

Université de Montréal

Activités proinflammatoires du VEGF et des angiopoïétines

par  
Alexandre Brkovic  
Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
En Pharmacologie

Février, 2007  
© Alexandre Brkovic 2006





## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Activités proinflammatoires du VEGF et des angiopoïétines

Présentée par :  
Alexandre Brkovic

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Philippe Gratton  
président-rapporteur

Martin G. Sirois  
directeur de recherche

Christian Beauséjour  
membre du jury

Jacques Huot  
examineur externe

Thèse acceptée le : .....

## RÉSUMÉ

Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF-A) et les angiopoïétines, via leur récepteur tyrosine kinase, agissent de concert afin de promouvoir l'angiogenèse. Ces facteurs de croissance endothéliaux supportent des activités angiogéniques telles que la survie, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, mais également des activités proinflammatoires. En effet, il est bien établi que la réponse inflammatoire et la réponse angiogénique sont des phénomènes mutuellement dépendants.

Dans une étude antérieure, nous avons rapporté que l'hyperperméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub> est médiée par la synthèse endothéliale d'un puissant médiateur inflammatoire, le facteur d'agrégation plaquettaire (PAF). Depuis, nous avons aussi déterminé les voies intracellulaires nécessaires à cette synthèse. Entre temps, il a été rapporté que le monoxyde d'azote (NO) contribue aux propriétés proinflammatoires du VEGF-A<sub>165</sub>. Par conséquent, dans cette première étude, nous avons voulu déterminer la contribution du PAF et du NO dans la perméabilité vasculaire induite par les membres de la famille du VEGF. Nous avons établi que l'hyperperméabilité vasculaire des membres de la famille du VEGF est médiée par l'activation du récepteur VEGFR-2 et potentiée par le co-récepteur NRP-1. De plus, l'inhibition de la voie du PAF ou de celle du monoxyde d'azote a bloqué la perméabilité vasculaire induite par les membres de la famille du VEGF. En revanche, seul le PAF, par opposition au NO, a été capable d'induire *per se* la perméabilité vasculaire suggérant que le PAF est un médiateur essentiel, tandis que le NO est un cofacteur intracellulaire dans l'hyperperméabilité médiée par le VEGF-A<sub>165</sub>.

De façon similaire au VEGF-A<sub>165</sub>, les angiopoïétines (Ang1 et Ang2), via l'activation du récepteur endothéliale Tie2, induisent des activités proinflammatoires telles que la synthèse de PAF et la translocation de la P-sélectine à la surface endothéliale, qui supporte l'adhérence des neutrophiles. Récemment, nous avons détecté la présence de Tie2 à la surface des neutrophiles et son activation par Ang1 et Ang2 induit des activités proinflammatoires incluant l'adhésion des neutrophiles, la synthèse de PAF et l'activation de la  $\beta$ 2-intégrine. Ensemble, ces observations suggèrent que les angiopoïétines peuvent moduler le trafic des neutrophiles. À l'appui, il a été rapporté que Ang1 et Ang2 ont un effet chimiotactique sur les neutrophiles. Toutefois, les voies intracellulaires impliquées dans cet effet chimiotactique des angiopoïétines sur les neutrophiles n'ont pas été délimitées. Nos données montrent que Ang1 et Ang2 induisent la migration des neutrophiles par l'entremise de l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). À l'appui, nous avons observé que la stimulation des neutrophiles avec Ang1 et Ang2 induit la phosphorylation d'Akt. Puisque les angiopoïétines sont capables de moduler les activités des cytokines proinflammatoires dans les cellules endothéliales, nous avons émis l'hypothèse qu'elles pouvaient aussi affecter la réponse des neutrophiles aux cytokines. Nos données montrent que Ang1 et Ang2 potentialisent la migration induite par une autre cytokine proinflammatoire CXCL-8/IL-8 et ce, via la voie de la PI3K. Nos observations supportent notre hypothèse que Ang1 et Ang2 jouent un rôle dans le trafic des neutrophiles.

Mots clés : VEGF, perméabilité vasculaire, inflammation, PAF, monoxyde d'azote, angiopoïétines, Tie2, PI3K, migration, neutrophile

## ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins are endothelial growth factors, which orchestrate together blood vessel formation during angiogenesis. Upon activation of their endothelial tyrosine kinase receptor, VEGF as well as angiopoietins can induce endothelial cell migration, proliferation and survival, but also proinflammatory events. Indeed, there are considerable evidence supporting that angiogenesis and inflammation are mutually-dependent.

In a previous study, we have shown that VEGF-A<sub>165</sub> hyperpermeability is mediated through endothelial synthesis of a potent inflammatory mediator, namely platelet activating factor (PAF), since then, we have defined the cellular pathways involved. Meanwhile, others have reported that nitric oxide (NO) is implicated in VEGF-A<sub>165</sub> proinflammatory activities. Thus, in the first study, we wanted to delineate the contribution of PAF and NO in the hyperpermeability induced by VEGF family members. Our data showed that VEGF analogs hyperpermeability is mediated through VEGFR-2 activation and that maximal hyperpermeability observed under VEGF-A<sub>165</sub> treatment involves NRP-1/VEGFR-2 complex formation. The blockade of PAF and NO/cGMP pathway abolished VEGF-A<sub>165</sub>-mediated permeability, however, PAF but not NO directly increased vascular permeability *per se*, thereby, suggesting that PAF is a direct inflammatory mediator, whereas NO serves as a cofactor in VEGF family members proinflammatory activities.

Like VEGF-A<sub>165</sub>, angiopoietins (Ang1 and Ang2), upon endothelial Tie2 activation, can induce proinflammatory events, including PAF synthesis and a P-

selectin-dependent neutrophil adhesion to activated endothelial cells. Recently, we detected Tie2 expression on the cell surface of neutrophils and we reported that their stimulation with Ang1 or Ang2 induces PAF synthesis and a  $\beta_2$ -integrin-dependent neutrophil adhesion to extracellular matrix. Taken together, these observations suggest that angiopoietins/Tie2 system can modulate leukocytes trafficking. In agreement, recent studies showed that angiopoietins can induce neutrophils and eosinophils chemotaxis, an important component of the acute inflammatory response. However, little is known about the cellular pathways involved in angiopoietins-mediated neutrophil migration. In addition, since angiopoietins can modulate the effect of proinflammatory cytokines in endothelial cells, we were led to investigate if angiopoietins could modulate cytokines activities in neutrophils. Our data showed that Ang1 and Ang2 mediated neutrophil migration is dependent on PI3K pathway activation and that Ang1 and Ang2 induce Akt phosphorylation in neutrophils. We also investigated the capacity of Ang1 and Ang2 to affect CXCL-8/IL-8-mediated neutrophil migration. Our data showed that pretreatment of neutrophils with angiopoietins potentiated CXCL-8/IL-8-mediated neutrophil migration. In support, both angiopoietins showed a synergistic effect on the induction of Akt phosphorylation mediated by CXCL-8/IL-8. Taken together, our data demonstrate that angiopoietins can induce neutrophil migration through a PI3K dependent pathway, which support our hypothesis that angiopoietins are implicated in leukocytes trafficking.

Key words : VEGF, vascular permeability, inflammation, PAF, nitric oxide, angiopoietins, Tie2, PI3K, migration, neutrophil



## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VII
LISTE DES FIGURES .....	XI
LISTE DES TABLES .....	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XIV
REMERCIEMENTS.....	XVIII
<b>1.0 INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 L'endothélium.....	1
1.2 Survol de l'angiogenèse .....	1
1.2.1 L'angiogenèse physiologique chez l'adulte .....	3
1.2.2 L'angiogenèse pathologique .....	3
1.3 Régulation moléculaire de l'angiogenèse.....	4
1.3.1 Les membres de la famille du VEGF.....	4
1.3.1.1 Régulation de l'expression du gène du VEGF-A .....	8
1.3.1.2 Activités biologiques des membres de la famille du VEGF .....	8
1.3.2 Récepteurs du VEGF .....	12
1.3.2.1 Le VEGFR-1.....	13
1.3.2.2 Le VEGFR-2.....	15
1.3.3 Rôle du VEGF-A/VEGFR dans l'angiogenèse tumorale et avenues thérapeutiques .....	22
1.4 Les angiopoïétines .....	23
1.4.1 Structure, localisation et régulation des angiopoïétines.....	24

1.4.2	Structure, localisation et régulation des récepteurs Tie .....	27
1.4.3	Rôle des angiopoïétines/Tie dans l'embryogenèse.....	29
1.4.4	Fonctions biologiques des angiopoïétines.....	31
1.4.5	Signalisation induite par les récepteurs Tie .....	35
1.4.6	Rôle des angiopoïétines dans l'angiogenèse tumorale et avenues thérapeutiques .....	37
1.5	L'inflammation et l'angiogenèse .....	40
1.5.1	La réponse inflammatoire .....	41
1.5.2.1	L'hyperperméabilité microvasculaire .....	42
1.5.2.2	Les jonctions interendothéliales .....	43
1.5.2.3	Contraction endothéliale .....	46
1.5.2.3	Rôle du monoxyde d'azote.....	48
1.5.2.4	Le PAF, médiateur inflammatoire .....	49
1.5.2.5	La cascade de l'infiltration leucocytaire .....	50
1.5.2.6	La migration leucocytaire.....	54
1.5.2.7	Les facteurs chimioattractants .....	54
1.5.2.8	Les voies de signalisation impliquées dans la migration .....	56
1.6	Contexte de la recherche .....	58
1.6.1	But du premier projet de recherche .....	58
1.6.2	But du second projet de recherche.....	59
<b>2.0</b>	<b>ARTICLE #1 .....</b>	<b>60</b>
2.1	ABSTRACT .....	64
2.2	INTRODUCTION .....	65
2.3	MATERIAL AND METHODS .....	68
2.4	RESULTS.....	71

2.5 DISCUSSION.....	75
2.6 REFERENCES .....	80
2.7 FIGURE LEGENDS .....	85
<b>3.0 ARTICLE #2 .....</b>	<b>93</b>
ABSTRACT .....	97
INTRODUCTION .....	98
MATERIAL AND METHODS .....	100
RESULTS.....	103
DISCUSSION.....	109
ACKNOWLEDGMENTS.....	114
REFERENCES .....	115
FIGURE LEGENDS.....	122
3.9 FIGURES .....	125
<b>4.0 DISCUSSION.....</b>	<b>133</b>
4.1 Hyperperméabilité vasculaire induite par la famille du VEGF.....	133
4.2 Validation du modèle expérimental.....	133
4.3 Le VEGFR-2 est responsable de l'hyperperméabilité induite par les membres de la famille du VEGF.....	134
4.4 La NRP-1 potentialise l'hyperperméabilité vasculaire induite par le VEGF-A <sub>165</sub> .....	135
4.5 Le PAF est un médiateur de l'hyperperméabilité induite par la famille du VEGF.....	136
4.6 Le NO est un cofacteur de l'hyperperméabilité médiée par la famille du VEGF.....	138

4.7 L'inhibition de l'AMPC/PKA est une cible de la voie eNOS/NO induite par le VEGF-A <sub>165</sub> .....	142
4.8 Contribution du PAF et du NO dans la phosphorylation de la VE-cadhérine engendrée par le VEGF-A <sub>165</sub> .....	144
4.9 Perspectives.....	145
4.10 Conclusions de la première étude.....	147
4.11 Activités proinflammatoires des angiopoïétines .....	148
4.12 Tie2 est exprimé à la surface des neutrophiles.....	148
4.13 Les angiopoïétines induisent des effets proinflammatoires sur les neutrophiles.....	150
4.14 La PI3K est un acteur clé de la migration des neutrophiles induite par Ang1 et Ang2.....	151
4.15 Les angiopoïétines potentient la migration des neutrophiles induite par CXCL8/IL-8.....	153
4.16 Les angiopoïétines : médiateurs proinflammatoires? .....	156
4.17 Perspectives.....	157
4.18 Conclusions de la seconde étude .....	159
<b>5.0 BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>160</b>
ANNEXE I.....	204
ANNEXE II.....	215

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Représentation schématisée des isoformes du VEGF-A humain
- Figure 2: Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs
- Figure 3: Représentation schématisée des voies de signalisation induites par le VEGFR-2 activé
- Figure 4: La famille des angiopoïétines (A) et ses récepteurs Tie (B)
- Figure 5: Représentation schématisée des voies de signalisation induites par l'activation de Tie2
- Figure 6 : Organisation structurale des jonctions adhérentes ainsi que des autres protéines de la jonction interendothéliale
- Figure 7 : Représentation schématisée de la synthèse endothéliale de PAF induite par le VEGF-A<sub>165</sub>
- Figure 8 : Représentation de l'infiltration des leucocytaires

### Article #1

- Figure 1 : Vascular permeability mediated by VEGF analogs
- Figure 2 : Dose-dependent effect of PAF on vascular permeability
- Figure 3 : Implication of NO and PAF on VEGF-induced protein extravasation
- Figure 4 : Implication of NO signaling pathway on VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein extravasation
- Figure 5 : Phosphorylation of VE-cadherin by VEGF-A<sub>165</sub>

**Article #2**

Figure 1 : Detection of Tie2 expression on neutrophil cell surface by FACScan analysis

Figure 2 : Ang1 and Ang2 mediate neutrophil migration through Tie2 activation

Figure 3 : Angiopoietins-mediated neutrophil migration requires PI3K signal transduction

Figure 4 : CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration requires PI3K/Akt signal transduction

Figure 5 : Angiopoietins enhance CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration

Figure 6 : Angiopoietins potentiate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration through PI3K/Akt activation pathway

**LISTE DES TABLES****Article #1**

Table I : Effect of vasoconstriction on VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein extravasation.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABIN-2	<i>A20 binding inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B activation-2</i>
AINS	anti-inflammatoire non-stéroïdien
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
Ang1	angiopoïétine 1
Ang2	angiopoïétine 2
ANP	peptide auriculaire natriurétique
BAEC	cellules endothéliales issues d'aortes de bœuf
CAM	membrane chorioalantoïdienne de poulet
CE	cellule endothéliale
COX-2	cyclooxygénase-2
cPLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub> cytosolique
CXCL-8/IL-8	interleukine-8
DAG	diacylglycerol
Dok-R	<i>downstream-of-kinase-related</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
eNOS	NOS endothéliale
EPC	cellules endothéliales progénitrices
ERK1/2	<i>extracellular signal regulated kinase-1/2</i>
ESGL-1	<i>E-selectin glycoprotein ligand-1</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FKHR	facteur de transcription proapoptotique <i>forkhead</i>
FN	fibrinogène
GCs	guanylate cyclase soluble



GMPc	guanosine monophosphate cyclique
Grb2	<i>growth-factor-receptor-bound-2</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia-inducible factor 1 <math>\alpha</math></i>
HSP27	<i>heat shock protein 27</i>
HUVEC	cellules endothéliales issues de veines ombilicales humaines
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
Ig	immunoglobulines
IL-1 $\beta$	interleukine-1 $\beta$
iNOS	NOS inductible
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
LAD	<i>Leukocyte adhesion deficiency</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MIP-1 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein-1<math>\alpha</math></i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MSK1	<i>mitogen-and stress-activated protein kinase-1</i>
NO	monoxyde d'azote
NRP-1	neuropiline-1
NRP-2	neuropiline-2
ODQ	1 H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3- $\alpha$ ) quinoxalin-1-one
PAEC	cellules endothéliales issues d'aortes porcines
PAF	facteur d'agrégation plaquettaire
PAK	<i>p21-activated kinase</i>

PIX $\alpha$	<i>PAK-interacting exchange factor</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine kinase B
PKG	protéine kinase G
PLC $\gamma$	phospholipase C $\gamma$
PlGF-1	<i>Placental Growth factor</i>
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PtIns	phosphatidylinositol
RTK	récepteurs à activité tyrosines kinases
SAPK2	<i>stress-activated protein kinase-2</i>
Sema	sémaphorines
SH2	<i>Src homology 2</i>
SNP	sodium nitroprusside
STAT-3	<i>signal transducers and activators of transcription factor-3</i>
STAT-5	<i>signal transducers and activators of transcription factor-5</i>
Tie2	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2</i>
TK	tyrosine kinase
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$

tPA	<i>tissue plasminogen activator</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE-cadhérine	<i>vascular endothelial-cadhérine</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR-2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
vHL	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
VRAP	<i>VEGFR-associated protein</i>
VVO	<i>organelles vésiculovacuolaires</i>
ZO-1	<i>zonula occludens</i>

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier le docteur Martin Sirois pour m'avoir incité à effectuer un doctorat, ce qui m'a permis d'explorer de nouvelles avenues scientifiques. Merci, également pour son coaching et sa patience lors de la rédaction d'articles et pour son soutien.

Merci à Ricardo Maliba et à Paul-Éduard Neagoe pour m'avoir fait rire si souvent et pour avoir partagé mon appétit pour le fast-food, mais aussi pour les nombreuses discussions ...

J'aimerais également remercier Simon Rollin, Judith Favier, Caroline Lemieux, Catherine Marchand, François Tremblay, Stéphanie Lapointe, Louis Villeneuve et Dominique Lauzier pour leur camaraderie, les échanges et les conseils.

Merci à l'équipe du docteur Yahye Merhi, avec une attention à Daniel Yacoub et Haissam Abou-Saleh pour les excellentes discussions scientifiques et les agréables collaborations.

Un grand merci à mes parents pour leur support et compréhension, à Michel pour ces judicieux conseils. Un merci particulier à Karine pour son écoute et sa compréhension. Merci, à toi, Liam pour ton sourire.

## **1.0 INTRODUCTION**

### **1.1 L'endothélium**

L'endothélium, composé de cellules endothéliales (CE), tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins et de l'endocarde. Initialement caractérisé tel une simple barrière physique, l'endothélium joue un rôle plus vaste dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. Cette homéostasie se traduit par de multiples fonctions de l'endothélium. Tout d'abord, l'endothélium joue le rôle d'une barrière sélective en fonction des besoins tissulaires. Par exemple, la barrière hématoencéphalique présente un endothélium très peu perméable, tandis qu'au niveau rénal, l'endothélium est fenestré permettant la filtration rapide du plasma sanguin. Ensuite, l'endothélium joue un rôle dans le développement de thromboses en sécrétant des facteurs capables de moduler l'agrégation plaquettaire. Les CE contribuent aussi à finement réguler le tonus vasculaire par l'entremise d'agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs. L'endothélium est également un acteur important de la réponse inflammatoire, particulièrement au niveau de l'œdème et de l'infiltration leucocytaire. Finalement, mentionnons que l'endothélium est une structure dynamique qui peut proliférer selon les besoins de l'organisme.

### **1.2 Survol de l'angiogenèse**

Le terme angiogenèse a été utilisé pour la première fois par Arthur Tremain Hertig en 1935 dans le cadre d'une étude portant sur la néovascularisation du placenta chez les macaques (1). L'angiogenèse dite classique ou par bourgeonnement se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Plus récemment, les étapes du processus angiogénique ont été décrites par le Dr Folkman (2). L'initiation de l'angiogenèse est marquée par une

vasodilatation et une augmentation de la perméabilité microvasculaire attribuée à un relâchement des jonctions interendothéliales. L'augmentation de la perméabilité vasculaire favorise l'extravasation des protéines plasmatiques et permet la formation d'un échafaudage provisoire mais nécessaire à la migration des cellules endothéliales. Par la suite, les cellules endothéliales relâchent les liens moléculaires les unissant et sécrètent des enzymes capables de dégrader la matrice extracellulaire permettant ainsi aux cellules de migrer vers le site de néovascularisation. Une fois parvenues, les cellules endothéliales s'organisent en structure tubulaire dont la stabilité dépend du recrutement de cellules musculaires et de péricytes. Mentionnons que les cellules sanguines (leucocytes et plaquettes) contribuent aussi à l'angiogenèse via la relâche de facteurs de croissance et de protéases (3, 4).

Au cours de l'embryogenèse, le processus de vascularisation est très actif et l'établissement du réseau vasculaire est généré suite à l'enchaînement de la vasculogenèse et de l'angiogenèse classique (5). La vasculogenèse est définie comme la formation d'un réseau sanguin primitif à partir de cellules endothéliales progénitrices, qui ont une origine commune avec les cellules hématopoïétiques progénitrices. Par la suite, l'angiogenèse classique induit la maturation du réseau vasculaire primitif par le bourgeonnement des vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants.

### **1.2.1 L'angiogenèse physiologique chez l'adulte**

Après la naissance, l'angiogenèse contribue toujours à la croissance des organes, mais chez l'adulte, la majorité des vaisseaux sanguins sont quiescents et l'angiogenèse dite physiologique est impliquée uniquement dans le cycle de reproduction chez la femme et la formation du placenta lors de la grossesse. Cependant, les cellules endothéliales gardent toujours leur capacité à se diviser rapidement en réponse à un stimulus physiologique, comme l'hypoxie. Ainsi, l'angiogenèse est réactivée au cours de la réparation tissulaire. Toutefois, dans plusieurs pathologies, les stimuli proangiogéniques deviennent excessifs et la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques est déséquilibrée engendrant ainsi une angiogenèse non contrôlée, dite pathologique.

### **1.2.2 L'angiogenèse pathologique**

La croissance non régulée des vaisseaux sanguins peut avoir un impact néfaste sur la santé et favorise le développement de certaines maladies. En effet, plusieurs pathologies ont été caractérisées avec une vascularisation excessive dont les principales sont : le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la rétinopathie et le cancer métastatique (5). À l'opposé, l'immaturité et la régression vasculaire sont impliquées dans plusieurs maladies telles que : la prééclampsie et les maladies cardiaques vasculaires et ischémiques. Ainsi, l'angiogenèse, soit incomplète ou excessive, a été associée à plus de 70 maladies, ce qui en fait une cible thérapeutique des plus intéressantes (pour revue voir (5)). Par conséquent, au cours de la dernière décennie, de nombreuses équipes de recherche se sont acharnées à identifier les facteurs moléculaires et les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse. Dans le cadre de cette thèse, notre

attention a porté sur le VEGF et les angiopoïétines, plus précisément sur les propriétés proinflammatoires de ces facteurs angiogéniques.

### **1.3 Régulation moléculaire de l'angiogenèse**

L'angiogenèse est un processus finement régulé. À l'état de quiescence vasculaire, il existe un équilibre dynamique entre les facteurs angiogéniques et les facteurs angiostatiques, ce qui favorise la stabilité de l'arbre vasculaire. Par contre, lorsque l'angiogenèse est stimulée, suite à un dommage tissulaire par exemple, les cellules endothéliales quittent l'état de quiescence vers un état actif sous l'effet des nombreux facteurs angiogéniques. Parmi ceux-ci, le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et ses récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK), constituent le premier système RTK identifié, et il agit comme un régulateur essentiel de la vasculogenèse et de l'angiogenèse (6).

#### **1.3.1 Les membres de la famille du VEGF**

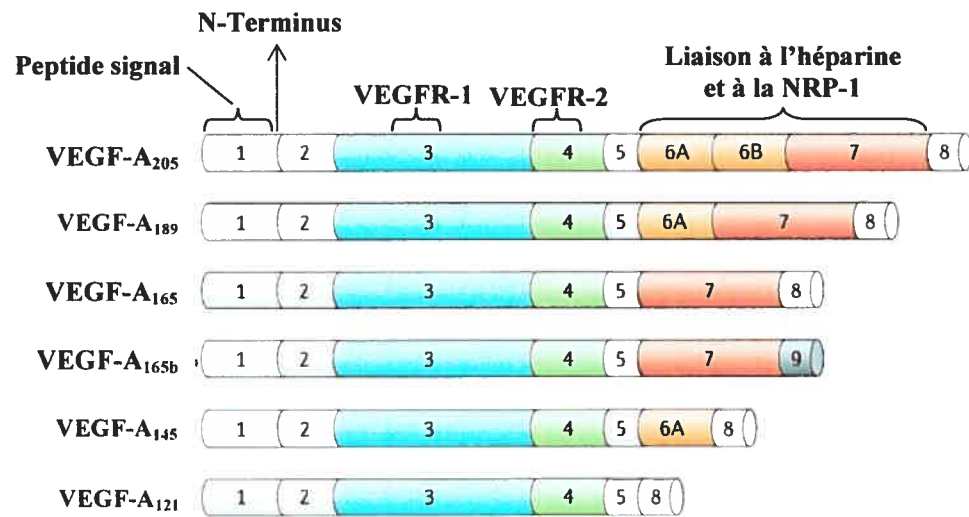
Le VEGF a été décrit presque simultanément par trois groupes de recherche à l'aide d'une variété de modèles expérimentaux (7). En 1983, Senger et coll. ont isolé un facteur sécrété par une lignée tumorale hépatique capable d'augmenter la perméabilité vasculaire (8). Cependant, la structure et la séquence en acides aminés de ce facteur, nommé alors *vascular permeability factor*, a uniquement été décrite au tournant de la décennie (9). Au même moment, Criscuolo et coll. ont réussi à purifier partiellement une protéine de gliomes qui elle aussi augmentait la perméabilité vasculaire (10). En juin 1989, Ferrara et Henzel ont été le troisième groupe à isoler le VEGF, mais les premiers à montrer son effet mitogénique sur les cellules endothéliales en culture. De plus, ils ont été les premiers à publier la



séquence partielle de ce facteur isolé de cellules hypophysaires et ils ont nommé ce facteur, le VEGF (11).

Suite à la découverte du VEGF, nommé aussi VEGF-A, plusieurs études ont montré l'existence de gènes codant pour des protéines avec une homologie de séquence pour le VEGF-A, soit le VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le *Placental Growth factor* (PlGF-1) (12).

L'analyse du gène codant pour le VEGF-A a révélé qu'il est composé de 8 exons entrecoupés de 7 introns (13). Chez l'humain, l'épissage alternatif de l'ARNm du gène codant pour le VEGF-A génère jusqu'à 5 différentes isoformes de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés, nommés VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>206</sub>, tandis que chez la souris, les isoformes contiennent un acide aminé de moins. Il est à noter que la liaison du VEGF-A avec les protéoglycanes héparanes sulfates et le corécepteur neuropiline-1 (NRP-1) est médiée par les exons 6 et 7. Aussi, le VEGF-A<sub>189</sub> et le VEGF-A<sub>206</sub>, qui possèdent l'exon 6 et l'exon 7 restent complètement liés aux protéoglycanes membranaires, ce qui fait de ces dernières un réservoir de VEGF-A. Quant au VEGF-A<sub>165</sub>, l'isoforme la plus abondante et la plus puissante, celui-ci n'exprime pas l'exon 6 et s'associe modérément à l'héparine, ce qui explique pourquoi approximativement 50% du VEGF-A<sub>165</sub> sécrété reste lié à l'héparine des protéoglycanes héparanes sulfates membranaires. Le VEGF-A<sub>121</sub>, qui ne possède pas l'exon 6 ni l'exon 7, diffuse librement dans le tissu environnant (12) (Figure 1).



**Figure 1: Représentation schématisée des isoformes du VEGF-A humain.** Les différents exons composant les isoformes du VEGF-A humain ont été indiqués par un numéro. Exon 3 (bleu) est principalement impliqué dans l'homodimérisation du VEGF-A et l'interaction avec le récepteur VEGFR-1. L'exon 4 (vert) est responsable de l'interaction avec le VEGFR-2. La liaison du VEGF-A avec les protéoglycanes héparanes sulfates et le corécepteur NRP-1 est médiée par l'exon 6 et 7 (orange et rouge, respectivement). L'exon 9 (gris) est exprimé dans l'isoforme inhibiteur du VEGF-A<sub>165b</sub> (adaptée d'après (14)).

Localisé sur un chromosome distinct du VEGF-A, le VEGF-B est exprimé, suite à un épissage alternatif, sous forme de VEGF-B<sub>167</sub> et le VEGF-B<sub>186</sub>. Seul le VEGF-B<sub>167</sub> peut se lier à l'héparine et par conséquent, ce dernier est séquestré par la matrice extracellulaire (14). Quant au PlGF, ce dernier est composé de quatre isoformes nommées PlGF-1, -2, -3 et 4, qui sont produites par épissage alternatif à partir de sept exons. Le PlGF-2 et -4 se lient à l'héparine, tandis que le PlGF-1 et -3 ne lie pas l'héparine et diffuse librement (14). De plus, le PlGF-2 peut se lier à la NRP-1 et à la NRP-2 via une séquence de 21 acides aminés basiques située à l'extrémité carboxy-terminale, tandis que chez le PlGF-1, -3 et -4, cette séquence est absente (14, 15). Le VEGF-C et -D sont produits sous la forme de protéines précurseurs et sous l'action de protéases, les formes matures sont produites (16). Les formes matures du VEGF-C et -D partagent une homologie structurale de 48%.

La structure secondaire des membres de la famille du VEGF est apparentée à celle de la famille du *platelet-derived growth factor* (PDGF) avec des ponts disulfures intra- et intermoléculaires entre huit résidus cystéines. L'analyse de la structure cristalline du VEGF-A<sub>165</sub> a révélé qu'il est formé d'un homodimère dont les monomères sont organisés de manière anti-parallèle et que les sites de liaison au récepteur sont situés au pôle du dimère (17). Même si des hétérodimères ont été identifiés, les membres de la famille du VEGF forment préférentiellement des homodimères (18).

### 1.3.1.1 Régulation de l'expression du gène du VEGF-A

Une autre caractéristique importante du VEGF-A est que son expression est régulée par le niveau ambiant d'oxygène. L'*hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1 $\alpha$ ), un facteur de transcription, est un médiateur clé de la réponse hypoxique. En présence d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  est rapidement hydroxylé sur plusieurs résidus proline permettant la liaison de HIF-1 $\alpha$  à la protéine *Von Hippel-Lindau tumor suppressor* (vHL). Cette dernière démarre alors une cascade d'ubiquitinylation qui dirige HIF-1 $\alpha$  vers les protéasomes pour y être dégradé. En condition hypoxique, l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$ , qui est dépendante de l'oxygène, est évitée et la transcription du VEGF-A est induite (19, 20).

Par ailleurs, l'expression du VEGF-A peut également être induite par certains facteurs de croissance, incluant l'*epidermal growth factor*, le *transforming growth factor*, le *keratinocyte growth factor*, l'*insulin like growth factor-1*, le *fibroblast growth factor* et le PDGF, qui agissent de manière autocrine et paracrine en collaboration avec l'hypoxie locale pour induire l'expression du VEGF-A (6).

### 1.3.1.2 Activités biologiques des membres de la famille du VEGF

Dans l'embryogenèse, le rôle du VEGF-A<sub>165</sub> est incontestable puisque la délétion d'un allèle est suffisante pour induire la létalité embryonnaire (E11-E12) causée par des défauts angiogéniques du sac vitellin, du placenta et de l'embryon (21, 22). Le VEGF-A possède une pléiotropie d'activités biologiques. *In vitro*, le VEGF-A<sub>165</sub> est un agent mitogénique des CE provenant du système macro- et microvasculaire artériel, veineux et lymphatique (9, 11, 19, 23, 24). De plus, le VEGF-A<sub>165</sub> promeut l'angiogenèse dans des modèles tridimensionnels tels que la

formation de tubes 3D et l'invasion du gel de collagène par les CE de microvaisseaux (25). *In vivo*, le VEGF-A induit l'angiogenèse dans une variété de modèles incluant la cornée de lapin (26) et la membrane chorioalantoïdienne de poulet (CAM) (27).

Le VEGF-A est aussi un facteur de survie endothéliale (28). En effet, il a été démontré que le VEGF-A<sub>165</sub> prévient l'apoptose endothéliale médiée par la privation de sérum et, induit l'expression de protéines anti-apoptotiques (29). *In vivo*, il a été rapporté que l'inactivation conditionnelle du VEGF-A<sub>165</sub> induit une apoptose marquée des CE dans les souris néonatales, tandis qu'aucune apoptose n'a été détectée dans les souris adultes (6). Afin d'expliquer cette dernière observation, il a été proposé que la survie des CE dans les néovaisseaux est sous la dépendance du VEGF-A<sub>165</sub> jusqu'au recrutement des péricytes (30).

Le VEGF-A a un effet chimiotactique sur les éosinophiles, neutrophiles, les monocytes ainsi que sur les cellules endothéliales et hématopoïétiques (31-34). Par ailleurs, le VEGF-A participe indirectement à la migration des CE en induisant l'expression de protéases comme la collagénase et les activateurs du plasminogène qui dégradent la matrice extracellulaire permettant la migration et l'infiltration des CE vers le site de néovascularisation (35).

Malgré l'importance des effets décrits ci-dessus, ses propriétés proinflammatoires démarquent le VEGF-A des autres facteurs de croissance. En effet, le VEGF-A<sub>165</sub> a été initialement identifié pour sa capacité à induire l'extravasation des protéines plasmatiques dans le derme du cochon d'inde (9). Une étude subséquente a

montré par microscopie électronique que l'injection intradermique du VEGF-A<sub>165</sub> augmente la perméabilité des veinules post-capillaires (36). De plus, l'analyse de l'endothélium des vaisseaux perméabilisés a révélé la présence de fenestrations (36). Ces dernières ont également été reproduites *in vitro* dans certaines études utilisant une monocouche confluente de CE (37). D'un autre côté, certaines données suggèrent que les organelles vésiculovacuolaires (VVO) contribuent aussi à l'exudation des protéines induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (38, 39). Il est à noter que les VVO ont été observées dans l'endothélium des vaisseaux tumoraux, qui sécrètent le VEGF-A<sub>165</sub> (40). De plus, dans certains lits vasculaires, le VEGF-A<sub>165</sub> augmente le passage de l'eau et de petits ions hydrosolubles et ainsi, favorise la formation d'un oedème tissulaire (7). Il a été suggéré que l'hyperperméabilité médiée par le VEGF-A<sub>165</sub> peut contribuer à l'angiogenèse tumorale par la formation d'un exudat tissulaire composé de filaments de fibrines, qui sert de matrice pour la migration des CE (6).

Par ailleurs, le VEGF-A<sub>165</sub> active une autre composante de la réponse inflammatoire aiguë, soit l'adhésion des leucocytes. En effet, la stimulation des CE avec le VEGF-A induit la translocation et l'expression endothéliale de molécules d'adhésion (PAF, P-sélectine, E-sélectine, *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1) et *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1)), qui favorisent le recrutement et l'adhésion des leucocytes à la surface endothéliale (41-43).

Finalement, *ex vivo*, l'application du VEGF-A<sub>165</sub> induit une vasodilatation dose-dépendante de plusieurs vaisseaux (44) et, *in vivo*, son injection intraveineuse

produit chez le rat une hypotension, une tachycardie et une diminution du volume d'éjection cardiaque (45). Ces effets hémodynamiques sont médiés par sa capacité à induire la formation du monoxyde d'azote (NO) et de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), mais dont la contribution respective varie en fonction du lit vasculaire (16).

Comparativement au VEGF-A<sub>165</sub>, peu de choses sont connues à propos du VEGF-B, un agoniste spécifique du VEGFR-1. Les souris, dont le gène du VEGF-B a été inactivé (VEGF-B<sup>-/-</sup>), sont viables et fertiles. Cependant, la taille du cœur des souris (VEGF-B<sup>-/-</sup>) est réduite et, suite à un infarctus du myocarde, la récupération des souris est compromise suggérant une implication du VEGF-B dans la formation des coronaires collatérales (46, 47). Il est intéressant de noter que l'expression du gène du VEGF-B est prépondérante au niveau du cœur des souris pré- et post-natales (47). Quant à l'autre agoniste sélectif du VEGFR-1, le PlGF-1, l'inactivation de son gène génère aussi une souris viable et fertile, mais dont l'angiogenèse pathologique est compromise (48). Par exemple, les tumeurs dans les souris PlGF<sup>-/-</sup> sont plus petites et moins vascularisées comparativement aux tumeurs des souris témoins (48, 49). Le PlGF-1 peut induire directement l'angiogenèse, mais aussi indirectement en potentialisant les effets du VEGF-A<sub>165</sub>. De plus, le PlGF-1 a un effet chimiotactique sur les monocytes et induit l'accumulation tissulaire des macrophages suite à son injection (50).

Le VEGF-C et le VEGF-D, deux ligands de VEGFR-2 et VEGFR-3, sont des cytokines clé de la lymphangiogenèse, un processus physiologique qui aboutit à la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir du réseau vasculaire

préexistant. De plus, similairement au VEGF-A<sub>165</sub>, le VEGF-C et le VEGF-D induisent la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. La génération d'analogues mutés du VEGF-C, qui sont incapables de lier le VEGFR-2, a permis de déterminer que l'hyperperméabilité et l'angiogenèse induites par le VEGF-C sont médiées par le VEGFR-2 (51).

Le VEGF-E a été découvert à partir du génome du parapoxvirus (virus Orf) qui infecte le mouton, la chèvre et à l'occasion les humains (52). L'infection avec ce type de virus cause des lésions cutanées prolifératives avec une angiogenèse marquée. Cet homologue viral peut lier le VEGFR-2 et la NRP-1 et par conséquent, générer des effets biologiques qui sont associés à leur activation (52). Récemment, un septième membre de la famille du VEGF, le VEGF-F, a été identifié à partir du venin de serpent (53, 54). Présentant une homologie structurale de 50% avec le VEGF-A<sub>165</sub>, le VEGF-F est un agoniste sélectif du VEGFR-2.

