, F. Radtke, M. Aguet, and N. Ferrara, *VEGF is required for growth and survival in neonatal mice*. Development, 1999. **126**(6): p. 1149-59.
86. Kitamoto, Y., H. Tokunaga, and K. Tomita, *Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2351-7.
87. Zelzer, E., W. McLean, Y.S. Ng, N. Fukai, A.M. Reginato, S. Lovejoy, P.A. D'Amore, and B.R. Olsen, *Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis*. Development, 2002. **129**(8): p. 1893-904.
88. Zelzer, E. and B.R. Olsen, *Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair*. Curr Top Dev Biol, 2005. **65**: p. 169-87.
89. Ryan, A.M., D.B. Eppler, K.E. Hagler, R.H. Bruner, P.J. Thomford, R.L. Hall, G.M. Shopp, and C.A. O'Neill, *Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody*. Toxicol Pathol, 1999. **27**(1): p. 78-86.
90. Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H.P. Gerber, T.N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K.J. Hillan, and R.H. Schwall, *Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis*. Nat Med, 1998. **4**(3): p. 336-40.
91. Fraser, H.M., S.E. Dickson, S.F. Lunn, C. Wulff, K.D. Morris, V.A. Carroll, and R. Bicknell, *Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor*. Endocrinology, 2000. **141**(3): p. 995-1000.
92. Zimmermann, R.C., E. Xiao, N. Husami, M.V. Sauer, R. Lobo, J. Kitajewski, and M. Ferin, *Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 768-72.
93. Dvorak, H.F., *Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1747-57.

94. Nagy, J.A., D. Feng, E. Vasile, W.H. Wong, S.C. Shih, A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A*. Lab Invest, 2006. **86**(8): p. 767-80.
95. Nagy, J.A., E. Vasile, D. Feng, C. Sundberg, L.F. Brown, E.J. Manseau, A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 227-37.
96. Pettersson, A., J.A. Nagy, L.F. Brown, C. Sundberg, E. Morgan, S. Jungles, R. Carter, J.E. Krieger, E.J. Manseau, V.S. Harvey, I.A. Eckelhoefer, D. Feng, A.M. Dvorak, R.C. Mulligan, and H.F. Dvorak, *Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor*. Lab Invest, 2000. **80**(1): p. 99-115.
97. Sundberg, C., J.A. Nagy, L.F. Brown, D. Feng, I.A. Eckelhoefer, E.J. Manseau, A.M. Dvorak, and H.F. Dvorak, *Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 1145-60.
98. Cao, Y., A. Hong, H. Schulten, and M.J. Post, *Update on therapeutic neovascularization*. Cardiovasc Res, 2005. **65**(3): p. 639-48.
99. de Muinck, E.D. and M. Simons, *Re-evaluating therapeutic neovascularization*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(1): p. 25-32.
100. Epstein, S.E., R. Kornowski, S. Fuchs, and H.F. Dvorak, *Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects*. Circulation, 2001. **104**(1): p. 115-9.
101. Li, J., L.F. Brown, M.G. Hibberd, J.D. Grossman, J.P. Morgan, and M. Simons, *VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1803-11.
102. Ren, G., L.H. Michael, M.L. Entman, and N.G. Frangogiannis, *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(1): p. 71-9.
103. Stowe, A.M., E.J. Plautz, I. Eisner-Janowicz, S.B. Frost, S. Barbay, E.V. Zoubina, N. Dancause, M.D. Taylor, and R.J. Nudo, *VEGF protein associates to neurons in remote regions following cortical infarct*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(1): p. 76-85.
104. Detmar, M., L.F. Brown, K.P. Claffey, K.T. Yeo, O. Kocher, R.W. Jackman, B. Berse, and H.F. Dvorak, *Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1141-6.
105. Fava, R.A., N.J. Olsen, G. Spencer-Green, K.T. Yeo, T.K. Yeo, B. Berse, R.W. Jackman, D.R. Senger, H.F. Dvorak, and L.F. Brown, *Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 341-6.

106. Claffey, K.P. and G.S. Robinson, *Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 1996. **15**(2): p. 165-76.
107. Levy, A.P., N.S. Levy, O. Iliopoulos, C. Jiang, W.G. Kaplin, Jr., and M.A. Goldberg, *Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene*. *Kidney Int*, 1997. **51**(2): p. 575-8.
108. Dvorak, H.F., L.F. Brown, M. Detmar, and A.M. Dvorak, *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. *Am J Pathol*, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
109. Kerbel, R. and J. Folkman, *Clinical translation of angiogenesis inhibitors*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(10): p. 727-39.
110. Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E.C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R.K. Jain, and B. Seed, *Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells*. *Cell*, 1998. **94**(6): p. 715-25.
111. Gerber, H.P., J. Kowalski, D. Sherman, D.A. Eberhard, and N. Ferrara, *Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6253-8.
112. Tsuzuki, Y., D. Fukumura, B. Oosthuysen, C. Koike, P. Carmeliet, and R.K. Jain, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha--> hypoxia response element--> VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6248-52.
113. Kabbinavar, F., H.I. Hurwitz, L. Fehrenbacher, N.J. Meropol, W.F. Novotny, G. Lieberman, S. Griffing, and E. Bergsland, *Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(1): p. 60-5.
114. Presta, L.G., H. Chen, S.J. O'Connor, V. Chisholm, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler, and N. Ferrara, *Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders*. *Cancer Res*, 1997. **57**(20): p. 4593-9.
115. Yang, J.C., L. Haworth, R.M. Sherry, P. Hwu, D.J. Schwartzentruber, S.L. Topalian, S.M. Steinberg, H.X. Chen, and S.A. Rosenberg, *A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(5): p. 427-34.
116. Prewett, M., J. Huber, Y. Li, A. Santiago, W. O'Connor, K. King, J. Overholser, A. Hooper, B. Pytowski, L. Witte, P. Bohlen, and D.J. Hicklin, *Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors*. *Cancer Res*, 1999. **59**(20): p. 5209-18.
117. Holash, J., S. Davis, N. Papadopoulos, S.D. Croll, L. Ho, M. Russell, P. Boland, R. Leidich, D. Hylton, E. Burova, E. Ioffe, T. Huang, C. Radziejewski, K. Bailey, J.P. Fandl, T. Daly, S.J. Wiegand, G.D.

- Yancopoulos, and J.S. Rudge, *VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11393-8.
118. Gerber, H.P. and N. Ferrara, *The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis*. J Mol Med, 2003. **81**(1): p. 20-31.
119. Aiello, L.P., R.L. Avery, P.G. Arrigg, B.A. Keyt, H.D. Jampel, S.T. Shah, L.R. Pasquale, H. Thieme, M.A. Iwamoto, J.E. Park, and et al., *Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders*. N Engl J Med, 1994. **331**(22): p. 1480-7.
120. Malecaze, F., S. Clamens, V. Simorre-Pinatel, A. Mathis, P. Chollet, C. Favard, F. Bayard, and J. Plouet, *Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy*. Arch Ophthalmol, 1994. **112**(11): p. 1476-82.
121. Hu, D.N., R. Ritch, J. Liebmann, Y. Liu, B. Cheng, and M.S. Hu, *Vascular endothelial growth factor is increased in aqueous humor of glaucomatous eyes*. J Glaucoma, 2002. **11**(5): p. 406-10.
122. Lip, P.L., D.C. Felmeden, A.D. Blann, N. Matheou, S. Thakur, I.A. Cunliffe, and G.Y. Lip, *Plasma vascular endothelial growth factor, soluble VEGF receptor FLT-1, and von Willebrand factor in glaucoma*. Br J Ophthalmol, 2002. **86**(11): p. 1299-302.
123. Shirasawa, M., N. Arimura, H. Otsuka, S. Sonoda, T. Hashiguchi, and T. Sakamoto, *Intravitreal VEGF-A in eyes with massive vitreous hemorrhage*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2011. **249**(12): p. 1805-10.
124. Tripathi, R.C., J. Li, B.J. Tripathi, K.V. Chalam, and A.P. Adamis, *Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma*. Ophthalmology, 1998. **105**(2): p. 232-7.
125. van Bruggen, N., H. Thibodeaux, J.T. Palmer, W.P. Lee, L. Fu, B. Cairns, D. Tumas, R. Gerlai, S.P. Williams, M. van Lookeren Campagne, and N. Ferrara, *VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain*. J Clin Invest, 1999. **104**(11): p. 1613-20.
126. Ferrara, N., G. Frantz, J. LeCouter, L. Dillard-Telm, T. Pham, A. Draksharapu, T. Giordano, and F. Peale, *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1881-93.
127. Davis, S., T.H. Aldrich, P.F. Jones, A. Acheson, D.L. Compton, V. Jain, T.E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P.C. Maisonpierre, and G.D. Yancopoulos, *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-9.
128. 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.
129. Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos, *Angiopoietin-2, a natural*



- antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.* Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
130. Lee, H.J., C.H. Cho, S.J. Hwang, H.H. Choi, K.T. Kim, S.Y. Ahn, J.H. Kim, J.L. Oh, G.M. Lee, and G.Y. Koh, *Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4.* Faseb J, 2004. **18**(11): p. 1200-8.
  131. Kim, I., H.J. Kwak, J.E. Ahn, J.N. So, M. Liu, K.N. Koh, and G.Y. Koh, *Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3.* FEBS Lett, 1999. **443**(3): p. 353-6.
  132. Nishimura, M., T. Miki, R. Yashima, N. Yokoi, H. Yano, Y. Sato, and S. Seino, *Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family.* FEBS Lett, 1999. **448**(2-3): p. 254-6.
  133. Valenzuela, D.M., J.A. Griffiths, J. Rojas, T.H. Aldrich, P.F. Jones, H. Zhou, J. McClain, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, T. Huang, N. Papadopoulos, P.C. Maisonpierre, S. Davis, and G.D. Yancopoulos, *Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1904-9.
  134. Kim, K.T., H.H. Choi, M.O. Steinmetz, B. Maco, R.A. Kammerer, S.Y. Ahn, H.Z. Kim, G.M. Lee, and G.Y. Koh, *Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2.* J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 20126-31.
  135. Procopio, W.N., P.I. Pelavin, W.M. Lee, and N.M. Yeilding, *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.
  136. Gale, N.W., G. Thurston, S.F. Hackett, R. Renard, Q. Wang, J. McClain, C. Martin, C. Witte, M.H. Witte, D. Jackson, C. Suri, P.A. Campochiaro, S.J. Wiegand, and G.D. Yancopoulos, *Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1.* Dev Cell, 2002. **3**(3): p. 411-23.
  137. Stratmann, A., W. Risau, and K.H. Plate, *Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis.* Am J Pathol, 1998. **153**(5): p. 1459-66.
  138. Zagzag, D., A. Hooper, D.R. Friedlander, W. Chan, J. Holash, S.J. Wiegand, G.D. Yancopoulos, and M. Grumet, *In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis.* Exp Neurol, 1999. **159**(2): p. 391-400.
  139. Fiedler, U., M. Scharpfenecker, S. Koidl, A. Hegen, V. Grunow, J.M. Schmidt, W. Kriz, G. Thurston, and H.G. Augustin, *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.
  140. Goede, V., T. Schmidt, S. Kimmina, D. Kozian, and H.G. Augustin, *Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis.* Lab Invest, 1998. **78**(11): p. 1385-94.
  141. Koga, K., T. Todaka, M. Morioka, J. Hamada, Y. Kai, S. Yano, A. Okamura, N. Takakura, T. Suda, and Y. Ushio, *Expression of angiopoietin-2 in human*

- glioma cells and its role for angiogenesis*. *Cancer Res*, 2001. **61**(16): p. 6248-54.
142. Tanaka, S., M. Mori, Y. Sakamoto, M. Makuuchi, K. Sugimachi, and J.R. Wands, *Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(3): p. 341-5.
143. Torimura, T., T. Ueno, M. Kin, R. Harada, E. Taniguchi, T. Nakamura, R. Sakata, O. Hashimoto, M. Sakamoto, R. Kumashiro, M. Sata, O. Nakashima, H. Yano, and M. Kojiro, *Overexpression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2004. **40**(5): p. 799-807.
144. Oliner, J., H. Min, J. Leal, D. Yu, S. Rao, E. You, X. Tang, H. Kim, S. Meyer, S.J. Han, N. Hawkins, R. Rosenfeld, E. Davy, K. Graham, F. Jacobsen, S. Stevenson, J. Ho, Q. Chen, T. Hartmann, M. Michaels, M. Kelley, L. Li, K. Sitney, F. Martin, J.R. Sun, N. Zhang, J. Lu, J. Estrada, R. Kumar, A. Coxon, S. Kaufman, J. Pretorius, S. Scully, R. Cattley, M. Payton, S. Coats, L. Nguyen, B. Desilva, A. Ndifor, I. Hayward, R. Radinsky, T. Boone, and R. Kendall, *Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(5): p. 507-16.
145. Zhang, L., N. Yang, J.W. Park, D. Katsaros, S. Fracchioli, G. Cao, A. O'Brien-Jenkins, T.C. Randall, S.C. Rubin, and G. Coukos, *Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2003. **63**(12): p. 3403-12.
146. Hackett, S.F., H. Ozaki, R.W. Strauss, K. Wahlin, C. Suri, P. Maisonpierre, G. Yancopoulos, and P.A. Campochiaro, *Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization*. *J Cell Physiol*, 2000. **184**(3): p. 275-84.
147. Yao, D., T. Taguchi, T. Matsumura, R. Pestell, D. Edelstein, I. Giardino, G. Suske, N. Rabbani, P.J. Thornalley, V.P. Sarthy, H.-P. Hammes, and M. Brownlee, *High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(42): p. 31038-31045.
148. Huang, Y.Q., J.J. Li, and S. Karpatkin, *Identification of a family of alternatively spliced mRNA species of angiopoietin-1*. *Blood*, 2000. **95**(6): p. 1993-9.
149. Mezquita, J., B. Mezquita, M. Pau, and C. Mezquita, *Characterization of a novel form of angiopoietin-2 (Ang-2B) and expression of VEGF and angiopoietin-2 during chicken testicular development and regression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **260**(2): p. 492-8.
150. Kim, I., J.H. Kim, Y.S. Ryu, S.H. Jung, J.J. Nah, and G.Y. Koh, *Characterization and expression of a novel alternatively spliced human angiopoietin-2*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(24): p. 18550-6.
151. Kim, I., J.H. Kim, S.O. Moon, H.J. Kwak, N.G. Kim, and G.Y. Koh, *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.