### **1.3.2 Récepteurs du VEGF**

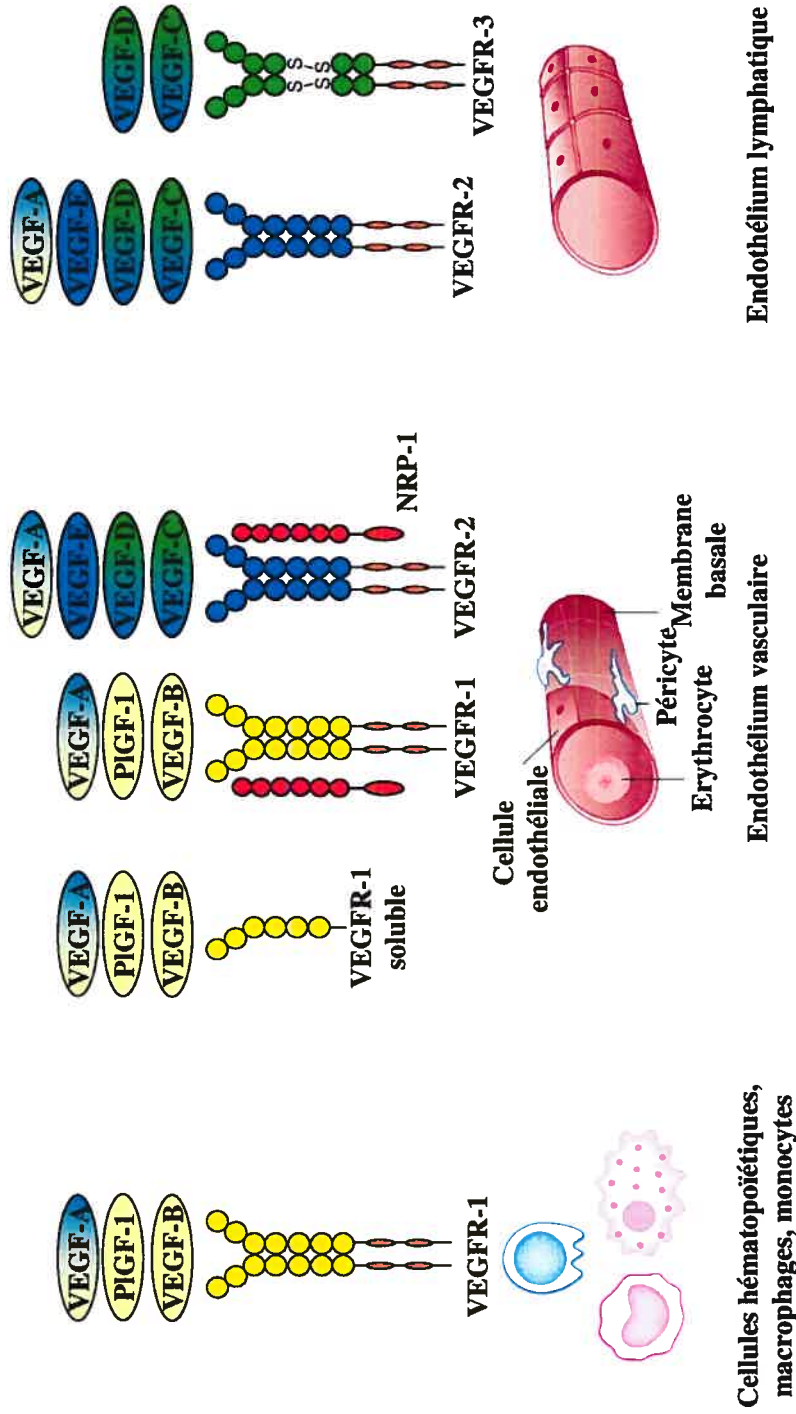
Le VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 sont des membres de la famille des récepteurs tyrosines kinases et possèdent un poids moléculaire variant entre 180 et 220 kDa. Suite à la liaison du ligand, les récepteurs se dimérisent de façon autologue ou hétérologue et s'autophosphorylent sur les résidus tyrosines, qui sert de poste d'ancrage pour l'initiation des signaux intracellulaires.



### 1.3.2.1 Le VEGFR-1

Le VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase, flt-1) est composé de 7 domaines extracellulaires de type immunoglobuline, d'un segment transmembranaire et d'une région intracellulaire dotée d'activité tyrosine kinase. Le VEGFR-1 est exprimé à la surface des monocytes, des macrophages, des ostéoclastes et des cellules endothéliales, hématopoïétiques et musculaires (12, 28, 55, 56). Il est à noter que, suite à un épissage alternatif, le VEGFR-1 est également produit sous forme soluble (sVEGFR-1) sans toutefois affecter la liaison aux agonistes (57) (Figure 2).

Le VEGFR-1 lie avec une grande affinité le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF-1, qui induisent une autophosphorylation distincte des tyrosines du VEGFR-1 (58). Par exemple, le PlGF-1 induit la phosphorylation sélective du résidu tyrosine (Y1309) permettant l'activation d'Akt/protéine kinase B (PKB) (59). La surexpression du VEGFR-1 a permis de déterminer que l'autophosphorylation du VEGFR-1 recrute la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), la phospholipase  $C_\gamma$  (PLC $\gamma$ ), SHP2, le *growth-factor-receptor-bound-2* (Grb2) et le Nck (60, 61). Les conséquences de l'activation de ces signaux de transduction sont encore mal comprises (61, 62) et l'étude du VEGFR-1 à l'aide de souris transgéniques suggère même que le VEGFR-1 agit comme récepteur de clairance dans l'embryogenèse. En effet, l'inactivation génique du VEGFR-1 chez les souris (VEGFR-1<sup>-/-</sup>) a induit une létalité embryonnaire (E7.5 et E8.5) causée par une désorganisation des vaisseaux sanguins de l'embryon (63). De plus, la délétion du domaine tyrosine kinase (TK) du VEGFR-1 (VEGFR-1(TK)<sup>-/-</sup>) n'a pas affecté le développement embryonnaire. Cependant, la délétion combinée du



**Figure 2: Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs.** Le PlGF et le VEGF-B interagissent uniquement avec le VEGFR-1, tandis que le VEGF-C et D se lient avec le VEGFR-2 et VEGFR-3. Quant au VEGF-A<sub>165</sub>, le plus puissant des membres de la famille, il se lie avec le VEGFR-1 et le VEGFR-2 ainsi qu'au complexe NRP-1/VEGFR-2 (adaptée de (66)).

domaine TK et transmembranaire (VEGFR-1(TM-TK)<sup>-/-</sup>) a induit 50% de létalité embryonnaire due à des malformations vasculaires révélant l'importance de l'ancrage du VEGFR-1 comparativement à son activité tyrosine kinase (64). Néanmoins, même si le domaine tyrosine kinase du VEGFR-1 n'est pas requis pour le développement vasculaire, il est indispensable au recrutement des monocytes/macrophages et des cellules hématopoïétiques induit par le VEGF-A<sub>165</sub> (65).

L'hétérodimérisation du VEGFR-1 avec le VEGFR-2 suivie d'une transphosphorylation est un autre mécanisme par lequel le VEGFR-1 peut induire des activités biologiques. *In vivo*, notre laboratoire a rapporté que l'inhibition de l'expression du VEGFR-1 a réduit de 85% l'effet angiogénique du VEGF-A (66) et récemment, nous avons rapporté que la synthèse de la prostacycline induite par le VEGF-A<sub>165</sub> requiert l'hétérodimérisation VEGFR-1/-2 (67).

De récentes études ont révélé que le VEGFR-1 et son agoniste le PlGF-1 ont un rôle clé dans l'angiogenèse pathologique. En effet, il a été démontré que l'utilisation d'un anticorps capable de bloquer le site de liaison du VEGFR-1 a supprimé la néovascularisation présente dans le cancer, la polyarthrite rhumatoïde et la rétinopathie (49).

### 1.3.2.2 Le VEGFR-2

La structure générale du VEGFR-2 (*kinase-insert domain receptor*, KDR; fetal liver kinase, flk-1) est similaire à celle du VEGFR-1. Par contre, comparativement au VEGFR-1, qui agit comme récepteur de clairance dans

l'embryogenèse, le VEGFR-2 est essentiel au développement de la vasculogenèse. En effet, l'inactivation génique du VEGFR-2 est létale (E8,5 et E9,5) due à une absence de prolifération des CE entraînant une vasculogenèse défectueuse (68). Le VEGFR-2 peut lier le VEGF-A, le VEGF-C, le VEGF-D et le VEGF-E et, même si l'affinité du VEGF-A<sub>165</sub> est presque 10 fois supérieure pour le VEGFR-1 que pour le VEGFR-2, ce dernier semble être le principal médiateur des effets biologiques du VEGF-A<sub>165</sub>.

La stimulation de plusieurs lignées de cellules endothéliales avec le VEGF-A<sub>165</sub> induit une forte autophosphorylation du VEGFR-2 permettant l'initiation d'une cascade intracellulaire complexe (14). Par l'intermédiaire du domaine *Src homology 2* (SH2), la PLC $\gamma$  s'associe au résidu Tyr1175 du VEGFR-2 (69) et hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ce faisant, le DAG active la PKC qui à son tour active la voie Raf-MEK1/2-*extracellular signal regulated kinase*-1/2 (ERK1/2), qui est responsable de l'effet mitogénique du VEGF-A sur les CE (70). Initialement, il a été rapporté que la voie Raf-MEK1/2-ERK1/2 était directement activée par la PKC (indépendante de la voie Ras) (70), mais de récentes études ont montré que le VEGF-A<sub>165</sub> peut également stimuler, mais à moindre niveau, la voie Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 (71).

Une seconde voie activée par le VEGFR-2 est celle de la PI3K, qui entraîne une augmentation du lipide phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate et subséquemment, l'activation de médiateurs intracellulaires tels que Akt et Rac. Il a été démontré que l'activation de Akt par la voie VEGFR-2/PI3K est suffisante et

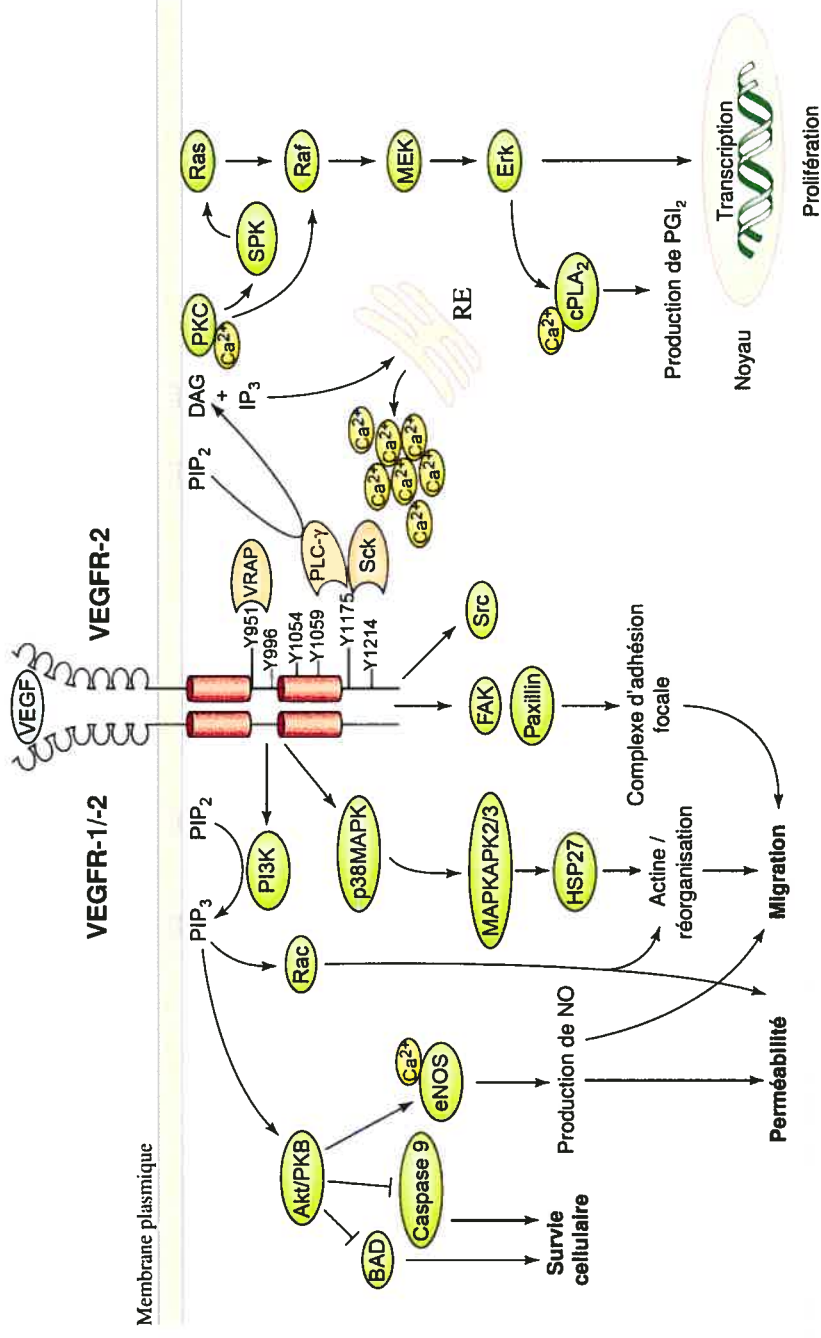
nécessaire afin de médier les effets anti-apoptotiques du VEGF-A<sub>165</sub> (28). Il a été proposé qu'une partie des effets anti-apoptotiques d'Akt résulte de l'inhibition des facteurs apoptotiques Bad et caspase-9 (16). Outre son implication dans la survie cellulaire, Akt phosphoryle et induit l'activité enzymatique de la *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), qui génère le monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur (72-74). D'un autre côté, l'activité de la eNOS peut être accrue par l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et par l'activation de la PKC, en conséquence de l'activation de la PLC $\gamma$  par le VEGF-A<sub>165</sub> (75-77). L'inhibition de l'activité enzymatique de la eNOS a révélé la contribution du NO dans les propriétés proinflammatoires du VEGF-A<sub>165</sub> en réduisant la perméabilité vasculaire et la vasodilatation induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (16, 74). De façon similaire à l'inhibition pharmacologique de la eNOS, l'inactivation génique de cette dernière chez les souris a diminué l'angiogenèse, la vasodilatation et l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A (78). Il est à noter qu'en fonction du lit vasculaire, les effets hypotenseurs du VEGF-A<sub>165</sub> peuvent être en parti médiés par la synthèse de la prostacycline et ce, suite à l'activation de la voie PLC $\gamma$ -DAG-PKC-Raf-MEK1/2-Erk1/2-Phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique dépendante du Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>) (74, 79).

L'effet chimiotactique du VEGF-A sur les CE est un élément clé de sa capacité à induire l'angiogenèse et dépend entièrement de l'activation du VEGFR-2 (80). En effet, des analogues mutés du VEGF-A<sub>165</sub>, uniquement capable de se lier au VEGFR-2, ont gardé leur capacité à induire la migration et la division des CE (80). *In vitro*, l'effet migratoire du VEGF-A<sub>165</sub> sur les CE s'observe par la formation de fibres de stress accompagnée du recrutement de la vinculine et de la

paxilline au complexe d'adhésion focale. Ces deux évènements sont sous le contrôle de deux voies différentes: *stress-activated protein kinase-2*(SAPK2)-p38 MAPK-MAPKAP kinase 2/3-*heat shock protein 27* (HSP27) (81-83) et HSP90-*focal adhesion kinase* (FAK)-RhoA-ROCK (84, 85). Il est à noter que la phosphorylation de FAK est également induite par Src indépendamment de la voie HSP90, mais seule la vinculine est recrutée (84) (Figure 3).

### 1.3.2.3 Le VEGFR-3

Le VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, flt4) est un récepteur de 195 KDa présentant une grande affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D. L'inactivation génique du VEGFR-3 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire au jour 9.5 causée par une désorganisation des plus gros vaisseaux engendrant une accumulation de fluide et une défaillance cardiaque (86). Présent sur tout l'endothélium au cours de l'embryogenèse, le VEGFR-3 est exprimé principalement sur l'endothélium lymphatique chez l'adulte (87). L'activation du VEGFR-3 par le VEGF-C ou le VEGF-D promeut la lymphangiogenèse en induisant la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (88). Le VEGFR-3 activé s'associe avec les protéines adaptatrices Shc et Grb2 via Tyr1337 (89). De façon indépendante à Ras, le VEGFR-3 active la voie Erk1/2 par l'entremise de la PLC- $\gamma$ -PKC (88). De plus, la stimulation du VEGFR-3 entraîne la mobilisation et l'activation de la voie PI3K-Akt (88).



**Figure 3: Représentation schématisée des voies de signalisation induites par le VEGFR-2 activé.** Les protéines *VEGFR-associated protein* (VRAP), Sck et la PLC-γ se lient à des résidus tyrosine spécifiques via leur domaine SH2, induisant la phosphorylation et l'activation de ces protéines. L'activation de la PLC-γ induit l'hydrolyse du phospholipide membranaire phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), qui génère les seconds messagers DAG et IP<sub>3</sub>. Le DAG induit l'activation de la PKC, tandis que l'IP<sub>3</sub> induit la relâche de Ca<sup>2+</sup> suite à son action sur le réticulum endoplasmique. De plus, plusieurs protéines sont activées par le VEGFR-2 incluant Src, la PI3K, la FAK et la p38 MAPK. L'activation de ces signaux intracellulaires propage un signal aboutissant à plusieurs fonctions endothéliales importantes comme la migration, la prolifération, la survie et la perméabilité vasculaire (adaptée de (66)).

#### 1.3.2.4 Les neuropilines

Initialement, la NRP-1 a été identifiée et reconnue pour son activité chimioréulsive dans la guidance neuronale due à sa capacité de lier les sémaphorines/collapsines de type III (Sema3A, 3B, 3C et 3D) (90, 91). Par la suite, la NRP-1 a été localisée dans les cellules endothéliales et décrite pour sa liaison sélective au VEGF-A<sub>165</sub> et non au VEGF-A<sub>121</sub>, qui ne possède pas l'exon 7 et par conséquent, ne peut lier la NRP-1 (92). Jusqu'à présent, deux neuropilines, NRP-1 et NRP-2, ont été identifiées et leurs gènes sont localisés sur deux chromosomes distincts (14). La structure générale de la NRP-1 et de la NRP-2 est similaire et elles possèdent une homologie en acides aminés d'environ 50%. La NRP-1 et la NRP-2 possèdent un petit domaine intracellulaire, mais celui-ci n'est pas requis pour la guidance neuronale induite par les sémaphorines (93). Ainsi, il semble que la NRP-1 et la NRP-2 ne soient pas des récepteurs tyrosines kinases, mais plutôt des protéines adaptatrices pour les ligands des récepteurs tyrosines kinases: pour le VEGF-A<sub>165</sub> avec le VEGFR-2 (94) et pour les sémaphorines avec les plexines (95). Cependant, un nombre grandissant d'études attribuent un rôle à la NRP-1 dans l'angiogenèse (96). Wang et coll. ont montré que la NRP-1 seule peut médier la migration des CE induite par le VEGF-A<sub>165</sub>, et ce, par l'activation de la PI3K via son domaine intracellulaire (97). De plus, Murga et coll. ont rapporté que le VEGF-A<sub>165</sub> peut promouvoir l'adhésion des CE à la matrice extracellulaire via la NRP-1 indépendamment de VEGFR-2 (98).

La génération de souris transgéniques surexprimant la NRP-1 a induit une létalité embryonnaire (E12,5-E17,5) et l'analyse morphologique des embryons a révélé une densité surélevée de capillaires, une dilatation marquée des vaisseaux



sanguins et une hémorragie étendue (99). L'inactivation du gène de la NRP-1 provoque des défauts vasculaires et neuronaux majeurs résultant en une mort embryonnaire (E12,5-E13,5) (100). En revanche, aucune malformation vasculaire n'a été observée suite à l'inactivation du gène de la NRP-2 (101). De façon étonnante, l'inactivation concomitante de la NRP-1 et -2 a induit une défaillance vasculaire plus prononcée que leur inactivation individuelle et une létalité embryonnaire plus précoce (102). De plus, les souris (NRP-1 et NRP-2)<sup>-/-</sup> présentent un phénotype vasculaire ressemblant à celui des souris VEGF-A<sup>-/-</sup> et VEGFR-2<sup>-/-</sup>. De surcroît, les souris transgéniques n'exprimant pas le VEGF-A<sub>164</sub> et VEGF-A<sub>188</sub> montrent une densité de capillaires cardiaques et de coronaires collatérales moindre que les souris témoins, ce qui peut être attribuable à l'incapacité du VEGF-A<sub>120</sub> de lier la NRP-1 et par conséquent, d'induire une angiogenèse «normale» (103). Ainsi, les expériences d'inactivation génique suggèrent que la NRP-1 et la NRP-2 sont nécessaires au développement vasculaire au cours de l'embryogenèse en contribuant en partie à potentialiser l'angiogenèse induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.

En appui, il a été démontré que l'interaction entre la NRP-1 et le VEGFR-2 a pour effet d'augmenter considérablement l'autophosphorylation du VEGFR-2 par le VEGF-A<sub>165</sub> et la migration cellulaire (92, 94, 104). De récents travaux effectués dans notre laboratoire ont confirmé l'effet potentiateur de la NRP-1 sur divers effets biologiques du VEGF-A<sub>165</sub> tels que : la migration et la prolifération des CE (105), la synthèse endothéliale du PAF (105) et de la PGI<sub>2</sub> (67), la perméabilité vasculaire, la translocation de la P-sélectine à la surface endothéliale ainsi que l'adhésion des neutrophiles aux CE (43).

Outre son rôle dans l'embryogenèse, la NRP-1 est aussi impliquée dans l'angiogenèse tumorale. De fait, la surexpression conditionnelle de la NRP-1 dans un carcinome du pancréas augmente l'angiogenèse tumorale et sa progression (106). De plus, les cellules de certains carcinomes mammaires, qui expriment la NRP-1 comme unique récepteur du VEGF-A, synthétisent une grande quantité de PAF en réponse au VEGF-A<sub>165</sub> (107). Ainsi, il semble que dans certaines conditions la NRP-1, peut médier certains effets biologiques du VEGF-A<sub>165</sub>.

### **1.3.3 Rôle du VEGF-A/VEGFR dans l'angiogenèse tumorale et avenues thérapeutiques**

Plusieurs études d'hybridation *in situ* ont montré que l'ARNm du VEGF-A est exprimé dans plusieurs lignées tumorales (108-112). De plus, en 1993, Kim et coll. ont rapporté qu'un anticorps dirigé contre le VEGF-A a pour effet de diminuer la croissance de plusieurs tumeurs chez la souris (113). Des études subséquentes ont confirmé l'implication du VEGF-A dans l'angiogenèse tumorale (pour revue voir (114)) et par conséquent, il est maintenant bien établi que le VEGF-A est un important médiateur de l'angiogenèse tumorale. Ces diverses observations ont conduit à développer des approches thérapeutiques pouvant bloquer les effets du VEGF-A. Dans cette perspective, plusieurs stratégies directes ou indirectes ont été mises de l'avant, telles que l'inhibition du VEGF-A (ARNm ou protéine), de ses récepteurs (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 ou NRP-1) et de voies intracellulaires activées par le VEGF-A (Raf). La majorité de ces cibles thérapeutiques sont présentement en phase d'étude clinique (pour revue voir (115)). Récemment, le bevacizumab (Avastin), un anticorps humanisé dirigé

contre le VEGF-A, en combinaison avec la chimiothérapie a montré un effet bénéfique supplémentaire sur la survie de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, du sein ou ovarien comparativement à la chimiothérapie seule (5). Ainsi, les malades atteints d'un cancer colorectal métastatique recevant le bevacizumab et le traitement prescrit ont survécu en moyenne cinq mois additionnels comparativement aux patients traités avec la chimiothérapie usuelle (115). D'un autre côté, le Vatalanib, un inhibiteur des trois récepteurs du VEGF (VEGFR-1,-2 et -3), n'a eu aucun effet additionnel sur la survie des patients dans le traitement de certains cancers. Les raisons de cet insuccès sont méconnues, toutefois, il a été suggéré que l'inefficacité du Vatalanib est reliée à son incapacité d'inhiber la NRP-1, qui peut médier la survie cellulaire (115). Une explication alternative réside dans la capacité de plusieurs tumeurs à sécréter de multiples facteurs angiogéniques à la fois. En fait, même si le VEGF-A est un important médiateur de l'angiogenèse tumorale, il est raisonnable de penser que les tumeurs empruntent des voies alternatives afin de promouvoir la néovascularisation.

#### **1.4 Les angiopoïétines**

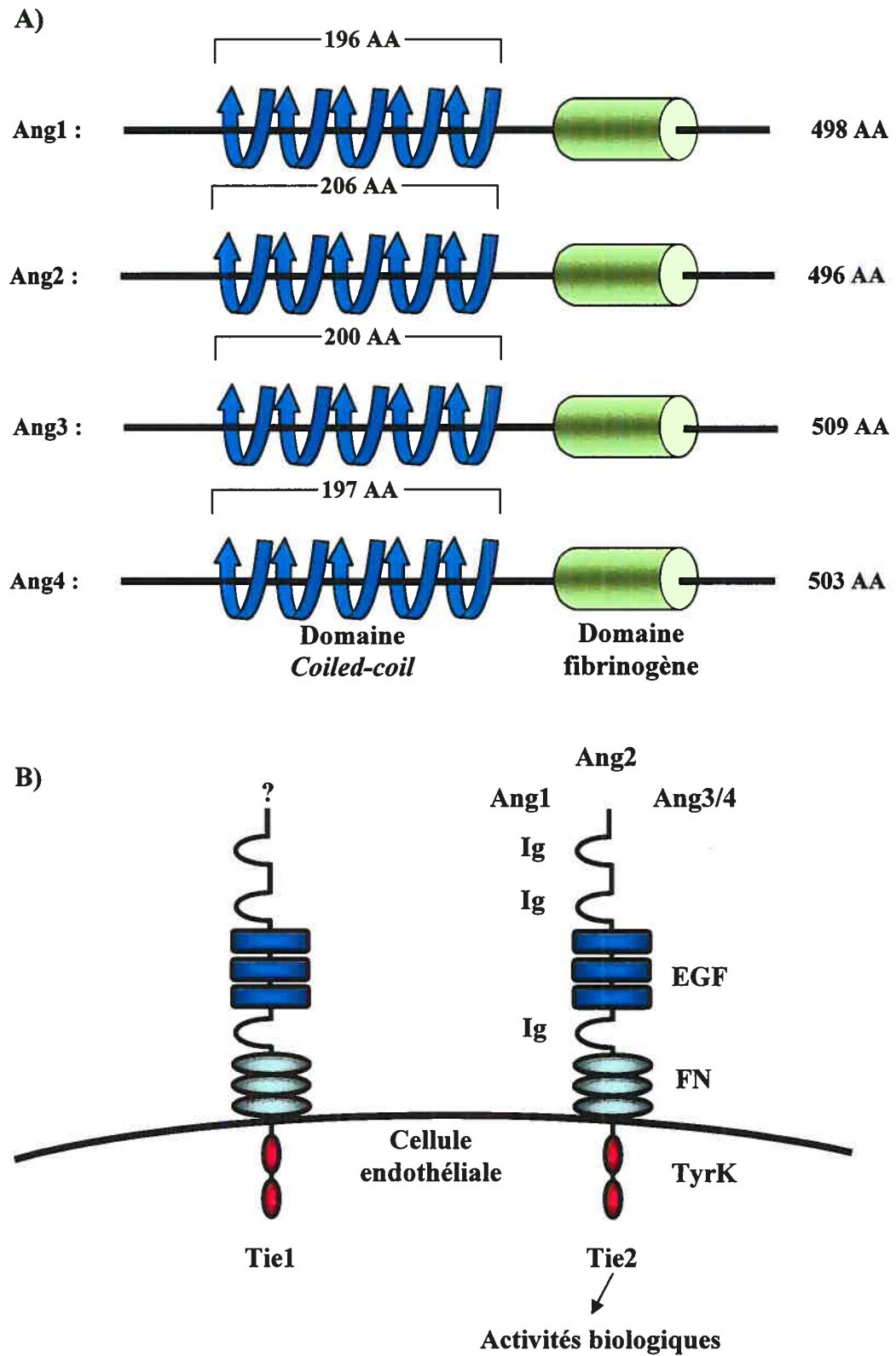
Malgré l'importance de son rôle dans l'angiogenèse, le VEGF-A agit de concert avec d'autres facteurs de croissance dans la formation et la stabilisation des vaisseaux sanguins. En effet, les premières études cliniques dans le traitement des membres inférieurs ischémiques avec le VEGF-A<sub>165</sub> ont rapporté l'induction de vaisseaux collatéraux, mais aussi la présence d'oedème tissulaire (116, 117). Afin d'expliquer cette dernière observation, il a été suggéré que les néovaisseaux étaient perméables et dysfonctionnels (116, 118). Récemment découvertes, les angiopoïétines 1 et 2 (Ang1 et Ang2) semblent jouer un rôle complémentaire à

celui du VEGF-A dans l'angiogenèse (119-121). Les angiopoïétines ont été découvertes comme des ligands du récepteur *tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2* (Tie2), qui est principalement exprimé à la surface des cellules endothéliales (122).

#### **1.4.1 Structure, localisation et régulation des angiopoïétines**

La famille des angiopoïétines est formée de quatre membres, nommés Ang1, Ang2, Ang3 et Ang4, dont les deux premières ont été particulièrement bien caractérisés (123). Les angiopoïétines sont composées d'un domaine amino-terminal hydrophobe responsable de l'oligomérisation suivi par un domaine *coiled-coil* qui est essentiel à la dimérisation et d'un domaine carboxy-terminal de type fibrinogène permettant la liaison au récepteur Tie2 (Figure 4A) (120, 121, 123).

En dépit que Ang1 et Ang2 se lient à Tie2 avec la même spécificité et affinité, les études initiales ont rapporté qu'Ang2 prévient de façon compétitive la phosphorylation de Tie2 médiée par Ang1 suggérant que Ang2 est un antagoniste endogène de Tie2 (120, 121). Cependant, de récentes études ont montré que Ang1 et Ang2 peuvent induire toutes deux, la phosphorylation de Tie2 et engendrer des activités biologiques similaires (124-130). Par exemple, il a été rapporté que Ang2 engendre la migration et la survie des CE, la formation de tubes capillaires 3D ainsi que plusieurs activités proinflammatoires aiguës indiquant que Ang2 peut agir également comme un agoniste (124-130). Les raisons sous-jacentes à cet effet bivalent de Ang2 sont peu comprises, mais la variabilité expérimentale (concentration, stimulation paracrine versus autocrine,



**Figure 4: La famille des angiopoïétines (A) et ses récepteurs Tie (B).** Du point de vue structural, les angiopoïétines sont similaires avec un domaine de type *coiled-coil* et fibrinogène (FN). Quant aux récepteurs Tie, ceux-ci sont composés de trois domaines immunoglobulines (Ig), de domaines de type *epidermal growth factor* (EGF), FN et de deux domaines intracellulaires tyrosines kinases (TK) (adaptée d'après (133)).

niveau d'oligomérisation, durée du traitement et type cellulaire) pourrait être en partie responsable de ces différences.

Chez l'adulte, Ang1 est exprimée de manière constitutive au niveau de plusieurs tissus tels que le système nerveux central, les intestins, les muscles squelettiques, le pancréas, l'utérus et les ovaires (121). Au niveau cellulaire, Ang1 est exprimée par les cellules péri-endothéliales comme les péricytes et les cellules musculaires lisses agissant de manière paracrine sur les CE (120). Une étude récente a démontré que l'hypoxie augmente l'ARNm de Ang1 dans les péricytes, mais non dans les CE (131). En condition pathologique, l'expression de Ang1 est augmentée dans plusieurs types de cancer (pour revue voir (132)).

Comparativement à Ang1, Ang2 ainsi que son ARNm sont très peu exprimés en condition physiologique, mais leur expression est rapidement induite de façon transitoire dans les zones de remodelage vasculaire telles que les organes reproductifs de la femme et les tissus en processus de régénération (133, 134). Principalement localisée dans les cellules endothéliales, l'expression protéique de Ang2 est induite par l'hypoxie et par des cytokines incluant le VEGF-A<sub>165</sub>, le bFGF, le TNF- $\alpha$  et l'angiotensine II (135-137). De plus, une récente étude a rapporté que Ang2 est entreposée dans les corps de Weibel-Palade des CE et que, suite à un stimulus approprié, les corps de Weibel-Palade fusionnent avec la membrane cytoplasmique relâchant Ang2 (138). En prenant en considération que Tie2 et Ang2 sont principalement exprimés par les CE, il a été suggéré qu'Ang2 agit rapidement et de manière autocrine pour induire ses activités biologiques

(139). Dans la majorité des tumeurs, l'expression de Ang2 est accrue et le ratio Ang2:Ang1 est augmenté en faveur de Ang2 (132).

En 1999, Valenzuela et coll. ont rapporté l'existence de deux membres additionnels dans la famille des angiopoïétines, soit Ang3 et Ang4, homologues retrouvés chez la souris et l'humain, respectivement (123). Ang3 est distribuée dans presque tous les tissus de la souris, tandis que la distribution de Ang4 est principalement restreinte aux poumons (123). La stimulation des CE avec une protéine chimérique de Ang4 a induit la phosphorylation de Tie2, tandis qu'une chimère de Ang3 a engendré uniquement la phosphorylation de Tie2 dans les cellules non-endothéliales (123). De plus, un excédant de Ang3 a bloqué l'activation de Tie2 par Ang1. En se basant sur ces observations, Valenzuela et coll. ont suggéré un rôle agonistique pour Ang4 et antagonistique pour Ang3 (123). Toutefois, en fonction du contexte expérimental (protéine recombinante et type cellulaire), Ang3 peut agir comme un agoniste modéré de Tie2 (140).

#### **1.4.2 Structure, localisation et régulation des récepteurs Tie**

La famille des récepteurs Tie est composée de deux membres, nommé Tie1 et Tie2. Les deux récepteurs ont une structure similaire avec une région extracellulaire composée de trois boucles apparentées aux immunoglobulines (Ig), de trois domaines de type EGF et de trois segments de type fibronectine situés au dessus de la membrane cellulaire. Les deux boucles Ig à l'extrémité amino-terminale sont responsables de la liaison aux angiopoïétines (141). La région intracellulaire des récepteurs Tie est formée de deux domaines dotés d'activités tyrosines kinases entrecoupés par un segment inter-kinase dépourvu de tyrosine. En dépit de cette homologie structurale, aucune angiopoïétine ne se lie à Tie1 et

par conséquent, Tie1 est considéré comme un récepteur orphelin (Figure 4B). Cependant, des études récentes suggèrent que le rôle de Tie1 est de coopérer et de moduler l'effet de Tie2 par l'entremise de leur hétérodimérisation via leur domaine intracellulaire (119, 141). De plus, ce complexe Tie1:Tie2 peut être également régulé par le VEGF, qui induit le clivage de l'ectodomaine de Tie1, suggérant qu'il existe une interaction entre les récepteurs VEGFR et Tie (142).

Chez la souris adulte, Tie1 et Tie2 sont principalement exprimés à la surface des cellules endothéliales (122). Dans les tissus vascularisés du rat adulte, Tie1 a une vaste distribution, tandis que Tie2 est plus abondant au niveau des poumons et des glandes surrénales (143). Cependant, il est de plus en plus clair qu'il existe d'autres populations cellulaires non-endothéliales sur lesquelles Tie2 est exprimé. Par exemple, Tie2 a été détecté sur les thyrocytes, où son expression est augmentée dans la goitrogénèse, et sur les cellules du système nerveux, où il a été suggéré que les angiopoïétines modulent l'apoptose (144, 145). De plus, notre laboratoire a récemment démontré que Tie2 est exprimé à la surface des neutrophiles et que son activation induit des activités proinflammatoires (127). En appui, une équipe de recherche indépendante a montré la présence de Tie2 sur les neutrophiles (146) mais aussi à la surface membranaire d'un autre polynucléaire, l'éosinophile (147). Finalement, Tie2 a été localisé sur les cellules souches hématopoïétiques et les cellules endothéliales progénitrices isolées à partir de la moelle osseuse et son activation promeut l'interaction des cellules souches hématopoïétiques avec leur microenvironnement et les protège contre les agents inducteurs de la myélosuppression (148-150).



### 1.4.3 Rôle des angiopoïétines/Tie dans l'embryogenèse

Tôt dans l'embryogenèse, les récepteurs VEGFR-2, Tie2 et Tie1 sont détectés à intervalles d'une demi-journée à partir de E7, suggérant que chacun de ces récepteurs tyrosines kinases jouent un rôle unique dans la vascularisation de l'embryon de souris (151). L'inactivation du gène Tie2 entraîne une létalité embryonnaire entre les jours E9,5 et E10,5 avec d'importants défauts vasculaires (152). Comparativement aux souris VEGFR-2<sup>-/-</sup> et VEGF-A<sup>-/-</sup>, dont l'angiogenèse est perturbée dans sa phase initiale, les défauts vasculaires présentés par les souris Tie2<sup>-/-</sup> reflètent une perturbation tardive de l'angiogenèse. En effet, l'analyse des embryons de souris Tie2<sup>-/-</sup> a révélé un réseau vasculaire simplifié, un nombre élevé de CE apoptotiques et une faible quantité de péricytes recrutés en périphérie des CE (152, 153).

Quant à Tie1, l'inactivation de son gène entraîne aussi une létalité embryonnaire, mais plus tardivement que Tie2, soit entre les jours E13,5 et 14,5 (154). Les embryons de souris Tie1<sup>-/-</sup> présentent un défaut vasculaire du développement caractérisé par des oedèmes et une rupture de microvaisseaux induisant des hémorragies (154). De façon étonnante, seul les capillaires sont affectés et les vaisseaux sanguins principaux apparaissent normaux (154). À la lumière de ces observations, Tie1 apparaît essentiel à l'embryogenèse et ce, malgré qu'il soit toujours un récepteur orphelin.

L'inactivation du gène de Ang1 produit un phénotype vasculaire similaire à celui de Tie2 avec un réseau vasculaire immature et une létalité embryonnaire (E12,5) (155). La surexpression de Ang1 dans la peau de souris (K14-Ang1) supporte

l'observation précédente puisque ces souris présentent une vascularisation accrue avec un calibre de vaisseaux plus gros ainsi qu'un nombre de vaisseaux et de ramifications plus élevé (156). De plus, ces souris transgéniques présentent une résistance à l'induction de l'hyperperméabilité par un agent inflammatoire indiquant que Ang1 est impliquée dans la maturation des vaisseaux sanguins et le maintien de l'intégrité vasculaire (157). Aussi, les embryons des souris Ang1<sup>-/-</sup> sont caractérisés par des CE rondes et une diminution des cellules périendothéliales ainsi que de la matrice extracellulaire suggérant que Ang1 favorise l'intégrité vasculaire en partie grâce au recrutement d'un support endothélial (155).

Tout comme les souris K14-Ang1, la peau des souris surexprimant le VEGF-A<sub>164</sub> (K14-VEGF-A<sub>164</sub>) présente une rougeur accrue due à une hypervascularisation du derme (157). Cependant, les souris K14-VEGF-A<sub>164</sub> présentent des signes d'inflammation aiguë tels que l'oedème et l'infiltration leucocytaire (157). Afin de mieux comprendre le rôle de ces deux facteurs dans l'angiogenèse, des souris doubles transgéniques pour le VEGF-A<sub>164</sub> et Ang1 ont été générées. Chez ces dernières, la vascularisation du derme est plus importante que celle retrouvée chez la souris K14-VEGF-A<sub>164</sub> ou K14-Ang1, mais elles ne présentent pas les signes d'inflammation retrouvés chez la souris K14-VEGF-A<sub>164</sub>. Suite à cette observation, Thurston et coll. ont suggéré qu'une bithérapie (Ang1 plus VEGF-A<sub>164</sub>) pourrait offrir un avantage versus la monothérapie (VEGF-A<sub>164</sub>) en générant une angiogenèse accrue avec des vaisseaux stables et non-perméables (157).

Quant à Ang2, les études de transgénèse ont généré des phénotypes complexes rendant difficile d'identifier précisément la fonction biologique de Ang2. Une étude initiale a rapporté que la surexpression de Ang2 induit un phénotype similaire aux souris Tie2<sup>-/-</sup> et Ang1<sup>-/-</sup> (121). En effet, les souris transgéniques surexprimant Ang2 sont caractérisées par des malformations vasculaires, cardiaques et une létalité embryonnaire au jour E9,5-E10,5. Ce phénotype ainsi que la capacité de Ang2 de bloquer la phosphorylation de Tie2 induite par Ang1 sont à l'origine du rôle antagoniste de Ang2. Toutefois, le rôle de Ang2 est plus complexe comme le démontre l'inactivation de son gène chez la souris (158). Les souris Ang2<sup>-/-</sup> sont viables, mais la majorité décèdent vers le 14<sup>ème</sup> jour. Peu de temps après s'être alimentés pour la première fois, les souriceaux développent des ascites chyleuses et des oedèmes causés par des malformations du système lymphatique. La substitution du gène de Ang2 par celui de Ang1 a prévenu les malformations lymphatiques suggérant que Ang2 agit comme un agoniste de Tie2 dans le développement lymphatique. Par ailleurs, l'analyse phénotypique des souris a révélé que Ang2 est impliquée dans le remodelage vasculaire de la rétine en induisant la régression et l'initiation de l'angiogenèse. Cependant, ce phénotype n'a pu être sauvé par la substitution de Ang2 avec Ang1. Ces résultats suggèrent que Ang2 est impliquée tardivement dans l'embryogenèse ainsi que dans l'angiogenèse postnatale (158).

#### **1.4.4 Fonctions biologiques des angiopoïétines**

L'angiopoïétine 1 est considérée comme un facteur angiogénique aux propriétés anti-inflammatoires. *In vitro*, Ang1 a un effet chimiotactique sur la migration des CE (159) et induit le bourgeonnement des CE dans un modèle 3D de gel de

fibrine (160, 161). De plus, Ang1 favorise indirectement la migration des CE en interagissant avec les intégrines  $\alpha 5$  situées à la surface endothéliale (162). Ainsi, d'une manière indépendante à Tie2, Ang1 sert de support extracellulaire pour la migration des CE.

Comparativement à son activité chimiotactique sur les CE, l'effet mitogénique de Ang1 sur celles-ci est plus controversé. En effet, une étude récente a démontré que Ang1 induit la prolifération cellulaire (163), tandis que d'autres équipes de recherche ont rapporté que Ang1 a peu ou pas d'effet mitogénique sur les CE (159, 161, 164, 165). Par conséquent, il semble que des études supplémentaires soient nécessaires afin de mieux clarifier le rôle de Ang1 sur la prolifération des CE. Par ailleurs, Ang1 agit comme facteur de survie cellulaire en présence d'une variété de stimuli proapoptotiques en inhibant les caspases-3, -7 et -9 (166-170).

Outre ses effets proangiogéniques, il a été montré que Ang1 a un effet bénéfique sur le traitement de plusieurs conditions pathologiques comme l'arthrite rhumatoïde, l'oedème, la septicémie et l'athérosclérose (157, 171-173). L'aspect bénéfique de Ang1 dans ces maladies semble être médié par ces propriétés anti-inflammatoires. En effet, de récentes études ont rapporté que Ang1 favorise le recrutement à la jonction interendothéliale de *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) et atténue la phosphorylation de la *vascular endothelial-(VE)-cadhérine* augmentant ainsi la stabilité des jonctions endothéliales (174). De plus, Ang1 réduit l'adhésion chronique des neutrophiles aux CE induite par les cytokines proinflammatoires incluant le VEGF-A<sub>165</sub> et le *tumor necrosis factor  $\alpha$*

(TNF $\alpha$ ) en atténuant l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine) (171, 174).

D'autre part, notre laboratoire a montré que Ang1 possède des activités proinflammatoires aiguës. En effet, la stimulation des CE avec Ang1 a induit la synthèse endogène du PAF, la translocation endothéliale de la P-sélectine et l'adhésion transitoire et rapide des neutrophiles aux CE (127, 128). De plus, la stimulation des neutrophiles avec Ang1 a engendré la synthèse du PAF, l'activation de la  $\beta_2$ -intégrine (CD18) et l'adhésion transitoire des neutrophiles à la matrice extracellulaire (127). Une équipe de recherche indépendante a également rapporté que Ang1 induit la migration dirigée des neutrophiles et des éosinophiles (146, 147), une autre composante de la réponse inflammatoire aiguë. Il est intéressant de noter que Ang1 a inhibé l'activité chimiotactique du VEGF-A sur les neutrophiles et les éosinophiles supportant l'hypothèse que l'effet net des angiopoïétines dépend en partie de la présence additionnelle de facteurs de croissance, particulièrement du VEGF-A.

Dans certains modèles *in vitro*, Ang1 et Ang2 possèdent des activités biologiques similaires. Tout comme Ang1, il a été démontré que Ang2 engendre la migration orientée des cellules endothéliales, des neutrophiles et des éosinophiles (125, 146, 147). Aussi, Ang2 supporte directement l'adhésion des CE par l'entremise des intégrines  $\alpha_5$  et la formation de structures tubulaires (125, 162). Toutefois, seul Ang2 a stimulé la migration des cellules endothéliales progénitrices (EPC) et leur adhésion aux CE (175). Compte tenu que chez l'adulte Ang2 est présent presque exclusivement aux sites de néovascularisation, il a été suggéré que Ang2 pourrait contribuer à l'angiogenèse en recrutant les EPC aux sites de néovascularisation.

De plus, l'angiopoïétine-2 prévient l'apoptose et promeut la survie des CE (124, 176).

Les corps de Weibel-Palade contiennent des facteurs de la cascade de coagulation (le facteur de von Willebrand, le facteur XIIIa et *tissue plasminogen activator* (tPA)), des médiateurs de la réponse inflammatoire aiguë (Il-8, la P-sélectine et l'éotaxine) et des vasomodulateurs (endothéline 1, enzyme de conversion de l'endothéline et le *calcitonin-gene-related peptide*) (177). Récemment, Fiedler et coll. ont rapporté que Ang2 est également emmagasinée dans les corps de Weibel-Palade et que Ang2 co-localise avec le facteur de von Willebrand, mais pas avec la P-sélectine (138). Le facteur de von Willebrand est un élément clé de la cascade de coagulation et sa co-localisation avec Ang2 laisse croire que cette dernière pourrait avoir un rôle dans le maintien de l'homéostasie vasculaire. En effet, de récentes données suggèrent que Ang2 a des propriétés inflammatoires similaires à celle du VEGF-A<sub>165</sub>. Roviezzo et coll. ont rapporté que Ang2 induit une augmentation de la perméabilité vasculaire et le recrutement des neutrophiles *in vivo* chez la souris (126). En accord avec cette dernière observation, Ang2 promeut *in vitro* la migration des neutrophiles (146). Par contre, Ang2 atténue l'infiltration des leucocytes engendrée par le zymosan, un exemple supplémentaire de l'effet bivalent de Ang2 (126). Quant à son effet sur la perméabilité vasculaire, il a été suggéré que Ang2 emprunte la même voie intracellulaire que le VEGF-A<sub>165</sub> tel que démontré par l'absence d'un effet additif lorsque le VEGF-A<sub>165</sub> et Ang2 sont injectés simultanément à leurs concentrations maximales (126).

Par ailleurs, une étude récente a montré qu'Ang2 sensibilise les CE à répondre aux médiateurs inflammatoires (178). En effet, les souris  $Ang2^{-/-}$  ont été incapables de générer une réponse inflammatoire aiguë suite à une injection de thioglycollate ou de *staphylococcus aureus*, des médiateurs du recrutement leucocytaire. L'analyse des mécanismes de l'infiltration leucocytaire dans les souris  $Ang2^{-/-}$  a révélé une défaillance dans l'adhésion ferme des leucocytes aux CE. Ang2 favorise l'expression de ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine en sensibilisant les CE à répondre aux cytokines proinflammatoires incluant le TNF- $\alpha$  (178). L'ensemble de ces observations ouvre plusieurs perspectives intéressantes quant au rôle de Ang2 dans le maintien de l'homéostasie vasculaire.

Comparativement aux angiopoïétines 1 et 2, la fonction biologique des angiopoïétines 3 et 4 a été relativement peu étudiée et, à ce jour, aucune étude d'inactivation génique n'a été réalisée. Toutefois, il a été rapporté que Ang3 et Ang4 stimulent l'angiogenèse dans le modèle de la cornée chez la souris et que toutes deux sont capables d'induire la phosphorylation de Tie2 dans les CE de souris et d'humains, respectivement (140).

#### **1.4.5 Signalisation induite par les récepteurs Tie**

Règle générale, la signalisation des récepteurs tyrosines kinases est initiée par la dimérisation du récepteur médiée par le ligand suivie d'une autophosphorylation de certains résidus tyrosines, qui servent de poste d'ancrage pour des protéines d'échafaudage. Des résultats récents ont montré que la stimulation des CE avec Ang1 induit la phosphorylation du résidu Y1108 de Tie2 et le recrutement de *downstream-of-kinase-related* (Dok-R), qui à son tour est phosphorylé (179).

Ensuite, la forme phosphorylée de Dok-R mobilise d'autres protéines de signalisation cellulaire incluant *p21-activated kinase* (PAK) et la protéine adaptatrice Nck. De plus, Master et coll. ont montré que la surexpression de PAK dans les CE augmente la motilité cellulaire endothéliale (179).

De plus, Ang1 induit le recrutement de la sous-unité régulatrice de la PI3K (p85) au résidu phosphorylé Y1102 de Tie2 entraînant l'activation de la sous-unité catalytique de la PI3K (p110) et subséquemment, l'activation de Akt (133). L'inhibition pharmacologique de la PI3K a révélé sa contribution essentielle à plusieurs des activités biologiques médiées par Ang1 et Ang2 incluant la survie cellulaire (164, 176, 180), la migration des CE (125, 181) et la formation de tubules 3D (125, 182). Outre Akt, il a été démontré que la PI3K peut activer la FAK, eNOS, RhoA, Rac1, p38 et p42/44 MAPK (160, 182-184) et inhiber le facteur de transcription proapoptotique forkhead (FKHR) (167). Ang1 peut également activer p42/44 MAPK par la voie ras-dépendante (185) via la mobilisation de Grb2 au résidu Y1102 de Tie2 (186). Aussi, l'inhibition de la p42/44 MAPK réduit l'effet migratoire et anti-apoptotique de Ang1 sur les CE (184, 185). De plus, de récentes données rapportées par notre laboratoire ont montré que la stimulation des BAEC avec des concentrations modérées de Ang2 induit la phosphorylation de Akt, p38 et p42/44 MAPK d'une manière similaire à Ang1 (128). En appui, Harfouche et coll. ont rapporté que ces voies intracellulaires sont également activées par Ang2 dans les HUVEC (176).

Par ailleurs, la phosphorylation du résidu Y1113 de Tie2 par Ang1 permet le recrutement de *A20 binding inhibitor of NF- $\kappa$ B activation-2* (ABIN-2), qui sert de

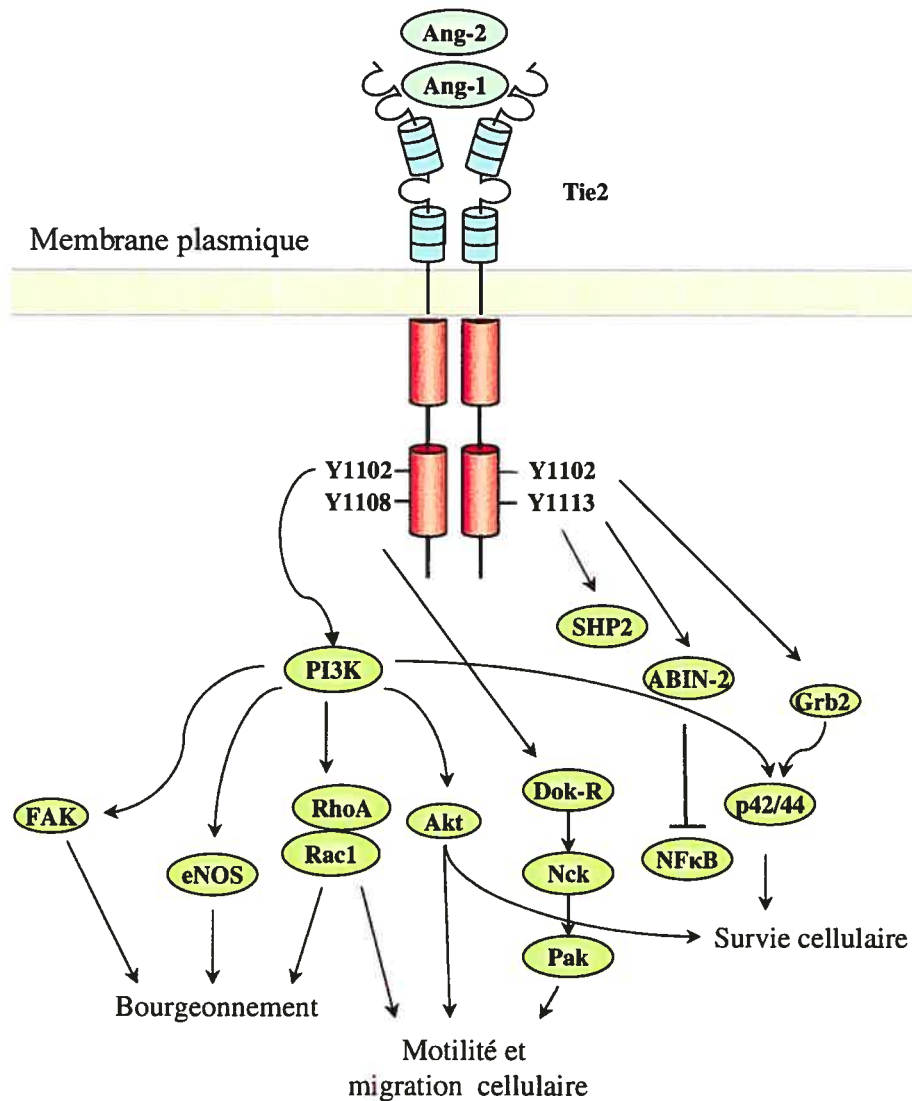


protéine régulatrice du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (187). Aussi, il a été démontré qu'Ang1 peut activer les *signal transducers and activators of transcription factor-3* (STAT-3) et *factor-5* (STAT-5) (188). De plus, plusieurs autres protéines pouvant s'associer à Tie2 ont été identifiées, mais dont les implications fonctionnelles n'ont pas encore été déterminées (Figure 5).

#### **1.4.6 Rôle des angiopoïétines dans l'angiogenèse tumorale et avenues thérapeutiques**

L'angiogenèse est un processus finement régulé présent lors de la réparation tissulaire, du cycle menstruel et du cancer, où les facteurs pro- et anti-angiogéniques peuvent être relâchés par les cellules cancéreuses, stromales, endothéliales et sanguines ainsi que par la matrice extracellulaire (189). Ces facteurs sont à la base de l'hypothèse de la transition angiogénique émise par Hanahan et Folkman (190). Ces derniers ont proposé que la transition angiogénique, qui apparaît généralement tôt dans le développement tumoral, est un phénotype que doit acquérir une tumeur pour se développer. De plus, ils ont suggéré que la transition est gouvernée par la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Il est maintenant accepté que la néovascularisation survient avant l'expansion clonale rapide associée au développement de tumeurs macroscopiques (190, 191).

Tanaka et coll. ont rapporté que l'Ang2 contribue à la transition angiogénique des tumeurs (192). Ces derniers ont suggéré que Ang2 déstabilise



**Figure 5: Représentation schématisée des voies de signalisation induites par l'activation de Tie2.** La liaison d'Ang1 ou Ang2 induit la dimérisation du récepteur Tie2 et l'autophosphorylation de certains résidus tyrosine, qui permet l'activation de la PI3K. Cette dernière induit à son tour l'activation d'Akt et de RhoA/Rac1 impliqués dans la motilité et la migration cellulaire. La PI3K peut aussi activer la FAK et la eNOS associées au bourgeonnement des vaisseaux sanguins. De plus, la survie cellulaire est médiée par p42/44 MAPK activée par via la PI3K et la voie Grb2/Ras/Raf. Finalement, une partie des effets anti-inflammatoires de Ang1 est due à sa capacité d'inhiber le facteur de transcription NFκB (adaptée de (133)).

les vaisseaux sanguins en induisant la perte des péricytes. Cette dénudation des vaisseaux, qui étaient au préalable quiescents, a pour effet de rendre les vaisseaux sensibles à l'effet des autres facteurs angiogéniques incluant le VEGF-A (191).

Quant à Ang1, son rôle est moins clair dans l'angiogenèse tumorale. L'expression de Ang1 est augmentée dans plusieurs tumeurs incluant les glioblastomes (193-195), le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (196-198) et dans certains cancers ovariens (199, 200). Toutefois, Hawighorst et coll. ont découvert que la surexpression de Ang1 dans un carcinome épidermoïde réduit de 70% la masse tumorale qui est caractérisée par peu de vaisseaux et ceux-ci présentent un phénotype plus mature dû à un nombre élevé de péricytes (201). L'explication de cette contradiction apparente réside dans la notion du *switch* angiogénique. En effet, à l'aide d'une méta-analyse, Tait et Jones ont observé une variation imprévisible de la quantité de Ang1 et Ang2 parmi les études et les types de cancer, mais ils ont rapporté une constance dans le ratio Ang2:Ang1, qui est augmenté dans la grande majorité des études supportant le concept de la transition angiogénique (132). Ainsi, une quantité plus élevée de Ang2 comparée à Ang1 entraîne une néovascularisation rapide et une tumeur plus proliférative et plus agressive, tandis qu'un ratio peu élevé induit une angiogenèse plus modérée et une tumeur moins invasive. Finalement, si la quantité d'Ang1 est supérieure à celle de Ang2 les tumeurs sont moins grosses et peu vascularisées (191).

Malgré le potentiel promoteur de Ang2 comme cible thérapeutique, à ce jour, aucun composé anti-angiogénique ciblant Ang2 n'a encore été rapporté dans la littérature. Toutefois, Tournaire et coll. ont rapporté que la courte séquence

peptidique NLLMAAS peut inhiber la liaison de Ang2 à Tie2 mais interfère aussi avec la liaison de Ang1 au récepteur Tie2 (202). La difficulté d'inhiber sélectivement Ang2 versus Ang1 réside en partie dans le fait qu'elles possèdent la même affinité et spécificité envers Tie2 (121). Aussi, l'utilisation d'un anticorps envers Ang2 apparaît plus prometteur tel que l'Avastatin pour le VEGF-A. Par ailleurs, il est possible de tirer avantage du fait que Ang2 apparaît de façon précoce sur l'endothélium perturbé par les cellules tumorales adjacentes. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps marqué et dirigé contre Ang2 pourrait servir de vecteur pour visualiser et repérer les tumeurs ou métastases non détectables ainsi que pour augmenter l'acuité de la chimiothérapie.

### **1.5 L'inflammation et l'angiogenèse**

Il est maintenant reconnu que l'angiogenèse et l'inflammation sont deux phénomènes mutuellement dépendants l'un de l'autre tant au niveau physiologique (réparation tissulaire) que pathologique (cancer, psoriasis et arthrite rhumatoïde) (203). Les tissus présentant une inflammation contiennent une quantité importante de cellules inflammatoires qui stimulent l'angiogenèse en relâchant des facteurs de croissance. D'autre part, la formation de nouveaux vaisseaux permet le maintien de l'inflammation en acheminant de nouvelles cellules inflammatoires et un apport accru en oxygène et nutriments (203). De fait, dans les modèles expérimentaux d'arthrite rhumatoïde, l'inhibition de l'angiogenèse atténue l'inflammation et à l'inverse, les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2) ainsi que les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) réduisent l'angiogenèse supportant la notion de codépendance entre l'angiogenèse et l'inflammation (204).

### 1.5.1 La réponse inflammatoire

La réaction inflammatoire se divise principalement en deux catégories : la réponse inflammatoire aiguë et la réponse inflammatoire chronique. Causée par une persistance de l'étiologie (bactérie, virus, réaction auto-immune), l'inflammation chronique succède à l'inflammation aiguë et conduit à plusieurs pathologies incluant l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'athérosclérose et la maladie de Crohn (205). Ces maladies sont caractérisées par une infiltration de leucocytes (monocytes/macrophages, lymphocytes et plasmocytes), une destruction tissulaire causée en partie par la relâche de métalloprotéases qui induisent la dégradation de la matrice interstitielle et une réparation tissulaire continue (angiogenèse, fibrose et prolifération des fibroblastes).

L'inflammation aiguë est définie comme la réponse physiologique locale d'un tissu à une agression (bactérie, brûlure, ischémie) et elle se manifeste par une rougeur, une tuméfaction, une sensation de douleur et de chaleur ainsi qu'à l'occasion par une perte de la fonction de l'organe. L'inflammation aiguë est orchestrée par de nombreux médiateurs inflammatoires qui peuvent être d'origine exogène (produits dérivés des bactéries et virus) ou endogène (cytokines, chimiokines et prostaglandines). Suite à l'agression, une première vague de médiateurs inflammatoires incluant le PAF, l'histamine, l'ATP, la bradykinine sont relâchés engendrant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité microvasculaire. Ces deux phénomènes induisent un accroissement de la pression hydrostatique et la formation d'œdème tissulaire. D'autre part, l'activation de l'endothélium par les médiateurs inflammatoires permet le recrutement de neutrophiles qui émigrent vers le site extravasculaire sous l'effet

de facteurs chimioattractants. Par la suite, s'il s'agit d'une infection bactérienne, les neutrophiles phagocytent l'agent microbien permettant ainsi la résolution de la réaction inflammatoire aiguë. Par contre, si cette dernière n'est pas résolue, elle se transforme en réaction inflammatoire chronique avec l'apparition de cellules mononuclées et l'établissement d'une boucle pernicieuse alternant entre réparation et destruction tissulaire.

### **1.5.2.1 L'hyperperméabilité microvasculaire**

Après une blessure thermique ou chimique à la peau, la perméabilité vasculaire augmente pour une phase initiale de 15 à 20 minutes, qui est suivie par une courte pause avant d'augmenter à nouveau pour plusieurs heures (206). Cependant, le type de réponse varie grandement en fonction de l'espèce animale, de l'organe et du stimulus affectant le tissu. Les médiateurs proinflammatoires comme l'histamine, la bradykinine, le PAF et le VEGF-A<sub>165</sub> induisent une hyperperméabilité similaire à la phase initiale décrite ci-dessus. À l'aide de la microscopie électronique, Majno et Palade ont montré que l'augmentation de la perméabilité médiée par l'histamine et la sérotonine est restreinte aux veinules (207, 208). En accord avec la précédente observation, d'autres études ont rapporté que le VEGF-A<sub>165</sub>, l'histamine, la sérotonine et la bradykinine induisent l'apparition de fenestrations au niveau des veinules post-capillaires (36, 209).

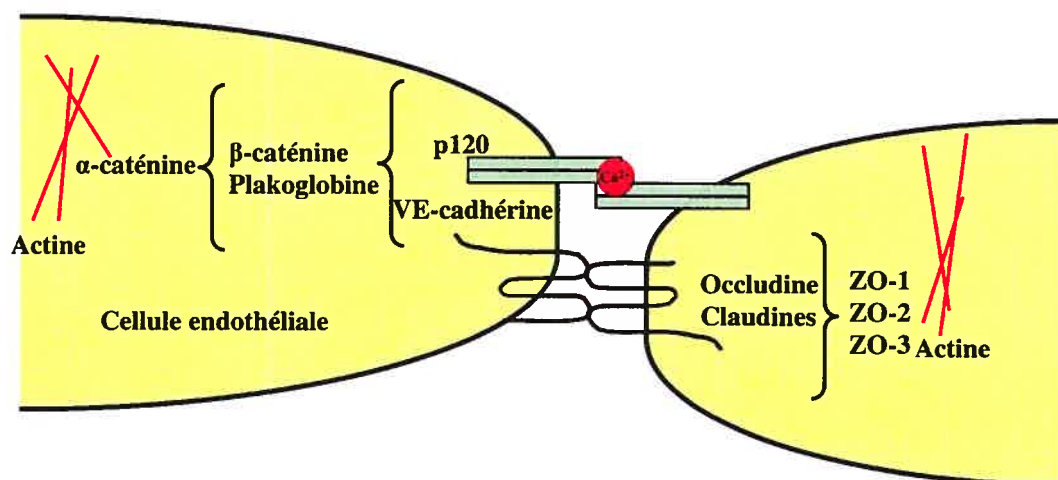
À partir de l'étude initiale de Majno et Palade, il a été suggéré que les fenestrations observées sont le résultat de la formation d'espaces intercellulaires due au relâchement des jonctions interendothéliales (208). En complément à cette hypothèse, Majno et Palade ont proposé que les espaces intercellulaires sont

généérés par la contraction des CE les éloignant ainsi l'une de l'autre (210). D'autre part, Dvorak et coll. ont également rapporté que le VEGF-A<sub>165</sub>, l'histamine et la sérotonine augmentent la perméabilité vasculaire par une route transcellulaire via les organelles vésiculovacuolaires (38). Toutefois, cette hypothèse a été peu approfondie au niveau moléculaire comparativement à celle liée aux espaces intercellulaires. Ainsi, il est généralement accepté que l'hyperperméabilité induite par les médiateurs inflammatoires est générée suite à la relâche des jonctions endothéliales combinée à une contraction des CE, bien que les deux hypothèses ne sont pas exclusives.

#### **1.5.2.2 Les jonctions interendothéliales**

Les deux principaux types de jonctions endothéliales sont les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. L'organisation des jonctions endothéliales varie tout au long de l'arbre vasculaire en fonction des besoins tissulaires. Par exemple, l'endothélium des veinules post-capillaires, qui permet un échange dynamique entre le milieu vasculaire et interstitiel, est composé principalement de jonctions adhérentes. À l'opposé, les CE de la barrière hématoencéphalique, qui requiert une étanchéité quasi complète, sont riches en jonctions serrées (211-214) (Figure 6).

Les jonctions serrées (*zona occludens*) sont localisées à l'apex des cellules épithéliales et endothéliales où elles forment une bande continue tout autour qui assure l'étanchéité. Les jonctions serrées sont formées de trois protéines extracellulaires: l'occludine, les claudines et la *junctional adhesion molecule* (JAM).



**Figure 6 : Organisation structurale des jonctions adhérentes ainsi que des autres protéines de la jonction interendothéliale.** La VE-cadhérine est une protéine transmembranaire des jonctions adhérentes. Par l'entremise de sa portion cytoplasmique, la VE-cadhérine est liée à la  $\beta$ -caténine, la p120 et la plakoglobine. La  $\beta$ -caténine et la plakoglobine s'associent à l' $\alpha$ -caténine, qui à son tour se lie au cytosquelette d'actine. Ces liaisons permettent l'ancrage de la jonction adhérente au cytosquelette. L'occludine et les claudines sont des protéines transmembranaires des jonctions serrées. Ces dernières sont fermement ancrées au cytosquelette via les protéines de la famille des zona-occludens (adaptée de (211)).



L'occludine et les claudines, qui composent une famille d'au moins 24 membres, sont responsables de l'étanchéité des jonctions serrées, tandis que JAM est impliquée dans la transmigration des leucocytes au travers de la monocouche endothéliale (212, 215). L'occludine et les claudines sont reliées au cytosquelette par plusieurs familles de protéines dont la mieux caractérisée est celle de la zonula occludens (ZO-1) (pour revue voir (212)). De récentes études ont montré que les jonctions serrées participent à la polarisation des CE et à la perméabilité paracellulaire (212). En effet, il a été démontré que la combinaison de l'interféron- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  augmente la perméabilité vasculaire suite à un réarrangement des jonctions serrées (216). Cependant, la faible expression des protéines de la jonction serrée dans les veinules post-capillaires (212), lieu principal de l'hyperperméabilité, laisse croire que les jonctions serrées ont un rôle marginal dans ce phénomène.

La VE-cadhérine, principale composante des jonctions adhérentes, est responsable de l'interaction cellule-cellule via la liaison homophile de son domaine extracellulaire (217). La partie carboxy-terminale de la VE-cadherine se lie à des protéines intracellulaires, incluant la  $\beta$ -caténine, la plakoglobine. Ces dernières par l'intermédiaire de leur liaison à l' $\alpha$ -caténine permettent l'ancrage de la VE-cadherine au cytosquelette d'actine stabilisant les jonctions interendothéliales. La partie intracellulaire de la VE-cadherine peut également s'associer à la p120, qui ne peut cependant lier l' $\alpha$ -caténine (212).

Récemment, il a été suggéré que la phosphorylation des protéines de la jonction adhérente contribue à l'apparition des fenestrations dans l'endothélium. En effet,

la stimulation d'une monocouche de CE avec les médiateurs inflammatoires (VEGF-A<sub>165</sub>, PAF, thrombine, histamine, TNF- $\alpha$ ) induit la phosphorylation de la partie intracellulaire de la VE-cadhérine ainsi que des composantes intracellulaires de la jonction adhérente (37, 218-220).

De plus, la phosphorylation de la VE-cadhérine est accompagnée d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (37) et dans certains cas, par la redistribution de la VE-cadhérine à partir de la jonction cellulaire (219, 221, 222). D'un autre côté, plusieurs études ont rapporté que la VE-cadhérine reste à la jonction cellulaire malgré une augmentation de la perméabilité vasculaire (37, 218). Néanmoins, dans tous les cas, la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine sont dissociées de leur ancrage au cytosquelette (223, 224).

Par ailleurs, les jonctions adhérentes sont aussi impliquées dans plusieurs autres fonctions endothéliales. Premièrement, la VE-cadhérine contribue à l'inhibition de contact entre les CE et l'arrêt de la prolifération des CE nécessaires à la formation d'une monocouche (225). D'une manière étonnante, la VE-cadhérine est aussi impliquée dans la survie cellulaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>/VEGFR-2 en amplifiant l'activation de la voie antiapoptotique PI3K/Akt (226). Finalement, en étroite collaboration avec le VEGFR-2, la VE-cadhérine agit à titre de senseur des forces de cisaillement (227).

### **1.5.2.3 Contraction endothéliale**

Outre la relâche des jonctions interendothéliales, l'hyperperméabilité est médiée par la contraction des CE, un mécanisme demandant l'interaction entre la myosine

et l'actine. Au niveau cellulaire, la contraction endothéliale se manifeste par la réorganisation de l'actine corticale, la polymérisation de l'actine en fibres de stress et l'association de la myosine non musculaire à l'actine. Ce dernier élément requiert la phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la chaîne légère de la myosine (MLC), qui induit un changement de conformation dans la myosine favorisant le glissement de la tête de myosine le long de l'actine.

La phosphorylation de la sous unité régulatrice de la MLC résulte, d'une part, de sa phosphorylation directe par la *myosin light chain kinase* (MLCK), et, d'autre part, de l'inhibition de la *myosin phosphatase type 1* (PP1M) par la voie de Rho kinase (228, 229). Ces deux événements sont sous le contrôle de deux voies distinctes. L'activation de la MLCK est médiée par le complexe calcium/calmoduline et/ou par  $p60^{src}$ . Quant à Rho kinase, celle-ci est activée en amont par RhoA. La contribution relative des deux voies signalétiques conduisant à la phosphorylation de la sous-unité régulatrice de la MLC n'est pas encore bien comprise. En effet, l'inhibition de la MLCK ou de la RhoA atténue de façon similaire l'augmentation de la perméabilité induite par la thrombine (230, 231).

Par ailleurs, il est reconnu que l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) inhibe la contraction endothéliale et par conséquent, favorise l'intégrité vasculaire (206). En effet, plusieurs études ont rapporté que l'AMPc et son effecteur principal, la protéine kinase A (PKA), protègent contre l'augmentation de la perméabilité induite par la thrombine, le *phorbol myristate acetate* (PMA) et le lipopolysaccharide (231-234). Il a été démontré que l'AMPc/PKA agit en inhibant la myosine par l'entremise de la MLCK et la phosphorylation de la VE-

cadhérine (231). Aussi, les agents activant la voie AMPc/PKA peuvent inhiber la formation des fibres de stress et l'activation de la Rho kinase (235) et réduire ainsi, la perméabilité vasculaire induite par l'histamine, la bradykinine et le PAF (236).

### 1.5.2.3 Rôle du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO), un médiateur soluble de faible poids moléculaire est impliqué dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques, incluant l'angiogenèse, l'agrégation plaquettaire, le tonus vasculaire et la perméabilité vasculaire (237). Le NO est généré par la famille des *nitric oxide synthase* (NOS), qui est composée de trois isoformes, la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). La eNOS et la nNOS sont exprimées de façon constitutive et leur activité enzymatique est régulée par le  $Ca^{2+}$  intracellulaire et par l'état de phosphorylation (76, 238, 239). De plus, l'interaction de la eNOS avec la calmoduline et la calvéoline-1 affecte son activation (75, 240). Quant à la iNOS, son expression est induite en condition inflammatoire chronique (heures) dans les cellules musculaires, endothéliales et immunitaires (241). En condition inflammatoire aiguë (minutes), la eNOS est impliquée dans l'hyperperméabilité vasculaire induite par plusieurs médiateurs inflammatoires. En effet, l'inhibition pharmacologique de la eNOS et son inactivation génique chez les souris atténuent la perméabilité vasculaire induite par l'histamine, l'ADP, la bradykinine, les ionophores, l'ATP, le PAF et le VEGF- $A_{165}$  (206). L'action proinflammatoire du NO semble être médiée par l'activation de la guanylate cyclase, une enzyme sensible au NO qui génère de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (242, 243). Les cibles moléculaires

de la voie NO/GMPc sont peu connues, mais il a été suggéré qu'une partie des effets pourrait être médiée par la protéine kinase G (PKG), une kinase dépendante du GMPc (244). D'un autre côté, il a été proposé que l'augmentation du GMPc stimule la phosphodiesterase II, qui dégrade l'AMPc et ainsi, diminuerait l'effet stabilisateur de la voie AMPc/PKA sur l'intégrité vasculaire (206, 245).

#### **1.5.2.4 Le PAF, médiateur inflammatoire**

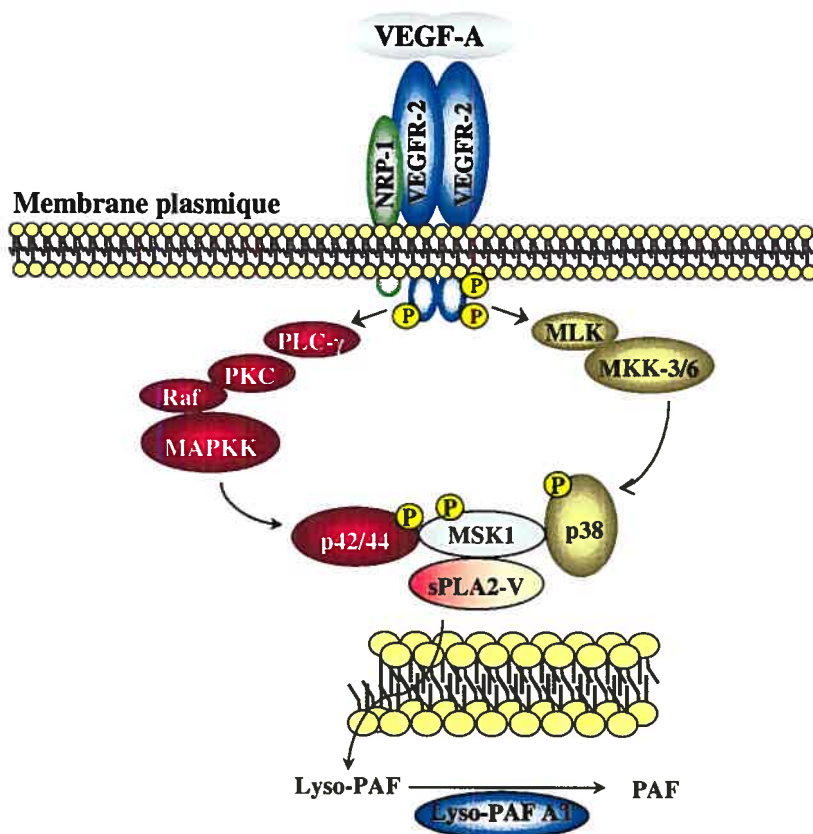
Identifié à partir d'extraits de leucocytes de lapin capable d'activer la fonction plaquettaire, le PAF est maintenant considéré comme un médiateur lipidique d'une multitude d'activités biologiques. Le PAF est produit par les cellules endothéliales, les leucocytes ainsi que d'autres cellules et agit comme un puissant médiateur de la réponse inflammatoire aiguë. Via ses récepteurs endothéliaux membranaires ou intracellulaires, le PAF induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire, la contraction des cellules et la relâche des jonctions endothéliales menant à l'hyperperméabilité (246-249). Un nombre grandissant d'évidences indique que le PAF participe à l'angiogenèse. Par exemple, *in vitro*, le PAF induit la migration des CE et la formation de tubes capillaires (246, 250). De plus, il a été rapporté que le PAF promeut la néovascularisation dans la cornée de souris, et ce, suite à l'induction d'une synthèse de VEGF (251).