152. Daly, C., E. Pasnikowski, E. Burova, V. Wong, T.H. Aldrich, J. Griffiths, E. Ioffe, T.J. Daly, J.P. Fandl, N. Papadopoulos, D.M. McDonald, G. Thurston, G.D. Yancopoulos, and J.S. Rudge, *Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(42): p. 15491-6.
153. 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, *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.
154. Scharpfenecker, M., U. Fiedler, Y. Reiss, and H.G. Augustin, *The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 4): p. 771-80.
155. Shim, W.S., I.A. Ho, and P.E. Wong, *Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(7): p. 655-65.
156. Brown, L.F., B.J. Dezube, K. Tognazzi, H.F. Dvorak, and G.D. Yancopoulos, *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.
157. Currie, M.J., S.P. Gunningham, C. Han, P.A. Scott, B.A. Robinson, A.L. Harris, and S.B. Fox, *Angiopoietin-1 is inversely related to thymidine phosphorylase expression in human breast cancer, indicating a role in vascular remodeling*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(4): p. 918-27.
158. Currie, M.J., S.P. Gunningham, K. Turner, C. Han, P.A. Scott, B.A. Robinson, W. Chong, A.L. Harris, and S.B. Fox, *Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas; regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia*. J Pathol, 2002. **198**(4): p. 502-10.
159. Gerritsen, M.E., J.E. Tomlinson, C. Zlot, M. Ziman, and S. Hwang, *Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(4): p. 595-610.
160. Lund, E.L., A. Hog, M.W. Olsen, L.T. Hansen, S.A. Engelholm, and P.E. Kristjansen, *Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma*. Int J Cancer, 2004. **108**(6): p. 833-8.
161. Yamakawa, M., L.X. Liu, T. Date, A.J. Belanger, K.A. Vincent, G.Y. Akita, T. Kuriyama, S.H. Cheng, R.J. Gregory, and C. Jiang, *Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors*. Circ Res, 2003. **93**(7): p. 664-73.
162. Abdulmalek, K., F. Ashur, N. Ezer, F. Ye, S. Magder, and S.N. Hussain, *Differential expression of Tie-2 receptors and angiopoietins in response to in vivo hypoxia in rats*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(3): p. L582-90.
163. Beaudet, M.J., N. Rueda, G.P. Kobinger, J. Villeneuve, and L. Vallieres, *Construction of a ganciclovir-sensitive lentiviral vector to assess the influence*

- of angiopoietin-3 and soluble Tie2 on glioma growth.* J Neurooncol, 2010. **99**(1): p. 1-11.
164. Xu, Y., Y.J. Liu, and Q. Yu, *Angiopoietin-3 inhibits pulmonary metastasis by inhibiting tumor angiogenesis.* Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6119-26.
165. Olsen, M.W., C.D. Ley, N. Junker, A.J. Hansen, E.L. Lund, and P.E. Kristjansen, *Angiopoietin-4 inhibits angiogenesis and reduces interstitial fluid pressure.* Neoplasia, 2006. **8**(5): p. 364-72.
166. 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.
167. Dumont, D.J., G.J. Gradwohl, G.H. Fong, R. Auerbach, and M.L. Breitman, *The endothelial-specific receptor tyrosine kinase, tek, is a member of a new subfamily of receptors.* Oncogene, 1993. **8**(5): p. 1293-1301.
168. Partanen, J., E. Armstrong, T.P. Makela, J. Korhonen, M. Sandberg, R. Renkonen, S. Knuutila, K. Huebner, and K. Alitalo, *A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains.* Mol Cell Biol, 1992. **12**(4): p. 1698-707.
169. Sato, T.N., Y. Qin, C.A. Kozak, and K.L. Audus, *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**(24): p. 9355-9358.
170. Korhonen, J., A. Polvi, J. Partanen, and K. Alitalo, *The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis.* Oncogene, 1994. **9**(2): p. 395-403.
171. Marron, M.B., D.P. Hughes, M.D. Edge, C.L. Forder, and N.P. Brindle, *Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2.* J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39741-39746.
172. Marron, M.B., H. Singh, T.A. Tahir, J. Kavumkal, H.Z. Kim, G.Y. Koh, and N.P. Brindle, *Regulated proteolytic processing of Tie1 modulates ligand responsiveness of the receptor-tyrosine kinase Tie2.* J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30509-17.
173. Tsiamis, A.C., P.N. Morris, M.B. Marron, and N.P. Brindle, *Vascular endothelial growth factor modulates the Tie-2:Tie-1 receptor complex.* Microvasc Res, 2002. **63**(2): p. 149-58.
174. Chen-Konak, L., Y. Guetta-Shubin, H. Yahav, A. Shay-Salit, M. Zilberman, O. Binah, and N. Resnick, *Transcriptional and post-translation regulation of the Tie1 receptor by fluid shear stress changes in vascular endothelial cells.* Faseb J, 2003. **17**(14): p. 2121-3.
175. Yabkowitz, R., S. Meyer, T. Black, G. Elliott, L.A. Merewether, and H.K. Yamane, *Inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation.* Blood, 1999. **93**(6): p. 1969-79.
176. Yabkowitz, R., S. Meyer, D. Yanagihara, D. Brankow, T. Staley, G. Elliott, S. Hu, and B. Ratzkin, *Regulation of tie receptor expression on human endothelial cells by protein kinase C-mediated release of soluble tie.* Blood, 1997. **90**(2): p. 706-15.

177. Saharinen, P., K. Kerkela, N. Ekman, M. Marron, N. Brindle, G.M. Lee, H. Augustin, G.Y. Koh, and K. Alitalo, *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.
178. Dumont, D.J., T.P. Yamaguchi, R.A. Conlon, J. Rossant, and M.L. Breitman, *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.
179. Helfrich, I., L. Edler, A. Sucker, M. Thomas, S. Christian, D. Schadendorf, and H.G. Augustin, *Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(4): p. 1384-92.
180. Sato, T.N., Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau, and Y. Qin, *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 70-4.
181. De Palma, M., M.A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L.S. Politi, M. Sampaolesi, and L. Naldini, *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.
182. Brkovic, A., M. Pelletier, D. Girard, and M.G. Sirois, *Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(4): p. 1093-101.
183. Lemieux, C., R. Maliba, J. Favier, J.F. Theoret, Y. Merhi, and M.G. Sirois, *Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1523-30.
184. Peters, K.G., A. Coogan, D. Berry, J. Marks, J.D. Iglehart, C.D. Kontos, P. Rao, S. Sankar, and E. Trogan, *Expression of Tie2/Tek in breast tumour vasculature provides a new marker for evaluation of tumour angiogenesis*. Br J Cancer, 1998. **77**(1): p. 51-6.
185. Takahama, M., M. Tsutsumi, T. Tsujiuchi, K. Nezu, K. Kushibe, S. Taniguchi, Y. Kotake, and Y. Konishi, *Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor, and CD31 in human non-small cell lung carcinomas*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(9): p. 2506-10.
186. Wong, A.L., Z.A. Haroon, S. Werner, M.W. Dewhirst, C.S. Greenberg, and K.G. Peters, *Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 567-74.
187. 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. 1097-1108.
188. Barton, W.A., D. Tzvetkova-Robev, E.P. Miranda, M.V. Kolev, K.R. Rajashankar, J.P. Himanen, and D.B. Nikolov, *Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 524-32.

189. Fiedler, U., T. Krissl, S. Koidl, C. Weiss, T. Koblizek, U. Deutsch, G. Martiny-Baron, D. Marme, and H.G. Augustin, *Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1721-7.
190. Fukuhara, S., K. Sako, T. Minami, K. Noda, H.Z. Kim, T. Kodama, M. Shibuya, N. Takakura, G.Y. Koh, and N. Mochizuki, *Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 513-526.
191. Saharinen, P., L. Eklund, J. Miettinen, R. Wirkkala, A. Anisimov, M. Winderlich, A. Nottebaum, D. Vestweber, U. Deutsch, G.Y. Koh, B.R. Olsen, and K. Alitalo, *Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 527-37.
192. Jones, N., S.H. Chen, C. Sturk, Z. Master, J. Tran, R.S. Kerbel, and D.J. Dumont, *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.
193. Master, Z., N. Jones, J. Tran, J. Jones, R.S. Kerbel, and D.J. Dumont, *Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak*. Embo J, 2001. **20**(21): p. 5919-28.
194. Kim, I., H.G. Kim, S.O. Moon, S.W. Chae, J.N. So, K.N. Koh, B.C. Ahn, and G.Y. Koh, *Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion*. Circ Res, 2000. **86**(9): p. 952-9.
195. Tournaire, R., M.P. Simon, F. le Noble, A. Eichmann, P. England, and J. Pouyssegur, *A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor*. EMBO Rep, 2004. **5**(3): p. 262-7.
196. Jones, N., Z. Master, J. Jones, D. Bouchard, Y. Gunji, H. Sasaki, R. Daly, K. Alitalo, and D.J. Dumont, *Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30896-905.
197. Huang, L., C.W. Turck, P. Rao, and K.G. Peters, *GRB2 and SH-PTP2: potentially important endothelial signaling molecules downstream of the TEK/TIE2 receptor tyrosine kinase*. Oncogene, 1995. **11**(10): p. 2097-103.
198. Kontos, C.D., T.P. Stauffer, W.P. Yang, J.D. York, L. Huang, M.A. Blonar, T. Meyer, and K.G. Peters, *Tyrosine 1101 of Tie2 is the major site of association of p85 and is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 4131-4140.
199. Thakker, G.D., D.P. Hajjar, W.A. Muller, and T.K. Rosengart, *The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling*. J Biol Chem, 1999. **274**(15): p. 10002-7.
200. Fujikawa, K., I. de Aos Scherpenseel, S.K. Jain, E. Presman, R.A. Christensen, and L. Varticovski, *Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-*

- mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells.* Exp Cell Res, 1999. **253**(2): p. 663-72.
201. Kim, I., J.L. Oh, Y.S. Ryu, J.N. So, W.C. Sessa, K. Walsh, and G.Y. Koh, *Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells.* FASEB J, 2002. **16**(1): p. 126-8.
  202. Zhu, W.H. and R.F. Nicosia, *The thin prep rat aortic ring assay: a modified method for the characterization of angiogenesis in whole mounts.* Angiogenesis, 2002. **5**(1-2): p. 81-6.
  203. Dejana, E., F. Orsenigo, and M.G. Lampugnani, *The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability.* J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 13): p. 2115-22.
  204. Gavard, J. and J.S. Gutkind, *VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin.* Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1223-34.
  205. Gavard, J., V. Patel, and J.S. Gutkind, *Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia.* Dev Cell, 2008. **14**(1): p. 25-36.
  206. Li, X., C.N. Hahn, M. Parsons, J. Drew, M.A. Vadas, and J.R. Gamble, *Role of protein kinase C $\zeta$  in thrombin-induced endothelial permeability changes: inhibition by angiopoietin-1.* Blood, 2004. **104**(6): p. 1716-24.
  207. Li, X., M. Stankovic, C.S. Bonder, C.N. Hahn, M. Parsons, S.M. Pitson, P. Xia, R.L. Proia, M.A. Vadas, and J.R. Gamble, *Basal and angiopoietin-1-mediated endothelial permeability is regulated by sphingosine kinase-1.* Blood, 2008. **111**(7): p. 3489-3497.
  208. Hughes, D.P., M.B. Marron, and N.P. Brindle, *The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2.* Circ Res, 2003. **92**(6): p. 630-6.
  209. Jeon, B.H., F. Khanday, S. Deshpande, A. Haile, M. Ozaki, and K. Irani, *Tie-2 inhibits the antiinflammatory effect of angiopoietin-1 to inhibition of NF-kappaB.* Circ Res, 2003. **92**(6): p. 586-8.
  210. Kim, K.L., I.-S. Shin, J.-M. Kim, J.-H. Choi, J. Byun, E.-S. Jeon, W. Suh, and D.-K. Kim, *Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells.* Cardiovasc Res, 2006. **72**(3): p. 394-402.
  211. Seegar, T.C., B. Eller, D. Tzvetkova-Robev, M.V. Kolev, S.C. Henderson, D.B. Nikolov, and W.A. Barton, *Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands.* Mol Cell, 2010. **37**(5): p. 643-55.
  212. Li, Z., H. Huang, P. Boland, M.G. Dominguez, P. Burfeind, K.M. Lai, H.C. Lin, N.W. Gale, C. Daly, W. Auerbach, D. Valenzuela, G.D. Yancopoulos, and G. Thurston, *Embryonic stem cell tumor model reveals role of vascular endothelial receptor tyrosine phosphatase in regulating Tie2 pathway in tumor angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(52): p. 22399-404.
  213. Winderlich, M., L. Keller, G. Cagna, A. Broermann, O. Kamenyeva, F. Kiefer, U. Deutsch, A.F. Nottebaum, and D. Vestweber, *VE-PTP controls blood vessel development by balancing Tie-2 activity.* J Cell Biol, 2009. **185**(4): p. 657-71.

214. Hodous, B.L., S.D. Geuns-Meyer, P.E. Hughes, B.K. Albrecht, S. Bellon, J. Bready, S. Caenepeel, V.J. Cee, S.C. Chaffee, A. Coxon, M. Emery, J. Fretland, P. Gallant, Y. Gu, D. Hoffman, R.E. Johnson, R. Kendall, J.L. Kim, A.M. Long, M. Morrison, P.R. Olivieri, V.F. Patel, A. Polverino, P. Rose, P. Tempest, L. Wang, D.A. Whittington, and H. Zhao, *Evolution of a highly selective and potent 2-(pyridin-2-yl)-1,3,5-triazine Tie-2 kinase inhibitor*. J Med Chem, 2007. **50**(4): p. 611-26.
215. Jones, N., K. Iljin, D.J. Dumont, and K. Alitalo, *Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 257-67.
216. Kim, I., H.G. Kim, J.N. So, J.H. Kim, H.J. Kwak, and G.Y. Koh, *Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway*. Circ Res, 2000. **86**(1): p. 24-9.
217. Semones, M., Y. Feng, N. Johnson, J.L. Adams, J. Winkler, and M. Hansbury, *Pyridinylimidazole inhibitors of Tie2 kinase*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(17): p. 4756-60.
218. Cardone, M.H., N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J.C. Reed, *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
219. Harfouche, R., H.M. Hassessian, Y. Guo, V. Faivre, C.B. Srikant, G.D. Yancopoulos, and S.N.A. Hussain, *Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells*. Microvasc Res, 2002. **64**(1): p. 135-147.
220. Papapetropoulos, A., D. Fulton, K. Mahboubi, R.G. Kalb, D.S. O'Connor, F. Li, D.C. Altieri, and W.C. Sessa, *Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9102-5.
221. Kobayashi, H. and P.C. Lin, *Angiopoietin/Tie2 signaling, tumor angiogenesis and inflammatory diseases*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 666-74.
222. Peters, K.G., C.D. Kontos, P.C. Lin, A.L. Wong, P. Rao, L. Huang, M.W. Dewhirst, and S. Sankar, *Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 51-71.
223. Dumont, D.J., G. Gradwohl, G.H. Fong, M.C. Puri, M. Gertsenstein, A. Auerbach, and M.L. Breitman, *Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo*. Genes Dev, 1994. **8**(16): p. 1897-909.
224. Patan, S., *TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth*. Microvasc Res, 1998. **56**(1): p. 1-21.
225. Jones, N., D. Voskas, Z. Master, R. Sarao, J. Jones, and D.J. Dumont, *Rescue of the early vascular defects in Tek/Tie2 null mice reveals an essential survival function*. EMBO Rep, 2001. **2**(5): p. 438-45.
226. Takakura, N., X.L. Huang, T. Naruse, I. Hamaguchi, D.J. Dumont, G.D. Yancopoulos, and T. Suda, *Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor*