De plus, il a été rapporté que le PAF joue un rôle important dans les fonctions biologiques du VEGF-A. En effet, les docteurs Sirois et Edelman ont démontré que le prétraitement des rats avec un antagoniste du PAF prévient l'exudation des protéines plasmatiques induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (252). De plus, ces derniers ont

rapporté que la stimulation des CE avec le VEGF-A<sub>165</sub> induit une synthèse de PAF (252). Des études subséquentes réalisées par notre laboratoire ont permis d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la synthèse du PAF (66, 105, 253-256). Le VEGF-A<sub>165</sub> par l'entremise du complexe VEGFR-2/NRP-1 active la voie de remodelage aboutissant à la synthèse de PAF. Suite à l'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1, les voies p38 et p42/44 MAPK sont activées et forment un complexe multiprotéique avec la *mitogen-and stress-activated protein kinase-1* (MSK1) et la phospholipase A<sub>2</sub> de type V permettant la synthèse du PAF (Figure 7). Il est à noter que le PAF peut être également généré par une voie *de novo*, mais cette dernière n'est pas impliquée dans la synthèse de PAF induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (257). En appui à la découverte initiale réalisée par Sirois et Edelman, un autre groupe de recherche a rapporté que la synthèse endothéliale de PAF est essentielle à l'angiogenèse tumorale induite par le VEGF-A<sub>165</sub> supportant l'hypothèse que le PAF est un médiateur des effets inflammatoires du VEGF-A<sub>165</sub> (258). En accord avec cette hypothèse, Rollin et coll. ont rapporté que la translocation de la P-sélectine à la surface endothéliale et l'adhésion subséquente des neutrophiles induite par le VEGF-A<sub>165</sub> sont médiées par la synthèse endothéliale du PAF (43) (Figure 7).

### **1.5.2.5 La cascade de l'infiltration leucocytaire**

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants et les premières cellules immunitaires retrouvées au foyer d'infection. L'infiltration leucocytaire vers le tissu enflammé est initiée par le roulement des neutrophiles à la surface de l'endothélium activé. En réponse aux médiateurs inflammatoires, les molécules d'adhésion sont exprimées à la surface des CE et des leucocytes favorisant

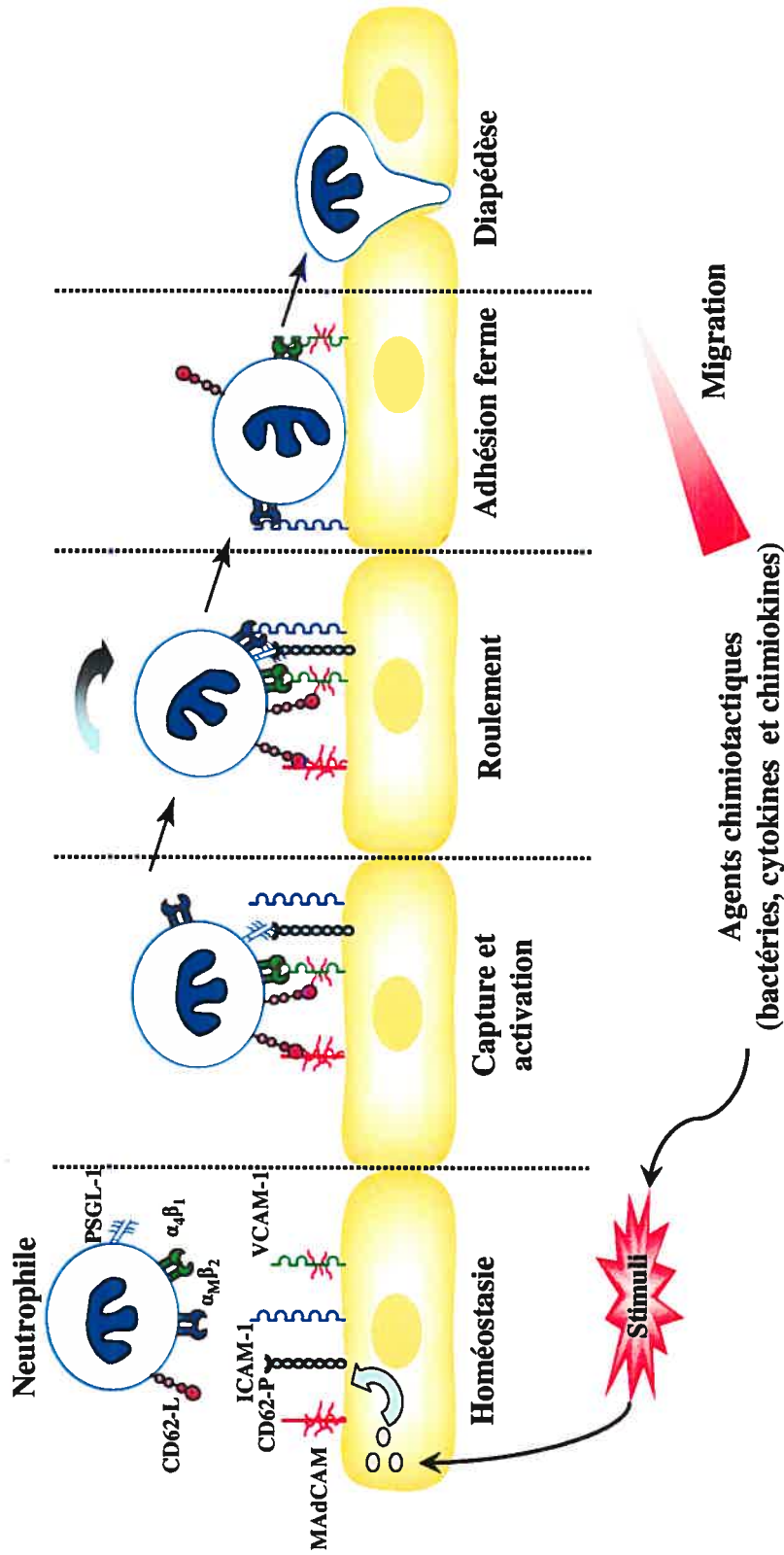


**Figure 7 : Représentation schématisée de la synthèse endothéliale de PAF induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.** La stimulation du VEGFR-2/NRP-1 par le VEGF-A<sub>165</sub> entraîne l'activation des voies p42/44, p38 MAPK et la sPLA2-V, qui forment un complexe multiprotéique avec la MSK1. Par la suite, sPLA2-V génère du lyso-PAF, qui, par la suite est converti en PAF suite à l'action de la lyso-PAF acétyl transférase (adaptée de (253)).

l'adhésion transitoire des leucocytes à l'endothélium. Cette première étape est principalement médiée par la famille des sélectines; L-sélectine (CD62L), exprimée de manière constitutive par les leucocytes; la E-sélectine (CD62E), dont l'expression endothéliale est induite par les médiateurs inflammatoires; et la P-sélectine (CD62P), entreposée dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des CE. Les sélectines interagissent avec leurs ligands oligosaccharidiques, *i.e.* CD34 pour CD62L, *E-selectin glycoprotein ligand-1* (ESGL-1) pour CD62E et *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) pour CD62P. Cette captation lâche des leucocytes à la surface endothéliale facilite leur activation et leur adhésion à la surface des veinules post-capillaires. De plus, la diapédèse des neutrophiles requiert la contribution additionnelle de *platelet endothelial adhesion molecule-1* (PECAM-1) (pour revue voir (259)).

L'adhésion ferme et la diapédèse des leucocytes sont dépendantes de l'activation des intégrines leucocytaires et de l'expression des molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines à la surface endothéliale. Les leucocytes activés par les médiateurs inflammatoires (IL-8, PAF et LPS) expriment à leur surface un hétérodimère formé de la  $\beta$ 2-intégrine (CD18) en association avec l'intégrine  $\alpha_L$  ou  $\alpha_M$ . Le principal ligand de la  $\beta$ 2-intégrine activée est la famille de molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines (ICAM), qui est formée de ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3. L'importance de l'interaction entre la  $\beta$ 2-intégrine et ICAM-1,-2 et -3 est illustrée par les individus présentant un déficit génique pour la  $\beta$ 2-intégrine (*Leukocyte adhesion deficiency, LAD-1*) qui souffrent d'infections graves et répétées dues à un défaut de recrutement des neutrophiles aux sites infectieux (pour revue voir (260)) (Figure 8).





**Figure 8 : Représentation de l'infiltration des leucocytes.** Suite à la stimulation des cellules endothéliales, ces dernières deviennent activées et expriment à leur surface la CD62P (P-sélectine) et MadCAM qui interagissent avec PSGL-1 et CD62L à la surface du neutrophile pour permettre le roulement des neutrophiles. Cette captation lâche des neutrophiles permet leur activation par les médiateurs inflammatoires. L'adhésion ferme et la diapédèse des neutrophiles sont médiées par les intégrines et les molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines. Après avoir transmigré, les neutrophiles migrent en direction d'un gradient de chemoattractants (adaptée de (66)).

### **1.5.2.6 La migration leucocytaire**

Une variété de cellules possèdent la capacité de répondre et de migrer en direction d'un agent chimioattractant. Ce phénomène est essentiel pour une multitude de processus incluant l'angiogenèse, la croissance neuronale, la réparation tissulaire et l'embryogenèse. Ce phénomène est bien illustré par la réponse chimiotactique des neutrophiles, qui migrent vers le site de l'inflammation. Lorsqu'ils sont exposés à un gradient d'agent chimioattractant, les neutrophiles se déplacent grâce à l'extension de pseudopodes accompagnée de la contraction et de la rétraction de la partie postérieure. Ce mouvement, dit amoéboïde, fait intervenir l'action concertée de plusieurs voies de signalisation permettant d'atteindre des vitesses allant jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  à la minute (261). Une autre caractéristique importante de la migration des neutrophiles réside dans le fait qu'ils répondent aux substances chimioattractantes en migrant d'un endroit avec une faible concentration de chimioattractants (*i.e.* la bordure des vaisseaux sanguins) vers un emplacement, où la concentration est plus élevée (*i.e.* le foyer d'infection ou d'inflammation). Cette migration orientée, nommée chimiotaxie, permet aux neutrophiles de localiser rapidement un site d'infection afin d'y phagocyter l'agent microbien.

### **1.5.2.7 Les facteurs chimioattractants**

La migration des neutrophiles peut être engendrée par une variété de composés de provenance endogène et exogène. De plus, les composantes des agents infectieux tels que les endotoxines et l'ARN double brin engendrent une vague de facteurs formés de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et TNF- $\alpha$ ) et de chimiokines. À leur tour les cytokines induisent la synthèse additionnelle de

facteurs chimioattractants (PAF, leucotriènes et chimiokines) générant une boucle d'amplification inflammatoire (262).

Les chimiokines (**chimi**otactiques cytokines) sont de petites protéines liant l'héparine et dirigeant, par l'entremise de leur récepteur à 7 domaines transmembranaires, le mouvement des leucocytes au site d'inflammation. À ce jour, plus 50 chimiokines ont été identifiées et regroupées en quatre familles. La famille la plus nombreuse est composée de chimiokines CC, nommées ainsi car les 2 premières de quatre cystéines sont adjacentes l'une à l'autre. Les membres les plus connus sont le *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1; CCL2), le *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ; CCL3) et RANTES (CCL5), qui agissent sur les éosinophiles, les monocytes, les basophiles et les lymphocytes T (263).

Les chimiokines CXC forment la seconde famille et possèdent un acide aminé entre les deux premières cystéines. L'interleukine 8 (CXCL8) est un prototype de cette famille et, comme la majorité des CXCL, attire les neutrophiles aux sites d'inflammation aiguë (263). De plus, CXCL8 est une chimiokine à caractère proinflammatoire qui induit l'hyperperméabilité microvasculaire et l'adhésion des neutrophiles et des monocytes à la surface endothéliale (264, 265).

La troisième famille, CX<sub>3</sub>C, dont les deux premières cystéines sont entrecoupées de trois résidus, est formée d'un seul membre, la fractalkine (266). Cette dernière a pour particularité d'agir comme molécule d'adhésion lorsqu'elle est liée à la membrane plasmique des CE et, comme agent chimioattractant quand elle est

clivée (267, 268). Quant à la dernière famille, elle est composée du facteur chimiotactique, la lymphotactine (XCL1) (269) (pour revue voir (263)).

#### 1.5.2.8 Les voies de signalisation impliquées dans la migration

La PI3K est une molécule-clé de la migration des neutrophiles induite par les chimiokines. L'activation de l'isoforme  $\gamma$  de la PI3K par les facteurs chimiotactiques est responsable de l'établissement du gradient intracellulaire de phosphatidylinositol (PtIns) 3,4,5-triphosphate nécessaire à l'orientation de la cellule vers le foyer d'infection. La PtIns 3,4,5-triphosphate permet aussi de phosphoryler et d'activer Akt. La fonction précise d'Akt dans la chimiotaxie des neutrophiles n'a pas encore été établie, mais chez *Dictyostelium*, une amibe, il a été démontré qu'Akt phosphoryle et active p21-activated kinase (PAK) qui est impliquée dans la régulation de la myosine (261). L'importance de la voie PI3K $\gamma$  est bien illustrée par son inactivation génique chez la souris où la chimiotaxie et la phosphorylation de Akt induites par CXCL8/IL-8, C5a et fMLP ont été fortement atténuées (270).

En dépit de cette réduction, les neutrophiles des souris PI3K $\gamma^{-/-}$  peuvent toujours migrer vers les chemoattractants et, en nombre suffisamment important pour suggérer l'existence d'une autre voie. En effet, il a été démontré que la voie p38 MAPK participe à la chimiotaxie des neutrophiles humains et de souris (271, 272), mais ses cibles moléculaires n'ont pas encore été bien définies (273). Par analogie avec son rôle dans la migration des cellules endothéliales, il est plausible que la p38 MAPK contribue à la polymérisation de l'actine chez les neutrophiles. Parmi les cibles potentielles, Rac, p21-activated kinase (PAK), PAK-interacting

*exchange factor* (PIX $\alpha$ ) et Cdc42 ont toutes été impliquées dans l'organisation et la polymérisation de l'actine lors de la chimiotaxie des neutrophiles (261, 273-275).

ERK1/2 est aussi exprimée dans les neutrophiles et peut être activée par plusieurs chimioattractants incluant CXCL8/IL-8 et fMLP (273). De récentes études ont rapporté que l'inhibition pharmacologique de ERK1/2 n'a pas affecté (276-278) ou partiellement (279, 280) la migration des neutrophiles induite par le fMLP suggérant que ERK1/2 ne joue pas un rôle majeur. Quant à son implication dans l'effet chimiotactique de CXCL8/IL-8, les données actuelles sont contradictoires indiquant la nécessité d'effectuer des études supplémentaires (281, 282).

Par ailleurs, les voies PI3K et p38 MAPK jouent un rôle important dans l'orientation du neutrophile dans le cas où deux chimioattractants sont localisés de part et d'autre. Il a été démontré que les neutrophiles se dirigent prioritairement vers l'agent qualifié de cible primaire (fMLP et C5a) versus l'agent secondaire (CXCL-8/IL-8 et le LTB<sub>4</sub>), qui est produit par l'hôte. Afin d'expliquer cette préférence des neutrophiles, Heit et coll. ont proposé la notion de hiérarchie intracellulaire entre les chimioattractants (283). En effet, ces derniers ont montré que les chimioattractants primaires activent la voie p38 MAPK, qui inhibe la voie PI3K requise aux chimioattractants secondaires pour induire la migration des neutrophiles.

## **1.6 Contexte de la recherche**

Un nombre grandissant d'études supportent l'hypothèse que l'inflammation contribue au développement et au maintien de l'angiogenèse physiopathologique. Cette contribution peut s'observer à différents niveaux, par exemple, l'apport de facteurs angiogéniques par les cellules inflammatoires. Pour notre part, au cours des dernières années, nous avons étudié plus spécifiquement les propriétés inflammatoires des facteurs de croissance incluant le VEGF et les angiopoïétines. De surcroît, nous avons identifié certaines des voies intracellulaires contribuant aux activités proinflammatoires de ces facteurs de croissance endothéliaux.

### **1.6.1 But du premier projet de recherche**

Notre laboratoire a démontré que le VEGF-A<sub>165</sub> induit la synthèse endothéliale du PAF et, a délimité les voies intracellulaires nécessaires à la synthèse de ce puissant médiateur inflammatoire. De plus, notre laboratoire ainsi que des équipes de recherche indépendantes ont rapporté que le PAF peut médier certaines propriétés inflammatoires du VEGF-A incluant l'adhésion des neutrophiles et l'hyperperméabilité vasculaire (43, 252, 258). En effet, les docteurs Sirois et Edelman ont rapporté que le prétraitement de rats avec un antagoniste des récepteurs du PAF prévient l'exsudation des protéines induite par le VEGF-A<sub>165</sub> et ce, dans tous les organes examinés (252). D'un autre côté, tout comme le PAF, il a été suggéré que le NO est un médiateur des effets inflammatoires du VEGF-A<sub>165</sub> portant une ambiguïté quant à la contribution de ces médiateurs dans l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Par conséquent, le but de ce projet de recherche était de délimiter le rôle du PAF et du NO dans la perméabilité vasculaire induite par les membres de la famille du VEGF.

### **1.6.2 But du second projet de recherche**

L'activation de Tie2 à la surface endothéliale par Ang1 et Ang2 engendrent plusieurs activités proinflammatoires notamment la synthèse de PAF, la translocation de la P-sélectine, l'adhésion transitoire des neutrophiles et l'hyperperméabilité vasculaire (127, 128). Or, une récente étude réalisée par notre laboratoire a démontré l'expression de Tie2 à la surface des neutrophiles. De plus, nous avons rapporté que l'activation de Tie2 par Ang1 et Ang2 induit aussi des activités proinflammatoires, incluant la synthèse endogène de PAF, l'activation de la  $\beta$ 2-intégrine et l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire (127). Ainsi, nous avons voulu déterminer si les angiopoïétines pouvaient moduler d'autres aspects de la réaction inflammatoire aiguë, plus particulièrement la migration des neutrophiles et le cas échéant, déterminer les voies intracellulaires impliquées.

**2.0 ARTICLE #1**



## ACCORD DES COAUTEURS

### *A) Déclaration des coauteurs d'un article*

#### **1. Identification de l'étudiant et du programme**

Alexandre Brkovic,  
Ph.D. Pharmacologie, 3-520-1-0

#### **2. Description de l'article**

**Auteurs** : Alexandre Brkovic et Martin G. Sirois.

**Titre** : Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo:  
Role of endogenous PAF and NO synthesis

**Revue** : Journal of Cellular Biochemistry

**État actuel de l'article** : Article accepté pour publication le 31-Jul-2006

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Alexandre Brkovic inclue cet article dans **sa thèse de doctorat** qui a pour titre *Activités Proinflammatoires du VEGF et des Angiopoïétines*.

Martin G. Sirois

---

Coauteur

Signature

Date

Permission de l'éditeur de la revue

**Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo:  
Role of endogenous PAF and NO synthesis**

Alexandre Brkovic and Martin G. Sirois\*

Research Center, Montreal Heart Institute, Department of pharmacology,  
Université de Montréal, Montreal (QC), Canada

Running head: VEGF increases vascular permeability through PAF and NO  
synthesis

Key words: **VEGF analogs, VEGF receptors, PAF, NO, vascular permeability**

Figure: 5

Table: 1

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. Alexandre Brkovic is recipient of doctoral studentship from Fonds de la recherche en santé du Québec, Dr. Sirois is recipient of a scholarship from CIHR.

\*Correspondence should be addressed to:

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

## 2.1 ABSTRACT

We previously reported that vascular endothelial growth factor (VEGF) increases vascular permeability through the synthesis of endothelial platelet activating factor (PAF), while others reported the contribution of nitric oxide (NO). Herein, we addressed the contribution of VEGF receptors and the role played by PAF and NO in VEGF-induced plasma protein extravasation. Using a modified Miles assay, intradermal injection in mice ears of VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>121</sub> and VEGF-C (1  $\mu$ M) which activate VEGFR-2 (Flk-1) receptor increased vascular permeability, whereas a treatment with VEGFR-1 (Flt-1) analogs; PlGF and VEGF-B (1  $\mu$ M) had no such effect. Pretreatment of mice with PAF receptor antagonist (LAU8080) or endothelial nitric oxide synthase (eNOS) inhibitor (L-NAME) abrogated protein extravasation mediated by VEGF-A<sub>165</sub>. As opposed to PAF (0.01-1  $\mu$ M), treatment with acetylcholine (ACh; up to 100  $\mu$ M; inducer of NO synthesis) or sodium nitroprusside (SNP; up to 1  $\mu$ M; NO donor) did not induce protein leakage. Simultaneous pretreatment of mice with eNOS and protein kinase A (PKA) inhibitors restored VEGF-A<sub>165</sub> vascular hyperpermeability suggesting that endogenous NO synthesis leads to PKA inhibition, which support maintenance of vascular integrity. Our data demonstrate that VEGF analogs increase vascular permeability through VEGFR-2 activation, and that both endogenous PAF and NO synthesis contribute to VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability. However, PAF but not NO directly increases vascular permeability *per se*, thereby, suggesting that PAF is a direct inflammatory mediator, whereas NO serves as a cofactor in VEGF-A<sub>165</sub> proinflammatory activities.

## 2.2 INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key modulator of angiogenesis promoting endothelial cell (EC) migration, proliferation and survival. In addition, VEGF possesses inflammatory properties by its capacity to mediate microvascular permeability increase and adhesion of leukocytes [Senger, 1983; Melder, 1996; Detmar, 1998]. There is at least five different VEGF homodimeric isoforms of 206, 189, 165, 145 and 121 amino acids, and termed as VEGF-A<sub>206</sub>, 189, 165, 145 and 121 which are produced from a single gene by alternative splicing [Jussila, 2002]. VEGF family includes also several members such as placental growth factors (PlGF-1 and -2), VEGF-A, -B, -C, -D and a viral homolog, VEGF-E. The actions of VEGF family members are mediated by the activation of tyrosine kinase receptors including VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR), which are expressed majoritary on EC, and VEGFR-3 (Flt-4), which is mainly limited to the lymphatic endothelium [Jussila, 2002]. VEGF-A binds to VEGFR-1 and VEGFR-2; PlGF-1, PlGF-2 and VEGF-B bind to VEGFR-1; VEGF-C and D bind to VEGFR-2 and R-3; whereas VEGF-E interacts only with VEGFR-2 [Jussila, 2002]. Recent studies also reported that neuropilin-1 (NRP-1), a transmembrane receptor, acts as a coreceptor, complexing with VEGFR-1 and VEGFR-2. NRP-1 specifically enhances the binding of VEGF-A<sub>165</sub> to VEGFR-2 and potentiates various VEGF-A<sub>165</sub> biological activities [Bernatchez, 2002; Rollin, 2004; Soker, 1997; Bernatchez, 2002]. Such selectivity is attributable to the presence of VEGF-A exon 7 in VEGF-A<sub>165</sub>, a domain that is lacking in VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-C, VEGF-D and PlGF-1 [Soker, 1997]

We previously reported that VEGF-A<sub>165</sub> increases vascular permeability through the synthesis of endothelial platelet-activating factor (PAF). Under *in vivo*

condition, VEGF-A<sub>165</sub>-mediated protein extravasation was prevented by a pretreatment with a PAF receptor antagonist. Our observation was supported by the capacity of VEGF-A<sub>165</sub> to induce a rapid and transient PAF synthesis in cultured endothelial cells [Sirois, 1997]. However, there is little information defining how PAF might contribute to the modulation of endothelial integrity under VEGF stimulation. The endothelial cell-cell interaction is maintained by junctional proteins and focal adhesion complexes that are anchored to the cytoskeleton.

Integrins interact with the cytoskeleton through intracellular linker proteins, such as paxillin, talin, vinculin,  $\alpha$ -actinin and focal adhesion kinase (FAK), and their extracellular domains bind to respective matrix components [Wu, 2005]. Recently, it has been reported that thrombin and VEGF-A phosphorylates FAK and that inhibition of FAK activation attenuates the microvascular hyperpermeability response [Wu, 2003; Shikata, 2003].

Vascular endothelial (VE)-cadherin is connecting adjacent EC through a calcium-dependent homophilic binding of its extracellular domain whereas its intracellular domain interacts with the actin cytoskeleton via a family of catenins, including  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenins,  $\alpha$ -actinin and vinculin [Bazzoni, 2004]. Interestingly, stimulation of EC either with VEGF-A<sub>165</sub> or PAF induces a rapid and transient phosphorylation of VE-cadherin and the dissociation of adherens junction leading to gap formation [Kevil, 1998; Esser, 1998; Hudry-Clergeon, 2005; Potter, 2005], thereby, suggesting that endogenous PAF formation is involved in VEGF-mediated VE-cadherin phosphorylation. The cytoplasmic domains of integrins interact with the cytoskeleton either directly or indirectly through intracellular

linker proteins, such as paxillin, talin, vinculin and  $\alpha$ -actinin, and their extracellular domains bind to respective matrix components.

On the other hand, it has also been reported that nitric oxide (NO) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production are contributing to VEGF-A<sub>165</sub>-induced vascular hyperpermeability [Murohara, 1998; Mayhan, 1999]. However, as opposed to PAF, the capacity of intracellular NO synthesis to promote vascular permeability is more ambiguous. For instance, by using NO donors, different studies reported that NO promote vascular leakage [Fujii, 1999; Gimeno, 1998], whereas others did not detect such effect [Murohara, 1998; Feletou, 1996; Klabunde, 2000]. Similar conflicting results are also observed with cGMP analogs, which increase basal permeability in isolated vessels, but attenuate vascular hyperpermeability mediated by various inflammatory agents. Such discrepancies remain elusive, but might result from differences in species, organs, involvement of leukocytes and hemodynamic factors.

In the present study, we wanted to define how VEGF analogs are modulating vascular permeability increase and investigate the contribution of PAF and NO.

### 2.3 MATERIAL AND METHODS

*Materials:* Vascular endothelial growth factor-A<sub>165</sub> (VEGF-A<sub>165</sub>) was purchased from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ), VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, placental growth factor-1 (PlGF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) were purchased from R&D (Minneapolis, MN). Sodium nitroprusside (SNP), acetylcholine (ACh), phenylephrine, Evans blue dye (EB), formamide, PAF and the following inhibitors: H-89 (ODQ) and N<sub>ω</sub>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). SU1498 and CV3988 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and BIOMOL (Plymouth Meeting, PA), respectively. LAU8080 (formerly known as BN50730) was generously provided by Dr. Nicolas Bazan (Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, LA).

*Cell culture:* Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated by collagenase treatment from fresh umbilical cords, seeded on gelatin-coated (0.25%) plates and cultured in endothelial growth medium-2 (EGM-2; Cambrex, Walkersville, MD) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Mediacorp, Montreal, QC, Canada) and antibiotics. HUVEC were used at passage 1.

*Vascular permeability studies:* EB dye binds specifically to albumin and is used to study vascular permeability to macromolecules [Rogers, 1989]. The procedures were performed by one trained operator in accordance to the guidelines set by the Montreal Heart Institute animal care committee and the Canadian Council for Animal Protection. CD1 mice (18-22 g body weight) (Charles River Breeding Laboratories; Saint-Constant, Quebec, Canada) were anesthetized with an



intraperitoneal injection of ketamine HCl (100 mg/kg) and xylazine HCl (10 mg/kg). The mice received a bolus injection of EB dye (20 mg/kg) in the caudal vein. This was followed 30 minutes later by an intradermal injection in mice ears of VEGF-A<sub>165</sub> (4, 40 or 400 ng/10  $\mu$ l; final concentration 0.01, 0.1 or 1  $\mu$ M, respectively), VEGF-A<sub>121</sub>, -B, -C, -D, PlGF-1 (1  $\mu$ M), bFGF (1  $\mu$ M), PAF (0.01, 0.1 and 1  $\mu$ M), SNP (1  $\mu$ M), ACh (up to 100  $\mu$ M) or PAF plus SNP (0.01 and 1  $\mu$ M, respectively). In another set of experiments, mice were treated with PAF receptor antagonist (LAU8080; 20 mg/kg [Ma, 2004]), VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 20 mg/kg; [Weis, 2004]), nitric oxide inhibitor (L-NAME; 20 mg/kg; [Murohara, 1998]), guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 20 mg/kg; [Cerwinka, 2002]) and protein kinase A inhibitor (H-89; 4 and 40  $\mu$ g/kg [Sanada, 2001]) co-administered with EB dye. Mice were sacrificed 60 minutes after the injection of agonists in the ears. The ears were dissected and EB dye extracted in formamide (4 ml/g wet weight for 24 hours). The concentration of EB dye was determined by spectrophotometry (620 nm wavelength) against a standard curve and expressed as micrograms of EB dye.

*Microscopy and image analyses:* Pictures of the arteriovenous system of mice ears were taken at different magnifications (8.4X, 12X, 24X, 38.4X and 48X) with a color videodigital camera (Sony DKC 5000) adapted to a stereomicroscope (Olympus SZX12). The surface of each vessel was calculated by computerized digital planimetry with a custom software (NIH image 1.6). Vascular tone was assessed at 0, 30 and 60 minutes following a bolus injection of L-NAME (20 mg/kg). The vasoconstrictor effect of L-NAME on the arteriovenous system of mice ears was reproduced by an intravenous infusion of phenylephrine (Phe; 0.1

mg/ml) at a constant rate (0.8 ml/hr). Phenylephrine infusion was initiated, and when similar constriction was reached as compared to L-NAME, VEGF-A<sub>165</sub> was injected in mice ears.

*Western blot analysis VE-cadherin phosphorylation:* HUVEC were starved for 6 hours with EBM-2 containing 1% FBS and antibiotics. HUVEC were stimulated with VEGF-A<sub>165</sub> (1 nM) or SNP (1  $\mu$ M) for various periods of time. In another set of experiments, HUVEC were pretreated with either SU1498 (10  $\mu$ M), LAU8080 (10  $\mu$ M), L-NAME (100  $\mu$ M) or ODQ (10  $\mu$ M) for 15 minutes prior to stimulation with VEGF-A<sub>165</sub> (1 nM) for 45 minutes. Western blots analyses were performed as described previously [Rollin, 2004]. Briefly, cells were rinsed with cold PBS containing depolymerized Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (2 mM) and lysed in ice cold lysis buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors. Cell lysates (500  $\mu$ g) were immunoprecipitated with a mouse monoclonal VE-cadherin IgG (2  $\mu$ g; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a PVDF membrane, and probed with a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine IgG (clone 4G10, 1:1000 dilution; Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY). Membranes were stripped using Re-Blot Plus Strong stripping solution (Chemicon Int., Temecula, CA) and reprobed with a monoclonal VE-cadherin IgG (1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Bands were visualized using LumiGlo™ (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA).

*Statistical analysis:* Data are presented as the mean + S.E. Statistical comparisons were made by analysis of variance followed by a Bonferroni's *t* test for multiple comparisons. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 2.4 RESULTS

*Effect of VEGF analogs and corresponding receptors on microvascular permeability:* Using VEGF analogs, we assessed the contribution of VEGF receptors on the modulation of vascular permeability in a modified EB dye Miles assay. Intradermal injection of VEGF-A<sub>165</sub> (0.01, 0.1 and 1  $\mu$ M) in mice ears increased within 60 minutes EB dye extravasation by 47, 160 and 320% as compared to control PBS-treated mice. VEGF-A<sub>121</sub> (1  $\mu$ M), which like VEGF-A<sub>165</sub> binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 but not to NRP-1 coreceptor increased microvascular permeability by 109% (Figure 1). Treatment with VEGF-C and VEGF-D (1  $\mu$ M; VEGFR-2 and R-3 analogs) increased EB dye exsudation by 107% and 79%, respectively, whereas a treatment with VEGF-B and PlGF-1 (1  $\mu$ M; VEGFR-1 analogs) had not significant effect. Treatment with bFGF (1  $\mu$ M) was used as negative control, and did not promote vascular permeability increase (Figure 1).

*Implication of PAF and NO in VEGF-induced microvascular permeability:* We previously showed that PAF is involved in VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability increase whereas others showed the contribution of NO [Mayhan, 1999; Murohara, 1998]. In addition, VEGF-A<sub>165</sub> can promote a rapid and transient synthesis of PAF and NO in EC [Sirois, 1997; Montrucchio, 2000; Murohara, 1998]. Thus, we wanted to delineate how PAF and NO are contributing to VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability increase. Intradermal injection of PAF (0.01, 0.1, 1  $\mu$ M) led to a concentration-dependent extravasation of EB dye by 363, 1005 and 1263% as compared to PBS-treated mice (Figure 2). Treatment with PAF (0.01  $\mu$ M) resulted in a similar vascular permeability

increase as observed with VEGF-A<sub>165</sub> (1  $\mu$ M), and was used for subsequent studies implying stimulation with PAF. Pretreatment with PAF receptor antagonist (LAU8080 or CV3988; 20 mg/kg, i.v.) 30 minutes prior to subcutaneous injection of PAF (0.01  $\mu$ M), abrogated PAF-mediated vascular permeability increase. We also wanted to assess the contribution of NO production on PAF-mediated hyperpermeability. Pretreatment with eNOS inhibitor (L-NAME; 20 mg/kg; i.v.) 30 minutes prior to subcutaneous injection of PAF (0.01  $\mu$ M) abrogated as well PAF-mediated vascular permeability increase. In another set of experiments, we combined PAF (0.01  $\mu$ M) with an exogenous NO donor (SNP; 1  $\mu$ M), and observed that SNP did not synergize PAF inflammatory activity (Figure 2).

Treatment with a nitric oxide donor (SNP up to 1  $\mu$ M) [Murohara, 1998] or with an inducer of NO production (ACh up to 100  $\mu$ M) [Feletou, 1996] were unable to promote vascular permeability increase (Figure 3). We then assessed the contribution of PAF and NO on microvascular permeability increase mediated by VEGF analogs (VEGF-A<sub>165</sub> and VEGF-C; 1  $\mu$ M). Pretreatment with either LAU8080 (20 mg/kg) or L-NAME (20 mg/kg) prevented vascular permeability increase mediated by VEGF-A<sub>165</sub> and VEGF-C (Figure 3).

*Assessment of L-NAME vasoconstrictor effect on VEGF-induced vascular permeability:* Inhibition of eNOS activity with L-NAME obliterates NO vasodilatory effect over basal tone and results in an arteriovenous constriction [Rees, 1990]. One might suggest that L-NAME inhibitory effect on vascular permeability increase was the result of L-NAME vasocontractile activity. Thus, we assessed how a bolus injection of L-NAME affected the arteriovenous tone in

mice ears. Thirty minutes following a bolus injection of L-NAME (20 mg/kg, i.v.), arterioles and venules surfaces were reduced, representing  $77.0 \pm 5.5$  and  $81.0 \pm 0.5\%$  of the initial surface area, respectively. Sixty minutes post-infusion, corresponding surfaces were at  $74.2 \pm 4.2$  and  $86.0 \pm 5.4\%$ , respectively as compared to basal surface (Table I). Based on these values, we performed a similar vasoconstriction of the arteriovenous system in mice ears by performing a sustained intravenous infusion of Phe (0.1 mg/ml at 0.8 ml/h) (Table I). Treatment with Phe did not alter the basal vascular permeability as compared to control mice ( $1.9 \mu\text{g} \pm 0.19$  vs  $1.34 \mu\text{g} \pm 0.16$ , respectively), and did not affect VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability ( $5.90 \mu\text{g} \pm 0.16$  vs  $5.64 \mu\text{g} \pm 0.78$ , respectively) as opposed to L-NAME pretreatment (Table I).

To identify the contribution of NO downstream effectors, a group of mice were pretreated with a NO-sensitive guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 20 mg/kg), which completely abolished VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular permeability. Since protein kinase A (PKA) has a barrier-tightening function on basal microvascular permeability, we assessed its role in VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein leakage. Pretreatment of mice with a PKA inhibitor (H89; 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) did not further increase VEGF-A<sub>165</sub>-induced permeability. However, coadministration of H89 (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) with L-NAME restored almost completely VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular permeability (Figure 4). Since a treatment with H-89 restored VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular permeability in the presence of L-NAME, we wanted to assess if H-89 in presence of PAF receptor antagonist (LAU8080) would restore VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability increase. The combination of H-89 with LAU8080 did not affect the blockade of VEGF-A<sub>165</sub> hyperpermeability mediated by LAU8080 (data not shown).

*Role of PAF and NO in VEGF-A<sub>165</sub>-mediated VE-cadherin phosphorylation:*

Microvascular hyperpermeability is associated with a redistribution of endothelial cell *adherens* junction proteins [Bazzoni, 2004]. Since, both VEGF-A<sub>165</sub> and PAF can induce phosphorylation of VE-cadherin and, that NO is implicated in VEGF-A<sub>165</sub>-mediated VE-cadherin redistribution, we assessed the contribution of PAF and NO in VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF-A<sub>165</sub>. Treatment of HUVEC with VEGF-A<sub>165</sub> ( $10^{-9}$  M) induced a transient phosphorylation of VE-cadherin starting at 30 minutes, reaching maximal phosphorylation at 45 minutes, and returning to basal level within 120 minutes (Figure 5a). Treatment of HUVEC with a VEGFR-2 inhibitor (SU1498;  $10^{-6}$  M) 15 minutes prior to VEGF-A<sub>165</sub> stimulation for 45 minutes abrogated VE-cadherin phosphorylation (Figure 5b). Treatment with LAU8080 ( $10^{-5}$  M) abolished VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF-A<sub>165</sub> whereas a treatment with L-NAME ( $10^{-4}$  M) or with ODQ ( $10^{-5}$  M) provided a partial inhibition (68 and 62%, respectively) of VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF-A<sub>165</sub> (Figure 5b).

## 2.5 DISCUSSION

In the current study, we observed that the increase of vascular permeability mediated by VEGF analogs was maximal under VEGF-A<sub>165</sub> stimulation through the activation of VEGFR-2/NRP-1 complex. Using selective PAF receptor antagonists and inhibitors of NO/cGMP pathway, we observed that both PAF and NO are essential to VEGF-mediated vascular hyperpermeability, despite that only PAF showed a direct inflammatory activity.

### **Contribution of VEGF receptors in vascular hyperpermeability**

To assess the contribution of VEGF receptors and NRP-1 coreceptor in VEGF-induced vascular permeability, we used a selective receptor-agonist approach. Intradermal injection of VEGFR-2 agonists (VEGF-A<sub>165</sub>, -A<sub>121</sub>, -C and -D) promoted exudation of vascular macromolecules, whereas a treatment with selective VEGFR-1 agonists (PlGF-1 and VEGF-B) had no such effect. Since VEGF-C and -D have the capacity to bind as well to VEGFR-3, one might suggest that VEGF-C and -D inflammatory activities can be mediated through VEGFR-3 activation. However, it has been reported that VEGF-C mutant ( $\Delta$ NAC156S-VEGF), a selective VEGFR-3 agonist, lost its property to promote vascular permeability [Joukov, 1998]. Thus, our data and previous reports demonstrate that VEGFR-2 activation is essential to vascular permeability increase [Kondo, 1995; Cao, 2004; Joukov, 1998].

Intradermal injection of VEGF-A<sub>165</sub> was about three times more potent than VEGF-A<sub>121</sub>, -C and -D to promote EB dye leakage, demonstrating that NRP-1 enhances VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular hyperpermeability. Our data are in agreement with previous reports demonstrating that NRP-1 potentiates VEGF-

A<sub>165</sub> effects upon VEGFR-2 activation, such as EC migration, proliferation, PGI<sub>2</sub> and PAF synthesis [Bernatchez, 2002; Neagoe, 2005; Rollin, 2004; Soker, 1997].

### **Contribution of PAF and NO/cGMP pathway in VEGF vascular hyperpermeability**

We previously showed that a pretreatment of rats with PAF receptor antagonist BN52021 (10 mg/kg) abolished EB dye leakage mediated by VEGF-A<sub>165</sub> intravenous injection. On the other hand, [Murohara, 1998] reported that another PAF receptor antagonist; CV6209 (2 mg/kg) failed to prevent vascular permeability increase upon intradermal injection of VEGF-A<sub>165</sub> in guiney pig skin. In the present study, two additional PAF receptor antagonists, CV-3988 and LAU-8080 (20 mg/kg) (figures 2 and 3) were used prior to VEGF-A<sub>165</sub> intradermal injection in mice ears, and both antagonists abrogated the hyperpermeability. The difference between our previous and current findings as compared to Murohara et al., observations might be explained by the type, the dosage and the potency of PAF receptor antagonist selected. Another explanation may reside in the species and/or tissues investigated in those studies.

Considering the discrepancies regarding the capacity of NO to modulate vascular permeability, we assessed the contribution of NO donor (SNP) and inducer (ACh) in our vascular permeability model and observed that intradermal injection of SNP or ACh did not alter basal vascular permeability. However, pretreatment with L-NAME prevented EB dye exsudation mediated by VEGF-A<sub>165</sub> and PAF. Since L-NAME abrogated protein extravasation mediated by VEGF-A<sub>165</sub> and PAF, and that NO *per se* had no such effect, our data suggest that NO is a cofactor in the signaling pathway of vascular hyperpermeability.



Since the basal formation of NO maintains an arteriovenous dilation, we delineated if the blockade of VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability by a pretreatment with L-NAME was due to vasocontractile or anti-inflammatory properties. To do so, we reproduced L-NAME-mediated vasoconstriction with Phe, which is deprived of inflammatory properties. Our data showed that a similar arteriovenous constriction mediated by phenylephrine as compared to L-NAME did not reduce VEGF-A<sub>165</sub>-mediated microvascular hyperpermeability. These data are strengthening our hypothesis that NO serves as an intracellular cofactor of VEGF-A<sub>165</sub> inflammatory effect, independently from the modulation of the vasomotor tone.

The proinflammatory contribution of NO resides in its capacity to activate endothelial soluble guanylate cyclase (sGC) to produce cGMP which participate in vascular hyperpermeability induced by inflammatory mediators [Michel, 1999]. Thus, we pretreated mice with a sGC inhibitor (ODQ). Selective inhibition of sGC prevented protein leakage-mediated by VEGF-A<sub>165</sub> supporting that an intact eNOS/NO/sGC/cGMP pathway is essential to support VEGF-A<sub>165</sub> hyperpermeability activity.

It is proposed that cGMP production induced by inflammatory mediators increases vascular permeability by a mechanism reducing cAMP level through activation of phosphodiesterase subtypes. The protective effect of cAMP is mediated by PKA activation which modulates cytoskeletal rearrangement associated with microvascular leakage [Birukova, 2004; Liu, 2001]. Thus, we hypothesized that the activation of NO/cGMP pathway by VEGF-A<sub>165</sub> leads to the inhibition of cAMP/PKA activity, thereby setting a proinflammatory environment. We observed that the blockade of NO/cGMP production and PKA activity under

quiescent conditions did not modulate basal vascular permeability. However, the blockade of NO or cGMP production, with L-NAME or ODQ abrogated VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability, whereas the blockade of PKA activity with H-89 did not alter VEGF-A<sub>165</sub> inflammatory activity. One might suggest that blockade of PKA activation should have increased VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability, however based on our hypothesis, PKA inhibition is already warranted by endogenous cGMP production. To confirm our hypothesis, mice were pretreated with a concomitant injection of L-NAME and H-89 which restored the capacity of VEGF-A<sub>165</sub> to increase vascular permeability. This series of experiments supports our hypothesis that the activation of NO/cGMP pathway is inhibiting cAMP/PKA pathway, thereby permitting the development of an inflammatory response.

Since a treatment with H-89 in presence of L-NAME restored VEGF-A<sub>165</sub>-hyperpermeability activity, we assessed if H-89 would restore VEGF-A<sub>165</sub> inflammatory activity in presence of LAU8080. H-89 did not rescue VEGF-A<sub>165</sub>-hyperpermeability activity, suggesting that PAF activity is not mediated through the inhibition of cAMP/PKA pathway.

#### **Contribution of PAF and NO in VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation**

The induction of VE-cadherin phosphorylation by VEGF-A<sub>165</sub> and PAF is leading to an intercellular redistribution of VE-cadherin, a disruption of cell-cell barrier function and vascular permeability increase [Dejana, 1999; Esser, 1998; Hudry-Clergeon, 2005]. However, there are no studies reporting whether PAF or NO/cGMP contribute to VE-cadherin phosphorylation upon VEGF-A<sub>165</sub> stimulation. Pretreatment of HUVEC with LAU8080 abrogated VEGF-A<sub>165</sub>-

mediated VE-cadherin phosphorylation, whereas a pretreatment with L-NAME or ODQ had an intermediate effect. This latter observation is in agreement with [Aramoto, 2004] who reported that the blockade of NO synthesis attenuated VEGF-A<sub>165</sub>-mediated VE-cadherin redistribution. In addition, we observed that a treatment of HUVEC with SNP was unable to promote VE-cadherin phosphorylation (data not shown), as compared to PAF [Hudry-Clergeon, 2005]. Our data, might explain why SNP itself as opposed to PAF is unable to provide a direct vascular permeability increase, thus, suggesting that NO serves as cofactor of VEGF-A<sub>165</sub>-mediated permeability increase.

In conclusion, VEGF analogs increase vascular permeability through VEGFR-2 activation, maximal protein leakage is induced under VEGF-A<sub>165</sub> stimulation, and involves NRP-1/VEGFR-2 complex formation. The blockade of PAF and NO/cGMP pathway abolished VEGF-A<sub>165</sub>-mediated permeability, however, PAF but not NO directly increases vascular permeability *per se*, thereby, suggesting that PAF is a direct inflammatory mediator, whereas NO serves as a cofactor in VEGF-A<sub>165</sub> proinflammatory activities.

## 2.6 REFERENCES

- Aramoto H, Breslin JW, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, Duran WN. 2004. Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1590-8.
- Bazzoni G, Dejana E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869-901.
- Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, Sirois MG. 2002. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem* 85:629-39.
- Birukova AA, Liu F, Garcia JG, Verin AD. 2004. Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L86-93.
- Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. 2004. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94:664-70.
- Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Feelisch M, Granger DN. 2002. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1111-7.
- Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. 1999. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252:13-9.
- Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK. 1998. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol* 111:1-6.

- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13):1853-65.
- Feletou M, Bonnardel E, Canet E. 1996. Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 118:1371-6.
- Fujii E, Wada K, Ishida H, Yoshioka T, Muraki T. 1999. Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin. *Eur J Pharmacol* 377:219-22.
- Gimeno G, Carpentier PH, Desquand-Billiald S, Hanf R, Finet M. 1998. L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecule extravasation in the microcirculation of awake hamsters. *Eur J Pharmacol* 346:275-82.
- Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I. 2005. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *Faseb J* 19:512-20.
- Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K. 1998. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 273:6599-602.
- Jussila L, Alitalo K. 2002. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82:673-700.
- Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273:15099-103.

- Klabunde RE, Anderson DE. 2000. Obligatory role of nitric oxide in platelet-activating factor-induced microvascular leakage. *Eur J Pharmacol* 404:387-94.
- Kondo S, Matsumoto T, Yokoyama Y, Ohmori I, Suzuki H. 1995. The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF121) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability. *Biochim Biophys Acta* 1243:195-202.
- Liu F, Verin AD, Borbiev T, Garcia JG. 2001. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L1309-17.
- Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG. 2004. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2915-21.
- Mayhan WG. 1999. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* 276:C1148-53.
- Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. 1996. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 2:992-7.
- Michel CC, Curry FE. 1999. Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79:703-61.
- Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Biancone L, Emanuelli G, Camussi G. 2000. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:80-8.

- Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. 1998. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97:99-107.
- Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. 2005. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem* 280:9904-12.
- Potter MD, Barbero S, Cheresh DA. 2005. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 280:31906-12.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746-52.
- Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. 1989. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods* 21:309-15.
- Rollin S, Lemieux C, Maliba R, Favier J, Villeneuve LR, Allen BG, Soker S, Bazan NG, Merhi Y, Sirois MG. 2004. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood* 103:3789-97.
- Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Asanuma H, Node K, Takashima S, Asakura M, Ogita H, Liao Y, Sakata Y, Ogai A, Fukushima T, Yamada J, Shinozaki Y, Kuzuya T, Mori H, Terada N, Hori M. 2001. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: the role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* 104:705-10.

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* 219:983-5.

Sirois MG, Edelman ER. 1997. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 272:H2746-56.

Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler H, Charnahelli H, Klagsbrun M. 1997. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* 272:31582-8.

Shikata Y, Birukov KG, Birukova AA, Verin A, Garcia JG. 2003. Involvement of site-specific FAK phosphorylation in sphingosine-1 phosphate- and thrombin-induced focal adhesion remodeling: role of Src and GIT. *Faseb J* 17:2240-9.

Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. 2004. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 167:223-9.

Wu MH. 2005 Endothelial focal adhesions and barrier function. *J Physiol*. 569: 359-66.

Wu MH, Guo M, Yuan SY, Granger HJ. 2003. Focal adhesion kinase mediates porcine venular hyperpermeability elicited by vascular endothelial growth factor. *J Physiol* 552: 691-9.



## 2.7 FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Vascular permeability mediated by VEGF analogs.** Evans blue dye (EB; 20 mg/kg) was injected in the caudal vein of mice and thirty minutes later PBS (control vehicle), VEGF-A<sub>165</sub> (4, 40 or 400 ng/10  $\mu$ l; final concentration 0.01, 0.1 or 1  $\mu$ M, respectively), VEGF-A<sub>121</sub>, -B, -C, -D, PlGF-1 (1  $\mu$ M), or bFGF (negative control; 1  $\mu$ M) were injected in the ears. Animals were sacrificed 60 minutes after agonists injection. Values are means  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to PBS.

**Figure 2. Dose-dependent effect of PAF on vascular permeability.** EB dye injection in the caudal vein was followed 30 minutes later by an intradermal injection of PBS or PAF (1, 0.1 and 0.01  $\mu$ M, respectively) or PAF (0.01  $\mu$ M) plus SNP (1  $\mu$ M). In another group, mice were pretreated with LAU8080, CV3988 or L-NAME (20 mg/kg) by concomitant intravenous injection with EB prior to PAF injection (0.01  $\mu$ M). The animals were sacrificed 60 minutes upon PBS or PAF injection. Values are means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to PBS, †  $p < 0.05$  compared to PAF.

**Figure 3. Implication of NO and PAF on VEGF-induced protein extravasation.** EB dye injection in the caudal vein was followed 30 minutes later by an intradermal injection of PBS, SNP (1  $\mu$ M), ACh (1 and 100  $\mu$ M), VEGF-A<sub>165</sub>, and VEGF-C (1  $\mu$ M). In another group, mice were pretreated with either L-NAME (20 mg/kg) or LAU8080 (20 mg/kg) combined with EB dye (20 mg/kg) and followed a subcutaneous injection of VEGF-A<sub>165</sub> or VEGF-C (1  $\mu$ M). In another group, mice were pretreated either with L-NAME or LAU8080 (20

mg/kg, respectively) by concomitant intravenous injection with EB dye 30 minutes prior to VEGF-A<sub>165</sub> or VEGF-C injection (1  $\mu$ M) in mice ears. The animals were sacrificed 60 minutes later. Values are means  $\pm$  SEM of at least four independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to PBS, †  $p < 0.05$  compared to VEGF-A<sub>165</sub> or VEGF-C.

**Figure 4. Implication of NO signaling pathway on VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein extravasation.** EB dye injection in the caudal vein was followed 30 minutes later by an intradermal injection of PBS, or VEGF-A<sub>165</sub> (1  $\mu$ M) in mice ears. In a second group, mice were pretreated with L-NAME (20 mg/kg), ODQ (20 mg/kg) or H-89 (40  $\mu$ g/kg). In a third group, mice were pretreated with a combined injection of L-NAME (20 mg/kg) and H-89 (4 or 40  $\mu$ g/kg) prior to injection of VEGF-A<sub>165</sub> (1  $\mu$ M), and the animals were sacrificed 60 minutes later. Values are mean  $\pm$  SEM of at four independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to PBS, †  $p < 0.05$  compared to VEGF-A<sub>165</sub> pretreated with L-NAME.

**Figure 5. Phosphorylation of VE-cadherin by VEGF-A<sub>165</sub>.** A) HUVEC were stimulated with PBS or VEGF-A<sub>165</sub> (1 nM; 0-120 minutes). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-VE-cadherin IgG. PhosphoVE-cadherin was detected by immunoblotting using an anti-phosphotyrosine IgG (upper bands). Membranes were stripped and the detection VE-cadherin protein expression was performed with an anti-VE-cadherin IgG. B) HUVEC were pretreated with SU1498 (10  $\mu$ M), LAU8080 (10  $\mu$ M), L-NAME (100  $\mu$ M) or ODQ (10  $\mu$ M) for 15 minutes prior to stimulation with VEGF (10<sup>-9</sup> M). WB, Western blotting, IP immunoprecipitation.

## 2.8 FIGURES

Figure 1

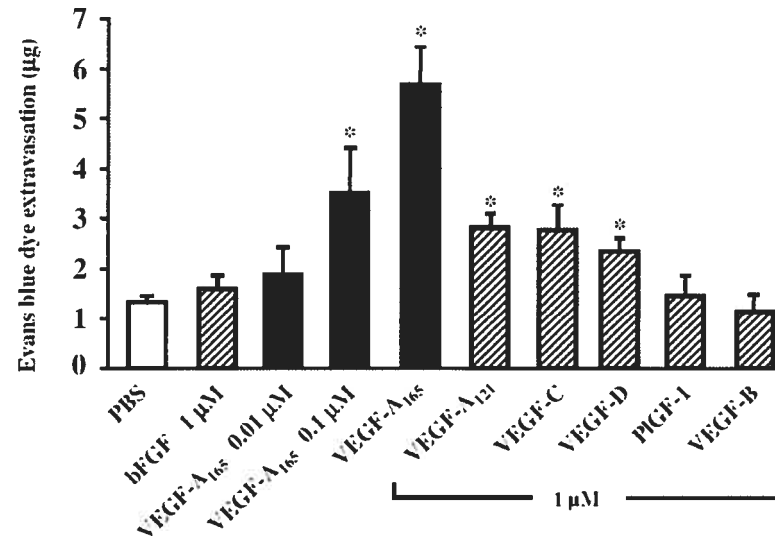


Figure 2

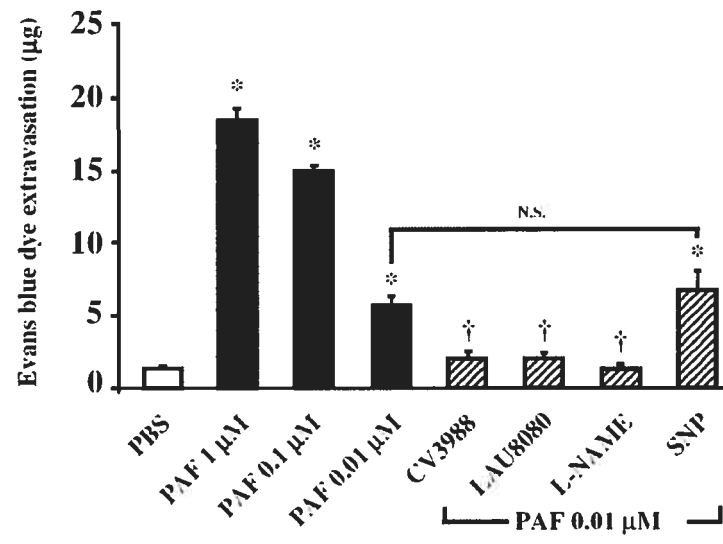


Figure 3

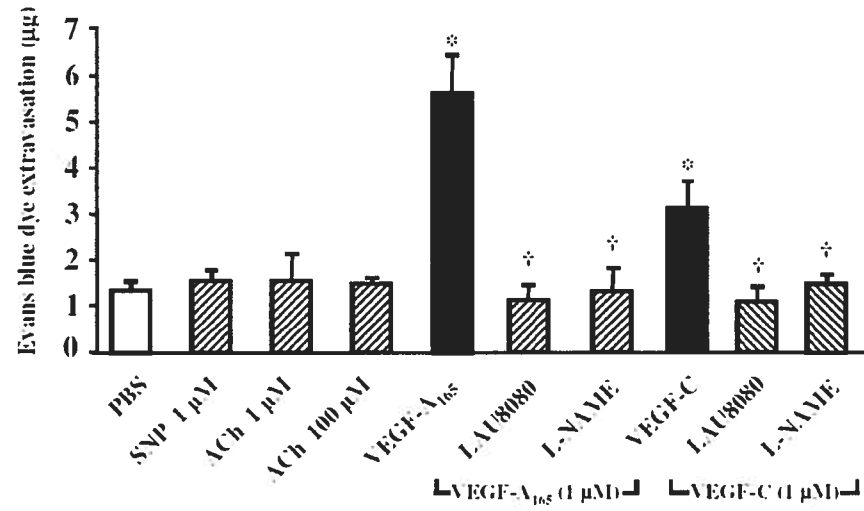


Figure 4

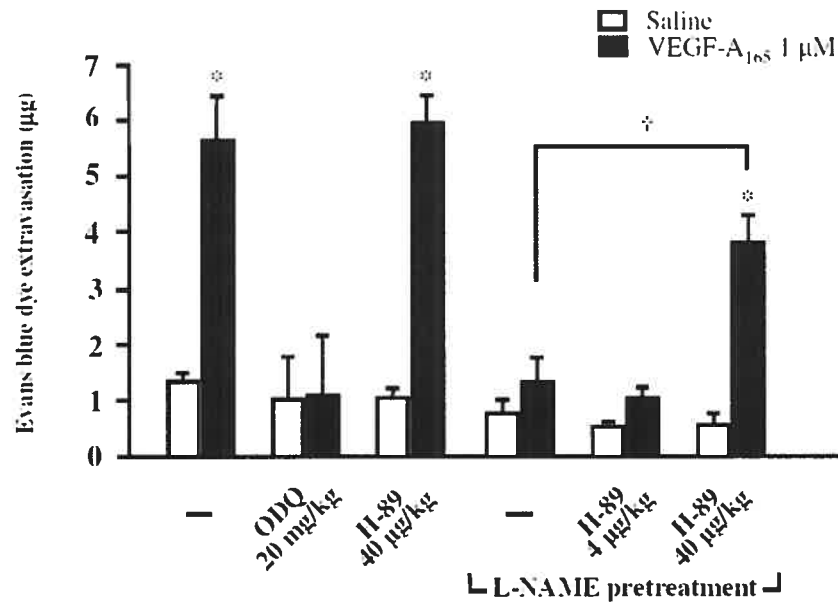
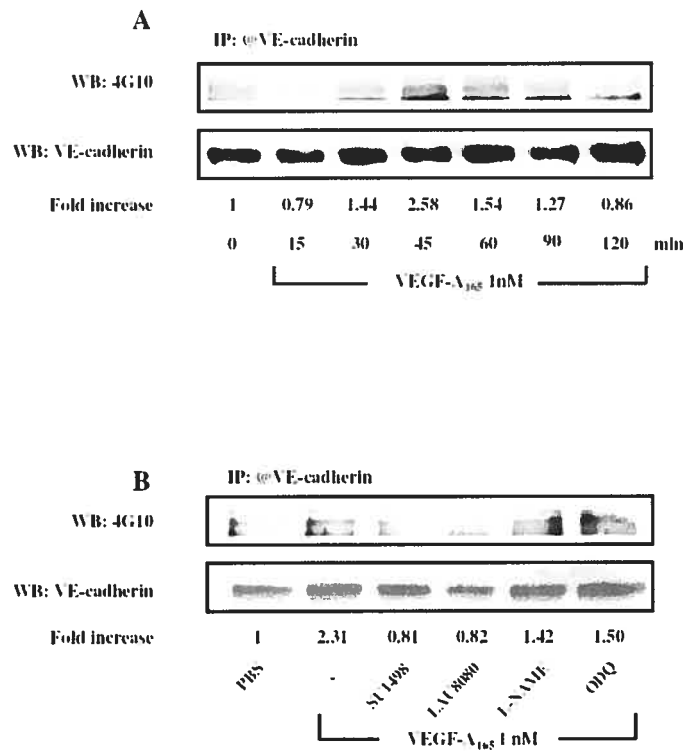


Figure 5



Pretreatment	Time (min)	Vascular tone modulation			Vascular permeability (EB dye extravasation; $\mu\text{g}$ )	
		-60	-30	0	Treatment	
					PBS	VEGF-A <sub>165</sub>
None	Arteries (%)	N/A	N/A	N/A	1.34 $\pm$ 0.16	5.64 $\pm$ 0.78*
	Venules (%)	N/A	N/A	N/A		
L-NAME	Arteries (%)	100	77.0 $\pm$ 5.5	74.2 $\pm$ 4.2	0.76 $\pm$ 0.26	1.03 $\pm$ 0.16††
	Venules (%)	100	81.0 $\pm$ 0.5	86.0 $\pm$ 5.4		
Phe	Arteries (%)	100	74.2 $\pm$ 15.1	68.4 $\pm$ 13.2	1.92 $\pm$ 0.19	5.90 $\pm$ 0.16*
	Venules (%)	100	76.1 $\pm$ 6.2	82.1 $\pm$ 10.2		

**Table I: Effect of vasoconstriction on VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein extravasation.** Vascular tone of arteries and venules in mice ears was assessed by taking pictures with a videocamera adapted to a stereomicroscope at 0, 30 and 60 minutes following a bolus intravenous injection of L-NAME (20 mg/kg), or sustained infusion of Phe (0.1 mg/ml; at a constant rate of 0.8 ml/hour). PBS or VEGF-A<sub>165</sub> (1  $\mu\text{M}$ ) were injected subcutaneously in mice ears and the animals were sacrificed 60 minutes later. Values are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to its control PBS, ††  $p < 0.01$  compared to VEGF-A<sub>165</sub>.



**3.0 ARTICLE #2**

## ACCORD DES COAUTEURS

### A) Déclaration des coauteurs d'un article

#### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Alexandre Brkovic,  
Ph.D. Pharmacologie, 3-520-1-0

#### 2. Description de l'article

**Auteurs** : Alexandre Brkovic, Martin Pelletier, Denis Girard et Martin G. Sirois.

**Titre** : Angiopoietins chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI3K activation

**Revue** : Journal of Leukocyte Biology

**État actuel de l'article** :

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Alexandre Brkovic inclue cet article dans **sa thèse de doctorat** qui a pour titre *Activités Proinflammatoires du VEGF et des Angiopoïétines*.

Martin Pelletier

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Denis Girard

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Martin G. Sirois

---

Coauteur	Signature	Date
----------	-----------	------

Permission de l'éditeur d'une revue

**Angiopoietins chemotactic activities on neutrophils  
are regulated by PI-3K activation**

Alexandre Brkovic<sup>1</sup>, Martin Pelletier<sup>2</sup>, Denis Girard<sup>2</sup> and Martin G. Sirois<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, Department of Pharmacology,  
Université de Montréal, Montreal and <sup>2</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-  
Claire, QC, Canada.

Running Title: Angiopoietins-mediated neutrophil migration is PI-3K dependent

Key words: Cytokines, polymorphonuclear cells, migration, Tie2 receptor

\*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, Ph.D.

Research Center

Montreal Heart Institute

5000, Belanger Street

Montreal (QC), Canada, H1T 1C8

Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)

Fax: (514) 376-1355

E-mail: [REDACTED]

### ABSTRACT

Angiopoietins (Ang1 and Ang2) modulate blood vessel integrity during the angiogenic process through the activation of tyrosine kinase receptor (Tie2). We recently detected Tie2 expression on neutrophils and reported that angiopoietins induce acute proinflammatory events including neutrophil  $\beta_2$ -integrin activation and their adhesion onto endothelial cells. Herein, we investigated the effect of angiopoietins on neutrophil migration and their capacity to modulate CXCL8/IL-8 chemotactic properties. Using a Boyden chamber assay, we observed that Ang1 and Ang2 (up to 10 nM; 60 minutes) increased the migration of neutrophils, maximal effect being achieved at 1 nM (72 and 114% increase, respectively) as compared to untreated cells. Angiopoietins induce a rapid and transient Akt phosphorylation, and pretreatment of neutrophils with PI-3K inhibitors, wortmannin (100 nM) and LY294002 (500 nM), reduced Ang1-mediated neutrophil migration by 100 and 78%, and Ang2 chemotactic activity by 100 and 71%, respectively. Treatment of neutrophils with CXCL8/IL-8 (up to 50 nM, 60 minutes) increased basal neutrophil migration by 257% at its optimal concentration (10 nM), and pretreatment of neutrophils with corresponding PI-3K inhibitors reduced CXCL8/IL-8 (1 nM) chemotactic effect. Pretreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 (10 nM; 15 minutes) potentiated neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (1 or 10 nM; 60 minutes) by 263 and 238% and by 177 and 164%, respectively. Finally, both angiopoietins showed a synergistic effect on the induction of Akt phosphorylation mediated by CXCL8/IL-8.

In summary, our data demonstrate that angiopoietins increase neutrophil migration through PI-3K activation and can enhance proinflammatory activities of other cytokines.

## INTRODUCTION

Angiogenesis is characterized by the formation of new blood vessels from preexisting vasculature. This process is tightly regulated and requires the coordinated action of numerous growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins. Angiopoietins (Ang1 and Ang2) are structurally related endothelial growth factors, having similar binding affinity for tyrosine kinase receptor Tie2. Ang1 has been shown to act as a Tie2 agonist, promoting endothelial cell (EC) survival, migration and proliferation (157, 163). On the other hand, Ang2 has been initially characterized as an endogenous Tie2 antagonist, thereby, counteracting Ang1 activities (121, 157). However, recent evidences suggest that Ang2, under certain circumstances, has a more complex role and may act as a Tie2 agonist. This hypothesis is supported by the capacity of Ang2 to induce Tie2 phosphorylation, EC chemotaxis and *in vitro* capillary-like tube formation (124-126). Furthermore, we reported that Ang1 and Ang2, upon endothelial Tie2 activation, can induce platelet activating factor (PAF) synthesis and transient P-selectin translocation, which support neutrophil adhesion onto activated EC (127, 128). Recent studies revealed that angiopoietins can also modulate the responsiveness of EC toward proinflammatory cytokines. For instance, Ang2 was shown to serve as a priming factor for tumor-necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) at low concentrations (178). Moreover, both Ang1 and Ang2 were shown to potentiate VEGF-mediated angiogenesis in a mouse cornea model (284).

Postnatal angiogenesis is associated with numerous inflammatory conditions such as atherosclerosis, rhumatoïd arthritis, retinopathy and tumor growth (5). It has been reported that inflammation precedes and accompanies

pathological angiogenesis as evidenced by increased vascular permeability and recruitment of inflammatory cells at angiogenic sites (108, 203).

Among inflammatory cells, neutrophils are the first ones recruited to the site of inflammation and have been suggested to participate in pathological angiogenesis (285, 286). Neutrophils produce several proangiogenic cytokines, including VEGF, TNF- $\alpha$ , and interleukins (IL-1, IL-6 and IL-8) as well as matrix-degrading enzymes, which together, contribute to trigger and support angiogenic activities. Recruitment of neutrophils is a multistep process implying neutrophil tethering, rolling and firm adhesion to EC, followed by the migration of neutrophils across the vasculature toward the subendothelial chemoattractant source.

Recently, we detected Tie2 expression on the cell surface of polymorphonuclear cells, which has been later confirmed by independent groups (127, 146, 147). Stimulation of neutrophils with Ang1 or Ang2 induces PAF synthesis and  $\beta_2$ -integrin-dependent neutrophil adhesion to extracellular matrix (127, 128). Taken together, these observations suggest that angiopoietins/Tie2 system can modulate leukocytes trafficking. In agreement, recent studies showed that angiopoietins can induce neutrophils and eosinophils chemotaxis, an important component of the acute inflammatory response (146, 147). However, little is known about the cellular pathways involved in angiopoietins-mediated neutrophil migration. In the present study, we thus wanted to define the cellular pathways involved in angiopoietins-mediated neutrophil migration. In addition, since angiopoietins can modulate the effect of proinflammatory cytokines in EC, we were led to investigate if angiopoietins could modulate cytokines activities in neutrophils.

## MATERIAL AND METHODS

*Neutrophil purification:* Venous blood was obtained from healthy donors free from medication for at least 10 days prior to the experiments. Neutrophils were isolated as described previously (127). Briefly, upon a 2%-dextran sedimentation, neutrophils were isolated under sterile conditions using Ficoll-Paque gradient and contaminating erythrocytes were removed by hypotonic shock. Unless otherwise noted, neutrophils were resuspended in RPMI containing 25 mM HEPES and 1% of antibiotics. Ninety-five 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. To characterize the ratio of neutrophils and eosinophils in our polymorphonuclear population, cells were centrifuged, spread onto microscope slides and stained with Diff-Quick solution. Only the populations of polymorphonuclear cells consisting of at least 95% of neutrophils were used in our study.

*Cell-surface expression of Tie2:* Neutrophils ( $10^7$  cells/ml) were rinsed and resuspended in RPMI, bovine IgG (150  $\mu$ g/ml) was added for 30 minutes to prevent nonspecific binding via Fc receptors. Neutrophils were centrifuged, rinsed, resuspended in RPMI ( $10^6$  cells/ml) and incubated with mouse monoclonal Tie2 IgG<sub>1</sub> (1-10  $\mu$ g/ml; R&D systems, Minneapolis, MN) or with mouse IgG<sub>1</sub> isotype control (1-10  $\mu$ g/ml; R&D systems) for 60 minutes at 4°C. Upon additional rinses, neutrophils were incubated with goat anti-mouse FITC-conjugated secondary IgG (1:100). Cells were rinsed and fixed with 0.5% paraformaldehyde. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).



*Neutrophil migration:* *In vitro* chemotaxis was performed in a 48-wells microchamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD) using a 3- $\mu$ m polycarbonate membrane filter as previously described (287, 288). The bottom wells were loaded with RPMI with or without agonists (final volume, 25  $\mu$ l), the polycarbonate membrane was placed over the wells, and the top layer of the chamber was added over the membrane. Neutrophils (50  $\mu$ l from a RPMI suspension;  $10^6$  cells/ml) were added into the upper wells. The chamber was incubated at 37°C for 60 minutes in a humidified incubator in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Upon the incubation period, the top of the chamber was removed and the upper side of the membrane was carefully wiped with the rubber scraper provided by the manufacturer. The polycarbonate membrane was fixed in methanol, colored with the Diff-Quick staining kit, mounted on a glass slide, and examined with light microscope under 400X magnification. The number of cells in five random fields was counted and the results were expressed as relative neutrophil migration (number of cells from tested group/number of cells from corresponding control vehicles). Treatment with the chemoattractant, CXCL8/IL-8 (25 nM) was used as positive control.

In another set of experiments, cells were pretreated for 15 minutes with a blocking goat polyclonal anti-human Tie2 (anti-hTie2) IgG (R&D systems) or isotypic goat IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) before cell migration toward recombinant angiopoietins (1 nM; R&D systems). In some experiments, cells were pretreated for 15 minutes with phosphatidylinositol 3 kinase (PI-3K) inhibitors (wortmannin; 10 and 100 nM (289), LY294002; 0.5 or 5  $\mu$ M (290)), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (SB380505; 10  $\mu$ M (290)), p42/44 MAPK (PD98059; 50  $\mu$ M (291)) or angiopoietins (0.1-10 nM)

prior to neutrophil migration toward agonists. In studies implying the use of inhibitors, the latter were also added into the bottom wells.

*Akt Western blot analyses:* Neutrophils were resuspended at a concentration of  $4 \times 10^7$  cells/ml and 100  $\mu$ l of cell suspension was stimulated with control vehicle, angiopoietins, CXCL8/IL-8, and angiopoietins plus CXCL8/IL-8 at room temperature. Neutrophils were lysed in 4X Laemmli's buffer and boiled for 10 minutes. Equal volume of samples was loaded in a 7.5% SDS-PAGE and proteins were transferred onto a PVDF membrane. Membranes were probed with a rabbit polyclonal phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) IgG (1:750; Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA). PVDF membranes were subsequently stripped in glycine stripping buffer and total Akt protein expression was determined with a rabbit polyclonal anti-Akt IgG (1:1000). Immunoreactive bands were visualized by using LumiGlo™ (Cell Signaling Technology Inc.), digitized using a 2-dimensional gel scanner, and quantified using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA).

*Statistical analysis:* Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were made by one-way analysis of variance, followed by a Tukey *t*-test for multiple comparisons. Data were considered significantly different if values of  $p < 0.05$  were observed.

## RESULTS

*Expression of Tie2 in neutrophils:* We recently reported by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), confocal microscopy and immunocytochemistry that Tie2 is expressed at the cell surface of neutrophils, while others demonstrated by RT-PCR and by flow cytometric analysis that Tie2 is expressed on eosinophils (127, 146, 147). To confirm that the detection of Tie2 on neutrophils in our initial study was not due to a marginal cross contamination by eosinophils, we performed a FACS analysis directed against Tie2 expression in a population of purified polymorphonuclear cells containing at least 95% of neutrophils (Fig. 1).

*Ang1 and Ang2 mediate neutrophil migration:* Using a modified Boyden chamber assay, we tested the capacity of angiopoietins to modulate neutrophil migration. Both Ang1 and Ang2 increased concentration-dependently the migration of neutrophils in a bell-shape manner. The maximal effect mediated by Ang1 and Ang2 was achieved at 1 nM (72% and 114% increase, respectively) as compared to PBS-treated cells (Fig. 2A), whereas at 5 and 10 nM the effect of both angiopoietins resumed to basal level. To assess if the migration of neutrophils mediated by Ang1 and Ang2 was Tie2-dependent, we pretreated the neutrophils with different concentrations of anti-hTie2 IgG (5 and 10 µg/ml; 15 minutes), capable of blocking angiopoietins/Tie2 interaction. Such pretreatment prevented neutrophil migration induced by Ang1 or Ang2 (1 nM), whereas a pretreatment with equivalent concentrations of control isotypic IgG had no such effect (Fig. 2B). In all studies, treatments with CXCL8/IL-8 (10 or 25 nM) were

included as positive control, increasing neutrophil migration by over 200% as compared to PBS-treated cells.

*Role of PI-3K pathway in angiopoietins-mediated neutrophil migration:* Previous studies reported that angiopoietins possess the capacity to activate PI-3K/Akt, p38 and p42/44 MAPK pathways (124, 128, 166, 176, 184). Thus, we wanted to address the signaling pathway(s) involved in neutrophil migration mediated by angiopoietins. Neutrophils were pretreated with inhibitors of PI-3K (wortmannin and LY294002), p38 MAPK (SB203580) and p42/44 MAPK (PD98059) pathways. Pretreatment of neutrophils with wortmannin (10 and 100 nM) for 15 minutes prior to their addition in the upper chamber did not affect basal migration mediated under PBS condition, but prevented by over 90% the migration of neutrophils mediated by Ang1 and Ang2 (1 nM; 60 minutes) (**Fig. 3A**). The contribution of PI-3K pathway was confirmed by using a second independent inhibitor LY294002. Pretreatment of neutrophils with LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) reduced basal PBS-mediated migration by 40 and 53% respectively. Pretreatment of neutrophils with LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) decreased by 72 and 78% the migration of neutrophil-mediated by Ang1 (1 nM), and by 80 and 71% under Ang2 (1 nM) stimulation respectively as compared to PBS-treated cells in presence LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M; Fig. 3A). In another set of experiments, neutrophils were pretreated either with PD98059 (50  $\mu$ M) or SB203580 (10  $\mu$ M) as defined above, and both did not affect neutrophil migration induced by Ang1 or Ang2 (1 nM) (data not shown).

Since the migration of neutrophils induced by angiopoietins was sensitive to PI-3K inhibitors, we therefore tested the capacity of angiopoietins to increase Akt phosphorylation in neutrophils. Treatment of neutrophils with Ang1 and

Ang2 (1 nM) induced a rapid and transient Akt phosphorylation which was maximal within 2 minutes (3.0- and 2.8-fold of increase, respectively) as compared to control PBS-treated cells, and returning to basal level within 30 minutes (Fig. 3, B and C).