- in the development of definitive hematopoiesis. Immunity, 1998. 9(5): p. 677-86.*
227. Rodewald, H.R. and T.N. Sato, *Tie1, a receptor tyrosine kinase essential for vascular endothelial cell integrity, is not critical for the development of hematopoietic cells. Oncogene, 1996. 12(2): p. 397-404.*
228. Puri, M.C., J. Partanen, J. Rossant, and A. Bernstein, *Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. Development, 1999. 126(20): p. 4569-80.*
229. DeBusk, L.M., D.E. Hallahan, and P.C. Lin, *Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. Exp Cell Res, 2004. 298(1): p. 167-77.*
230. Kontos, C.D., E.H. Cha, J.D. York, and K.G. Peters, *The endothelial receptor tyrosine kinase Tie1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to inhibit apoptosis. Mol Cell Biol, 2002. 22(6): p. 1704-13.*
231. Kwak, H.J., J.N. So, S.J. Lee, I. Kim, and G.Y. Koh, *Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. FEBS Lett, 1999. 448(2-3): p. 249-53.*
232. Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, T.J. Dengler, P.C. Maisonpierre, G.D. Yancopoulos, and W.C. Sessa, *Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. Lab Invest, 1999. 79(2): p. 213-23.*
233. Daly, C., V. Wong, E. Burova, Y. Wei, S. Zabski, J. Griffiths, K.M. Lai, H.C. Lin, E. Ioffe, G.D. Yancopoulos, and J.S. Rudge, *Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). Genes Dev, 2004. 18(9): p. 1060-71.*
234. Tsigkos, S., Z. Zhou, A. Kotanidou, D. Fulton, S. Zakyntinos, C. Roussos, and A. Papapetropoulos, *Regulation of Ang2 release by PTEN/PI3-kinase/Akt in lung microvascular endothelial cells. J Cell Physiol, 2006. 207(2): p. 506-11.*
235. Tadros, A., D.P. Hughes, B.J. Dunmore, and N.P.J. Brindle, *ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1. Blood, 2003. 102(13): p. 4407-4409.*
236. Babaei, S., K. Teichert-Kuliszewska, Q. Zhang, N. Jones, D.J. Dumont, and D.J. Stewart, *Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. Am J Pathol, 2003. 162(6): p. 1927-36.*
237. Koblizek, T.I., C. Weiss, G.D. Yancopoulos, U. Deutsch, and W. Risau, *Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. Curr Biol, 1998. 8(9): p. 529-32.*
238. Witzenbichler, B., P.C. Maisonpierre, P. Jones, G.D. Yancopoulos, and J.M. Isner, *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.*
239. Carlson, T.R., Y. Feng, P.C. Maisonpierre, M. Mrksich, and A.O. Morla, *Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. J Biol Chem, 2001. 276(28): p. 26516-25.*

240. Kanda, S., Y. Miyata, Y. Mochizuki, T. Matsuyama, and H. Kanetake, *Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(15): p. 6820-7.
241. Dallabrida, S.M., N. Ismail, J.R. Oberle, B.E. Himes, and M.A. Rupnick, *Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins*. *Circ Res*, 2005. **96**(4): p. 8-24.
242. Serini, G., L. Napione, M. Arese, and F. Bussolino, *Besides adhesion: new perspectives of integrin functions in angiogenesis*. *Cardiovasc Res*, 2008. **78**(2): p. 213-22.
243. Weber, C.C., H. Cai, M. Ehrbar, H. Kubota, G. Martiny-Baron, W. Weber, V. Djonov, E. Weber, A.S. Mallik, M. Fussenegger, K. Frei, J.A. Hubbell, and A.H. Zisch, *Effects of protein and gene transfer of the angiopoietin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(23): p. 22445-53.
244. Dejana, E., *Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(9): p. 1949-53.
245. Shay-Salit, A., M. Shushy, E. Wolfvitz, H. Yahav, F. Breviario, E. Dejana, and N. Resnick, *VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(14): p. 9462-7.
246. Wang, Y., S. Pampou, K. Fujikawa, and L. Varticovski, *Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC beta*. *J Cell Physiol*, 2004. **198**(1): p. 53-61.
247. Cascone, I., L. Napione, F. Maniero, G. Serini, and F. Bussolino, *Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(6): p. 993-991004.
248. Baffert, F., T. Le, G. Thurston, and D.M. McDonald, *Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(1): p. H107-18.
249. Mammoto, T., S.M. Parikh, A. Mammoto, D. Gallagher, B. Chan, G. Mostoslavsky, D.E. Ingber, and V.P. Sukhatme, *Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(33): p. 23910-8.
250. Thurston, G., J.S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S.D. Croll, N. Glazer, J. Holash, D.M. McDonald, and G.D. Yancopoulos, *Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 460-3.
251. Gamble, J.R., J. Drew, L. Trezise, A. Underwood, M. Parsons, L. Kasminkas, J. Rudge, G. Yancopoulos, and M.A. Vadas, *Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions*. *Circ Res*, 2000. **87**(7): p. 603-7.
252. Kim, I., S.O. Moon, S.H. Kim, H.J. Kim, Y.S. Koh, and G.Y. Koh, *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.
253. Cho, C.H., H.K. Sung, K.T. Kim, H.G. Cheon, G.T. Oh, H.J. Hong, O.J. Yoo, and G.Y. Koh, *COMP-angiopoietin-1 promotes wound healing through enhanced angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow in a diabetic mouse model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(13): p. 4946-51.
  254. Cho, C.H., R.A. Kammerer, H.J. Lee, K. Yasunaga, K.T. Kim, H.H. Choi, W. Kim, S.H. Kim, S.K. Park, G.M. Lee, and G.Y. Koh, *Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(15): p. 5553-8.
  255. Nykanen, A.I., R. Krebs, A. Saaristo, P. Turunen, K. Alitalo, S. Yla-Herttuala, P.K. Koskinen, and K.B. Lemstrom, *Angiopoietin-1 protects against the development of cardiac allograft arteriosclerosis*. *Circulation*, 2003. **107**(9): p. 1308-14.
  256. Kim, I., S.O. Moon, S.K. Park, S.W. Chae, and G.Y. Koh, *Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression*. *Circ Res*, 2001. **89**(6): p. 477-9.
  257. Pizurki, L., Z. Zhou, K. Glynos, C. Roussos, and A. Papapetropoulos, *Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production*. *Br J Pharmacol*, 2003. **139**(2): p. 329-36.
  258. Fiedler, U., Y. Reiss, M. Scharpfenecker, V. Grunow, S. Koidl, G. Thurston, N.W. Gale, M. Witzenthath, S. Rosseau, N. Suttorp, A. Sobke, M. Herrmann, K.T. Preissner, P. Vajkoczy, and H.G. Augustin, *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.
  259. 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.
  260. De Palma, M., C. Murdoch, M.A. Venneri, L. Naldini, and C.E. Lewis, *Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(12): p. 519-24.
  261. Rao, S., I.B. Lobov, J.E. Vallance, K. Tsujikawa, I. Shiojima, S. Akunuru, K. Walsh, L.E. Benjamin, and R.A. Lang, *Obligatory participation of macrophages in an angiopoietin 2-mediated cell death switch*. *Development*, 2007. **134**(24): p. 4449-58.
  262. Ramsauer, M. and P.A. D'Amore, *Contextual role for angiopoietins and TGFbeta1 in blood vessel stabilization*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 10): p. 1810-7.
  263. Audoy-Remus, J., J.F. Richard, D. Soulet, H. Zhou, P. Kubes, and L. Vallieres, *Rod-Shaped monocytes patrol the brain vasculature and give rise to perivascular macrophages under the influence of proinflammatory cytokines and angiopoietin-2*. *J Neurosci*, 2008. **28**(41): p. 10187-99.
  264. Tressel, S.L., H. Kim, C.W. Ni, K. Chang, J.C. Velasquez-Castano, W.R. Taylor, Y.S. Yoon, and H. Jo, *Angiopoietin-2 stimulates blood flow recovery after femoral artery occlusion by inducing inflammation and arteriogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(11): p. 1989-95.

265. Roviezzo, F., S. Tsigkos, A. Kotanidou, M. Bucci, V. Brancaleone, G. Cirino, and A. Papapetropoulos, *Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(2): p. 738-44.
266. Korff, T., S. Kimmina, G. Martiny-Baron, and H.G. Augustin, *Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness*. *Faseb J*, 2001. **15**(2): p. 447-57.
267. Mochizuki, Y., T. Nakamura, H. Kanetake, and S. Kanda, *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.
268. Nykanen, A.I., K. Pajusola, R. Krebs, M.A. Keranen, O. Raisky, P.K. Koskinen, K. Alitalo, and K.B. Lemstrom, *Common protective and diverse smooth muscle cell effects of AAV-mediated angiopoietin-1 and -2 expression in rat cardiac allograft vasculopathy*. *Circ Res*, 2006. **98**(11): p. 1373-80.
269. Mandriota, S.J. and M.S. Pepper, *Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia*. *Circ Res*, 1998. **83**(8): p. 852-9.
270. Mangan, S.H., A. Van Campenhout, C. Rush, and J. Golledge, *Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor-alpha associated with induction of angiopoietin-2*. *Cardiovasc Res*, 2007. **76**(3): p. 494-505.
271. Brindle, N.P., P. Saharinen, and K. Alitalo, *Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection*. *Circ Res*, 2006. **98**(8): p. 1014-23.
272. Das, A., W. Fanslow, D. Cerretti, E. Warren, N. Talarico, and P. McGuire, *Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization*. *Lab Invest*, 2003. **83**(11): p. 1637-45.
273. Maliba, R., S. Lapointe, P.E. Neagoe, A. Brkovic, and M.G. Sirois, *Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways*. *Cell Signal*, 2006. **18**(11): p. 1947-57.
274. Maliba, R., A. Brkovic, P.E. Neagoe, L.R. Villeneuve, and M.G. Sirois, *Angiopoietin-mediated endothelial P-selectin translocation: cell signaling mechanisms*. *J Leukoc Biol*, 2008. **83**(2): p. 352-60.
275. Bezuidenhout, L., M. Bracher, G. Davison, P. Zilla, and N. Davies, *Ang-2 and PDGF-BB cooperatively stimulate human peripheral blood monocyte fibrinolysis*. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(6): p. 1496-503.
276. Murdoch, C., S. Tazzyman, S. Webster, and C.E. Lewis, *Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2*. *J Immunol*, 2007. **178**(11): p. 7405-7411.
277. Venneri, M.A., M. De Palma, M. Ponzoni, F. Pucci, C. Scielzo, E. Zonari, R. Mazzieri, C. Doglioni, and L. Naldini, *Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer*. *Blood*, 2007. **109**(12): p. 5276-85.
278. Balkwill, F.R., *Tumour necrosis factor and cancer*. *Prog Growth Factor Res*, 1992. **4**(2): p. 121-37.

279. Dumas, E., C. Martel, P.-E. Neagoe, A. Bonnefoy, and M.G. Sirois, *Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 promotes neutrophil viability: Role of interleukin-8 and platelet-activating factor*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2012. **1823**(2): p. 358-367.
280. Suri, C., J. McClain, G. Thurston, D.M. McDonald, H. Zhou, E.H. Oldmixon, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos, *Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1*. *Science*, 1998. **282**(5388): p. 468-71.
281. Audero, E., I. Cascone, F. Maniero, L. Napione, M. Arese, L. Lanfrancone, and F. Bussolino, *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. 13224-13233.
282. Hayes, A.J., W.Q. Huang, J. Mallah, D. Yang, M.E. Lippman, and L.Y. Li, *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.
283. Reiss, Y., J. Droste, M. Heil, S. Tribulova, M.H. Schmidt, W. Schaper, D.J. Dumont, and K.H. Plate, *Angiopoietin-2 impairs revascularization after limb ischemia*. *Circ Res*, 2007. **101**(1): p. 88-96.
284. Lobov, I.B., P.C. Brooks, and R.A. Lang, *Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11205-10.
285. Ogawa, M., H. Yamamoto, H. Nagano, Y. Miyake, Y. Sugita, T. Hata, B.N. Kim, C.Y. Ngan, B. Damdinsuren, M. Ikenaga, M. Ikeda, M. Ohue, S. Nakamori, M. Sekimoto, M. Sakon, N. Matsuura, and M. Monden, *Hepatic expression of ANG2 RNA in metastatic colorectal cancer*. *Hepatology*, 2004. **39**(2): p. 528-39.
286. Dumont, D.J., G.H. Fong, M.C. Puri, G. Gradwohl, K. Alitalo, and M.L. Breitman, *Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development*. *Dev Dyn*, 1995. **203**(1): p. 80-92.
287. Holash, J., P.C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C.R. Alexander, D. Zagzag, G.D. Yancopoulos, and S.J. Wiegand, *Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF*. *Science*, 1999. **284**(5422): p. 1994-8.
288. Ozawa, C.R., A. Banfi, N.L. Glazer, G. Thurston, M.L. Springer, P.E. Kraft, D.M. McDonald, and H.M. Blau, *Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(4): p. 516-527.
289. Zagzag, D., R. Amirnovin, M.A. Greco, H. Yee, J. Holash, S.J. Wiegand, S. Zabski, G.D. Yancopoulos, and M. Grumet, *Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis*. *Lab Invest*, 2000. **80**(6): p. 837-49.
290. Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet, *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. *Development*, 1998. **125**(9): p. 1591-1598.

291. Grosskreutz, C.L., B. Anand-Apte, C. Duplaa, T.P. Quinn, B.I. Terman, B. Zetter, and P.A. D'Amore, *Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro*. *Microvasc Res*, 1999. **58**(2): p. 128-36.
292. Baffert, F., G. Thurston, M. Rochon-Duck, T. Le, R. Brekken, and D.M. McDonald, *Age-related changes in vascular endothelial growth factor dependency and angiopoietin-1-induced plasticity of adult blood vessels*. *Circ Res*, 2004. **94**(7): p. 984-92.
293. Peirce, S.M., R.J. Price, and T.C. Skalak, *Spatial and temporal control of angiogenesis and arterialization using focal applications of VEGF164 and Ang-1*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(3): p. 918-925.
294. Yamauchi, A., Y. Ito, M. Morikawa, M. Kobune, J. Huang, K. Sasaki, K. Takahashi, K. Nakamura, H. Dehari, Y. Niitsu, T. Abe, and H. Hamada, *Pre-administration of angiopoietin-1 followed by VEGF induces functional and mature vascular formation in a rabbit ischemic model*. *J Gene Med*, 2003. **5**(11): p. 994-1004.
295. Lee, O.H., J. Fueyo, J. Xu, W.K. Yung, M.G. Lemoine, F.F. Lang, B.N. Bekele, X. Zhou, M.A. Alonso, K.D. Aldape, G.N. Fuller, and C. Gomez-Manzano, *Sustained angiopoietin-2 expression disrupts vessel formation and inhibits glioma growth*. *Neoplasia*, 2006. **8**(5): p. 419-28.
296. Zhu, Y., C. Lee, F. Shen, R. Du, W.L. Young, and G.Y. Yang, *Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain*. *Stroke*, 2005. **36**(7): p. 1533-7.
297. Hanahan, D., *Signaling vascular morphogenesis and maintenance*. *Science*, 1997. **277**(5322): p. 48-50.
298. Cho, C.H., K.E. Kim, J. Byun, H.S. Jang, D.K. Kim, P. Baluk, F. Baffert, G.M. Lee, N. Mochizuki, J. Kim, B.H. Jeon, D.M. McDonald, and G.Y. Koh, *Long-term and sustained COMP-Ang1 induces long-lasting vascular enlargement and enhanced blood flow*. *Circ Res*, 2005. **97**(1): p. 86-94.
299. Hoffmann, J., Y. Feng, F. vom Hagen, A. Hillenbrand, J. Lin, R. Erber, P. Vajkoczy, E. Gourzoulidou, H. Waldmann, A. Giannis, H. Wolburg, M. Shani, V. Jaeger, H.A. Weich, K.T. Preissner, S. Hoffmann, U. Deutsch, and H.P. Hammes, *Endothelial survival factors and spatial completion, but not pericyte coverage of retinal capillaries determine vessel plasticity*. *Faseb J*, 2005. **19**(14): p. 2035-2036.
300. Vikkula, M., L.M. Boon, K.L. Carraway, 3rd, J.T. Calvert, A.J. Diamonti, B. Goumnerov, K.A. Pasyk, D.A. Marchuk, M.L. Warman, L.C. Cantley, J.B. Mulliken, and B.R. Olsen, *Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2*. *Cell*, 1996. **87**(7): p. 1181-90.
301. Uemura, A., M. Ogawa, M. Hirashima, T. Fujiwara, S. Koyama, H. Takagi, Y. Honda, S.J. Wiegand, G.D. Yancopoulos, and S. Nishikawa, *Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(11): p. 1619-28.
302. Bhardwaj, S., H. Roy, T. Karpanen, Y. He, S. Jauhiainen, M. Hedman, K. Alitalo, and S. Yla-Herttuala, *Periadventitial angiopoietin-1 gene transfer*