*Enhancing activity of angiopoietins on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration:* A recent report revealed that angiopoietins can modulate endothelial cell responsiveness to proinflammatory cytokines (178). Different studies provided evidence that PI-3K activation contributes to CXCL8/IL-8 chemotactic properties (281, 283). Our data suggest as well that PI-3K activation contributes to angiopoietins chemotactic activity on neutrophils, thus we wanted to assess if angiopoietins can modulate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. In a first series of experiments, we performed a CXCL8/IL-8 concentration-dependent assay (0.001 to 50 nM) on neutrophil migration and assessed the extent of PI-3K contribution. CXCL8/IL-8 induced a significant neutrophil migration at 1, 10 and 50 nM, with a maximal effect being achieved at 10 nM (257% increase as compared to PBS-treated cells; **Fig. 4A**). Pretreatment of neutrophils with wortmannin (10 and 100 nM) or LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) for 15 minutes prevented neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (1 nM), whereas at a higher concentration of CXCL8/IL-8 (10 nM), wortmannin (10 and 100 nM) or LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) provided a partial inhibitory effect (52 to 59% inhibition) on neutrophil migration (Fig. 4B). In another set of experiments, neutrophils were pretreated either with PD98059 (50  $\mu$ M) or SB203580 (10  $\mu$ M), which did not affect neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (10 nM; data not shown).

As the migration of neutrophils induced by CXCL8/IL-8 was sensitive to PI-3K inhibitors, we therefore tested the capacity of CXCL8/IL-8 to increase Akt phosphorylation in neutrophils. Neutrophils were treated with CXCL8/IL-8 (0.001 to 50 nM) for 2 minutes (283, 292), and we observed Akt phosphorylation at 10 and 50 nM—11.9- and 15.6-fold of increase, respectively—as compared with control, PBS-treated cells (Fig. 4C). Pretreatment of neutrophils with increasing concentrations of PI-3K inhibitors (wortmannin, 10 and 100 nM; LY294002, 0.5 and 5  $\mu$ M) for 15 minutes prior to stimulation with CXCL8/IL-8 (10 nM; 2 minutes) reduced Akt phosphorylation with maximal inhibition reaching 80 and 99% under wortmannin and LY294002 pretreatment respectively (Fig. 4D).

We then assessed the capacity of angiopoietins to modulate CXCL8/IL-8 chemotactic activities on neutrophils. Pretreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 (0.1, 1 and 10 nM) for 15 minutes prior to the addition of neutrophils in the upper wells with their corresponding Ang1 or Ang2 conditioned media did not modulate basal neutrophil migration toward control PBS (bottom wells). However, pretreatment of neutrophils with Ang1 (10 nM) under the same condition potentiated neutrophil migration toward CXCL8/IL-8 concentration gradient (0.1, 1 or 10 nM) for 60 minutes. For instance, addition of CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM) alone in the bottom wells increase neutrophil migration by 35, 101 and 286%, and the pretreatment of neutrophils with Ang1 (10 nM) prior to the addition of CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM) in the bottom wells raised the migration of neutrophils to 154, 266 and 507%, respectively (Fig. 5A). Similarly, in another series of experiments basal migration of neutrophils under CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM) exposure alone increased by 27, 63 and 222% respectively

and a pretreatment of neutrophils with Ang2 increased their mediated toward CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM) by 41, 150 and 363%, respectively (Fig. 5B).

As both angiopoietins and CXCL8/IL-8 increase neutrophil migration through the activation of PI-3K pathway, we hypothesized that it could be implicated in the priming effect of angiopoietins on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. To address this issue, neutrophils were initially pretreated for 15 minutes with wortmannin (100 nM) or LY294002 (5  $\mu$ M) prior to the addition of PBS, Ang1 or Ang2 (10 nM) for an additional 15 minutes exposure. Then, neutrophils were added to the upper chambers allowing them to migrate toward CXCL8/IL-8 (10 nM) gradient for 60 minutes.

In the current set of experiments, pretreatment of neutrophils with wortmannin and LY294002 partially blocked (50 and 51%, respectively) CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. If the priming effect of angiopoietins on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration is PI-3K-dependent, thus, the inhibition of angiopoietins priming effect by PI-3K inhibitors should decrease the migration of neutrophils to the level mediated by CXCL8/IL-8 in presence of PI-3K inhibitors (Fig. 6A; dotted line). Pretreatment of neutrophils with wortmannin or LY294002 decreased by 70 and 79% the priming effect of Ang1 and by 88 and 82% the priming effect of Ang2 on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration (Fig. 6A).

As the activation of PI-3K pathway is involved in angiopoietins priming effect on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration, we then tested the capacity of angiopoietins to potentiate CXCL8/IL-8-mediated Akt phosphorylation. Treatment of neutrophils with CXCL8/IL-8 (0.1 and 1 nM; 2 minutes) did not mediate Akt phosphorylation, whereas a treatment with CXCL8/IL-8 (10 nM)

induced Akt phosphorylation (28-fold increase) as compared to PBS-treated cells (Fig. 6, B and C). Combination of Ang1 (0.1, 1 and 10 nM) to suboptimal CXCL8/IL-8 (1 nM) concentration, potentiated Akt-phosphorylation by 2.1-, 3.9- and 7.0-fold respectively, as compared to CXCL8/IL-8 alone (1 nM; Fig. 6B). Similarly, cotreatment of neutrophils with increasing concentrations of Ang2 (0.1, 1 and 10 nM) plus CXCL8/IL-8 (1 nM) potentiated as well by 1.3-, 5.1- and 4.8-fold respectively, the phosphorylation of Akt mediated by CXCL8/IL-8. Cotreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 (0.1, 1 and 10 nM) did not provide a synergistic effect on Akt-phosphorylation mediated by the lowest and the highest concentrations of CXCL8/IL-8 (0.1 and 10 nM; Fig. 6, B and C).



## DISCUSSION

In the present study, we showed that both Ang1 and Ang2 possess a similar agonistic capacity to mediate neutrophil migration through the activation of PI-3K pathway. These data are in accordance with our previous findings in which we defined proinflammatory activities of angiopoietins in neutrophils. Furthermore, we have observed that both angiopoietins can potentiate the effect of CXCL8/IL-8 on neutrophil migration.

### *Both Ang1 and Ang2 promote neutrophil migration through Tie2 activation*

Classically, Tie2 was recognized as being expressed on endothelial and hematopoietic stem cells (122). However, we recently detected Tie2 expression on neutrophils by RT-PCR, confocal microscopy and immunocytochemistry and reported the capacity of Ang1 and Ang2 to induce PAF synthesis,  $\beta_2$ -integrin functional upregulation and neutrophil adhesion onto extracellular matrix and endothelial cells (EC) (127). During the same time, Tie2 receptor expression was observed on eosinophils and neutrophils by RT-PCR and flow cytometry (146, 147). In eosinophils, Feistritzer et al. observed that Ang1 has a chemotactic activity which is partially driven through PI-3K activation, whereas Ang2 has no or a marginal effect (147). In neutrophils, Sturn et al. reported that both angiopoietins promote chemotaxis, however, they did not address the contribution of PI-3K pathway (146). By FACS analysis we confirmed our initial data demonstrating Tie2 expression on neutrophils (127), which is in agreement with the observation made by Sturn and colleagues (146).

Using a modified Boyden chamber assay, we demonstrate that angiopoietins increase concentration-dependently the migration of neutrophils in

a bell-shape manner. Maximal agonistic activity is observed at 1 nM, whereas, at a higher concentration (10 nM), Ang1 and Ang2 lose their capacity to promote neutrophil migration. This latter observation is in line with previous studies where we observed a similar bell-shape response, namely VEGF-A<sub>165</sub>- and angiopoietins-mediated endothelial P-selectin translocation, angiopoietins-mediated PAF synthesis (127, 128). This phenomenon can be explained by the fact that the binding of a ligand to a receptor tyrosine kinase induces receptor hetero- and homodimerization, which is essential to trigger receptor autophosphorylation and signal transduction (128, 293). However, an overabundance of ligands impedes receptors dimerization (294). In addition, by using an antibody capable of blocking angiopoietins/Tie2 interaction we demonstrate that neutrophil migration mediated by both angiopoietins is Tie2-dependent.

*PI-3K activation pathway is essential to angiopoietins-mediated neutrophil migration*

In ECs, Ang1/Tie2 interaction activates PI-3K/Akt, p42/44 and p38 MAPK pathways (119, 164, 184, 185, 202, 295, 296), while Ang2/Tie2 interaction mediates PI-3K/Akt signal transduction (124). More recently, we observed that Ang2 is also capable to activate p38 and p42/44 MAPK pathways with a similar kinetic as induced by Ang1 (128). Furthermore, we reported that both angiopoietins promote similarly endothelial PAF synthesis, and the aforementioned intracellular pathways are contributing to angiopoietins-mediated PAF synthesis (128).

In the current study, we observed that a pretreatment with two PI-3K inhibitors prevented angiopoietins-mediated neutrophil migration, whereas the blockade of p38 and p42/44 MAPK activity had no such effect. Our data are in line with previous studies reporting that PI-3K activation is essential for Ang1 and Ang2-mediated EC survival, migration and sprouting (124, 125, 166, 180, 181), whereas the activation of p38 and p42/44 MAPKs by angiopoietins modulate cell survival (184). In addition, our data demonstrate that in neutrophils, PI-3K activation is essential to both Ang1 and Ang2-chemotactic properties, whereas in eosinophils, Ang1-chemotactic activity is predominant and partially dependent onto PI-3K activation (147).

Since Akt is a target of PI-3K signalling upon stimulation of neutrophils with various proinflammatory cytokines (297), we assessed the capacity of angiopoietins to induce Akt phosphorylation. We observed that Ang1 and Ang2 can induce a very rapid and transient phosphorylation of Akt in neutrophils. Our data are in agreement with the previous study, in which a similar Akt kinetic activation was observed upon stimulation of neutrophils with chemoattractants including CXCL8/IL-8 and fMet-Leu-Phe (fMLP) (297).

#### *Ang1 and Ang2 potentiate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration*

Stimulation of ECs by proinflammatory mediators can induce the release of Ang2 and CXCL8/IL-8 from Weibel-Palade bodies (WPBs), which promotes neutrophil migration and their adhesion onto ECs (127, 138, 177). Since we observed that PI-3K activation contributes to angiopoietins chemotactic activity on neutrophils, and that different studies provided evidence that PI-3K activation contributes to

CXCL8/IL-8 chemotactic properties (281, 283), we thus hypothesized that angiopoietins might modulate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration.

Herein, we show that CXCL8/IL-8 increases migration of neutrophils in a bell-shape manner, which is in agreement with previous reports (298-300). Our data are in line with previous studies indicating that PI-3K pathway activation contributes to CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration (281, 283). We observed that a pretreatment with PI-3K inhibitors prevented neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (1 nM). However, identical pretreatment reduced by about 50% the migration of neutrophils mediated by CXCL8/IL-8 (10 nM), despite the fact that those PI-3K inhibitors were capable to prevent CXCL8/IL-8 (10 nM) mediated Akt phosphorylation. The difference between the effects of PI-3K inhibition on neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 at 1 nM versus 10 nM might be explained by the stimulation of additional pathway(s) independently from PI-3K/Akt activation. However, based on our current data, we can discard the contribution of p38 and p42/44 MAPK pathways since their inhibition had no effect on CXCL8/IL-8 (10 nM) chemotactic activity.

Our data showed that a pretreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 even at the highest concentration did not promote their migration in absence of chemotactic mediators, but potentiated neutrophil migration response toward CXCL8/IL-8 (Figure 5A and B). These data suggest that neutrophil activation by Ang1 and Ang2 is priming their migration toward chemotactic mediators such as CXCL8/IL-8. By Western blot analyses, we also observed the capacity of Ang1 and Ang2 to potentiate Akt phosphorylation mediated by suboptimal CXCL8/IL-8 concentration, which *per se* is insufficient to increase basal level of Akt phosphorylation. Finally, by using selective PI-3K inhibitors, we observed that

the potentiating activity of Ang1 and Ang2 on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration is driven through PI-3K activation.

In a recent study, we observed under in vitro condition that both Ang1 and Ang2 can promote a rapid and transient endothelial P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto activated endothelial cells. Under in vivo condition, Roviezzo *et al.* reported that a subcutaneous injection of Ang2 in mouse air pouch model promoted transmigration of circulating leukocytes, whereas Ang1 did not induce such effect. Taken together, these data show that under in vitro conditions, both angiopoietins can share common proinflammatory activities. However, under in vivo conditions, Ang1 and Ang2 may have a different capacity to support a prolong adhesion of leukocytes onto endothelial cells and subsequently, their transmigration.

In summary, we observed that both angiopoietins promote neutrophil chemotaxis through the activation of PI-3K pathway. In addition, both angiopoietins have the capacity to potentiate CXCL8/IL-8 chemotactic activity on neutrophils.

### ACKNOWLEDGMENTS

Mr. Brkovic was recipient of a Ph.D. studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and this work was supported by grants from CIHR (MOP-43919) and Heart and Stroke Foundation of Quebec to Dr. Sirois. Dr. Girard is a Scholar from FRSQ and this work was supported in part, by a CIHR grant (MOP-14416). Dr. Pelletier was recipient of a Ph.D. studentship from CIHR. We would like to thank Mr. Haissam Abou Saleh and Dr. Yahye Merhi for their technical assistance.

## REFERENCES

1. Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., McDonald, D.M. (1999) Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286**, 2511-4.
2. Kanda, S., Miyata, Y., Mochizuki, Y., Matsuyama, T., Kanetake, H. (2005) Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells. *Cancer Res* **65**, 6820-7.
3. Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60.
4. Kim, I., Kim, J.H., Moon, S.O., Kwak, H.J., Kim, N.G., Koh, G.Y. (2000) Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* **19**, 4549-52.
5. 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**, 175-83.
6. 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**, 738-44.

7. Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Theoret, J.F., Merhi, Y., Sirois, M.G. (2005) Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* **105**, 1523-30.
8. Maliba, R., Lapointe, S., Neagoe, P.E., Brkovic, A., Sirois, M.G. (2006) Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: Intracellular signalling pathways. *Cell Signal*.
9. Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N.W., Witzernath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Sobke, A., Herrmann, M., Preissner, K.T., Vajkoczy, P., Augustin, H.G. (2006) Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* **12**, 235-9.
10. Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G.D., Isner, J.M. (1998) Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* **83**, 233-40.
11. Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-6.
12. Brown, L.F., Berse, B., Jackman, R.W., Tognazzi, K., Guidi, A.J., Dvorak, H.F., Senger, D.R., Connolly, J.L., Schnitt, S.J. (1995) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* **26**, 86-91.
13. Jackson, J.R., Seed, M.P., Kircher, C.H., Willoughby, D.A., Winkler, J.D. (1997) The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *Faseb J* **11**, 457-65.



14. McCourt, M., Wang, J.H., Sookhai, S., Redmond, H.P. (1999) Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* **134**, 1325-31; discussion 1331-2.
15. Shaw, J.P., Chuang, N., Yee, H., Shamamian, P. (2003) Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res* **109**, 37-42.
16. Feistritzer, C., Mosheimer, B.A., Sturn, D.H., Bijuklic, K., Patsch, J.R., Wiedermann, C.J. (2004) Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 1077-84.
17. Sturn, D.H., Feistritzer, C., Mosheimer, B.A., Djanani, A., Bijuklic, K., Patsch, J.R., Wiedermann, C.J. (2005) Angiopoietin affects neutrophil migration. *Microcirculation* **12**, 393-403.
18. Miyagi, T., Lam, K.M., Chuang, L.F., Chuang, R.Y. (1998) Suppression of chemokine-induced chemotaxis of monkey neutrophils and monocytes by chlorinated hydrocarbon insecticides. *In Vivo* **12**, 441-6.
19. Ratthe, C., Pelletier, M., Roberge, C.J., Girard, D. (2002) Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin Immunol* **105**, 169-75.
20. Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y., Matsuda, Y. (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* **268**, 25846-56.

21. Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y., Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**, 5241-8.
22. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E., Kubes, P. (2002) An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* **159**, 91-102.
23. Knall, C., Young, S., Nick, J.A., Buhl, A.M., Worthen, G.S., Johnson, G.L. (1996) Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem* **271**, 2832-8.
24. Harfouche, R., Hussain, S.N. (2006) Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
25. Harfouche, R., Gratton, J.P., Yancopoulos, G.D., Nosedá, M., Karsan, A., Hussain, S.N. (2003) Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *Faseb J* **17**, 1523-5.
26. Kim, I., Kim, H.G., So, J.N., Kim, J.H., Kwak, H.J., Koh, G.Y. (2000) Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* **86**, 24-9.
27. Knall, C., Worthen, G.S., Johnson, G.L. (1997) 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* **94**, 3052-7.
28. Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A., McLeish, K.R. (2000) Granulocyte-

- macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* **164**, 4286-91.
29. Dumont, D.J., Yamaguchi, T.P., Conlon, R.A., Rossant, J., Breitman, M.L. (1992) tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471-80.
  30. van der Geer, P., Hunter, T., Lindberg, R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 251-337.
  31. Gruber, B.L., Marchese, M.J., Kew, R. (1995) Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* **86**, 2488-93.
  32. Eklund, L., Olsen, B.R. (2006) Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* **312**, 630-41.
  33. Fujikawa, K., de Aos Scherpenseel, I., Jain, S.K., Presman, E., Christensen, R.A., Varticovski, L. (1999) Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp Cell Res* **253**, 663-72.
  34. Kim, I., Ryu, Y.S., Kwak, H.J., Ahn, S.Y., Oh, J.L., Yancopoulos, G.D., Gale, N.W., Koh, G.Y. (2002) EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *Faseb J* **16**, 1126-8.
  35. Tournaire, R., Simon, M.P., le Noble, F., Eichmann, A., England, P., Pouyssegur, J. (2004) A short synthetic peptide inhibits signal

- transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep* **5**, 262-7.
36. Zhu, W.H., MacIntyre, A., Nicosia, R.F. (2002) Regulation of angiogenesis by vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in the rat aorta model: distinct temporal patterns of intracellular signaling correlate with induction of angiogenic sprouting. *Am J Pathol* **161**, 823-30.
  37. Yoon, M.J., Cho, C.H., Lee, C.S., Jang, I.H., Ryu, S.H., Koh, G.Y. (2003) Localization of Tie2 and phospholipase D in endothelial caveolae is involved in angiopoietin-1-induced MEK/ERK phosphorylation and migration in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **308**, 101-5.
  38. DeBusk, L.M., Hallahan, D.E., Lin, P.C. (2004) Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. *Exp Cell Res* **298**, 167-77.
  39. Chen, J.X., Lawrence, M.L., Cunningham, G., Christman, B.W., Meyrick, B. (2004) HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J Appl Physiol* **96**, 612-20.
  40. Tilton, B., Andjelkovic, M., Didichenko, S.A., Hemmings, B.A., Thelen, M. (1997) G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem* **272**, 28096-101.
  41. Lowenstein, C.J., Morrell, C.N., Yamakuchi, M. (2005) Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* **15**, 302-8.
  42. Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J.M., Kriz, W., Thurston, G., Augustin, H.G. (2004) The Tie-2

ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* **103**, 4150-6.

43. Grob, P.M., David, E., Warren, T.C., DeLeon, R.P., Farina, P.R., Homon, C.A. (1990) Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J Biol Chem* **265**, 8311-6.
44. Tanaka, S., Robinson, E.A., Yoshimura, T., Matsushima, K., Leonard, E.J., Appella, E. (1988) Synthesis and biological characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor. *FEBS Lett* **236**, 467-70.
45. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J. (1987) 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* **84**, 9233-7.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Detection of Tie2 expression on neutrophil cell surface by FACScan analysis. Neutrophils were incubated with mouse monoclonal Tie2 IgG<sub>1</sub> (@Tie2; 1, 5 or 10  $\mu\text{g/ml}$ ) or with control mouse isotypic IgG<sub>1</sub> (control IgG<sub>1</sub>; 1, 5 or 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Neutrophils were then incubated with a secondary goat anti-mouse FITC-conjugated IgG (1:100). Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan. Representative analysis of 3 independent experiments.

**Fig. 2.** Ang1 and Ang2 mediate neutrophil migration through Tie2 activation. Neutrophils were added to the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus and the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS, Ang1 or Ang2 (0.1 to 10 nM; A). In another series of experiments, neutrophils were pretreated with a blocking goat anti-human Tie2 IgG (@Tie2; 5 or 10  $\mu\text{g/ml}$ ) or control goat isotypic IgG (IgG; 5 or 10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 15 minutes prior to the addition of neutrophils in the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus in which the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS, Ang1 or Ang2 (1 nM) (B). Treatment with CXCL8/IL-8 (25 nM; lower wells) was used as positive control. Migrating cells were fixed, stained and counted under light microscopy at 400X magnification. Values are means  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  and \*\*\*,  $p < 0.001$  compared to PBS, †,  $p < 0.05$ , ††,  $p < 0.01$  and †††,  $p < 0.001$  as compared to corresponding agonist.

**Fig. 3.** Angiopoietins-mediated neutrophil migration requires PI-3K signal transduction. Neutrophils were pretreated with two unrelated selective inhibitors for PI-3K, wortmannin ( $W_1$ , 10 nM;  $W_2$ , 100 nM) or LY294002 ( $LY_1$ , 0.5  $\mu$ M;  $LY_2$ , 5  $\mu$ M) for 15 minutes prior to the addition of neutrophils in the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus in which the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS, Ang1 or Ang2 (1 nM; A). The cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. In another set of experiments, neutrophils were stimulated with Ang1 (B), or Ang2 (C; 1 nM) for up to 30 minutes at room temperature. Western blot analyses were performed with an anti-phospho-Akt (p-Akt) IgG. Membranes were then stripped and corresponding protein expression determined by using an anti-Akt IgG.

**Fig. 4.** CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration requires PI-3K/Akt signal transduction. Neutrophils were added to the upper wells of a modified Boyden chamber; the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS or CXCL8/IL-8 (0.001 to 50 nM; A). In a second set of experiments, neutrophils were pretreated with wortmannin ( $W_1$ , 10 nM;  $W_2$ , 100 nM) or LY294002 ( $LY_1$ , 0.5  $\mu$ M;  $LY_2$ , 5  $\mu$ M) for 15 minutes prior to the addition of neutrophils in the upper wells and the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS or CXCL8/IL-8 (1 or 10 nM; B). The cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. In another set of experiments, neutrophils were stimulated with PBS or CXCL8/IL-8 (0.001 to 50 nM) for 2 min (C), neutrophils were also pretreated with wortmannin ( $W_1$ , 10 nM;  $W_2$ , 100 nM) or LY294002 ( $LY_1$ , 0.5  $\mu$ M;  $LY_2$ , 5  $\mu$ M) for 15 minutes prior stimulation with PBS or CXCL8/IL-8 (10 nM; 2 minutes; D). Western blot analyses of Akt activation were performed as detailed for Figure 3.

**Fig. 5.** Angiopoietins enhance CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. Neutrophils were pretreated (Pre-Tx) with Ang1 (A) or Ang2 (B; 0.1, 1 or 10 nM) for 15 minutes prior to the addition of neutrophils in presence of corresponding Ang1- or Ang2- conditioned media in the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus in which the lower wells (Bottom IL-8) were filled with RPMI  $\pm$  PBS or CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM). Following a sixty minute incubation period at 37°C, the cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. \*,  $p < 0.05$  compared to PBS or CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM). N.S., Not significant.

**Fig. 6.** Angiopoietins potentiate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration through PI-3K/Akt activation pathway. Neutrophils were initially pretreated with wortmannin (W<sub>2</sub>; 100 nM) or LY294002 (LY<sub>2</sub>; 5  $\mu$ M) for 15 minutes, which was followed by the addition of PBS, Ang1 or Ang2 (10 nM) for an additional 15 minutes of pretreatment. Neutrophils were then added to the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus, the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS or CXCL8/IL-8 (10 nM; A). Following a sixty minute incubation period at 37°C, the cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. \*,  $p < 0.05$  compared to PBS; †,  $p < 0.05$  compared to CXCL8/IL-8 (10 nM)  $\pm$  PBS, Ang1 or Ang2, and  $\Delta$ ,  $p < 0.05$  compared to CXCL8/IL-8 (10 nM) + PBS. In another set of experiments, neutrophils were stimulated with PBS, CXCL8/IL-8 (0.1, 1 or 10 nM)  $\pm$  Ang1 (0.1, 1 or 10 nM; B) or Ang2 (0.1, 1 or 10 nM; C) for 2 minutes at room temperature. Western blot analyses of Akt activation were performed as detailed for Figure 3.



## 3.9 FIGURES

Figure 1

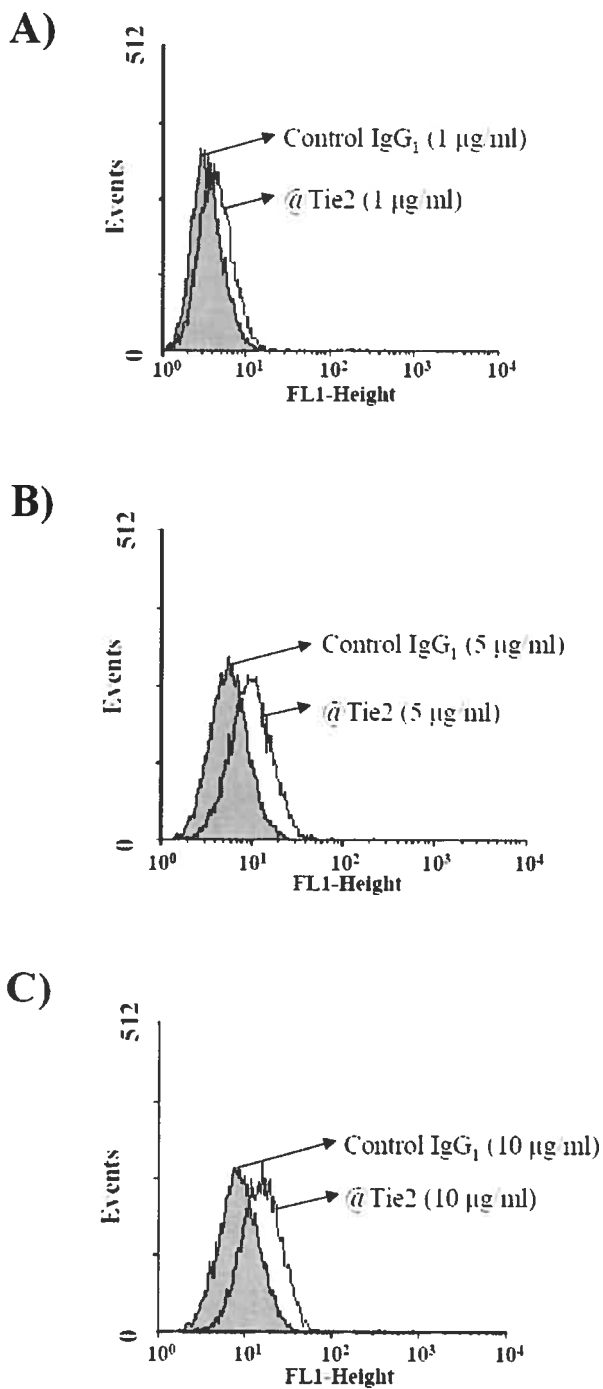


Figure 2

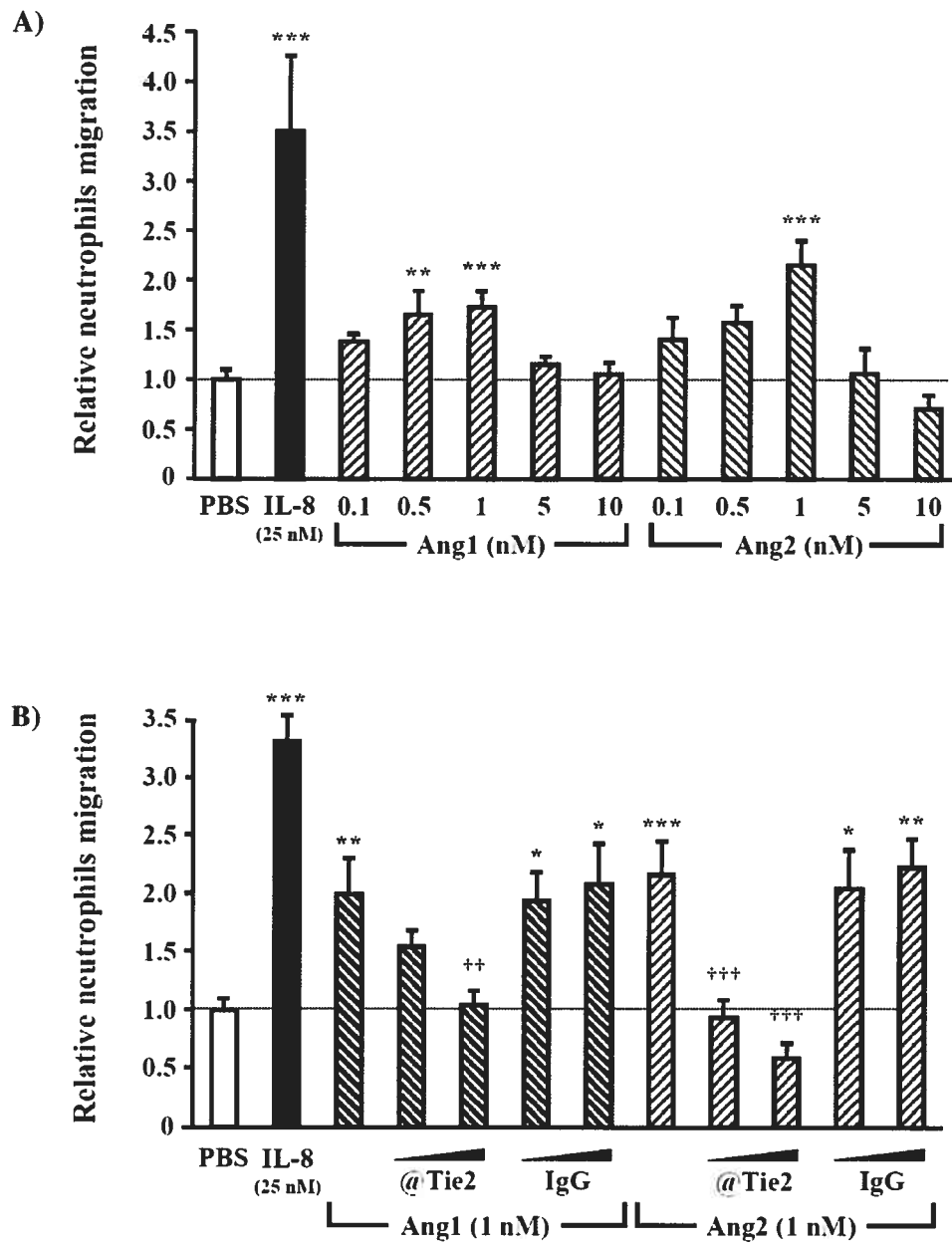
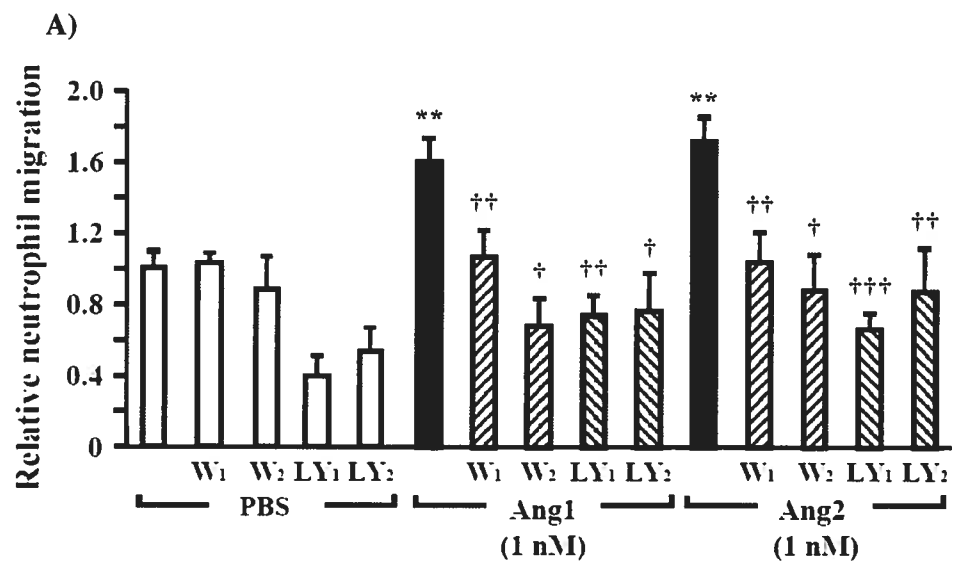
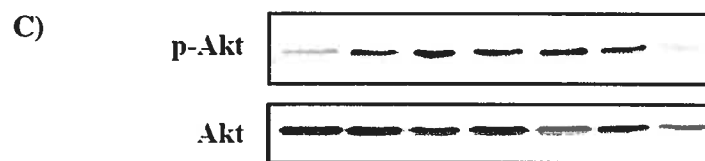


Figure 3



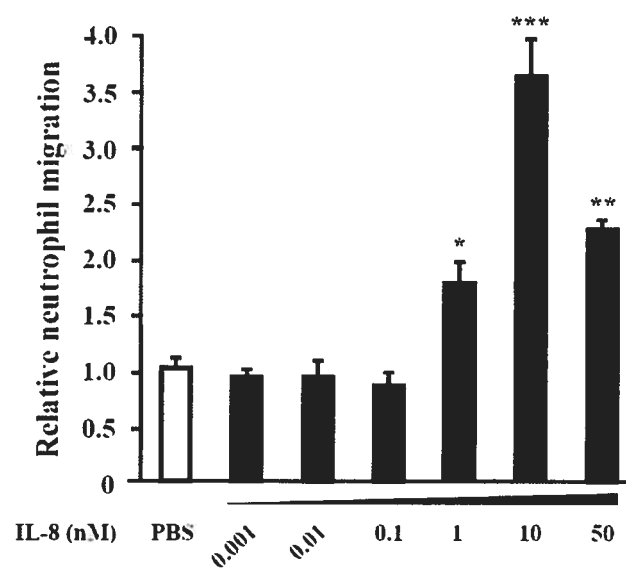
Relative Akt activation (p-Akt/Akt)	1.0	1.7	1.8	3.0	2.4	1.9	1.1
Time (min)	0	0.5	1	2	5	15	30
Ang1 (1 nM)	-	+	+	+	+	+	+



Relative Akt activation (p-Akt/Akt)	1.0	1.7	2.8	2.1	2.7	1.6	0.9
Time (min)	0	0.5	1	2	5	15	30
Ang2 (1 nM)	-	+	+	+	+	+	+

Figure 4

A)



B)

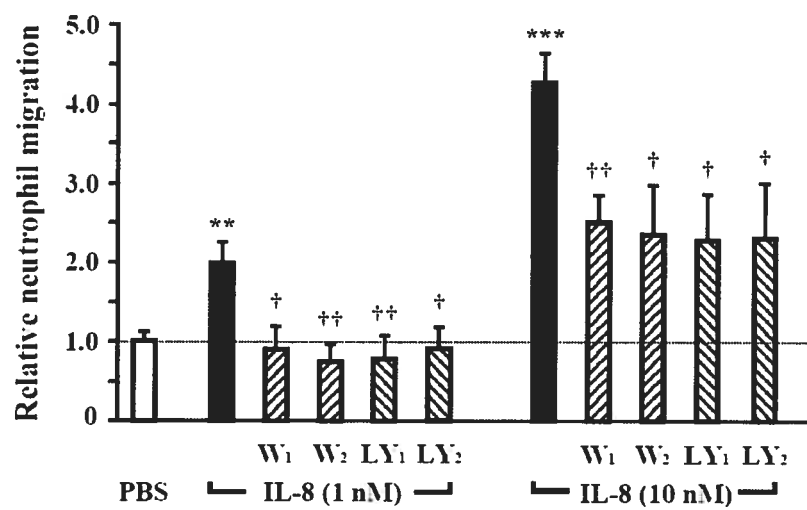


Figure 4

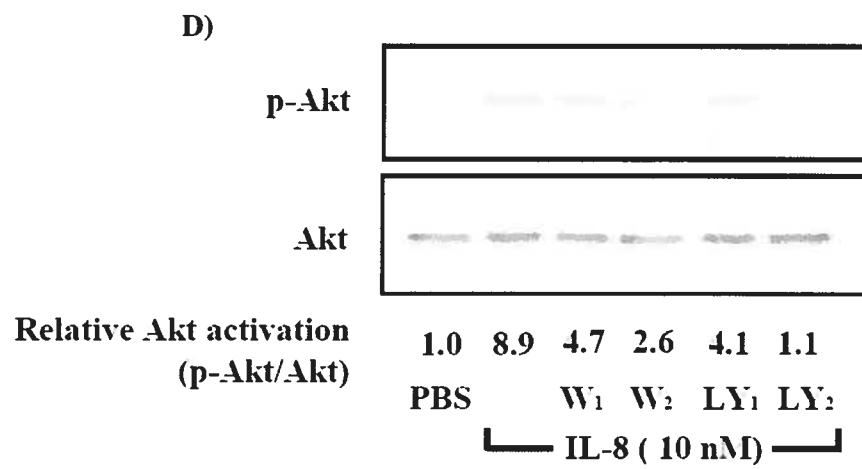
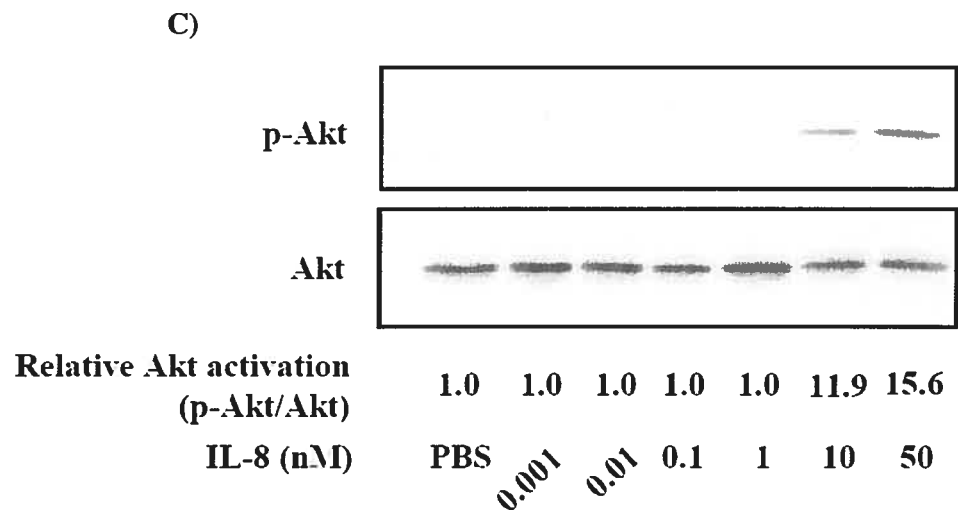


Figure 5

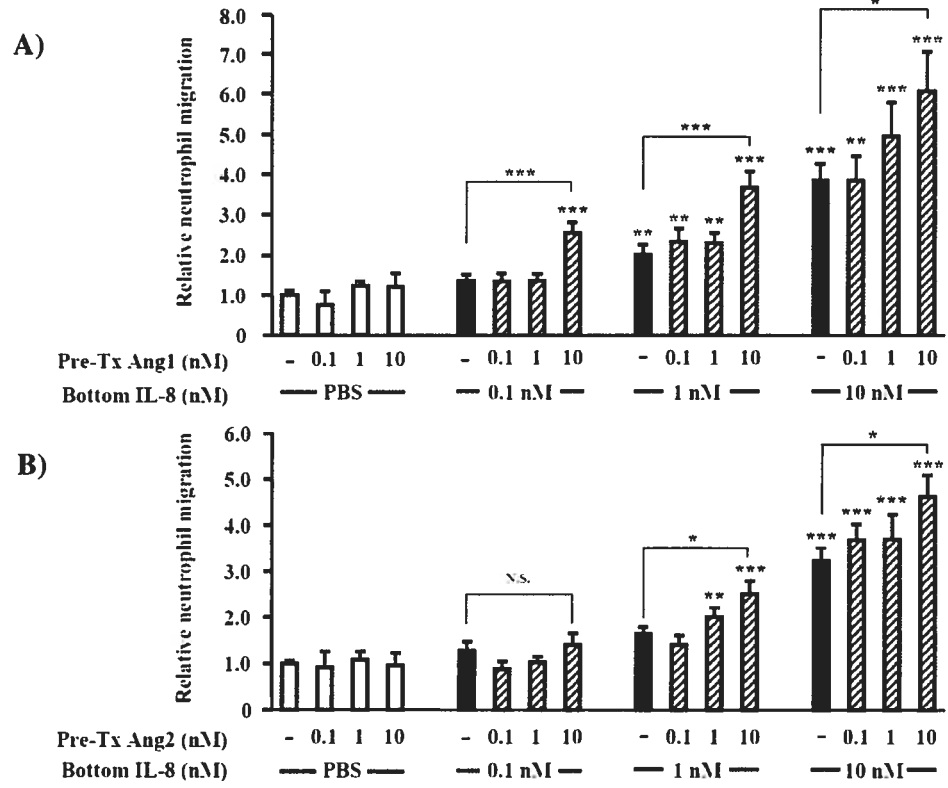
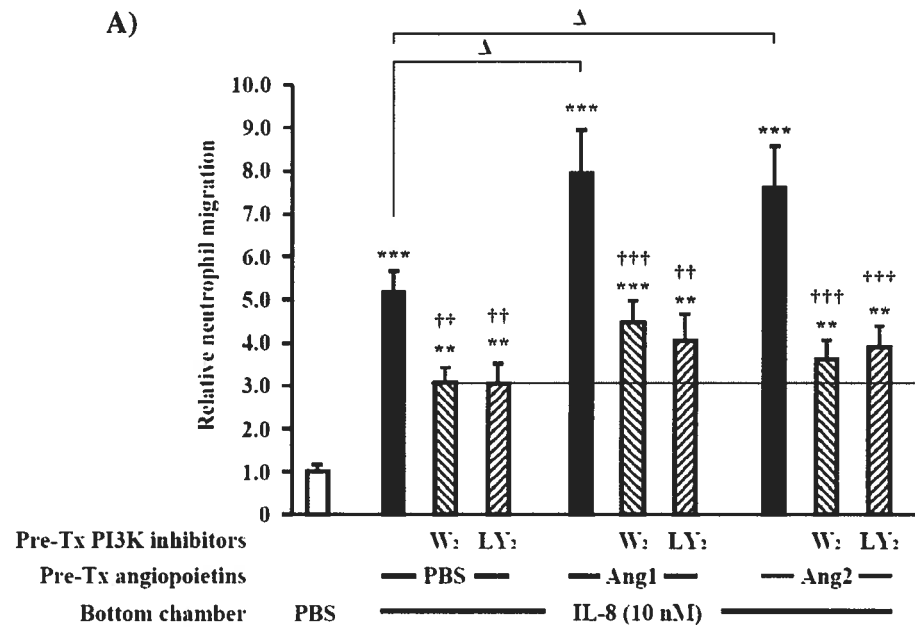


Figure 6







## 4.0 DISCUSSION

### 4.1 Hyperperméabilité vasculaire induite par la famille du VEGF

Notre laboratoire a montré que l'hyperperméabilité vasculaire engendrée par le VEGF-A<sub>165</sub> est médiée par la synthèse endothéliale de PAF (252). De plus, nous avons identifié les voies de signalisation requises pour cette synthèse de PAF dans les cellules endothéliales (66, 105, 253-255). D'autre part, des équipes de recherche ont montré que le NO est un médiateur de l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (74). Ainsi, au cours de la première étude, nous avons déterminé la capacité des membres de la famille du VEGF à moduler la perméabilité vasculaire et nous avons évalué la contribution du PAF et du NO dans cet effet inflammatoire du VEGF. Nos travaux ont permis de démontrer que l'hyperperméabilité induite par la famille du VEGF est médiée via le VEGFR-2 et que l'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1 est responsable de l'effet maximal observé sous un traitement au VEGF-A<sub>165</sub>. De plus, les résultats de notre étude suggèrent que le PAF est un médiateur essentiel, tandis que le NO, qui *per se* n'affecte pas l'intégrité vasculaire, est un cofacteur de l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.

### 4.2 Validation du modèle expérimental

Tout d'abord, nous avons validé notre modèle expérimental en effectuant des injections intradermiques de PBS, de VEGF-A<sub>165</sub> ou de PAF dans l'oreille de souris suivant une injection intraveineuse de bleu d'Evans. Ce dernier lie les protéines plasmatiques, plus spécifiquement l'albumine, et par conséquent, est un marqueur de l'exsudation des protéines (301). Tel qu'appréhendé, uniquement les injections intradermiques de VEGF-A<sub>165</sub> et de PAF dans l'oreille de souris ont

induit l'exudation du bleu d'Evans dans le derme. Cette observation est en accord avec les études antérieures montrant que le VEGF-A<sub>165</sub> et le PAF augmentent la perméabilité vasculaire aux macromolécules (8, 302). Puisque ces médiateurs proinflammatoires sont également reconnus pour engendrer une hyperperméabilité à l'eau et aux ions (206), nous avons effectué une analyse histologique des oreilles de souris traitées au PBS, au VEGF-A<sub>165</sub> et au PAF. L'examen à l'aide de la microscopie optique a révélé un épaissement tissulaire des oreilles injectées au VEGF-A<sub>165</sub> et au PAF comparativement au PBS supportant la présence d'un œdème tissulaire. Ensemble, ces observations confirment la validité du modèle expérimental dans le but d'évaluer la perméabilité vasculaire aux solutés (œdème) et aux macromolécules (albumine-bleu d'Evans) induite par le VEGF-A<sub>165</sub> et par le PAF.

#### **4.3 Le VEGFR-2 est responsable de l'hyperperméabilité induite par les membres de la famille du VEGF**

Afin de discriminer le rôle des récepteurs du VEGF dans la perméabilité vasculaire, nous avons utilisé une approche d'agonistes sélectifs. Nos résultats ont montré que le VEGF-A<sub>165</sub>, le VEGF-A<sub>121</sub>, le VEGF-C et le VEGF-D, tous des agonistes du VEGFR-2, ont augmenté la perméabilité vasculaire. D'un autre côté, les agonistes du VEGFR-1, le VEGF-B et le PlGF-1, ont été incapables d'induire un tel effet. En tenant compte du fait que le VEGF-C et le VEGF-D sont également des agonistes du VEGFR-3, il est raisonnable de penser que leur effet inflammatoire pourrait être médié par ce récepteur. Toutefois, Joukov et coll. ont rapporté qu'un mutant du VEGF-C ( $\Delta$ N $\Delta$ C156S-VEGF), devenu un ligand spécifique du VEGFR-3, ne possède plus la capacité d'induire

l'hyperperméabilité vasculaire (51). Cette dernière observation et nos résultats suggèrent que l'activation du VEGFR-2 est requise et suffisante afin d'induire l'hyperperméabilité de la famille du VEGF. Cette conclusion est aussi supportée par le fait que le VEGF-E, qui est un agoniste spécifique du VEGFR-2 et du co-récepteur NRP-1, induit l'accroissement de la perméabilité vasculaire (303).

#### **4.4 La NRP-1 potentialise l'hyperperméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>**

La présence exclusive de l'exon 7 dans le VEGF-A<sub>165</sub>, qui est absent du VEGF-A<sub>121</sub>, du VEGF-C, du VEGF-D et du PlGF-1 mais nécessaire pour la liaison du VEGF-A<sub>165</sub> à la NRP-1, nous a permis d'évaluer la contribution de la NRP-1 dans l'augmentation de la perméabilité induite par les analogues du VEGF. Nos données révèlent que l'injection du VEGF-A<sub>165</sub> est approximativement trois fois plus puissante que celle du VEGF-A<sub>121</sub>, du VEGF-C et du VEGF-D pour induire l'exsudation des protéines plasmatiques. Ces résultats suggèrent que la NRP-1 potentialise l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Ce phénomène s'explique par la capacité de la NRP-1 de former un complexe avec le VEGFR-2, qui par conséquent, augmente l'affinité du VEGF-A<sub>165</sub> pour le VEGFR-2 (94). En accord, plusieurs études ont démontré que la NRP-1 potentialise les effets du VEGFR-2 incluant la migration endothéliale, la prolifération cellulaire, la synthèse de PGI<sub>2</sub> et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales (43, 67, 104, 105). De surcroît, une étude réalisée par notre laboratoire a montré que les cellules endothéliales issues d'aortes porcines (PAEC) cotransfectées avec la NRP-1 et le VEGFR-2 synthétisent davantage de PAF en réponse au VEGF-A<sub>165</sub> que les PAEC transfectées avec le VEGFR-2 seul (105). Ces données suggèrent

que la synthèse endothéliale de PAF est maximale sous un traitement au VEGF-A<sub>165</sub> due à sa liaison au complexe VEGFR-2/NRP-1. Cette observation nous permet donc de supposer que l'exudation maximale des protéines plasmatiques, qui est observée suite à une injection de VEGF-A<sub>165</sub>, pourrait être médiée par une synthèse accrue de PAF causée par l'effet potentiateur de la NRP-1 sur le VEGFR-2.

Fait intéressant, Becker et coll. ont rapporté que les souris transgéniques surexprimant le VEGF-A<sub>165</sub> présente un oedème pulmonaire pouvant être inhibé avec un anticorps dirigé contre la NRP-1 (304). Par conséquent, les auteurs ont suggéré que la présence de la NRP-1 est requise pour supporter l'hyperperméabilité du VEGF-A<sub>165</sub>, du moins au niveau pulmonaire. À la lumière de cette observation, il semble que l'importance de la NRP-1 dans l'hyperperméabilité du VEGF-A<sub>165</sub> peut varier en fonction de certaines conditions, par exemple : stimulation aiguë versus chronique et/ou tissus exposés. Nous pouvons conclure que la NRP-1 joue un rôle clé dans l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.

#### **4.5 Le PAF est un médiateur de l'hyperperméabilité induite par la famille du VEGF**

Tel que mentionné précédemment, les docteurs Sirois et Edelman ont montré que le prétraitement de rats avec un antagoniste du PAF a prévenu l'exudation des protéines plasmatiques induite par le VEGF-A<sub>165</sub> et ce, dans tous les organes examinés (252). D'un autre côté, Murohara et coll. ont rapporté que le prétraitement de cochons d'inde avec un antagoniste du PAF n'a pas atténué

l'hyperperméabilité observée suite à une injection sous-cutanée de VEGF-A<sub>165</sub> (74). Or, une comparaison entre l'étude initiale des docteurs Sirois et Edelman par rapport à celle de Murohara et coll. permet de soulever certains éléments qui expliqueraient cette différence, incluant le choix des antagonistes ainsi que la dose à laquelle ils ont été utilisés. En effet, dans l'étude de Sirois et Edelman, le BN52021 a été sélectionné et injecté à une dose de 10 mg/kg, tandis que Murohara et coll. ont choisi de prétraiter les cochons d'inde avec le CV6209 à une dose de 2 mg/kg (305). Or, dans la présente étude, afin de pallier aux éléments énumérés ci haut, deux antagonistes supplémentaires du PAF, soit le LAU8080 et le CV3988, ont été administrés chez la souris à une dose de 20 mg/kg. Nos données ont montré que les deux antagonistes préviennent l'exudation des protéines plasmatiques induite par le VEGF-A<sub>165</sub> supportant l'hypothèse que le PAF est un médiateur essentiel à l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Il est important de mentionner que ces antagonistes ont également bloqué la perméabilité vasculaire induite par le PAF validant ainsi leur spécificité.

D'autre part, les différences entre nos études et celle de Murohara et coll. peuvent s'expliquer aussi par le fait que la synthèse endothéliale de PAF en réponse au VEGF-A<sub>165</sub> peut varier en fonction du tissu examiné et/ou de l'espèce animale. En effet, des études réalisées par notre laboratoire ont montré que les CE issues d'aortes de bœuf (BAEC) génèrent une synthèse de PAF plus importante en réponse au VEGF-A<sub>165</sub> que les CE issues de veines ombilicales humaines (HUVEC) (43).

#### **4.6 Le NO est un cofacteur de l'hyperperméabilité médiée par la famille du VEGF**

Contrairement au PAF, la capacité du NO d'augmenter *per se* la perméabilité vasculaire est plus controversée. Certaines études ont rapporté que non seulement l'application d'un donneur de NO n'induit pas la perméabilité dans certains lits vasculaires (74, 306-308), mais qu'elle peut réduire la perméabilité basale (309). D'un autre côté, d'autres études ont rapporté que les donneurs de NO augmentent la perméabilité vasculaire (55, 310). Cette variabilité peut être attribuée au fait que l'administration de forte dose de NO peut favoriser la formation de radicaux libres de l'oxygène, notamment le peroxy-nitrite, et ainsi engendrer une hyperperméabilité vasculaire (311, 312).

Compte tenu de cette variabilité, nous avons voulu définir la contribution du NO dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Aussi, afin que le NO soit considéré comme un médiateur de l'hyperperméabilité vasculaire du VEGF-A, les conditions suivantes doivent être respectées :

- 1) le VEGF-A induit la synthèse de NO dans les CE,
- 2) l'inhibition de la production de NO bloque l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>,
- 3) l'application d'un donneur de NO engendre un accroissement de la perméabilité vasculaire de façon similaire à celle du VEGF-A<sub>165</sub>.

Premièrement, plusieurs groupes de recherche incluant le notre ont montré que le VEGF-A<sub>165</sub> induit la production de NO et de GMPc dont la cinétique est compatible avec celle de l'hyperperméabilité vasculaire médiée par le VEGF-A<sub>165</sub>

(74, 75, 313). Deuxièmement, dans la présente étude, nous avons observé que le prétraitement des souris avec le L-NAME, un inhibiteur de la eNOS, a prévenu l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Toutefois, nos résultats montrent que l'injection intradermique de nitroprussiate de sodium (SNP), un donneur de NO, dans l'oreille de souris n'a pas affecté la perméabilité vasculaire. Puisque cette dernière condition n'a pas été respectée, mais que les deux premières ont été remplies, nos résultats suggèrent que le NO est un cofacteur dans l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.

Cette conclusion repose en partie sur l'absence d'effet de la part du SNP et de l'acétylcholine sur la perméabilité vasculaire. Or, il est possible d'argumenter que le SNP et l'acétylcholine n'augmentent pas la perméabilité vasculaire parce qu'ils n'affectent pas les CE responsables de ce phénomène, ce qui, par conséquent, invaliderait la conclusion. Le SNP est un composé chimique dont le métal de transition relâche du NO suivant son contact avec les groupements thiols (314). Ces derniers sont présents dans la chaîne latérale de certains acides aminés. Par conséquent, le SNP est un donneur de NO agissant de façon non-sélective sur les cellules. Ainsi, il y a peu de chance que les CE des veinules post-capillaires n'aient pas été affectées par ce traitement. À l'appui, Klabunde et coll. ont démontré que le SNAP, un autre donneur de NO similaire au SNP, augmente le diamètre des vaisseaux de la microcirculation dans la joue de cochon d'inde sans toutefois accroître la perméabilité de ces vaisseaux (307). Quant à l'acétylcholine, son action vasodilatatrice est médiée par le récepteur muscarinique 3 (M3) localisé à la surface endothéliale. En dépit qu'il est reconnu que l'acétylcholine induit une vasodilatation artérioveineuse, la localisation

précise de M3 dans l'arbre vasculaire a été peu étudiée. Par conséquent, il serait pertinent de déterminer si le récepteur M3 est présent spécifiquement sur les CE des veinules post-capillaires et ce, afin de supporter nos observations.

Par ailleurs, suite au prétraitement des souris avec le L-NAME, nous avons observé une vasoconstriction artérioveineuse partielle dans l'oreille de souris semant un doute quant à l'effet anti-inflammatoire du L-NAME. En effet, la production basale de NO permet le maintien d'une dilation artérioveineuse et par conséquent, il est raisonnable de penser que la constriction partielle générée par le L-NAME pourrait affecter l'hyperperméabilité médiée par le VEGF-A<sub>165</sub>. Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons reproduit la vasoconstriction du L-NAME avec la phényléphrine, un agoniste  $\alpha$ -adrénergique. Nos résultats ont montré que la vasoconstriction induite par la phényléphrine n'a pas affectée l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Ainsi, ces données démontrent que la capacité du L-NAME à prévenir l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub> est indépendante de la vasoconstriction partielle que nous avons observée. De plus, ces résultats supportent notre hypothèse initiale que le NO est un cofacteur intracellulaire dans l'hyperperméabilité du VEGF-A<sub>165</sub> indépendamment de sa capacité à moduler le tonus vasculaire.

La GCs est un des principaux effecteurs du NO et son produit, la GMPc, est associé à plusieurs des pathologies impliquant une dysfonction de la production du NO notamment la neurodégénérescence, la dysfonction érectile et l'hypertension (315). De plus, une étude antérieure effectuée par notre laboratoire a démontré que la stimulation des BAEC avec le VEGF-A<sub>165</sub> induit la production



de GMPc et que celle-ci est dépendante de l'activation de la eNOS (75). Aussi, l'utilisation d'analogues stables de la GMPc permet de reproduire certaines des activités biologiques médiées par le NO (316, 317). Par conséquent, nous avons évalué la contribution de la GCs dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Similairement au prétraitement avec le L-NAME, nos données ont montré que le prétraitement des souris avec un inhibiteur de la guanylate cyclase, le 1 H-(1, 2, 4) oxadiazolo (4, 3- $\alpha$ ) quinoxalin-1-one (ODQ), prévient l'exsudation des protéines plasmatiques induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Ces résultats indiquent que l'activation de la voie eNOS/NO/GCs/GMPc est nécessaire à l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Toutefois, nos résultats ne permettent pas d'identifier le ou les isoformes de la GCs impliqués dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Plusieurs isoformes de la GCs ont été identifiés (318) et l'inhibiteur utilisé dans notre étude ne permet pas de différencier les isoformes.

Fait intéressant, les souris transgéniques surexprimant le peptide auriculaire natriurétique (ANP) montre une résistance à l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>164</sub> (319). Or, le récepteur de l'ANP est du type guanylate cyclase, qui génère du GMPc en réponse à l'ANP et, il a été rapporté que le GMPc ainsi produit est responsable de l'effet anti-inflammatoire de l'ANP (319). Ces résultats semblent conflictuels avec ceux de notre étude, qui démontre que le GMPc a des effets proinflammatoires. Les raisons de cet effet bivalent du GMPc dans la perméabilité vasculaire du VEGF-A<sub>165</sub> ne sont pas flagrantes, mais l'activation de voies cellulaires localisées pourrait être en cause. En effet, puisque le récepteur de l'ANP est membranaire, il est raisonnable de penser que

les cibles du GMPc sont membranaires ou à proximité. De fait, il a été montré que l'ANP, via le GMPc, active la PKG qui peut moduler les canaux ioniques membranaires (319, 320). D'autre part, le GMPc généré par la GCs agirait via les phosphodiesterases cytosoliques (206, 321) supportant des effets proinflammatoires. Ainsi, l'effet net du GMPc dépendrait de la localisation cellulaire de la GC (cytosolique versus membranaire) et de l'activation des voies de signalisation à proximité.

#### **4.7 L'inhibition de l'AMPc/PKA est une cible de la voie eNOS/NO induite par le VEGF-A<sub>165</sub>**

Dans les plaquettes, il a été démontré qu'une augmentation de GMPc a pour effet de stimuler la phosphodiesterase de type II, qui possède pour substrat l'AMPc, engendrant ainsi une diminution de l'AMPc (322). Or, dans les CE, l'AMPc promeut l'intégrité vasculaire par l'entremise de la PKA, une kinase dépendante de l'AMPc (206, 323). Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'activation de la voie eNOS/NO/GCs/GMPc par le VEGF-A<sub>165</sub> aboutit à l'inhibition de la cAMP/PKA établissant ainsi un environnement proinflammatoire. Tout d'abord, l'inhibition de la PKA n'a pas affecté la perméabilité basale ni celle induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. En revanche, nos résultats ont montré que l'inhibition de la eNOS ou de la GCs prévient l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Nos données révèlent que l'inhibition concomitante de la eNOS et de la PKA rétablit l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Aussi, ces résultats supportent notre hypothèse initiale et poussent d'un cran additionnel les connaissances actuelles sur la signalisation cellulaire impliquée dans l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.

Il est à noter que le prétraitement des souris avec le L-NAME a aussi bloqué l'hyperperméabilité médiée par le PAF, ce qui est en accord avec les études rapportant que l'inhibition enzymatique de la eNOS prévient l'accroissement de la perméabilité vasculaire induite par l'histamine, l'ADP, la bradykinine, les ionophores, l'ATP, le PAF et le VEGF-A<sub>165</sub> (pour revue voir (206)). Ainsi, nos résultats montrent que le NO contribue à la perméabilité vasculaire induite tant par le VEGF-A<sub>165</sub> que par le PAF. De plus, le PAF participe à l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Afin d'intégrer ces résultats, deux modèles peuvent être envisagés. Premièrement, l'effet perméabilisant du VEGF-A<sub>165</sub> pourrait être le résultat d'une relation linéaire impliquant successivement le PAF et le NO. Deuxièmement, le VEGF-A<sub>165</sub> pourrait induire de façon parallèle la synthèse du NO et du PAF, et le PAF, à son tour, pourrait induire la synthèse du NO. Ainsi, ce dernier modèle suggère que la synthèse de NO induite par le VEGF-A est biphasique. À l'appui, notre laboratoire a rapporté que le VEGF-A<sub>165</sub> induit la synthèse de GMPc, un effecteur du NO, de façon biphasique (75). De surcroît, le fait que le PAF ne contribue pas à toutes les activités biologiques du VEGF-A supporte aussi le second modèle. La vasodilatation induite par VEGF-A est indépendante de la synthèse de PAF, mais dépendante de la production de NO suggérant qu'il ne s'agit pas du modèle de relation linéaire. Toutefois, nos données ne permettent pas de départager entre les deux modèles et des expériences additionnelles seraient nécessaires afin d'y parvenir. Par exemple, la mesure en temps réel de la synthèse de NO pourrait être utile. En effet, dans le cas d'un modèle de type parallèle, une synthèse biphasique serait probablement observée avec un premier maximum induit par le VEGF-A suivi d'un deuxième maximum médié par le PAF. Néanmoins, à partir de nos résultats, il apparaît que

l'activation de la voie eNOS permet l'établissement d'un environnement proinflammatoire nécessaire à l'augmentation de la perméabilité vasculaire par les médiateurs inflammatoires.

#### **4.8 Contribution du PAF et du NO dans la phosphorylation de la VE-cadhérine engendrée par le VEGF-A<sub>165</sub>**

Des études récentes ont démontré que le PAF et le VEGF-A<sub>165</sub> induisent la phosphorylation de la VE-cadhérine et des autres protéines de la jonction adhérente (37, 219). Or, la phosphorylation des protéines de la jonction cellulaire a pour effet de favoriser la dissociation de la VE-cadhérine du cytosquelette d'actine et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (212). Aussi, afin de délimiter davantage le rôle du PAF et du NO dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>, nous avons évalué leur contribution respective dans la phosphorylation de la VE-cadhérine induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Le prétraitement des HUVEC avec un antagoniste du récepteur du PAF a complètement bloqué la phosphorylation de la VE-cadhérine médiée par le VEGF-A<sub>165</sub>. En revanche, l'inhibition spécifique de la eNOS ou de la GCs a partiellement inhibé cette phosphorylation. En accord, une autre équipe de recherche a démontré que l'inhibition de la eNOS réduit partiellement la redistribution de la VE-cadhérine à la jonction endothéliale induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (324). Ainsi, nos résultats suggèrent que le NO pourrait en partie contribuer à l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub> en inhibant l'effet stabilisateur de l'AMPC/PKA et en induisant la phosphorylation de la VE-cadhérine.

#### 4.9 Perspectives

Dans l'éventuelle poursuite de ce projet, certaines expériences permettraient de délimiter davantage le rôle du PAF et du NO dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub>. Par exemple, l'actine est reconnue pour contribuer à l'hyperperméabilité vasculaire engendrée par les médiateurs inflammatoires (325, 326). La polymérisation de l'actine agit de concert avec le relâchement des jonctions intercellulaires pour former des brèches et favoriser le passage des protéines, des ions et des molécules d'eau (206). De plus, il a été démontré que le VEGF-A<sub>165</sub> induit la formation de fibres de stress dans les cellules endothéliales (83, 85). Aussi, une approche intéressante consisterait à visualiser par microscopie confocale la formation des filaments d'actine induite par le VEGF-A<sub>165</sub> et à évaluer la contribution du NO et du PAF dans ce phénomène.

La FAK est une protéine cytoplasmique retrouvée au sein du complexe d'adhérence focale et son activation par les intégrines, les facteurs de croissance et les cytokines entraîne son autophosphorylation, qui se traduit par la transmission de signaux. La FAK a été impliquée dans plusieurs processus incluant la migration et la survie cellulaire (327). De plus, une étude récente a démontré que l'inhibition de la FAK réduit l'hyperperméabilité vasculaire induite par le VEGF-A<sub>165</sub> (328). Il a été proposé qu'il y a une relation directe entre la phosphorylation de la FAK et l'hyperperméabilité vasculaire (329). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la contribution du PAF et du NO dans la phosphorylation de la FAK induite par le VEGF-A<sub>165</sub>.

D'un point de vue thérapeutique, les études de notre laboratoire démontrent que le PAF est un médiateur essentiel de l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub>, ainsi l'utilisation d'un antagoniste du PAF pourrait avoir un impact bénéfique dans le cadre d'une thérapie anti-angiogénique. Il est bien connu que les cellules tumorales hypoxiques sécrètent du VEGF-A<sub>165</sub> favorisant ainsi l'angiogenèse et subséquentement la croissance tumorale. Or, il a été proposé que le VEGF-A<sub>165</sub> contribue à initier l'angiogenèse tumorale en augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins à proximité des cellules cancéreuses permettant l'établissement d'une matrice composée de fibrines (5). En tenant compte de nos observations, il est raisonnable de penser que l'utilisation d'un antagoniste du PAF pourrait bloquer l'initiation de l'angiogenèse tumorale induite par le VEGF-A<sub>165</sub> et par conséquent, ralentir la progression de la tumeur. À l'appui de cette hypothèse, Montrucchio et coll. ont rapporté que le traitement des souris avec des antagonistes du PAF prévient l'angiogenèse induite par le VEGF-A<sub>165</sub> dans un modèle murin d'implant de *matrigel* (258).

#### 4.10 Conclusions de la première étude

À la lumière des objectifs initiaux, nous pouvons conclure :

- 1) Notre étude démontre que la perméabilité vasculaire induite par les membres de la famille du VEGF est médiée par le VEGFR-2, et que, l'hyperperméabilité maximale, observée sous un traitement au VEGF-A<sub>165</sub>, nécessite l'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1,
- 2) Le PAF est un médiateur essentiel de l'hyperperméabilité vasculaire induite par les membres de la famille du VEGF et ce, dû à son effet direct sur l'intégrité vasculaire en partie via la phosphorylation de la VE-cadhérine.
- 3) Étant incapable d'accroître la perméabilité vasculaire en soi, le NO agit à titre de cofacteur dans l'hyperperméabilité du VEGF-A<sub>165</sub>. Toutefois, l'activation de la voie du NO par le VEGF-A<sub>165</sub> permet d'établir des conditions proinflammatoires en désactivant la voie stabilisatrice AMPc/PKA.

Ainsi, les résultats de cette première étude souscrivent à mettre en valeur la contribution du PAF et de clarifier le rôle du NO dans l'hyperperméabilité induite par le VEGF-A<sub>165</sub> *in vivo*. Ils ont permis d'identifier certaines des cibles moléculaires délimitant la contribution du PAF et du NO. Dans la perspective d'une thérapie anti-angiogénique, ces résultats pourraient permettre le développement de thérapies plus ciblées.

#### **4.11 Activités proinflammatoires des angiopoïétines**

Jusqu'à tout récemment, le VEGF était considéré comme la seule famille de facteurs de croissance possédant des propriétés proinflammatoires. Or, de récentes études réalisées par notre laboratoire ont démontré que Ang1 et Ang2 induisent aussi des activités proinflammatoires aiguës incluant la synthèse endothéliale de PAF, la translocation de la P-sélectine à la surface endothéliale et l'adhésion transitoire des neutrophiles aux CE activées (127, 128). De plus, nous avons détecté l'expression de Tie2 à la surface des neutrophiles et démontré que la stimulation des neutrophiles avec Ang1 et Ang2 génère des effets proinflammatoires tels que l'activation fonctionnelle de la  $\beta$ 2-intégrine, la synthèse endogène de PAF et l'adhésion des neutrophiles à la matrice extracellulaire (127). Dans la présente étude, nous venons de démontrer que Ang1 et Ang2 induisent la migration des neutrophiles par l'entremise de la voie PI3K. De plus, nous avons démontré que Ang1 et Ang2 potentialisent la migration des neutrophiles en réponse à une autre cytokine proinflammatoire.

#### **4.12 Tie2 est exprimé à la surface des neutrophiles**

Précédemment, notre laboratoire a rapporté la détection de Tie2 à la surface des neutrophiles humains (127). Par la suite, Wiedermann et coll. ont également observé l'expression de Tie2 à la surface des éosinophiles (147). Les éosinophiles et les neutrophiles sont des cellules polynucléées dont la densité cellulaire est très similaire. Or, la technique d'isolation des neutrophiles utilisée dans notre étude initiale était basée sur un gradient de densité ne permettant pas la séparation des cellules polynucléées entre eux. Par conséquent, dans un premier temps, nous avons voulu confirmer par cytométrie de flux la présence de Tie2 sur



les neutrophiles afin d'exclure une possible contamination aux éosinophiles lors de notre étude antérieure. Nos résultats supportent notre étude initiale telle que démontré par une analyse en cytométrie de flux sur des populations de polynucléaires avec un pourcentage de neutrophiles supérieur à 95%. Entre temps, Sturn et coll. ont également rapporté la détection de Tie2 sur une population de cellules polynuclées enrichie de neutrophiles et que Ang1 et Ang2 ont un effet chimiotactique sur les neutrophiles (146).

Règle générale, la présence de Tie2 est considérée comme un marqueur des cellules endothéliales. Toutefois, Tie2 est aussi exprimé par les précurseurs des cellules endothéliales et par les cellules hématopoïétiques (148-150), mais non par les monocytes/macrophages (330). Par conséquent, sa présence sur les neutrophiles suggère fortement que son expression est maintenue tout au long du développement de la lignée des neutrophiles et peut-être même parmi tous les granulocytes. En effet, puisque les éosinophiles expriment Tie2 et que ceux-ci partagent avec les basophiles un précurseur de la lignée des promyélocytes engagés, il y a de forte chance que Tie2 soit aussi présent à la surface des basophiles, une autre cellule polynuclée. Il est à noter que les basophiles sont les moins nombreux (0,5%) des granulocytes et qu'ils se transforment en mastocytes après leur migration tissulaire. Des observations effectuées par notre laboratoire semblent supporter cette hypothèse démontrant la présence de Tie2 à la surface des HL60, une lignée myélocytaire établie qui a été isolée à partir de la moelle osseuse d'un patient atteint d'une leucémie aiguë (données non publiées). Par ailleurs, puisque les angiopoïétines préviennent l'apoptose des cellules

endothéliales, il serait intéressant d'évaluer si elles contribuent également à la survie des HL60 et des neutrophiles.

#### **4.13 Les angiopoïétines induisent des effets proinflammatoires sur les neutrophiles**

Nos résultats démontrent que Ang1 et Ang2 induisent la migration des neutrophiles avec un effet maximal à 1 nM, ce qui est en accord avec l'étude de Sturn et coll. (146). Fait intéressant, à une concentration plus élevée, l'effet chimioattractant des angiopoïétines sur les neutrophiles disparaît. Nous avons observé un tel phénomène dans des contextes expérimentaux différents, notamment lors de la synthèse endothéliale de PAF induite par les angiopoïétines, la translocation de la P-sélectine médiée par le VEGF-A<sub>165</sub> et les angiopoïétines (43, 127, 128). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que la liaison du ligand à un récepteur tyrosine kinase induit la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur TK permettant la transduction du signal (128, 293). Toutefois, quand la quantité de ligands surpasse le nombre de récepteurs, la dimérisation est entravée empêchant ainsi l'activation subséquente de la cascade intracellulaire (294).

D'un autre côté, nos résultats ont montré que CXCL8/IL-8, qui agit via un récepteur à 7 domaines transmembranaires, génère aussi une courbe dose-réponse en forme de cloche suggérant que ce phénomène n'est pas exclusif aux récepteurs tyrosines kinases. Aussi, il existe une explication alternative à ce phénomène qui réside dans la capacité même du neutrophile de s'orienter en direction d'un agent chimioattractant. À des concentrations faibles et intermédiaires, la membrane

cellulaire est partiellement exposée à l'agent chimioattractant permettant aux neutrophiles de s'orienter vers la source attractante. Par contre, à des concentrations saturantes de chimioattractant, il est plausible que la surface entière du neutrophile soit exposée empêchant ainsi ce dernier de s'orienter vers la source et par conséquent, de migrer.

#### **4.14 La PI3K est un acteur clé de la migration des neutrophiles induite par Ang1 et Ang2**

Dans les cellules endothéliales, il a été démontré que la liaison des angiopoïétines au récepteur Tie2 engendre la dimérisation et l'autophosphorylation des résidus tyrosines permettant l'activation de signaux intracellulaires. Par exemple, la stimulation des CE avec Ang1 engendre la phosphorylation du résidu Y1102 de Tie2 mobilisant la PI3K (133). Cette dernière est un important médiateur des fonctions biologiques des angiopoïétines incluant la migration des cellules endothéliales et des éosinophiles (147, 164). D'autre part, plusieurs études ont rapporté que Ang1 et Ang2 peuvent également activer les voies p38 MAPK et ERK1/2, qui sont impliquées dans la survie cellulaire (184). Par conséquent, nous avons prétraité les neutrophiles à l'aide d'inhibiteurs des différentes voies métaboliques mentionnées ci-dessus dans le but de déterminer leur fonction dans la migration des neutrophiles induite par les angiopoïétines. Le prétraitement des neutrophiles avec deux inhibiteurs indépendants de la PI3K, la wortmannin et le LY294005 a bloqué la migration des neutrophiles médiée par Ang1 et Ang2. Toutefois, les inhibiteurs des voies p38 MAPK et ERK1/2 n'ont pas affecté la migration des neutrophiles induite par Ang1 et Ang2.

La PI3K joue un rôle important dans les fonctions biologiques des neutrophiles incluant la migration et le relargage de radicaux libres (270). Les neutrophiles expriment les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\delta$  de la PI3K Ia et l'isoforme  $\gamma$  de la PI3K IIa (261, 273). Or, les inhibiteurs de la PI3K utilisés dans le cadre de cette étude ne permettent pas de distinguer quel isoforme de la PI3K est impliqué. Néanmoins, Sturn et coll. ont rapporté que la migration des neutrophiles induite par les angiopoïétines est atténuée suite à l'inhibition de Src. Or, Src est reconnu pour activer l'isoforme PI3K $\delta$  (146, 331). D'autre part, ils ont montré que la migration des neutrophiles en direction des angiopoïétines est aussi sensible à la toxine pertussique indiquant l'implication des protéines G-hétérotrimériques, qui quant à elles peuvent activer l'isoforme PI3K $\gamma$  (146, 332). Par conséquent, ces observations ainsi que nos résultats suggèrent que tant la PI3K $\delta$  que la PI3K $\gamma$  pourraient participer à la migration des neutrophiles induite par les angiopoïétines. Il est également important de mentionner que la contribution de ces deux isoformes à la migration n'est pas spécifique aux angiopoïétines puisqu'il a été démontré que la PI3K $\delta$  et la PI3K $\gamma$  contribuent à la chimiotaxie des neutrophiles en direction du tripeptide bactérien, fMLP (270, 333).