- induces angiogenesis in rabbit carotid arteries.* Gene Ther, 2005. **12**(5): p. 388-94.
303. Shyu, K.G., O. Manor, M. Magner, G.D. Yancopoulos, and J.M. Isner, *Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb.* Circulation, 1998. **98**(19): p. 2081-2087.
304. Hawighorst, T., M. Skobe, M. Streit, Y.K. Hong, P. Velasco, L.F. Brown, L. Riccardi, B. Lange-Asschenfeldt, and M. Detmar, *Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth.* Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1381-92.
305. Stoeltzing, O., S.A. Ahmad, W. Liu, M.F. McCarty, J.S. Wey, A.A. Parikh, F. Fan, N. Reinmuth, M. Kawaguchi, C.D. Bucana, and L.M. Ellis, *Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors.* Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3370-7.
306. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications.* N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
307. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.* Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
308. Morikawa, S., P. Baluk, T. Kaidoh, A. Haskell, R.K. Jain, and D.M. McDonald, *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors.* Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 985-1000.
309. Ward, N.L. and D.J. Dumont, *The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development.* Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(1): p. 19-27.
310. Ding, H., L. Roncari, X. Wu, N. Lau, P. Shannon, A. Nagy, and A. Guha, *Expression and hypoxic regulation of angiopoietins in human astrocytomas.* Neuro-oncol, 2001. **3**(1): p. 1-10.
311. Nakayama, T., L. Yao, and G. Tosato, *Mast cell-derived angiopoietin-1 plays a critical role in the growth of plasma cell tumors.* J Clin Invest, 2004. **114**(9): p. 1317-25.
312. Martoglio, A.M., B.D. Tom, M. Starkey, A.N. Corps, D.S. Charnock-Jones, and S.K. Smith, *Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays.* Mol Med, 2000. **6**(9): p. 750-65.
313. Shirakawa, K., H. Tsuda, Y. Heike, K. Kato, R. Asada, M. Inomata, H. Sasaki, F. Kasumi, M. Yoshimoto, T. Iwanaga, F. Konishi, M. Terada, and H. Wakasugi, *Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer.* Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 445-51.
314. Tangkeangsirisin, W., J. Hayashi, and G. Serrero, *PC cell-derived growth factor mediates tamoxifen resistance and promotes tumor growth of human breast cancer cells.* Cancer Res, 2004. **64**(5): p. 1737-43.
315. Wang, J., K. Wu, D. Zhang, H. Tang, H. Xie, L. Hong, Y. Pan, M. Lan, S. Hu, X. Ning, and D. Fan, *Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **337**(1): p. 386-93.

316. Machein, M.R., A. Knedla, R. Knoth, S. Wagner, E. Neuschl, and K.H. Plate, *Angiopoietin-1 promotes tumor angiogenesis in a rat glioma model*. Am J Pathol, 2004. **165**(5): p. 1557-70.
317. Shim, W.S., M. Teh, A. Bapna, I. Kim, G.Y. Koh, P.O. Mack, and R. Ge, *Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice*. Exp Cell Res, 2002. **279**(2): p. 299-309.
318. Zadeh, G., K. Koushan, L. Pillo, P. Shannon, and A. Guha, *Role of Ang1 and its interaction with VEGF-A in astrocytomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(9): p. 978-89.
319. Hayes, A.J., W.Q. Huang, J. Yu, P.C. Maisonpierre, A. Liu, F.G. Kern, M.E. Lippman, S.W. McLeskey, and L.Y. Li, *Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(9): p. 1154-60.
320. Ahmad, S.A., W. Liu, Y.D. Jung, F. Fan, M. Wilson, N. Reinmuth, R.M. Shaheen, C.D. Bucana, and L.M. Ellis, *The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1255-9.
321. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Angiopoietin-2 is implicated in the regulation of tumor angiogenesis*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 563-570.
322. Bach, F., F.J. Uddin, and D. Burke, *Angiopoietins in malignancy*. Eur J Surg Oncol, 2006.
323. Hegen, A., S. Koidl, K. Weindel, D. Marme, H.G. Augustin, and U. Fiedler, *Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(10): p. 1803-1809.
324. Cao, Y., P. Sonveaux, S. Liu, Y. Zhao, J. Mi, B.M. Clary, C.Y. Li, C.D. Kontos, and M.W. Dewhirst, *Systemic overexpression of angiopoietin-2 promotes tumor microvessel regression and inhibits angiogenesis and tumor growth*. Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3835-44.
325. Etoh, T., H. Inoue, S. Tanaka, G.F. Barnard, S. Kitano, and M. Mori, *Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2145-2153.
326. Hu, B., P. Guo, Q. Fang, H.-Q. Tao, D. Wang, M. Nagane, H.-J.S. Huang, Y. Gunji, R. Nishikawa, K. Alitalo, W.K. Cavenee, and S.-Y. Cheng, *Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8904-8909.
327. Reiss, Y., A. Knedla, A.O. Tal, M.H.H. Schmidt, M. Jugold, F. Kiessling, A.M. Burger, H. Wolburg, U. Deutsch, and K.H. Plate, *Switching of vascular phenotypes within a murine breast cancer model induced by angiopoietin-2*. J Pathol, 2009. **217**(4): p. 571-580.
328. Ochiuni, T., S. Tanaka, S. Oka, T. Hiyama, M. Ito, Y. Kitadai, K. Haruma, and K. Chayama, *Clinical significance of angiopoietin-2 expression at the deepest invasive tumor site of advanced colorectal carcinoma*. Int J Oncol, 2004. **24**(3): p. 539-547.



329. Sfiligoi, C., A. de Luca, I. Cascone, V. Sorbello, L. Fusco, R. Ponzzone, N. Biglia, E. Audero, R. Arisio, F. Bussolino, P. Sismondi, and M. De Bortoli, *Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival*. *Int J Cancer*, 2003. **103**(4): p. 466-74.
330. Reiss, Y., M.R. Machein, and K.H. Plate, *The role of angiopoietins during angiogenesis in gliomas*. *Brain Pathol*, 2005. **15**(4): p. 311-7.
331. Yoshida, Y., Y. Oshika, Y. Fukushima, T. Tokunaga, H. Hatanaka, H. Kijima, H. Yamazaki, Y. Ueyama, N. Tamaoki, S. Miura, and M. Nakamura, *Expression of angiostatic factors in colorectal cancer*. *Int J Oncol*, 1999. **15**(6): p. 1221-5.
332. Eggert, A., N. Ikegaki, J. Kwiatkowski, H. Zhao, G.M. Brodeur, and B.P. Himelstein, *High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 1900-1908.
333. Osada, H., T. Tokunaga, H. Hatanaka, T. Kawakami, T. Tsuchida, Y. Abe, A. Tsugu, H. Kijima, H. Yamazaki, K. Shima, Y. Osamura, Y. Ueyama, and M. Nakamura, *Gene expression of angiogenesis related factors in glioma*. *Int J Oncol*, 2001. **18**(2): p. 305-9.
334. Caine, G.J., A.D. Blann, P.S. Stonelake, P. Ryan, and G.Y. Lip, *Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer: a comparison with VEGF and Flt-1*. *Eur J Clin Invest*, 2003. **33**(10): p. 883-90.
335. Hatanaka, H., Y. Abe, M. Naruke, T. Tokunaga, Y. Oshika, T. Kawakami, H. Osada, J. Nagata, J. Kamochi, T. Tsuchida, H. Kijima, H. Yamazaki, H. Inoue, Y. Ueyama, and M. Nakamura, *Significant correlation between interleukin 10 expression and vascularization through angiopoietin/TIE2 networks in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(5): p. 1287-92.
336. Tanaka, F., S. Ishikawa, K. Yanagihara, R. Miyahara, Y. Kawano, M. Li, Y. Otake, and H. Wada, *Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer*. *Cancer Res*, 2002. **62**(23): p. 7124-9.
337. Nakayama, T., A. Yoshizaki, N. Kawahara, A. Ohtsuru, C.Y. Wen, E. Fukuda, M. Nakashima, and I. Sekine, *Expression of Tie-1 and 2 receptors, and angiopoietin-1, 2 and 4 in gastric carcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors*. *Histopathology*, 2004. **44**(3): p. 232-9.
338. Mitsutake, N., H. Namba, K. Takahara, K. Ishigaki, J. Ishigaki, H. Ayabe, and S. Yamashita, *Tie-2 and angiopoietin-1 expression in human thyroid tumors*. *Thyroid*, 2002. **12**(2): p. 95-9.
339. Kuroda, H., A. Ohtsuru, M. Futakuchi, Y. Kawashita, Y. Nagayama, E. Fukuda, H. Namba, T. Shirai, T. Kanematsu, and S. Yamashita, *Distinctive gene expression of receptor-type tyrosine kinase families during rat hepatocarcinogenesis*. *Int J Mol Med*, 2002. **9**(5): p. 473-80.
340. Lee, O.-H., J. Xu, J. Fueyo, G.N. Fuller, K.D. Aldape, M.M. Alonso, Y. Piao, T.-J. Liu, F.F. Lang, B.N. Bekele, and C. Gomez-Manzano, *Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with*

- integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix.* Mol Cancer Res, 2006. **4**(12): p. 915-926.
341. Hashizume, H., P. Baluk, S. Morikawa, J.W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R.K. Jain, and D.M. McDonald, *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness.* Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-1380.
342. McDonald, D.M., G. Thurston, and P. Baluk, *Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation.* Microcirculation, 1999. **6**(1): p. 7-22.
343. Ward, N.L., T. Putoczki, K. Mearow, T.L. Ivanco, and D.J. Dumont, *Vascular-specific growth factor angiopoietin 1 is involved in the organization of neuronal processes.* J Comp Neurol, 2005. **482**(3): p. 244-256.
344. Costa, C., R. Soares, and F. Schmitt, *Angiogenesis: now and then.* APMIS, 2004. **112**(7-8): p. 402-412.
345. Byzova, T.V., C.K. Goldman, N. Pampori, K.A. Thomas, A. Bett, S.J. Shattil, and E.F. Plow, *A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins.* Mol Cell, 2000. **6**(4): p. 851-60.
346. Serini, G., D. Valdembri, and F. Bussolino, *Integrins and angiogenesis: a sticky business.* Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 651-8.
347. Herbst, R.S., D. Hong, L. Chap, R. Kurzrock, E. Jackson, J.M. Silverman, E. Rasmussen, Y.N. Sun, D. Zhong, Y.C. Hwang, J.L. Evelhoch, J.D. Oliner, N. Le, and L.S. Rosen, *Safety, pharmacokinetics, and antitumor activity of AMG 386, a selective angiopoietin inhibitor, in adult patients with advanced solid tumors.* J Clin Oncol, 2009. **27**(21): p. 3557-65.
348. Holopainen, T., H. Huang, C. Chen, K.E. Kim, L. Zhang, F. Zhou, W. Han, C. Li, J. Yu, J. Wu, G.Y. Koh, K. Alitalo, and Y. He, *Angiopoietin-1 overexpression modulates vascular endothelium to facilitate tumor cell dissemination and metastasis establishment.* Cancer Res, 2009. **69**(11): p. 4656-64.
349. Williams, R., *Discontinued drugs in 2007: oncology drugs.* Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(12): p. 1791-816.
350. Tian, S., A.J. Hayes, L.J. Metheny-Barlow, and L.Y. Li, *Stabilization of breast cancer xenograft tumour neovasculature by angiopoietin-1.* Br J Cancer, 2002. **86**(4): p. 645-51.
351. Fukuhara, S., K. Sako, K. Noda, K. Nagao, K. Miura, and N. Mochizuki, *Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiopoietin-1.* Exp Mol Med, 2009. **41**(3): p. 133-139.
352. Jackson, J.R., M.P. Seed, C.H. Kircher, D.A. Willoughby, and J.D. Winkler, *The codependence of angiogenesis and chronic inflammation.* Faseb J, 1997. **11**(6): p. 457-65.
353. Arroyo, A.G. and M.L. Iruela-Arispe, *Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response.* Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 226-35.
354. Stamenkovic, I., *Inflammation Aigue*, in *Pathologie inflammatoire I.* 2010.
355. Cotran, R.S., V. Kumar, T. Collins, and S.L. Robbins, *Robbins pathologic basis of disease.* 6th ed. 1999, Philadelphia: Saunders. xv, 1,425 p.
356. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing.* N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 738-46.

357. Serhan, C.N., *Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 101-37.
358. Godson, C., S. Mitchell, K. Harvey, N.A. Petasis, N. Hogg, and H.R. Brady, *Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1663-7.
359. Serhan, C.N., K. Gotlinger, S. Hong, Y. Lu, J. Siegelman, T. Baer, R. Yang, S.P. Colgan, and N.A. Petasis, *Anti-inflammatory actions of neuroprotectin D1/protectin D1 and its natural stereoisomers: assignments of dihydroxy-containing docosatrienes*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1848-59.
360. Canny, G., O. Levy, G.T. Furuta, S. Narravula-Alipati, R.B. Sisson, C.N. Serhan, and S.P. Colgan, *Lipid mediator-induced expression of bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3902-7.
361. Mitchell, S., G. Thomas, K. Harvey, D. Cottell, K. Reville, G. Berlasconi, N.A. Petasis, L. Erwig, A.J. Rees, J. Savill, H.R. Brady, and C. Godson, *Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(10): p. 2497-507.
362. Serhan, C.N., *Controlling the resolution of acute inflammation: a new genus of dual anti-inflammatory and proresolving mediators*. J Periodontol, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1520-6.
363. Serhan, C.N., S. Hong, K. Gronert, S.P. Colgan, P.R. Devchand, G. Mirick, and R.L. Moussignac, *Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals*. J Exp Med, 2002. **196**(8): p. 1025-37.
364. Sun, Y.P., S.F. Oh, J. Uddin, R. Yang, K. Gotlinger, E. Campbell, S.P. Colgan, N.A. Petasis, and C.N. Serhan, *Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9323-34.
365. Hong, S., K. Gronert, P.R. Devchand, R.L. Moussignac, and C.N. Serhan, *Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14677-87.
366. Mukherjee, P.K., V.L. Marcheselli, C.N. Serhan, and N.G. Bazan, *Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8491-6.
367. Marcheselli, V.L., S. Hong, W.J. Lukiw, X.H. Tian, K. Gronert, A. Musto, M. Hardy, J.M. Gimenez, N. Chiang, C.N. Serhan, and N.G. Bazan, *Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43807-17.
368. Gronert, K., N. Maheshwari, N. Khan, I.R. Hassan, M. Dunn, and M. Laniado Schwartzman, *A role for the mouse 12/15-lipoxygenase pathway in promoting*

- epithelial wound healing and host defense*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15267-78.
369. Mazzone, M., D. Dettori, R. Leite de Oliveira, S. Loges, T. Schmidt, B. Jonckx, Y.M. Tian, A.A. Lanahan, P. Pollard, C. Ruiz de Almodovar, F. De Smet, S. Vinckier, J. Aragonés, K. Debackere, A. Luttun, S. Wyns, B. Jordan, A. Pisacane, B. Gallez, M.G. Lampugnani, E. Dejana, M. Simons, P. Ratcliffe, P. Maxwell, and P. Carmeliet, *Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization*. Cell, 2009. **136**(5): p. 839-51.
370. Stamenkovic, I., *Inflammation chronique*, in *Pathologie inflammatoire II*. 2010.
371. Costa, C., J. Incio, and R. Soares, *Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence?* Angiogenesis, 2007. **10**(3): p. 149-66.
372. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
373. Charo, I.F. and M.B. Taubman, *Chemokines in the pathogenesis of vascular disease*. Circ Res, 2004. **95**(9): p. 858-66.
374. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
375. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
376. Philip, M., D.A. Rowley, and H. Schreiber, *Inflammation as a tumor promoter in cancer induction*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 433-9.
377. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 24-37.
378. Tracey, K.J., *The inflammatory reflex*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 853-9.
379. Beaudoux, J.L., P. Giral, E. Bruckert, M.J. Foglietti, and M.J. Chapman, *Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(2): p. 121-31.
380. Mrowietz, U. and W.H. Boehncke, *Leukocyte adhesion: a suitable target for anti-inflammatory drugs*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(22): p. 2825-31.
381. Murdoch, C., M. Muthana, and C.E. Lewis, *Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6257-63.
382. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
383. Semenza, G.L., L.A. Shimoda, and N.R. Prabhakar, *Regulation of gene expression by HIF-1*. Novartis Found Symp, 2006. **272**: p. 2-8; discussion 8-14, 33-6.
384. Benelli, R., G. Lorusso, A. Albinì, and D.M. Noonan, *Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(24): p. 3101-15.
385. Ishida, S., T. Usui, K. Yamashiro, Y. Kaji, S. Amano, Y. Ogura, T. Hida, Y. Oguchi, J. Ambati, J.W. Miller, E.S. Gragoudas, Y.-S. Ng, P.A. D'Amore, D.T. Shima, and A.P. Adamis, *VEGF164-mediated inflammation is required*

- for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization.* J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 483-489.
386. Murphy, E.J., L. Joseph, R. Stephens, and L.A. Horrocks, *Phospholipid composition of cultured human endothelial cells.* Lipids, 1992. **27**(2): p. 150-3.
387. Clark, P.O., D.J. Hanahan, and R.N. Pinckard, *Physical and chemical properties of platelet-activating factor obtained from human neutrophils and monocytes and rabbit neutrophils and basophils.* Biochim Biophys Acta, 1980. **628**(1): p. 69-75.
388. Ramesha, C.S. and W.C. Pickett, *Fatty acid composition of diacyl, alkylacyl, and alkenylacyl phospholipids of control and arachidonate-depleted rat polymorphonuclear leukocytes.* J Lipid Res, 1987. **28**(3): p. 326-31.
389. Chilton, F.H. and T.R. Connell, *1-ether-linked phosphoglycerides. Major endogenous sources of arachidonate in the human neutrophil.* J Biol Chem, 1988. **263**(11): p. 5260-5.
390. Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and D.M. Stafforini, *The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis.* Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S294-301.
391. Sirois, M.G. and E.R. Edelman, *VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor.* Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2746-56.
392. Au, B.T., T.J. Williams, and P.D. Collins, *Zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils involves activation via the CD11b/CD18 receptor and endogenous platelet-activating factor as an autocrine modulator.* J Immunol, 1994. **152**(11): p. 5411-9.
393. Predescu, D., K. Ihida, S. Predescu, and G.E. Palade, *The vascular distribution of the platelet-activating factor receptor.* Eur J Cell Biol, 1996. **69**(1): p. 86-98.
394. Ye, R.D., E.R. Prossnitz, A.H. Zou, and C.G. Cochrane, *Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **180**(1): p. 105-11.
395. Zhou, W., M.A. Javors, and M.S. Olson, *Impaired surface expression of PAF receptors on human neutrophils is dependent upon cell activation.* Arch Biochem Biophys, 1994. **308**(2): p. 439-45.
396. Khreiss, T., L. Jozsef, J.S. Chan, and J.G. Filep, *Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils.* Cell Signal, 2004. **16**(7): p. 801-10.
397. Beutler, B., V. Tkacenko, I. Milsark, N. Krochin, and A. Cerami, *Effect of gamma interferon on cachectin expression by mononuclear phagocytes. Reversal of the lpsd (endotoxin resistance) phenotype.* J Exp Med, 1986. **164**(5): p. 1791-6.
398. Matic, M. and S.R. Simon, *Effects of gamma interferon on release of tumor necrosis factor alpha from lipopolysaccharide-tolerant human monocyte-derived macrophages.* Infect Immun, 1992. **60**(9): p. 3756-62.

399. Imaizumi, T., H. Itaya, K. Fujita, D. Kudoh, S. Kudoh, K. Mori, K. Fujimoto, T. Matsumiya, H. Yoshida, and K. Satoh, *Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(2): p. 410-5.
400. Vassalli, P., *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 411-52.
401. Smart, S.J. and T.B. Casale, *Pulmonary epithelial cells facilitate TNF-alpha-induced neutrophil chemotaxis. A role for cytokine networking*. *J Immunol*, 1994. **152**(8): p. 4087-94.
402. Smart, S.J. and T.B. Casale, *TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(3 Pt 1): p. L238-45.
403. Zhang, W.J. and B. Frei, *Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells*. *FASEB J*, 2001. **15**(13): p. 2423-32.
404. Hess, D.J., M.J. Henry-Stanley, C.M. Bendel, B. Zhang, M.A. Johnson, and C.L. Wells, *Escherichia coli and TNF-alpha modulate macrophage phagocytosis of Candida glabrata*. *J Surg Res*, 2009. **155**(2): p. 217-24.
405. Hofmann, S., H. Grasberger, P. Jung, M. Bidlingmaier, J. Vlotides, O.E. Janssen, and R. Landgraf, *The tumour necrosis factor-alpha induced vascular permeability is associated with a reduction of VE-cadherin expression*. *Eur J Med Res*, 2002. **7**(4): p. 171-6.
406. Nooijen, P.T., E.R. Manusama, A.M. Eggermont, L. Schalkwijk, J. Stavast, R.L. Marquet, R.M. de Waal, and D.J. Ruiter, *Synergistic effects of TNF-alpha and melphalan in an isolated limb perfusion model of rat sarcoma: a histopathological, immunohistochemical and electron microscopical study*. *Br J Cancer*, 1996. **74**(12): p. 1908-15.
407. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 519-50.
408. Kaspar, R.L. and L. Gehrke, *Peripheral blood mononuclear cells stimulated with C5a or lipopolysaccharide to synthesize equivalent levels of IL-1 beta mRNA show unequal IL-1 beta protein accumulation but similar polyribosome profiles*. *J Immunol*, 1994. **153**(1): p. 277-86.
409. Voronov, E., D.S. Shouval, Y. Krelin, E. Cagnano, D. Benharroch, Y. Iwakura, C.A. Dinarello, and R.N. Apte, *IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2645-50.
410. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. *Blood*, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
411. Dinarello, C.A., *Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1beta secretion and disease activity*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(9): p. 2817-22.
412. Baggiolini, M., A. Walz, and S.L. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(4): p. 1045-9.

413. Yoshimura, T., K. Matsushima, S. Tanaka, E.A. Robinson, E. Appella, J.J. Oppenheim, and E.J. Leonard, *Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9233-7.
414. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
415. Baldwin, E.T., I.T. Weber, R. St Charles, J.C. Xuan, E. Appella, M. Yamada, K. Matsushima, B.F. Edwards, G.M. Clore, A.M. Gronenborn, and et al., *Crystal structure of interleukin 8: symbiosis of NMR and crystallography*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(2): p. 502-6.
416. Remick, D.G., *Interleukin-8*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S466-7.
417. Standiford, T.J., S.L. Kunkel, M.A. Basha, S.W. Chensue, J.P. Lynch, 3rd, G.B. Toews, J. Westwick, and R.M. Strieter, *Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung*. J Clin Invest, 1990. **86**(6): p. 1945-53.
418. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6735-41.
419. Gimbrone, M.A., Jr., M.S. Obin, A.F. Brock, E.A. Luis, P.E. Hass, C.A. Hebert, Y.K. Yip, D.W. Leung, D.G. Lowe, W.J. Kohr, and et al., *Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions*. Science, 1989. **246**(4937): p. 1601-3.
420. Larsen Cg Fau - Anderson, A.O., J.J. Anderson Ao Fau - Oppenheim, K. Oppenheim Jj Fau - Matsushima, and K. Matsushima, *Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor*. (0019-2805 (Print)).
421. Smyth Mj Fau - Zachariae, C.O., Y. Zachariae Co Fau - Norihisa, J.R. Norihisa Y Fau - Ortaldo, A. Ortaldo Jr Fau - Hishinuma, K. Hishinuma A Fau - Matsushima, and K. Matsushima, *IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets*. (0022-1767 (Print)).
422. Cassatella, M.A., L. Meda, S. Bonora, M. Ceska, and G. Constantin, *Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2207-11.
423. Kasahara, T., N. Mukaida, K. Yamashita, H. Yagisawa, T. Akahoshi, and K. Matsushima, *IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line*. Immunology, 1991. **74**(1): p. 60-7.
424. Brasier, A.R., M. Jamaluddin, A. Casola, W. Duan, Q. Shen, and R.P. Garofalo, *A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3551-61.
425. Aihara, M., D. Tsuchimoto, H. Takizawa, A. Azuma, H. Wakebe, Y. Ohmoto, K. Imagawa, M. Kikuchi, N. Mukaida, and K. Matsushima, *Mechanisms*

- involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. Infect Immun, 1997. 65(8): p. 3218-24.*
426. Hobbie, S., L.M. Chen, R.J. Davis, and J.E. Galan, *Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by Salmonella typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. J Immunol, 1997. 159(11): p. 5550-9.*
427. Mastronarde, J.G., M.M. Monick, N. Mukaida, K. Matsushima, and G.W. Hunninghake, *Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. J Infect Dis, 1998. 177(5): p. 1275-81.*
428. Murayama, T., Y. Ohara, M. Obuchi, K.S. Khabar, H. Higashi, N. Mukaida, and K. Matsushima, *Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. J Virol, 1997. 71(7): p. 5692-5.*
429. DeForge, L.E., A.M. Preston, E. Takeuchi, J. Kenney, L.A. Boxer, and D.G. Remick, *Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. J Biol Chem, 1993. 268(34): p. 25568-76.*
430. Shapiro, L. and C.A. Dinarello, *Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(26): p. 12230-4.*
431. Sonoda, Y., T. Kasahara, Y. Yamaguchi, K. Kuno, K. Matsushima, and N. Mukaida, *Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. J Biol Chem, 1997. 272(24): p. 15366-72.*
432. Holtmann, H., R. Winzen, P. Holland, S. Eickemeier, E. Hoffmann, D. Wallach, N.L. Malinin, J.A. Cooper, K. Resch, and M. Kracht, *Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. Mol Cell Biol, 1999. 19(10): p. 6742-53.*
433. Stuhlmeier, K.M., J. Broll, and B. Iliev, *NF-kappaB independent activation of a series of proinflammatory genes by hydrogen sulfide. Exp Biol Med (Maywood), 2009. 234(11): p. 1327-38.*
434. Hipp, M.S., C. Urbich, P. Mayer, J. Wischhusen, M. Weller, M. Kracht, and I. Spyridopoulos, *Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1. Eur J Immunol, 2002. 32(8): p. 2208-17.*
435. Joshi-Barve, S., S.S. Barve, W. Butt, J. Klein, and C.J. McClain, *Inhibition of proteasome function leads to NF-kappaB-independent IL-8 expression in human hepatocytes. Hepatology, 2003. 38(5): p. 1178-87.*
436. Scholz, H., A. Yndestad, J.K. Damas, T. Waehre, S. Tonstad, P. Aukrust, and B. Halvorsen, *8-isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. Cardiovasc Res, 2003. 59(4): p. 945-54.*



437. Choi, E.Y., Z.Y. Park, E.J. Choi, H.M. Oh, S. Lee, S.C. Choi, K.M. Lee, S.H. Im, J.S. Chun, and C.D. Jun, *Transcriptional regulation of IL-8 by iron chelator in human epithelial cells is independent from NF-kappaB but involves ERK1/2- and p38 kinase-dependent activation of AP-1*. J Cell Biochem, 2007. **102**(6): p. 1442-57.
438. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. **87**(1): p. 13-20.
439. Schmitz, M.L., S. Bacher, and M. Kracht, *I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(3): p. 186-90.
440. Kunsch, C., R.K. Lang, C.A. Rosen, and M.F. Shannon, *Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6*. J Immunol, 1994. **153**(1): p. 153-64.
441. Matsusaka T Fau - Fujikawa, K., Y. Fujikawa K Fau - Nishio, N. Nishio Y Fau - Mukaida, K. Mukaida N Fau - Matsushima, T. Matsushima K Fau - Kishimoto, S. Kishimoto T Fau - Akira, and S. Akira, *Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8*. (0027-8424 (Print)).
442. Mukaida, N., M. Morita, Y. Ishikawa, N. Rice, S. Okamoto, T. Kasahara, and K. Matsushima, *Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression*. J Biol Chem, 1994. **269**(18): p. 13289-95.
443. Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, and K. Matsushima, *Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(5): p. 554-8.
444. Wu, G.D., E.J. Lai, N. Huang, and X. Wen, *Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2396-403.
445. Zandi, E. and M. Karin, *Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 4547-51.
446. Nourbakhsh, M., S. Kalble, A. Dorrie, H. Hauser, K. Resch, and M. Kracht, *The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4501-8.
447. Falvo, J.V., B.S. Parekh, C.H. Lin, E. Fraenkel, and T. Maniatis, *Assembly of a functional beta interferon enhanceosome is dependent on ATF-2-c-jun heterodimer orientation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4814-25.
448. Wathlet, M.G., C.H. Lin, B.S. Parekh, L.V. Ronco, P.M. Howley, and T. Maniatis, *Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 507-18.
449. Carey, M., *The enhanceosome and transcriptional synergy*. Cell, 1998. **92**(1): p. 5-8.

450. Ashburner, B.P., S.D. Westerheide, and A.S. Baldwin, Jr., *The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(20): p. 7065-77.
451. Winzen, R., M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C.Y. Chen, A.B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann, *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. EMBO J, 1999. **18**(18): p. 4969-80.
452. Holmes, W.E., J. Lee, W.J. Kuang, G.C. Rice, and W.I. Wood, *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.
453. Murphy, P.M. and H.L. Tiffany, *Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor*. Science, 1991. **253**(5025): p. 1280-3.
454. Moser B Fau - Loetscher, P. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. (1529-2908 (Print)).
455. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. (1529-2908 (Print)).
456. Schraufstatter, I.U., J. Chung, and M. Burger, *IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. 1094-1103.
457. Brat, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 122-33.
458. Knall, C., G.S. Worthen, and G.L. Johnson, *Interleukin 8-stimulated phosphatidylinositol-3-kinase activity regulates the migration of human neutrophils independent of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3052-7.
459. Knall, C., S. Young, J.A. Nick, A.M. Buhl, G.S. Worthen, and G.L. Johnson, *Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2832-8.
460. MacManus, C.F., J. Pettigrew, A. Seaton, C. Wilson, P.J. Maxwell, S. Berlingeri, C. Purcell, M. McGurk, P.G. Johnston, and D.J. Waugh, *Interleukin-8 signaling promotes translational regulation of cyclin D in androgen-independent prostate cancer cells*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(7): p. 737-48.
461. Venkatakrishnan, G., R. Salgia, and J.E. Groopman, *Chemokine receptors CXCR-1/2 activate mitogen-activated protein kinase via the epidermal growth factor receptor in ovarian cancer cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(10): p. 6868-75.
462. Luppi, F., A.M. Longo, W.I. de Boer, K.F. Rabe, and P.S. Hiemstra, *Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation*. Lung Cancer, 2007. **56**(1): p. 25-33.

463. Glynn, P.C., E. Henney, and I.P. Hall, *The selective CXCR2 antagonist SB272844 blocks interleukin-8 and growth-related oncogene-alpha-mediated inhibition of spontaneous neutrophil apoptosis*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2002. **15**(2): p. 103-10.
464. Li, A., S. Dubey, M.L. Varney, B.J. Dave, and R.K. Singh, *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 3369-76.
465. Brew, R., J.S. Erikson, D.C. West, A.R. Kinsella, J. Slavin, and S.E. Christmas, *Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro*. *Cytokine*, 2000. **12**(1): p. 78-85.
466. Kamohara, H., M. Takahashi, T. Ishiko, M. Ogawa, and H. Baba, *Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor*. *Int J Oncol*, 2007. **31**(3): p. 627-632.
467. Takamori, H., Z.G. Oades, O.C. Hoch, M. Burger, and I.U. Schraufstatter, *Autocrine growth effect of IL-8 and GROalpha on a human pancreatic cancer cell line, Capan-1*. *Pancreas*, 2000. **21**(1): p. 52-6.
468. Murphy, C., M. McGurk, J. Pettigrew, A. Santinelli, R. Mazzucchelli, P.G. Johnston, R. Montironi, and D.J. Waugh, *Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(11): p. 4117-27.
469. Richardson, R.M., H. Ali, B.C. Pridgen, B. Haribabu, and R. Snyderman, *Multiple signaling pathways of human interleukin-8 receptor A. Independent regulation by phosphorylation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(17): p. 10690-5.
470. Nasser, M.W., R.J. Marjoram, S.L. Brown, and R.M. Richardson, *Cross-desensitization among CXCR1, CXCR2, and CCR5: role of protein kinase C-epsilon*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 6927-6933.
471. Takami, M., V. Terry, and L. Petruzzelli, *Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1*. *J Immunol*, 2002. **168**(9): p. 4559-4566.
472. Schraufstatter, I.U., K. Trieu, M. Zhao, D.M. Rose, R.A. Terkeltaub, and M. Burger, *IL-8-mediated cell migration in endothelial cells depends on cathepsin B activity and transactivation of the epidermal growth factor receptor*. *J Immunol*, 2003. **171**(12): p. 6714-22.
473. Petreaca, M.L., M. Yao, Y. Liu, K. Defea, and M. Martins-Green, *Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor-2 by interleukin-8 (IL-8/CXCL8) is required for IL-8/CXCL8-induced endothelial permeability*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(12): p. 5014-23.
474. Cohen-Hillel, E., I. Yron, T. Meshel, and A. Ben-Baruch, *Interleukin 8 and cell migration to inflammatory sites: the regulation of focal adhesion kinase under conditions of migratory desensitization*. *Isr Med Assoc J*, 2007. **9**(8): p. 579-83.
475. Cohen-Hillel, E., I. Yron, T. Meshel, G. Soria, H. Attal, and A. Ben-Baruch, *CXCL8-induced FAK phosphorylation via CXCR1 and CXCR2: cytoskeleton-*

- and integrin-related mechanisms converge with FAK regulatory pathways in a receptor-specific manner.* Cytokine, 2006. **33**(1): p. 1-16.
476. Feniger-Barish, R., I. Yron, T. Meshel, E. Matityahu, and A. Ben-Baruch, *IL-8-induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase.* Biochemistry, 2003. **42**(10): p. 2874-2886.
477. Lee, L.F., M.C. Louie, S.J. Desai, J. Yang, H.W. Chen, C.P. Evans, and H.J. Kung, *Interleukin-8 confers androgen-independent growth and migration of LNCaP: differential effects of tyrosine kinases Src and FAK.* Oncogene, 2004. **23**(12): p. 2197-205.
478. Wang, D. and A. Richmond, *Nuclear factor-kappa B activation by the CXC chemokine melanoma growth-stimulatory activity/growth-regulated protein involves the MEKK1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway.* J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3650-9.
479. Burger, M., T. Hartmann, J.A. Burger, and I. Schraufstatter, *KSHV-GPCR and CXCR2 transforming capacity and angiogenic responses are mediated through a JAK2-STAT3-dependent pathway.* Oncogene, 2005. **24**(12): p. 2067-75.
480. De Larco, J.E., B.R. Wuertz, and L.T. Furcht, *The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 4895-900.
481. Araki, S., Y. Omori, D. Lyn, R.K. Singh, D.M. Meinbach, Y. Sandman, V.B. Lokeshwar, and B.L. Lokeshwar, *Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer.* Cancer Res, 2007. **67**(14): p. 6854-6862.
482. Lang, K., B. Niggemann, K.S. Zanker, and F. Entschladen, *Signal processing in migrating T24 human bladder carcinoma cells: role of the autocrine interleukin-8 loop.* Int J Cancer, 2002. **99**(5): p. 673-80.
483. Yao, C., Y. Lin, M.S. Chua, C.S. Ye, J. Bi, W. Li, Y.F. Zhu, and S.M. Wang, *Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells.* Int J Cancer, 2007. **121**(9): p. 1949-57.
484. Maxwell, P.J., R. Gallagher, A. Seaton, C. Wilson, P. Scullin, J. Pettigrew, I.J. Stratford, K.J. Williams, P.G. Johnston, and D.J. Waugh, *HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells.* Oncogene, 2007. **26**(52): p. 7333-45.
485. Huang, S., L. Mills, B. Mian, C. Tellez, M. McCarty, X.D. Yang, J.M. Gudas, and M. Bar-Eli, *Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma.* Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 125-34.
486. Inoue, K., J.W. Slaton, B.Y. Eve, S.J. Kim, P. Perrotte, M.D. Balbay, S. Yano, M. Bar-Eli, R. Radinsky, C.A. Pettaway, and C.P. Dinney, *Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 2104-19.

487. Inoue, K., J.W. Slaton, S.J. Kim, P. Perrotte, B.Y. Eve, M. Bar-Eli, R. Radinsky, and C.P. Dinney, *Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastasis in human bladder cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(8): p. 2290-9.
488. Karashima, T., P. Sweeney, A. Kamat, S. Huang, S.J. Kim, M. Bar-Eli, D.J. McConkey, and C.P.N. Dinney, *Nuclear factor-kappaB mediates angiogenesis and metastasis of human bladder cancer through the regulation of interleukin-8*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(7): p. 2786-2797.
489. Mian, B.M., C.P. Dinney, C.E. Bermejo, P. Sweeney, C. Tellez, X.D. Yang, J.M. Gudas, D.J. McConkey, and M. Bar-Eli, *Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(8): p. 3167-75.
490. Shi, Q., J.L. Abbruzzese, S. Huang, I.J. Fidler, Q. Xiong, and K. Xie, *Constitutive and inducible interleukin 8 expression by hypoxia and acidosis renders human pancreatic cancer cells more tumorigenic and metastatic*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(11): p. 3711-21.
491. Malech, H.L. and J.I. Gallin, *Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases*. *N Engl J Med*, 1987. **317**(11): p. 687-94.
492. Athens, J.W., O.P. Haab, S.O. Raab, A.M. Mauer, H. Ashenbrucker, G.E. Cartwright, and M.M. Wintrobe, *Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects*. *J Clin Invest*, 1961. **40**: p. 989-95.
493. Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L.M. Kwast, R.J. de Boer, J.A. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman, *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. *Blood*, 2010. **116**(4): p. 625-7.
494. Dunon, D., L. Piali, and B.A. Imhof, *To stick or not to stick: the new leukocyte homing paradigm*. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(5): p. 714-23.
495. Springer, T.A., *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 827-72.
496. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. *Annual Review of Immunology*, 2005. **23**: p. 197-223.
497. Lee, W.L., R.E. Harrison, and S. Grinstein, *Phagocytosis by neutrophils*. *Microbes Infect*, 2003. **5**(14): p. 1299-306.
498. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. *Immunol Today*, 1995. **16**(1): p. 21-6.
499. Winkler, I.G., V. Barbier, R. Wadley, A.C. Zannettino, S. Williams, and J.P. Levesque, *Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches*. *Blood*, 2010. **116**(3): p. 375-85.
500. Lapidot, T. and O. Kollet, *The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice*. *Leukemia*, 2002. **16**(10): p. 1992-2003.

501. Eash, K.J., J.M. Means, D.W. White, and D.C. Link, *CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions*. *Blood*, 2009. **113**(19): p. 4711-9.
502. Eash, K.J., A.M. Greenbaum, P.K. Gopalan, and D.C. Link, *CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(7): p. 2423-31.
503. Theilgaard-Monch, K., L.C. Jacobsen, R. Borup, T. Rasmussen, M.D. Bjerregaard, F.C. Nielsen, J.B. Cowland, and N. Borregaard, *The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation*. *Blood*, 2005. **105**(4): p. 1785-96.
504. Lieschke, G.J., D. Grail, G. Hodgson, D. Metcalf, E. Stanley, C. Cheers, K.J. Fowler, S. Basu, Y.F. Zhan, and A.R. Dunn, *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. *Blood*, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
505. Ley, K., E. Smith, and M.A. Stark, *IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes*. *Immunol Res*, 2006. **34**(3): p. 229-42.
506. Stark, M.A., Y. Huo, T.L. Burcin, M.A. Morris, T.S. Olson, and K. Ley, *Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 285-94.
507. von Vietinghoff, S. and K. Ley, *IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice*. *J Immunol*, 2009. **183**(2): p. 865-73.
508. Iking-Konert, C., C. Cseko, C. Wagner, S. Stegmaier, K. Andrassy, and G.M. Hansch, *Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils: acquisition of CD83 and other functional characteristics of dendritic cells*. *J Mol Med (Berl)*, 2001. **79**(8): p. 464-74.
509. Iking-Konert, C., B. Ostendorf, O. Sander, M. Jost, C. Wagner, L. Joosten, M. Schneider, and G.M. Hansch, *Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(10): p. 1436-42.
510. Iking-Konert, C., C. Wagner, B. Deneffle, F. Hug, M. Schneider, K. Andrassy, and G.M. Hansch, *Up-regulation of the dendritic cell marker CD83 on polymorphonuclear neutrophils (PMN): divergent expression in acute bacterial infections and chronic inflammatory disease*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **130**(3): p. 501-8.
511. Arnljots, K., O. Sorensen, K. Lollike, and N. Borregaard, *Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells*. *Leukemia*, 1998. **12**(11): p. 1789-95.
512. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. *Blood*, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
513. Borregaard, N., L. Kjeldsen, K. Rygaard, L. Bastholm, M.H. Nielsen, H. Sengelov, O.W. Bjerrum, and A.H. Johnsen, *Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(1): p. 86-96.

514. Borregaard, N., O.E. Sorensen, and K. Theilgaard-Monch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends Immunol, 2007. **28**(8): p. 340-5.
515. Faurschou, M., O.E. Sorensen, A.H. Johnsen, J. Askaa, and N. Borregaard, *Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1591**(1-3): p. 29-35.
516. Sengelov, H., P. Follin, L. Kjeldsen, K. Lollike, C. Dahlgren, and N. Borregaard, *Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 4157-65.
517. Bainton, D.F. and M.G. Farquhar, *Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes*. J Cell Biol, 1966. **28**(2): p. 277-301.
518. Bainton, D.F., J.L. Ulliot, and M.G. Farquhar, *The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow*. J Exp Med, 1971. **134**(4): p. 907-34.
519. Hartmann, J., S. Scepek, and M. Lindau, *Regulation of granule size in human and horse eosinophils by number of fusion events among unit granules*. J Physiol, 1995. **483** ( Pt 1): p. 201-209.
520. Spicer, S.S. and J.H. Hardin, *Ultrastructure, cytochemistry, and function of neutrophil leukocyte granules. A review*. Lab Invest, 1969. **20**(5): p. 488-97.
521. Kjeldsen, L., D.F. Bainton, H. Sengelov, and N. Borregaard, *Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation*. Blood, 1993. **82**(10): p. 3183-3191.
522. Borregaard, N., M. Sehested, B.S. Nielsen, H. Sengelov, and L. Kjeldsen, *Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation*. Blood, 1995. **85**(3): p. 812-817.
523. Borregaard, N., L.J. Miller, and T.A. Springer, *Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils*. Science, 1987. **237**(4819): p. 1204-6.
524. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(6): p. 989-95.
525. Sorensen, O., K. Arnljots, J.B. Cowland, D.F. Bainton, and N. Borregaard, *The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2796-2803.
526. Le Cabec, V., J.B. Cowland, J. Calafat, and N. Borregaard, *Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6454-6457.

527. Bjerregaard, M.D., J. Jurlander, P. Klausen, N. Borregaard, and J.B. Cowland, *The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow*. *Blood*, 2003. **101**(11): p. 4322-32.
528. Cham, B.P., J.M. Gerrard, and D.F. Bainton, *Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation*. *Am J Pathol*, 1994. **144**(6): p. 1369-1380.
529. Cieutat, A.M., P. Lobel, J.T. August, L. Kjeldsen, H. Sengelov, N. Borregaard, and D.F. Bainton, *Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker*. *Blood*, 1998. **91**(3): p. 1044-58.
530. Dahms, N.M., P. Lobel, and S. Kornfeld, *Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(21): p. 12115-8.
531. Michaelson, D., J. Rayner, M. Couto, and T. Ganz, *Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity?* *J Leukoc Biol*, 1992. **51**(6): p. 634-9.
532. Nauseef, W.M., S. McCormick, and H. Yi, *Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase*. *Blood*, 1992. **80**(10): p. 2622-33.
533. Egesten, A., J. Breton-Gorius, J. Guichard, U. Gullberg, and I. Olsson, *The heterogeneity of azurophil granules in neutrophil promyelocytes: immunogold localization of myeloperoxidase, cathepsin G, elastase, proteinase 3, and bactericidal/permeability increasing protein*. *Blood*, 1994. **83**(10): p. 2985-94.
534. Parmley, R.T., W.G. Rice, J.M. Kinkade, Jr., C. Gilbert, and J.C. Barton, *Peroxidase-containing microgranules in human neutrophils: physical, morphological, cytochemical, and secretory properties*. *Blood*, 1987. **70**(5): p. 1630-8.
535. Rice, W.G., T. Ganz, J.M. Kinkade, Jr., M.E. Selsted, R.I. Lehrer, and R.T. Parmley, *Defensin-rich dense granules of human neutrophils*. *Blood*, 1987. **70**(3): p. 757-65.
536. Sengelov, H., L. Kjeldsen, M.S. Diamond, T.A. Springer, and N. Borregaard, *Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(3): p. 1467-76.
537. Joiner, K.A., T. Ganz, J. Albert, and D. Rotrosen, *The opsonizing ligand on Salmonella typhimurium influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(6): p. 2771-2782.
538. Garwicz, D., A. Lindmark, A.M. Persson, and U. Gullberg, *On the role of the proform-conformation for processing and intracellular sorting of human cathepsin G*. *Blood*, 1998. **92**(4): p. 1415-22.
539. Gullberg, U., A. Lindmark, G. Lindgren, A.M. Persson, E. Nilsson, and I. Olsson, *Carboxyl-terminal prodomain-deleted human leukocyte elastase and cathepsin G are efficiently targeted to granules and enzymatically activated in the rat basophilic/mast cell line RBL*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(21): p. 12912-8.



540. Lindmark, A., D. Garwicz, P.B. Rasmussen, H. Flodgaard, and U. Gullberg, *Characterization of the biosynthesis, processing, and sorting of human HBP/CAP37/azurocidin*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 634-43.
541. Liu, L. and T. Ganz, *The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting*. Blood, 1995. **85**(4): p. 1095-1103.
542. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 383-9.
543. Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton, and R.I. Lehrer, *Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils*. J Clin Invest, 1985. **76**(4): p. 1427-35.
544. Daher, K.A., M.E. Selsted, and R.I. Lehrer, *Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins*. J Virol, 1986. **60**(3): p. 1068-74.
545. Lehrer, R.I., T. Ganz, D. Szklarek, and M.E. Selsted, *Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations*. J Clin Invest, 1988. **81**(6): p. 1829-35.
546. Wimley, W.C., M.E. Selsted, and S.H. White, *Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores*. Protein Sci, 1994. **3**(9): p. 1362-1373.
547. Chertov, O., D.F. Michiel, L. Xu, J.M. Wang, K. Tani, W.J. Murphy, D.L. Longo, D.D. Taub, and J.J. Oppenheim, *Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils*. J Biol Chem, 1996. **271**(6): p. 2935-2940.
548. Territo, M.C., T. Ganz, M.E. Selsted, and R. Lehrer, *Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils*. J Clin Invest, 1989. **84**(6): p. 2017-20.
549. Yang, D., Q. Chen, O. Chertov, and J.J. Oppenheim, *Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(1): p. 9-14.
550. Elsbach, P., *The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(1): p. 14-8.
551. Weiss, J. and I. Olsson, *Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils*. Blood, 1987. **69**(2): p. 652-9.
552. Ooi, C.E., J. Weiss, P. Elsbach, B. Frangione, and B. Mannion, *A 25-kDa NH2-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein*. J Biol Chem, 1987. **262**(31): p. 14891-14894.
553. Iovine, N.M., P. Elsbach, and J. Weiss, *An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10973-10978.
554. Kjeldsen, L., O.W. Bjerrum, J. Askaa, and N. Borregaard, *Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules*. Biochem J, 1992. **287** (Pt 2): p. 603-10.

555. Jesaitis, A.J., E.S. Buescher, D. Harrison, M.T. Quinn, C.A. Parkos, S. Livesey, and J. Linner, *Ultrastructural localization of cytochrome b in the membranes of resting and phagocytosing human granulocytes*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 821-35.
556. Mollinedo, F., M. Nakajima, A. Llorens, E. Barbosa, S. Callejo, C. Gajate, and A. Fabra, *Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils*. Biochem J, 1997. **327** ( Pt 3): p. 917-23.
557. Cramer, E., K.B. Pryzwansky, J.L. Villeval, U. Testa, and J. Breton-Gorius, *Ultrastructural localization of lactoferrin and myeloperoxidase in human neutrophils by immunogold*. Blood, 1985. **65**(2): p. 423-32.
558. Masson, P.L., J.F. Heremans, and E. Schonne, *Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes*. J Exp Med, 1969. **130**(3): p. 643-58.
559. Oram, J.D. and B. Reiter, *Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents*. Biochim Biophys Acta, 1968. **170**(2): p. 351-65.
560. Agerberth, B., H. Gunne, J. Odeberg, P. Kogner, H.G. Boman, and G.H. Gudmundsson, *FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(1): p. 195-199.
561. Turner, J., Y. Cho, N.N. Dinh, A.J. Waring, and R.I. Lehrer, *Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(9): p. 2206-14.
562. Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell, and G.H. Gudmundsson, *The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15258-15263.
563. Kjeldsen, L., A.H. Johnsen, H. Sengelov, and N. Borregaard, *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10425-32.
564. Triebel, S., J. Blaser, H. Reinke, and H. Tschesche, *A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase*. FEBS Lett, 1992. **314**(3): p. 386-388.
565. Kjeldsen, L., D.F. Bainton, H. Sengelov, and N. Borregaard, *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils*. Blood, 1994. **83**(3): p. 799-807.
566. Friedl, A., S.P. Stoesz, P. Buckley, and M.N. Gould, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression*. Histochem J, 1999. **31**(7): p. 433-41.
567. Nielsen, B.S., N. Borregaard, J.R. Bundgaard, S. Timshel, M. Sehested, and L. Kjeldsen, *Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases*. Gut, 1996. **38**(3): p. 414-20.
568. Goetz, D.H., M.A. Holmes, N. Borregaard, M.E. Bluhm, K.N. Raymond, and R.K. Strong, *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1033-1043.

569. Lollike, K., L. Kjeldsen, H. Sengelov, and N. Borregaard, *Purification of lysozyme from human neutrophils, and development of an ELISA for quantification in cells and plasma*. *Leukemia*, 1995. **9**(1): p. 206-9.
570. Selsted, M.E. and R.J. Martinez, *Lysozyme: primary bactericidin in human plasma serum active against *Bacillus subtilis**. *Infect Immun*, 1978. **20**(3): p. 782-91.
571. Tanida, N., N. Ohno, Y. Adachi, M. Matsuura, M. Nakano, M. Kiso, A. Hasegawa, and T. Yadomae, *Modification of immunopharmacological activities of synthetic monosaccharide lipid A analogue, GLA60, by lysozyme*. *J Biochem*, 1992. **112**(5): p. 616-23.
572. Takada, K., N. Ohno, and T. Yadomae, *Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo*. *Infect Immun*, 1994. **62**(4): p. 1171-5.
573. Vidal, S.M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, and P. Gros, *Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 469-85.
574. Canonne-Hergaux, F., J. Calafat, E. Richer, M. Cellier, S. Grinstein, N. Borregaard, and P. Gros, *Expression and subcellular localization of NRAMPI in human neutrophil granules*. *Blood*, 2002. **100**(1): p. 268-75.
575. Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein, and P. Gros, *Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane*. *J Exp Med*, 2000. **192**(9): p. 1237-1248.
576. Lazarus, G.S., R.S. Brown, J.R. Daniels, and H.M. Fullmer, *Human granulocyte collagenase*. *Science*, 1968. **159**(3822): p. 1483-1485.
577. Murphy, G., J.J. Reynolds, U. Bretz, and M. Baggiolini, *Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes*. *Biochem J*, 1977. **162**(1): p. 195-197.
578. Wilhelm, S.M., I.E. Collier, B.L. Marmer, A.Z. Eisen, G.A. Grant, and G.I. Goldberg, *SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(36): p. 17213-17221.
579. Kang, T., J. Yi, A. Guo, X. Wang, C.M. Overall, W. Jiang, R. Elde, N. Borregaard, and D. Pei, *Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(24): p. 21960-8.
580. Pei, D., *Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage*. *Cell Res*, 1999. **9**(4): p. 291-303.
581. Owen, C.A. and E.J. Campbell, *The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis*. *J Leukoc Biol*, 1999. **65**(2): p. 137-50.
582. Cederqvist, K., T. Sorsa, T. Tervahartiala, P. Maisi, K. Reunanen, P. Lassus, and S. Andersson, *Matrix metalloproteinases-2, -8, and -9 and TIMP-2 in tracheal aspirates from preterm infants with respiratory distress*. *Pediatrics*, 2001. **108**(3): p. 686-92.

583. Bainton, D.F., L.J. Miller, T.K. Kishimoto, and T.A. Springer, *Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils*. J Exp Med, 1987. **166**(6): p. 1641-53.
584. Calafat, J., T.W. Kuijpers, H. Janssen, N. Borregaard, A.J. Verhoeven, and D. Roos, *Evidence for small intracellular vesicles in human blood phagocytes containing cytochrome b558 and the adhesion molecule CD11b/CD18*. Blood, 1993. **81**(11): p. 3122-9.
585. Sengelov, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation*. J Immunol, 1993. **150**(4): p. 1535-43.
586. Sengelov, H., L. Kjeldsen, W. Kroeze, M. Berger, and N. Borregaard, *Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils*. J Immunol, 1994. **153**(2): p. 804-10.
587. Sengelov, H., F. Boulay, L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils*. Biochem J, 1994. **299** ( Pt 2): p. 473-9.
588. Detmers, P.A., D. Zhou, D. Powell, H. Lichenstein, M. Kelley, and R. Pironkova, *Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 2085-2095.
589. Borregaard, N., L. Kjeldsen, H. Sengelov, M.S. Diamond, T.A. Springer, H.C. Anderson, T.K. Kishimoto, and D.F. Bainton, *Changes in subcellular localization and surface expression of L-selectin, alkaline phosphatase, and Mac-1 in human neutrophils during stimulation with inflammatory mediators*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(1): p. 80-7.
590. Berton, G., L. Fumagalli, C. Laudanna, and C. Sorio, *Beta 2 integrin-dependent protein tyrosine phosphorylation and activation of the FGR protein tyrosine kinase in human neutrophils*. J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 1111-21.
591. Fuortes, M., W.W. Jin, and C. Nathan, *Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor*. J Cell Biol, 1993. **120**(3): p. 777-84.
592. Fallman, M., M. Gullberg, C. Hellberg, and T. Andersson, *Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2656-2663.
593. Hellberg, C., L. Molony, L. Zheng, and T. Andersson, *Ca<sup>2+</sup> signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>*. Biochem J, 1996. **317** ( Pt 2): p. 403-9.
594. Agwu, D.E., L.C. McPhail, M.C. Chabot, L.W. Daniel, R.L. Wykle, and C.E. McCall, *Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils*. J Biol Chem, 1989. **264**(3): p. 1405-13.
595. Berton, G. and C.A. Lowell, *Integrin signalling in neutrophils and macrophages*. Cell Signal, 1999. **11**(9): p. 621-35.
596. Suchard, S.J., T. Nakamura, A. Abe, J.A. Shayman, and L.A. Boxer, *Phospholipase D-mediated diradylglycerol formation coincides with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

- and lactoferrin release in adherent human neutrophils.* J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8063-8.
597. Bradford, P.G. and R.P. Rubin, *Quantitative changes in inositol 1,4,5-trisphosphate in chemoattractant-stimulated neutrophils.* J Biol Chem, 1986. **261**(33): p. 15644-7.
598. Blackwood, R.A. and J.D. Ernst, *Characterization of Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins.* Biochem J, 1990. **266**(1): p. 195-200.
599. Ernst, J.D., E. Hoye, R.A. Blackwood, and D. Jaye, *Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent aggregation of isolated specific granules.* J Clin Invest, 1990. **85**(4): p. 1065-1071.
600. Francis, J.W., K.J. Balazovich, J.E. Smolen, D.I. Margolis, and L.A. Boxer, *Human neutrophil annexin I promotes granule aggregation and modulates Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent membrane fusion.* J Clin Invest, 1992. **90**(2): p. 537-44.
601. Sjolín, C., C. Movitz, H. Lundqvist, and C. Dahlgren, *Translocation of annexin XI to neutrophil subcellular organelles.* Biochim Biophys Acta, 1997. **1326**(1): p. 149-56.
602. Rothman, J.E., *The protein machinery of vesicle budding and fusion.* Protein Sci, 1996. **5**(2): p. 185-94.
603. Brumell, J.H., A. Volchuk, H. Sengelov, N. Borregaard, A.M. Cieutat, D.F. Bainton, S. Grinstein, and A. Klip, *Subcellular distribution of docking/fusion proteins in neutrophils, secretory cells with multiple exocytic compartments.* J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5750-9.
604. Sorensen, O.E., P. Follin, A.H. Johnsen, J. Calafat, G.S. Tjabringa, P.S. Hiemstra, and N. Borregaard, *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3.* Blood, 2001. **97**(12): p. 3951-3959.
605. Geng, J.G., M.P. Bevilacqua, K.L. Moore, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, J.M. Kim, G.A. Bliss, G.A. Zimmerman, and R.P. McEver, *Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140.* Nature, 1990. **343**(6260): p. 757-60.
606. Norman, K.E., K.L. Moore, R.P. McEver, and K. Ley, *Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1.* Blood, 1995. **86**(12): p. 4417-4421.
607. Bevilacqua, M.P., S. Stengelin, M.A. Gimbrone, Jr., and B. Seed, *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.* Science, 1989. **243**(4895): p. 1160-5.
608. Huber, A.R., S.L. Kunkel, R.F. Todd, 3rd, and S.J. Weiss, *Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8.* Science, 1991. **254**(5028): p. 99-102.
609. Tu, L., M.D. Delahunty, H. Ding, F.W. Luscinskas, and T.F. Tedder, *The cutaneous lymphocyte antigen is an essential component of the L-selectin ligand induced on human vascular endothelial cells.* J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 241-252.

610. Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, M. Mehra, and S.M. Prescott, *Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion*. J Cell Biol, 1990. **110**(2): p. 529-40.
611. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
612. Delclaux, C., C. Delacourt, M.P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf, *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **14**(3): p. 288-95.
613. Singer, II, S. Scott, D.W. Kawka, and D.M. Kazazis, *Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes*. J Cell Biol, 1989. **109**(6 Pt 1): p. 3169-82.
614. Chapple, D.S., D.J. Mason, C.L. Joannou, E.W. Odell, V. Gant, and R.W. Evans, *Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against Escherichia coli serotype O111*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2434-40.
615. De, Y., Q. Chen, A.P. Schmidt, G.M. Anderson, J.M. Wang, J. Wooters, J.J. Oppenheim, and O. Chertov, *LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1069-74.
616. Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli, *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.
617. Feistritzer, C., B.A. Mosheimer, D.H. Sturn, K. Bijuklic, J.R. Patsch, and C.J. Wiedermann, *Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(5): p. 1077-84.
618. Sturn, D.H., C. Feistritzer, B.A. Mosheimer, A. Djanani, K. Bijuklic, J.R. Patsch, and C.J. Wiedermann, *Angiopoietin affects neutrophil migration*. Microcirculation, 2005. **12**(5): p. 393-403.
619. Nishishita, T. and P.C. Lin, *Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF-beta gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction*. J Cell Biochem, 2004. **91**(3): p. 584-93.
620. Sundberg, C., M. Kowanetz, L.F. Brown, M. Detmar, and H.F. Dvorak, *Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo*. Lab Invest, 2002. **82**(4): p. 387-401.
621. Ancelin, M., S. Chollet-Martin, M.A. Herve, C. Legrand, J. El Benna, and M. Perrot-Appinat, *Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism*. Lab Invest, 2004. **84**(4): p. 502-12.
622. Bazzoni, F., M.A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald, and M. Baggiolini, *Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8*. J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 771-4.

623. Gaudry, M., O. Bregerie, V. Andrieu, J. El Benna, M.A. Pocardalo, and J. Hakim, *Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils*. *Blood*, 1997. **90**(10): p. 4153-61.
624. Strieter, R.M., K. Kasahara, R. Allen, H.J. Showell, T.J. Standiford, and S.L. Kunkel, *Human neutrophils exhibit disparate chemotactic factor gene expression*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **173**(2): p. 725-30.
625. Webb, N.J., C.R. Myers, C.J. Watson, M.J. Bottomley, and P.E. Brenchley, *Activated human neutrophils express vascular endothelial growth factor (VEGF)*. *Cytokine*, 1998. **10**(4): p. 254-7.
626. Taichman, N.S., S. Young, A.T. Cruchley, P. Taylor, and E. Paleolog, *Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor*. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(3): p. 397-400.
627. Thurston, G., *Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage*. *J Anat*, 2002. **200**(6): p. 575-80.
628. Scapini, P., F. Calzetti, and M.A. Cassatella, *On the detection of neutrophil-derived vascular endothelial growth factor (VEGF)*. *J Immunol Methods*, 1999. **232**(1-2): p. 121-9.
629. Fujishima, S., A.R. Hoffman, T. Vu, K.J. Kim, H. Zheng, D. Daniel, Y. Kim, E.F. Wallace, J.W. Larrick, and T.A. Raffin, *Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta*. *J Cell Physiol*, 1993. **154**(3): p. 478-85.
630. Lund, T. and B. Osterud, *The effect of TNF-alpha, PMA, and LPS on plasma and cell-associated IL-8 in human leukocytes*. *Thromb Res*, 2004. **113**(1): p. 75-83.
631. Sallenave, J.M., M. Si Tahar, G. Cox, M. Chignard, and J. Gauldie, *Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(6): p. 695-702.
632. Remold-O'Donnell, E., J.C. Nixon, and R.M. Rose, *Elastase inhibitor. Characterization of the human elastase inhibitor molecule associated with monocytes, macrophages, and neutrophils*. *J Exp Med*, 1989. **169**(3): p. 1071-86.
633. Thomas, R.M., W.M. Nauseef, S.S. Iyer, M.W. Peterson, P.J. Stone, and R.A. Clark, *A cytosolic inhibitor of human neutrophil elastase and cathepsin G*. *J Leukoc Biol*, 1991. **50**(6): p. 568-79.
634. Sallenave, J.M. and A. Silva, *Characterization and gene sequence of the precursor of elafin, an elastase-specific inhibitor in bronchial secretions*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993. **8**(4): p. 439-45.
635. Sharkey, N.A., K.L. Leach, and P.M. Blumberg, *Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(2): p. 607-10.
636. Sha'afi, R.I., J.R. White, T.F. Molski, J. Shefcyk, M. Volpi, P.H. Naccache, and M.B. Feinstein, *Phorbol 12-myristate 13-acetate activates rabbit neutrophils without an apparent rise in the level of intracellular free calcium*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1983. **114**(2): p. 638-45.

637. Toothill, V.J., J.A. Van Mourik, H.K. Niewenhuis, M.J. Metzelaar, and J.D. Pearson, *Characterization of the enhanced adhesion of neutrophil leukocytes to thrombin-stimulated endothelial cells*. J Immunol, 1990. **145**(1): p. 283-91.
638. MacGlashan, D., Jr., *Histamine: A mediator of inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(4 Suppl): p. S53-9.
639. Richter, J., T. Andersson, and I. Olsson, *Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation*. J Immunol, 1989. **142**(9): p. 3199-205.
640. Currie, M.S., K.M. Rao, J. Padmanabhan, A. Jones, J. Crawford, and H.J. Cohen, *Stimulus-specific effects of pentoxifylline on neutrophil CR3 expression, degranulation, and superoxide production*. J Leukoc Biol, 1990. **47**(3): p. 244-50.
641. Xu, Y. and Q. Yu, *Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 34990-8.
642. Cassatella, M.A., F. Bazzoni, M. Ceska, I. Ferro, M. Baggiolini, and G. Berton, *IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway*. J Immunol, 1992. **148**(10): p. 3216-20.
643. Showell, H.J., R.J. Freer, S.H. Zigmond, E. Schiffmann, S. Aswanikumar, B. Corcoran, and E.L. Becker, *The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils*. J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1154-69.
644. Kuhns, D.B. and J.I. Gallin, *Increased cell-associated IL-8 in human exudative and A23187-treated peripheral blood neutrophils*. J Immunol, 1995. **154**(12): p. 6556-62.
645. Kuhns, D.B., H.A. Young, E.K. Gallin, and J.I. Gallin, *Ca<sup>2+</sup>-dependent production and release of IL-8 in human neutrophils*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 4332-9.
646. McColl, S.R., R. Paquin, C. Menard, and A.D. Beaulieu, *Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1992. **176**(2): p. 593-8.
647. Pellme, S., M. Morgelin, H. Tapper, U.H. Mellqvist, C. Dahlgren, and A. Karlsson, *Localization of human neutrophil interleukin-8 (CXCL-8) to organelle(s) distinct from the classical granules and secretory vesicles*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(3): p. 564-73.
648. Strieter, R.M., K. Kasahara, R.M. Allen, T.J. Standiford, M.W. Rolfe, F.S. Becker, S.W. Chensue, and S.L. Kunkel, *Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8*. Am J Pathol, 1992. **141**(2): p. 397-407.
649. Vanden Berghe, W., K. De Bosscher, E. Boone, S. Plaisance, and G. Haegeman, *The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32091-8.



650. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways*. J Mol Med, 1996. **74**(10): p. 589-607.
651. Cloutier, A., T. Ear, E. Blais-Charron, C.M. Dubois, and P.P. McDonald, *Differential involvement of NF-kappaB and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(2): p. 567-77.
652. McDonald, P.P., A. Bald, and M.A. Cassatella, *Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3421-33.
653. McDonald, P.P. and M.A. Cassatella, *Activation of transcription factor NF-kappa B by phagocytic stimuli in human neutrophils*. FEBS Lett, 1997. **412**(3): p. 583-6.
654. McDonald, P.P., C. Bovolenta, and M.A. Cassatella, *Activation of distinct transcription factors in neutrophils by bacterial LPS, interferon-gamma, and GM-CSF and the necessity to overcome the action of endogenous proteases*. Biochemistry, 1998. **37**(38): p. 13165-73.
655. McDonald, P.P., M.P. Russo, S. Ferrini, and M.A. Cassatella, *Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4828-35.
656. Cloutier, A., C. Guindi, P. Larivee, C.M. Dubois, A. Amrani, and P.P. McDonald, *Inflammatory cytokine production by human neutrophils involves C/EBP transcription factors*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 563-71.
657. Cloutier, A., T. Ear, O. Borissevitch, P. Larivee, and P.P. McDonald, *Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 signaling cascade in human neutrophils*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3751-61.
658. Tamassia, N., V. Le Moigne, F. Calzetti, M. Donini, S. Gasperini, T. Ear, A. Cloutier, F.O. Martinez, M. Fabbri, M. Locati, A. Mantovani, P.P. McDonald, and M.A. Cassatella, *The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7344-56.
659. Ear, T. and P.P. McDonald, *Cytokine generation, promoter activation, and oxidant-independent NF-kappaB activation in a transfectable human neutrophilic cellular model*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 14.
660. Nourbakhsh, M. and H. Hauser, *Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB*. EMBO J, 1999. **18**(22): p. 6415-25.
661. Nourbakhsh, M., K. Hoffmann, and H. Hauser, *Interferon-beta promoters contain a DNA element that acts as a position-independent silencer on the NF-kappa B site*. EMBO J, 1993. **12**(2): p. 451-9.
662. Trabandt, A., W.K. Aicher, R.E. Gay, V.P. Sukhatme, H.G. Fassbender, and S. Gay, *Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts*. Rheumatol Int, 1992. **12**(2): p. 53-9.

663. Lau, L.F. and D. Nathans, *Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1182-6.
664. Mohn, K.L., T.M. Laz, J.C. Hsu, A.E. Melby, R. Bravo, and R. Taub, *The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(1): p. 381-90.
665. Beadling, C., K.W. Johnson, and K.A. Smith, *Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(7): p. 2719-23.
666. Mauviel, A., S. Reitamo, A. Remitz, J.C. Lapiere, M. Ceska, M. Baggiolini, A. Walz, C.H. Evans, and J. Uitto, *Leukoregulin, a T cell-derived cytokine, induces IL-8 gene expression and secretion in human skin fibroblasts. Demonstration and secretion in human skin fibroblasts. Demonstration of enhanced NF-kappa B binding and NF-kappa B-driven promoter activity*. J Immunol, 1992. **149**(9): p. 2969-76.
667. Rathanaswami, P., M. Hachicha, M. Sadick, T.J. Schall, and S.R. McColl, *Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines*. J Biol Chem, 1993. **268**(8): p. 5834-9.
668. Blease, K., Y. Chen, P.G. Hellewell, and A. Burke-Gaffney, *Lipoteichoic acid inhibits lipopolysaccharide-induced adhesion molecule expression and IL-8 release in human lung microvascular endothelial cells*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6139-47.
669. Roger, T., T. Out, N. Mukaida, K. Matsushima, H. Jansen, and R. Lutter, *Enhanced AP-1 and NF-kappaB activities and stability of interleukin 8 (IL-8) transcripts are implicated in IL-8 mRNA superinduction in lung epithelial H292 cells*. Biochem J, 1998. **330** ( Pt 1): p. 429-35.
670. Sehgal, P.B., D.S. Lyles, and I. Tamm, *Superinduction of human fibroblast interferon production: further evidence for increased stability of interferon mRNA*. Virology, 1978. **89**(1): p. 186-98.
671. Sehgal, P.B. and I. Tamm, *Two mechanisms contribute to the superinduction of poly(I).poly(C)-induced human fibroblast interferon production*. Virology, 1979. **92**(1): p. 240-4.
672. Adcock, I.M., C.R. Brown, H. Shirasaki, and P.J. Barnes, *Effects of dexamethasone on cytokine and phorbol ester stimulated c-Fos and c-Jun DNA binding and gene expression in human lung*. Eur Respir J, 1994. **7**(12): p. 2117-23.
673. Edwards, D.R. and L.C. Mahadevan, *Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2415-24.
674. Arenzana-Seisdedos, F., J. Thompson, M.S. Rodriguez, F. Bachelierie, D. Thomas, and R.T. Hay, *Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2689-96.

675. Hashimoto, S., K. Matsumoto, Y. Gon, S. Maruoka, I. Takeshita, S. Hayashi, T. Koura, K. Kujime, and T. Horie, *p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells*. Eur Respir J, 1999. **13**(6): p. 1357-64.
676. Islam, Z., J.S. Gray, and J.J. Pestka, *p38 Mitogen-activated protein kinase mediates IL-8 induction by the ribotoxin deoxynivalenol in human monocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **213**(3): p. 235-44.
677. Neff, L., M. Zeisel, V. Druet, K. Takeda, J.P. Klein, J. Sibilias, and D. Wachsmann, *ERK 1/2- and JNKs-dependent synthesis of interleukins 6 and 8 by fibroblast-like synoviocytes stimulated with protein I/II, a modulin from oral streptococci, requires focal adhesion kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 27721-8.
678. Shinkai, M., G.H. Foster, and B.K. Rubin, *Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(1): p. L75-85.
679. Tanaka, Y., F. Sekiguchi, H. Hong, and A. Kawabata, *PAR2 triggers IL-8 release via MEK/ERK and PI3-kinase/Akt pathways in GI epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **377**(2): p. 622-6.
680. Tong, K.M., D.C. Shieh, C.P. Chen, C.Y. Tzeng, S.P. Wang, K.C. Huang, Y.C. Chiu, Y.C. Fong, and C.H. Tang, *Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts*. Cell Signal, 2008. **20**(8): p. 1478-88.
681. Arbabi, S., M.R. Rosengart, I. Garcia, S. Jelacic, and R.V. Maier, *Priming interleukin 8 production: role of platelet-activating factor and p38*. Arch Surg, 1999. **134**(12): p. 1348-53.
682. Hippenstiel, S., S. Soeth, B. Kellas, O. Fuhrmann, J. Seybold, M. Krull, C. Eichel-Streiber, M. Goebeler, S. Ludwig, and N. Suttorp, *Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3044-51.
683. Bellei, B., V. Maresca, E. Flori, A. Pitisci, L. Larue, and M. Picardo, *p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7288-99.
684. Kim, S.H., J. Kim, and R.P. Sharma, *Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression*. Pharmacol Res, 2004. **49**(5): p. 433-9.
685. Shimo, T., S. Matsumura, S. Ibaragi, S. Isowa, K. Kishimoto, H. Mese, A. Nishiyama, and A. Sasaki, *Specific inhibitor of MEK-mediated cross-talk between ERK and p38 MAPK during differentiation of human osteosarcoma cells*. J Cell Commun Signal, 2007. **1**(2): p. 103-11.
686. Ross, R., *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 1999. **138**(5 Pt 2): p. S419-20.
687. Silvestre, J.S., Z. Mallat, A. Tedgui, and B.I. Levy, *Post-ischaemic neovascularization and inflammation*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 242-9.
688. Grunstein, J., J.J. Masbad, R. Hickey, F. Giordano, and R.S. Johnson, *Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To*

- recruit and expand tumor vasculature*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7282-91.
689. Neagoe, P.E., E. Dumas, F. Hajjar, and M.G. Sirois, *Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils*. J Cell Physiol, 2011.
690. Brown, J.L., Z.A. Cao, M. Pinzon-Ortiz, J. Kendrew, C. Reimer, S. Wen, J.Q. Zhou, M. Tabrizi, S. Emery, B. McDermott, L. Pablo, P. McCoon, V. Bedian, and D.C. Blakey, *A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(1): p. 145-56.
691. Anargyrou, K., E. Terpos, T.P. Vassilakopoulos, A. Pouli, S. Sachanas, T. Tzenou, S. Masouridis, D. Christoulas, M.K. Angelopoulou, E.M. Dimitriadou, C. Kalpadakis, K. Tsionos, P. Panayiotidis, M.A. Dimopoulos, G.A. Pangalis, and M.C. Kyrtsonis, *Normalization of the serum angiopoietin-1 to angiopoietin-2 ratio reflects response in refractory/resistant multiple myeloma patients treated with bortezomib*. Haematologica, 2008. **93**(3): p. 451-4.
692. Farokhzad, O.C. and R. Langer, *Impact of nanotechnology on drug delivery*. ACS Nano, 2009. **3**(1): p. 16-20.
693. Jain, K.K., *Nanotechnology-based drug delivery for cancer*. Technol Cancer Res Treat, 2005. **4**(4): p. 407-16.
694. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. Nanomedicine, 2005. **1**(3): p. 193-212.
695. Park, K., *Nanotechnology: What it can do for drug delivery*. J Control Release, 2007. **120**(1-2): p. 1-3.
696. Sinha, R., G.J. Kim, S. Nie, and D.M. Shin, *Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(8): p. 1909-17.