La stimulation de la PI3K par les angiopoïétines peut mobiliser et activer en aval plusieurs protéines de signalisation telles que la FAK, RhoA, Rac1, ERK1/2 et Akt (133). Nos données montrent bien l'activation d'Akt par les angiopoïétines avec une cinétique de phosphorylation similaire à celle observée avec d'autres médiateurs inflammatoires incluant CXCL8/IL-8 et fMLP (297). Toutefois, puisque la PI3K possède plusieurs effecteurs, nos résultats ne permettent pas de conclure quant à l'implication d'Akt dans l'effet attractant des angiopoïétines sur

les neutrophiles. En revanche, l'état de phosphorylation d'Akt nous a permis d'évaluer l'activation de la PI3K par les angiopoïétines. De plus, un aspect majeur des données présentées vient du fait que cette activation d'Akt par les angiopoïétines est la première voie intracellulaire rapportée pouvant être activée par les angiopoïétines dans les neutrophiles.

#### **4.15 Les angiopoïétines potentialisent la migration des neutrophiles induite par CXCL8/IL-8**

En réponse à une infection, les cytokines et les chimiokines sont produites simultanément et peuvent interagir ensemble afin d'amplifier la réponse inflammatoire aiguë. Ce phénomène d'amplification peut être observé à différents niveaux de la réponse inflammatoire aiguë. Par exemple, le TNF- $\alpha$  induit la synthèse de CXCL8/IL-8 dans les neutrophiles de façon plus marquée que l'IL-1 $\beta$ . Toutefois, combinés, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent un effet synergique sur la production de CXCL8/IL-8 (334). Cet effet d'amplification est aussi observé dans le contexte de la migration des neutrophiles et se traduit par une synergie entre les différents chimioattractants. Ainsi, il a été rapporté que le prétraitement des neutrophiles avec regakine-1 potentialise l'effet chimioattractant du C5a (262, 335). Par conséquent, nous avons voulu déterminer si les angiopoïétines pouvaient avoir un tel effet sur la migration des neutrophiles induite par une autre cytokine proinflammatoire.

Étant donné que la stimulation des CE avec des médiateurs inflammatoires induit la relâche de Ang2 et de CXCL8/IL-8 des corps de Weibel-Palade et que toutes deux promouvoient l'adhésion et la migration des neutrophiles, nous avons émis

l'hypothèse que les angiopoïétines pourraient affecter l'effet chimiotactique de CXCL8/IL-8. Dans une première série d'expériences, nous avons défini l'effet de CXCL8/IL-8 sur la migration des neutrophiles. Nos données démontrent que CXCL8/IL-8 induit la migration des neutrophiles de façon dose-dépendante avec une courbe en forme de cloche. En accord avec les valeurs rapportées dans la littérature (298-300), nous avons observé que la chimiotaxie des neutrophiles est maximale à une concentration de 10 nM de CXCL8/IL-8.

Ensuite, nous avons prétraité les neutrophiles avec les angiopoïétines avant de les exposer à un gradient de concentration de CXCL8/IL-8. Nos résultats montrent que le prétraitement des neutrophiles avec Ang1 et Ang2 potentialise leur migration en direction de CXCL8/IL-8. Ainsi, cette observation suggère que les angiopoïétines sensibilisent les neutrophiles à répondre à l'effet chimioattractant de CXCL8/IL-8. Par ailleurs, une analyse plus poussée de nos données et de notre méthodologie révèle une autre information pertinente. En effet, les neutrophiles ont migré en direction de CXCL8/IL-8 dans la chambre du bas en dépit du fait que les neutrophiles ont été déposés dans la chambre supérieure avec les angiopoïétines, qui en soi ont un effet chimiotactique. Par conséquent, cette observation suggère que les neutrophiles migrent de façon préférentielle vers CXCL8/IL-8.

Puisque la migration des neutrophiles induite par Ang1 et Ang2 est médiée par la voie de la PI3K et que cette dernière contribue aussi à celle de CXCL8/IL-8 (281, 283), nous avons émis l'hypothèse que l'effet potentialisateur des angiopoïétines serait médié par la PI3K. Tout d'abord, nous avons délimité la contribution de la

PI3K dans l'activité chimioattractante de CXCL8/IL-8 sur les neutrophiles. Nos résultats montrent que l'inhibition de la PI3K bloque complètement la migration des neutrophiles engendrée par CXCL8/IL-8 à 1 nM, tandis qu'à 10 nM, l'inhibition de la migration est partielle. Toutefois, les inhibiteurs de la PI3K ont prévenu la phosphorylation d'Akt induite par CXCL8/IL-8 à 10 nM démontrant que cette disparité n'est pas le fruit d'un manque d'efficacité des inhibiteurs. Ainsi, ces données suggèrent que la migration des neutrophiles induite par CXCL8/IL-8 à 10 nM est partiellement dépendante de la voie de la PI3K et impliquerait l'activation de voies intracellulaires additionnelles. Mentionnons que nous pouvons éliminer une possible contribution de la voie ERK1/2 et p38 MAPK, puisque leur inhibition n'a pas affecté la migration des neutrophiles induite par CXCL8/IL-8 à 10 nM.

Ensuite, nous avons évalué l'implication de la PI3K dans l'effet potentialisateur des angiopoïétines sur la migration des neutrophiles induite par CXCL8/IL-8. Nos résultats ont montré que ce phénomène d'amplification par les angiopoïétines est médié par la PI3K. À l'appui, nos données ont montré que Ang1 et Ang2 ont potentialisé la phosphorylation d'Akt induite par une concentration suboptimale de CXCL8/IL-8, qui *per se* a été incapable d'induire la phosphorylation d'Akt. De plus, cette dernière observation montre à nouveau la capacité des angiopoïétines à potentialiser la réponse des neutrophiles à CXCL-8/IL-8.

#### 4.16 Les angiopoïétines : médiateurs proinflammatoires?

La capacité de Ang1 à induire la migration des neutrophiles semble paraître à première vue en désaccord avec le concept du rôle anti-inflammatoire de Ang1 proposé par la littérature. Par exemple, *in vivo*, il a été démontré que les souris transgéniques surexprimant Ang1 présentent une mortalité réduite face au choc septique suite à une diminution de l'oedème pulmonaire et de l'infiltration leucocytaire (173). De plus, il été rapporté que Ang1 protège contre les effets inflammatoires du VEGF-A<sub>165</sub>, incluant l'hyperperméabilité vasculaire et l'adhésion chronique des neutrophiles (171). En revanche, de récentes études effectuées par notre laboratoire ont montré que Ang1 induit des activités proinflammatoires telles que la synthèse de endothéliale de PAF, la translocation de la P-sélective à la surface endothéliale et l'adhésion des neutrophiles (127, 128). De plus, Ang1 active Tie2 sur les neutrophiles engendrant la synthèse de PAF et l'activation de la  $\beta$ 2-intégrine qui ensemble contribuent à l'adhésion des neutrophiles. Une analyse plus poussée de nos observations montrant un effet proinflammatoire de la part des angiopoïétines révèle que la majeure partie de celles-ci ont été effectuées à très court terme (inférieur à 60 minutes) et avec des concentrations modérées de Ang1. Or, dans ces conditions spécifiques, d'autres équipes de recherche ont montré que Ang1 induit des effets proinflammatoires tels que la migration des neutrophiles et des éosinophiles (146, 147). Par conséquent, il apparaît que seules les études examinant une cinétique rapide permettent d'observer un tel phénomène. Toutefois, une récente étude a rapporté que la stimulation prolongée d'anneaux aortiques avec Ang1 entraîne l'activation génique des cytokines proinflammatoires avant d'induire l'angiogenèse suggérant que Ang1 pourrait avoir aussi des effets proinflammatoires à long terme (336).



En tenant compte que Ang2 est reconnue pour déstabiliser les vaisseaux sanguins (121), il est plus intuitif de suggérer que Ang2 a des effets proinflammatoires. Malgré tout, ce n'est que récemment que Ang2 a été considérée comme un agent proinflammatoire. En effet, *in vitro*, tout comme Ang1, il a été rapporté que Ang2 induit la synthèse endothéliale de PAF, la translocation de la P-sélectine à la surface endothéliale, l'adhésion ainsi que la migration des neutrophiles et potentialise les effets des cytokines inflammatoires (127, 128, 146, 147, 178). Toutefois, *in vivo*, seul Ang2 induit le recrutement des neutrophiles dans un modèle murin d'inflammation (126). *In vitro*, les observations suggèrent que Ang1 et Ang2 sont toutes deux capables d'induire des effets proinflammatoires aigus, tandis que *in vivo*, il apparaît que Ang1, comparativement à Ang2, ne peut activer l'ensemble des mécanismes cellulaires nécessaires à l'infiltration leucocytaire. En effet, il est reconnu que l'adhésion ferme et la transmigration des leucocytes font intervenir une séquence d'évènements complexes qui requiert le support de molécules d'adhésion. Par conséquent, il se peut que Ang1 nécessite la présence de facteurs additionnels afin de soutenir l'adhésion ferme des leucocytes et leur transmigration.

#### **4.17 Perspectives**

Plusieurs études incluant celle-ci suggèrent que Ang1 et Ang2 sont impliquées dans le trafic des leucocytes (127, 138, 178). Ainsi, il est raisonnable de penser que Ang1 et Ang2 doivent se retrouver à proximité des CE ou des leucocytes afin d'exercer de telles fonctions. En accord, Ang2 est localisée dans les corps de Weibel-Palade en compagnie de d'autres médiateurs inflammatoires et, suite à un stimulus approprié, ils sont libérés à l'extérieur des CE. Quant à Ang1, sa

localisation périendothéliale et son expression relativement faible ne concordent pas avec cette hypothèse. Or, nous avons émis une seconde hypothèse, *i.e.* que Ang1 est contenue dans les neutrophiles humains. Des études pilotes réalisées par notre laboratoire ont montré que Ang1 est bel et bien présent dans les neutrophiles, mais pas Ang2. Cette observation ouvre de nouvelles avenues de recherche très prometteuses. Dans un premier temps, il convient de déterminer dans quel compartiment intracellulaire des neutrophiles est localisé Ang1 et d'identifier les stimuli capables d'induire la libération de Ang1.

Par ailleurs, une récente étude a démontré que les neutrophiles infiltrants les tumeurs contribuent à promouvoir l'angiogenèse en relâchant du VEGF-A (337). De plus, il a été montré que Ang1 et le VEGF-A ont un effet synergique sur l'angiogenèse dans un modèle murin (284). Par conséquent, il serait intéressant de déterminer si Ang1 est également relâchée par les neutrophiles lorsque ces derniers entrent en contact avec les cellules tumorales ou l'endothélium activé.

Finalement, dans les CE, il a démontré que Ang1 ou Ang2 favorise la survie cellulaire via l'activation de la voie PI3K/Akt. Or, dans la présente étude nous venons de démontrer que Ang1 et Ang2 activent aussi la voie PI3K/Akt dans les neutrophiles. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la capacité des angiopoïétines à prévenir l'apoptose des neutrophiles. Le cas échéant, ceci aurait pour effet d'augmenter la demi-vie des neutrophiles prolongeant ainsi la période durant laquelle les neutrophiles sont actifs au cours de la réaction inflammatoire aiguë. Dans ce contexte, les angiopoïétines pourraient indirectement supporter les activités inflammatoires des neutrophiles.

#### 4.18 Conclusions de la seconde étude

À la lumière des objectifs initiaux, nous pouvons conclure :

- 1) Notre étude démontre que Ang1 et Ang2 induisent la migration des neutrophiles et ce, par l'entremise de l'activation de Tie2.
- 2) La migration des neutrophiles engendrée par Ang1 et Ang2 est médiée par l'activation de la PI3K, mais indépendante des voies p42/44 et p38 MAPK. De plus, la stimulation des neutrophiles avec Ang1 ou Ang2 induit la phosphorylation d'Akt.
- 3) Nos travaux démontrent que Ang1 et Ang2 potentialisent la réponse chimiotactique des neutrophiles envers CXCL-8/IL-8 et que ce phénomène est médié par la PI3K.

Ensemble, ces résultats supportent nos observations précédentes révélant que Ang1 et Ang2 induisent des activités proinflammatoires, incluant la migration des neutrophiles. De plus, les angiopoïétines modulent l'activité chimiotactique des cytokines proinflammatoires sur les neutrophiles. Cette étude permet une meilleure compréhension du rôle des angiopoïétines dans le trafic des leucocytes.

## 5.0 BIBLIOGRAPHIE

1. Hertig ET. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol* 1935(25):39-81.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985;43:175-203.
3. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6(4):389-395.
4. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Rak J. Contribution of the hemostatic system to angiogenesis in cancer. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):5-20.
5. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438(7070):932-936.
6. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9(6):669-676.
7. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* 2002;200(6):581-597.
8. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219(4587):983-985.
9. Senger DR, Connolly DT, Van de Water L, Feder J, Dvorak HF. Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990;50(6):1774-1778.
10. Criscuolo GR, Merrill MJ, Oldfield EH. Further characterization of malignant glioma-derived vascular permeability factor. *J Neurosurg* 1988;69(2):254-262.

11. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161(2):851-858.
12. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005;65(3):550-563.
13. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(5):359-371.
14. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006;580(12):2879-2887.
15. Yla-Herttuala S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 2003;9(6):694-701.
16. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003;28(9):488-494.
17. Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC, de Vos AM. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(14):7192-7197.
18. De Falco S, Gigante B, Persico MG. Structure and function of placental growth factor. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12(6):241-246.
19. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18(1):4-25.
20. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4604-4613.

21. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380(6573):435-439.
22. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380(6573):439-442.
23. Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM et al. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(7):2628-2632.
24. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R. In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res* 1994;210(2):298-305.
25. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189(2):824-831.
26. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84(5):1470-1478.
27. Wilting J, Christ B, Weich HA. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. *Anat Embryol (Berl)* 1992;186(3):251-257.
28. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V et al. 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):30336-30343.

29. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273(21):13313-13316.

30. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999;103(2):159-165.

31. Favard C, Moukadiri H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell* 1991;73(1):1-6.

32. Feistritzer C, Kaneider NC, Sturm DH, Mosheimer BA, Kahler CM, Wiedermann CJ. Expression and function of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 in human eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(5):729-735.

33. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990;172(6):1535-1545.

34. Ancelin M, Chollet-Martin S, Herve MA, Legrand C, El Benna J, Perrot-Appinanat M. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest* 2004;84(4):502-512.

35. Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix

metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998;75(5):780-786.

36. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108 ( Pt 6):2369-2379.

37. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998;111 ( Pt 13):1853-1865.

38. Dvorak AM, Feng D. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 2001;49(4):419-432.

39. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF, Dvorak AM. Vesiculo-vacuolar organelles and the regulation of venule permeability to macromolecules by vascular permeability factor, histamine, and serotonin. *J Exp Med* 1996;183(5):1981-1986.

40. Nagy JA, Feng D, Vasile E, Wong WH, Shih SC, Dvorak AM et al. Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Lab Invest* 2006;86(8):767-780.

41. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 1996;2(9):992-997.

42. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-



1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276(10):7614-7620.

43. Rollin S, Lemieux C, Maliba R, Favier J, Villeneuve LR, Allen BG et al. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood* 2004;103(10):3789-3797.

44. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 1993;265(2 Pt 2):H586-592.

45. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B et al. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;27(6):838-844.

46. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000;86(2):E29-35.

47. Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD. The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther* 2006;19(1):61-69.

48. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7(5):575-583.

49. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F et al. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor

angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8(8):831-840.

50. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J et al. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 2003;92(4):378-385.

51. Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O et al. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 1998;273(12):6599-6602.

52. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994;68(1):84-92.

53. Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem* 2005;280(3):2126-2131.

54. Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T. Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry* 2005;44(24):8858-8864.

55. Fujii E, Wada K, Ishida H, Yoshioka T, Muraki T. Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin. *Eur J Pharmacol* 1999;377(2-3):219-222.

56. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87(8):3336-3343.
57. Kendall RL, Thomas KA. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(22):10705-10709.
58. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9(7):936-943.
59. Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. 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):1356-1370.
60. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001;2001(112):RE21.
61. Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem* 1998;273(36):23410-23418.
62. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, Shibuya M. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene* 1995;10(1):135-147.
63. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376(6535):66-70.

64. Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Mol Cell Biol* 2005;25(1):346-354.
65. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(16):9349-9354.
66. Marchand GS, Noiseux N, Tanguay JF, Sirois MG. Blockade of in vivo VEGF-mediated angiogenesis by antisense gene therapy: role of Flk-1 and Flt-1 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(1):H194-204.
67. Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. 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):9904-9912.
68. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376(6535):62-66.
69. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *Embo J* 2001;20(11):2768-2778.
70. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. 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):2221-2230.

71. Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D. Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22(22):7758-7768.
72. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399(6736):601-605.
73. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399(6736):597-601.
74. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97(1):99-107.
75. Gelinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, Bazan NG, Sirois MG. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol* 2002;137(7):1021-1030.
76. Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, Granger HJ. Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 2):H535-542.
77. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999;274(35):25130-25135.
78. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial

growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2604-2609.

79. Wei W, Jin H, Chen ZW, Zioncheck TF, Yim AP, He GW. Vascular endothelial growth factor-induced nitric oxide- and PGI<sub>2</sub>-dependent relaxation in human internal mammary arteries: a comparative study with KDR and Flt-1 selective mutants. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44(5):615-621.

80. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 1999;253(1):117-130.

81. Rousseau S, Houle F, Huot J. Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(8):321-327.

82. Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2000;275(14):10661-10672.

83. Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 1997;15(18):2169-2177.

84. Le Boeuf F, Houle F, Huot J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J Biol Chem* 2004;279(37):39175-39185.

85. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272(24):15442-15451.
86. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998;282(5390):946-949.
87. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D et al. Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(8):3566-3570.
88. Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *Embo J* 2001;20(17):4762-4773.
89. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* 1994;9(12):3545-3555.
90. Kolodkin AL, Levensgood DV, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 1997;90(4):753-762.
91. Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 1993;75(7):1389-1399.
92. Soker S, Fidler H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1996;271(10):5761-5767.
93. Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol* 2006;7(3):211.

94. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92(6):735-745.
95. Winberg ML, Noordermeer JN, Tamagnone L, Comoglio PM, Spriggs MK, Tessier-Lavigne M et al. Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 1998;95(7):903-916.
96. Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X. C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *Faseb J* 2006;20(9):1513-1515.
97. Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem* 2003;278(49):48848-48860.
98. Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood* 2005;105(5):1992-1999.
99. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995;121(12):4309-4318.
100. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999;126(21):4895-4902.
101. Chen H, Bagri A, Zupicich JA, Zou Y, Stoeckli E, Pleasure SJ et al. Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* 2000;25(1):43-56.



102. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Tashiro F et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3657-3662.
103. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 1999;5(5):495-502.
104. Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidder H, Charmahelli H, Klagsbrun M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* 1997;272(50):31582-31588.
105. Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, Sirois MG. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem* 2002;85(3):629-639.
106. Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J* 2000;14(15):2532-2539.
107. Bussolati B, Biancone L, Cassoni P, Russo S, Rola-Pleszczynski M, Montrucchio G et al. PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 2000;157(5):1713-1725.
108. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol* 1995;26(1):86-91.

109. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993;53(19):4727-4735.
110. Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br J Cancer* 1996;73(7):931-934.
111. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11(8):1569-1579.
112. Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res* 1996;56(9):2013-2016.
113. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993;362(6423):841-844.
114. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2002;2(10):795-803.
115. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3(1):24-40.
116. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996;348(9024):370-374.

117. Isner JM, Takayuki A. Therapeutic angiogenesis. *Front Biosci* 1998;3:e49-69.
118. Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, Kolostova K. Gene therapy of the ischemic lower limb--Therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 2006;44(6):395-405.
119. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006;312(5):630-641.
120. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87(7):1161-1169.
121. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277(5322):55-60.
122. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992;7(8):1471-1480.
123. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(5):1904-1909.
124. Kim I, Kim JH, Moon SO, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* 2000;19(39):4549-4552.

125. Mochizuki Y, Nakamura T, Kanetake H, Kanda S. Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 1):175-183.
126. Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancaleone V, Cirino G et al. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314(2):738-744.
127. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 2005;105(4):1523-1530.
128. Maliba R, Lapointe S, Neogoe PE, Brkovic A, Sirois MG. Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: Intracellular signalling pathways. *Cell Signal* 2006.
129. Kim KT, Choi HH, Steinmetz MO, Maco B, Kammerer RA, Ahn SY et al. Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2. *J Biol Chem* 2005;280(20):20126-20131.
130. Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(42):15491-15496.
131. Park YS, Kim NH, Jo I. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc Res* 2003;65(2):125-131.
132. Tait CR, Jones PF. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol* 2004;204(1):1-10.
133. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res* 2006;98(8):1014-1023.

134. Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Lab Invest* 2001;81(3):361-373.
135. Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. Tumor necrosis factor-alpha upregulates angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269(2):361-365.
136. Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 1998;83(8):852-859.
137. Oh H, Takagi H, Suzuma K, Otani A, Matsumura M, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274(22):15732-15739.
138. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* 2004;103(11):4150-4156.
139. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 4):771-780.
140. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *Faseb J* 2004;18(11):1200-1208.

141. Macdonald PR, Progias P, Ciani B, Patel S, Mayer U, Steinmetz MO et al. Structure of the extracellular domain of tie receptor tyrosine kinases and localization of the angiopoietin-binding epitope. *J Biol Chem* 2006.
142. Tsiamis AC, Morris PN, Marron MB, Brindle NP. Vascular endothelial growth factor modulates the Tie-2:Tie-1 receptor complex. *Microvasc Res* 2002;63(2):149-158.
143. Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G. Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 1993;8(6):1631-1637.
144. Valable S, Bellail A, Lesne S, Liot G, Mackenzie ET, Vivien D et al. Angiopoietin-1-induced PI3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *Faseb J* 2003;17(3):443-445.
145. Ramsden JD, Cocks HC, Shams M, Nijjar S, Watkinson JC, Sheppard MC et al. Tie-2 is expressed on thyroid follicular cells, is increased in goiter, and is regulated by thyrotropin through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2709-2716.
146. Sturn DH, Feistritz C, Mosheimer BA, Djanani A, Bijuklic K, Patsch JR et al. Angiopoietin affects neutrophil migration. *Microcirculation* 2005;12(5):393-403.
147. Feistritz C, Mosheimer BA, Sturn DH, Bijuklic K, Patsch JR, Wiedermann CJ. Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(5):1077-1084.
148. Sato A, Iwama A, Takakura N, Nishio H, Yancopoulos GD, Suda T. Characterization of TEK receptor tyrosine kinase and its ligands, Angiopoietins, in human hematopoietic progenitor cells. *Int Immunol* 1998;10(8):1217-1227.

149. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005;8(3):211-226.
150. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004;118(2):149-161.
151. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. 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):80-92.
152. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A et al. 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):1897-1909.
153. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995;376(6535):70-74.
154. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *Embo J* 1995;14(23):5884-5891.
155. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87(7):1171-1180.

156. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1998;282(5388):468-471.
157. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999;286(5449):2511-2514.
158. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J et al. 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):411-423.
159. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 1998;273(29):18514-18521.
160. Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN et al. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000;86(9):952-959.
161. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 1998;8(9):529-532.
162. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, Morla AO. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem* 2001;276(28):26516-26525.
163. Kanda S, Miyata Y, Mochizuki Y, Matsuyama T, Kanetake H. Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells. *Cancer Res* 2005;65(15):6820-6827.



164. Fujikawa K, de Aos Scherpenseel I, Jain SK, Presman E, Christensen RA, Varticovski L. Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp Cell Res* 1999;253(2):663-672.
165. Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP et al. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 2001;49(3):659-670.
166. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* 2000;86(1):24-29.
167. Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, Griffiths J et al. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev* 2004;18(9):1060-1071.
168. Kwak HJ, Lee SJ, Lee YH, Ryu CH, Koh KN, Choi HY et al. Angiopoietin-1 inhibits irradiation- and mannitol-induced apoptosis in endothelial cells. *Circulation* 2000;101(19):2317-2324.
169. Kwak HJ, So JN, Lee SJ, Kim I, Koh GY. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett* 1999;448(2-3):249-253.
170. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 1999;79(2):213-223.

171. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res* 2001;89(6):477-479.
172. Nykanen AI, Krebs R, Saaristo A, Turunen P, Alitalo K, Yla-Herttuala S et al. Angiopoietin-1 protects against the development of cardiac allograft arteriosclerosis. *Circulation* 2003;107(9):1308-1314.
173. Witzenbichler B, Westermann D, Knueppel S, Schultheiss HP, Tschope C. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation* 2005;111(1):97-105.
174. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res* 2000;87(7):603-607.
175. Gill KA, Brindle NP. Angiopoietin-2 stimulates migration of endothelial progenitors and their interaction with endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336(2):392-396.
176. Harfouche R, Hussain SN. Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006.
177. Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15(8):302-308.
178. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006;12(2):235-239.
179. Master Z, Jones N, Tran J, Jones J, Kerbel RS, Dumont DJ. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *Embo J* 2001;20(21):5919-5928.

180. DeBusk LM, Hallahan DE, Lin PC. Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. *Exp Cell Res* 2004;298(1):167-177.
181. Chen JX, Lawrence ML, Cunningham G, Christman BW, Meyrick B. HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J Appl Physiol* 2004;96(2):612-620.
182. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ. Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am J Pathol* 2003;162(6):1927-1936.
183. Cascone I, Audero E, Giraudo E, Napione L, Maniero F, Philips MR et al. Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood* 2003;102(7):2482-2490.
184. Harfouche R, Gratton JP, Yancopoulos GD, Nosedá M, Karsan A, Hussain SN. Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *Faseb J* 2003;17(11):1523-1525.
185. Kim I, Ryu YS, Kwak HJ, Ahn SY, Oh JL, Yancopoulos GD et al. EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *Faseb J* 2002;16(9):1126-1128.
186. Jones N, Master Z, Jones J, Bouchard D, Gunji Y, Sasaki H et al. Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem* 1999;274(43):30896-30905.

187. Hughes DP, Marron MB, Brindle NP. The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res* 2003;92(6):630-636.
188. Korpelainen EI, Karkkainen M, Gunji Y, Vikkula M, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene* 1999;18(1):1-8.
189. Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N et al. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998;94(6):715-725.
190. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-364.
191. Bach F, Uddin FJ, Burke D. Angiopoietins in malignancy. *Eur J Surg Oncol* 2006.
192. Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, Shirabe K, Shimada M, Wands JR et al. Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors. *J Gastroenterol* 2003;38 Suppl 15:93-97.
193. Audero E, Cascone I, Zanon I, Previtali SC, Piva R, Schiffer D et al. Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: in vivo and in vitro studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(4):536-541.
194. Ding H, Roncari L, Wu X, Lau N, Shannon P, Nagy A et al. Expression and hypoxic regulation of angiopoietins in human astrocytomas. *Neuro-oncol* 2001;3(1):1-10.

195. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;153(5):1459-1466.
196. Hatanaka H, Abe Y, Naruke M, Tokunaga T, Oshika Y, Kawakami T et al. Significant correlation between interleukin 10 expression and vascularization through angiopoietin/TIE2 networks in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7(5):1287-1292.
197. Takahama M, Tsutsumi M, Tsujiuchi T, Nezu K, Kushibe K, Taniguchi S et al. 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):2506-2510.
198. Tanaka F, Ishikawa S, Yanagihara K, Miyahara R, Kawano Y, Li M et al. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2002;62(23):7124-7129.
199. Martoglio AM, Tom BD, Starkey M, Corps AN, Charnock-Jones DS, Smith SK. 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):750-765.
200. Zhang L, Yang N, Park JW, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G et al. 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):3403-3412.
201. Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong YK, Velasco P, Brown LF et al. Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel

- maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol* 2002;160(4):1381-1392.
202. Tournaire R, Simon MP, le Noble F, Eichmann A, England P, Pouyssegur J. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep* 2004;5(3):262-267.
203. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *Faseb J* 1997;11(6):457-465.
204. Monnier Y, Zaric J, Ruegg C. Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: from the bench to the bedside and back. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4(1):31-38.
205. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006;4(4):221-233.
206. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev* 1999;79(3):703-761.
207. Majno G, Palade GE, Schoefl GI. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:607-626.
208. Majno G, Palade GE. Studies on inflammation. I. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;11:571-605.
209. Cotran RS, Majno G. The Delayed and Prolonged Vascular Leakage in Inflammation. I. Topography of the Leaking Vessels after Thermal Injury. *Am J Pathol* 1964;45:261-281.

210. Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol* 1969;42(3):647-672.
211. Dejana E. Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 1996;98(9):1949-1953.
212. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004;84(3):869-901.
213. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999;252(1):13-19.
214. Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 2001;86(1):308-315.
215. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P et al. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142(1):117-127.
216. Blum MS, Toninelli E, Anderson JM, Balda MS, Zhou J, O'Donnell L et al. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. *Am J Physiol* 1997;273(1 Pt 2):H286-294.
217. Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B et al. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* 1995;129(1):203-217.

218. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(10):2286-2297.
219. Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *Faseb J* 2005;19(6):512-520.
220. Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS et al. TNF{alpha} Increases Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial-Cadherin and Opens the Paracellular Pathway Through Fyn Activation in Human Lung Endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006.
221. Wright TJ, Leach L, Shaw PE, Jones P. Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells. *Exp Cell Res* 2002;280(2):159-168.
222. Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16(3):488-496.
223. Navarro P, Caveda L, Breviario F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem* 1995;270(52):30965-30972.
224. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(17):9815-9820.



225. Grazia Lampugnani M, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* 2003;161(4):793-804.
226. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999;98(2):147-157.
227. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E et al. 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):9462-9467.
228. Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 2001;91(4):1487-1500.
229. Wysolmerski RB, Lagunoff D. Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Am J Physiol* 1991;261(1 Pt 1):C32-40.
230. Carbajal JM, Gratrix ML, Yu CH, Schaeffer RC, Jr. ROCK mediates thrombin's endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279(1):C195-204.
231. Garcia JG, Davis HW, Patterson CE. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 1995;163(3):510-522.
232. Essler M, Staddon JM, Weber PC, Aepfelbacher M. Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in

endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signaling. *J Immunol* 2000;164(12):6543-6549.

233. Liu F, Verin AD, Borbiev T, Garcia JG. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280(6):L1309-1317.

234. Patterson CE, Lum H, Schaphorst KL, Verin AD, Garcia JG. Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium* 2000;7(4):287-308.

235. Dong JM, Leung T, Manser E, Lim L. cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J Biol Chem* 1998;273(35):22554-22562.

236. McDonald DM. Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli. *Am J Physiol* 1994;266(1 Pt 1):L61-83.

237. Hickey MJ. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leucocyte recruitment. *Clin Sci (Lond)* 2001;100(1):1-12.

238. Brock TA, Dvorak HF, Senger DR. Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991;138(1):213-221.

239. Busse R, Mulch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 1990;265(1-2):133-136.

240. Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 2000;6(12):1362-1367.

241. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82(22):7738-7742.
242. van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat* 2002;200(6):549-560.
243. van Hinsbergh WM. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(6):1018-1023.
244. Hillman NJ, Whittles CE, Pocock TM, Williams B, Bates DO. Differential effects of vascular endothelial growth factor-C and placental growth factor-1 on the hydraulic conductivity of frog mesenteric capillaries. *J Vasc Res* 2001;38(2):176-186.
245. He P, Zeng M, Curry FE. cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Am J Physiol* 1998;274(6 Pt 2):H1865-1874.
246. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2000;80(4):1669-1699.
247. Brock TA, Gimbrone MA, Jr. Platelet activating factors alters calcium homeostasis in cultured vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1986;250(6 Pt 2):H1086-1092.
248. Korth R, Hirafuji M, Keraly CL, Delautier D, Bidault J, Benveniste J. Interaction of the Paf antagonist WEB 2086 and its hexazepine analogues with human platelets and endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1989;98(2):653-661.

249. Korth RM, Hirafuji M, Benveniste J, Russo-Marie F. Human umbilical vein endothelial cells: specific binding of platelet-activating factor and cytosolic calcium flux. *Biochem Pharmacol* 1995;49(12):1793-1799.
250. Camussi G, Montrucchio G, Lupia E, De Martino A, Perona L, Arese M et al. Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism. *J Immunol* 1995;154(12):6492-6501.
251. Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):2915-2921.
252. Sirois MG, Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 1997;272(6 Pt 2):H2746-2756.
253. Bernatchez PN, Allen BG, Gelinias DS, Guillemette G, Sirois MG. Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. *Br J Pharmacol* 2001;134(6):1253-1262.
254. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999;274(43):31047-31054.
255. Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, Sirois MG. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br J Pharmacol* 2001;134(1):197-205.
256. Marchand C, Favier J, Sirois MG. Role of MSK1 in the signaling pathway leading to VEGF-mediated PAF synthesis in endothelial cells. *J Cell Biochem* 2006;98(5):1095-1105.

257. Woodard DS, Lee TC, Snyder F. The final step in the de novo biosynthesis of platelet-activating factor. Properties of a unique CDP-choline:1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol choline-phosphotransferase in microsomes from the renal inner medulla of rats. *J Biol Chem* 1987;262(6):2520-2527.
258. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Biancone L et al. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(1):80-88.
259. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79(1):181-213.
260. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002;31:485-516.
261. Parent CA. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(1):4-13.
262. Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(6):561-580.
263. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354(6):610-621.
264. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;398(6729):718-723.

265. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Franciose RJ, Banerjee A. Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils. *J Trauma* 1995;39(1):98-102; discussion 102-103.
266. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385(6617):640-644.
267. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med* 1998;188(8):1413-1419.
268. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997;387(6633):611-617.
269. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266(5189):1395-1399.
270. Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L et al. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 2000;287(5455):1049-1053.
271. Cara DC, Kaur J, Forster M, McCafferty DM, Kubes P. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *J Immunol* 2001;167(11):6552-6558.
272. Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL et al. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest* 1997;99(5):975-986.

273. Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(12):1619-1638.
274. Srinivasan S, Wang F, Glavas S, Ott A, Hofmann F, Aktories K et al. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 2003;160(3):375-385.
275. Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 2000;287(5455):1037-1040.
276. Coffey PJ, Geijsen N, M'Rabet L, Schweizer RC, Maikoe T, Raaijmakers JA et al. Comparison of the roles of mitogen-activated protein kinase kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signal transduction in neutrophil effector function. *Biochem J* 1998;329 ( Pt 1):121-130.
277. Downey GP, Butler JR, Tapper H, Fialkow L, Saltiel AR, Rubin BB et al. Importance of MEK in neutrophil microbicidal responsiveness. *J Immunol* 1998;160(1):434-443.
278. Heuertz RM, Tricomi SM, Ezekiel UR, Webster RO. C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. *J Biol Chem* 1999;274(25):17968-17974.
279. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *Eur J Immunol* 2002;32(2):393-403.
280. Hii CS, Stacey K, Moghaddami N, Murray AW, Ferrante A. Role of the extracellular signal-regulated protein kinase cascade in human neutrophil killing

of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* and in migration. *Infect Immun* 1999;67(3):1297-1302.

281. Knall C, Worthen GS, Johnson GL. 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):3052-3057.

282. Lehman JA, Paul CC, Baumann MA, Gomez-Cambronero J. MAP kinase upregulation after hematopoietic differentiation: role of chemotaxis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280(1):C183-191.

283. Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* 2002;159(1):91-102.

284. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M et al. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 1998;83(3):233-240.

285. McCourt M, Wang JH, Sookhai S, Redmond HP. Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch Surg* 1999;134(12):1325-1331; discussion 1331-1322.

286. Shaw JP, Chuang N, Yee H, Shamamian P. Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J Surg Res* 2003;109(1):37-42.

287. Miyagi T, Lam KM, Chuang LF, Chuang RY. Suppression of chemokine-induced chemotaxis of monkey neutrophils and monocytes by chlorinated hydrocarbon insecticides. *In Vivo* 1998;12(5):441-446.



288. Ratthe C, Pelletier M, Roberge CJ, Girard D. Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin Immunol* 2002;105(2):169-175.
289. Yano H, Nakanishi S, Kimura K, Hanai N, Saitoh Y, Fukui Y et al. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J Biol Chem* 1993;268(34):25846-25856.
290. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994;269(7):5241-5248.
291. Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL. Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem* 1996;271(5):2832-2838.
292. Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* 2000;164(8):4286-4291.
293. van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:251-337.
294. Gruber BL, Marchese MJ, Kew R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 1995;86(7):2488-2493.
295. Zhu WH, MacIntyre A, Nicosia RF. Regulation of angiogenesis by vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in the rat aorta model:

distinct temporal patterns of intracellular signaling correlate with induction of angiogenic sprouting. *Am J Pathol* 2002;161(3):823-830.

296. Yoon MJ, Cho CH, Lee CS, Jang IH, Ryu SH, Koh GY. Localization of Tie2 and phospholipase D in endothelial caveolae is involved in angiotensin-1-induced MEK/ERK phosphorylation and migration in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308(1):101-105.

297. Tilton B, Andjelkovic M, Didichenko SA, Hemmings BA, Thelen M. G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J Biol Chem* 1997;272(44):28096-28101.

298. Grob PM, David E, Warren TC, DeLeon RP, Farina PR, Homon CA. Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J Biol Chem* 1990;265(14):8311-8316.

299. Tanaka S, Robinson EA, Yoshimura T, Matsushima K, Leonard EJ, Appella E. Synthesis and biological characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor. *FEBS Lett* 1988;236(2):467-470.

300. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ et al. 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):9233-9237.

301. Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods* 1989;21(4):309-315.

302. Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ. Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE

anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* 1979;123(4):1847-1857.

303. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003;94(9):751-756.

304. Becker PM, Waltenberger J, Yachechko R, Mirzapoiazova T, Sham JS, Lee CG et al. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ Res* 2005;96(12):1257-1265.

305. Marcheselli VL, Rossowska MJ, Domingo MT, Braquet P, Bazan NG. Distinct platelet-activating factor binding sites in synaptic endings and in intracellular membranes of rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 1990;265(16):9140-9145.

306. Feletou M, Bonnardel E, Canet E. Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1996;118(6):1371-1376.

307. Klabunde RE, Anderson DE. Obligatory role of nitric oxide in platelet-activating factor-induced microvascular leakage. *Eur J Pharmacol* 2000;404(3):387-394.

308. Kageyama N, Miura M, Ichinose M, Tomaki M, Ishikawa J, Ohuchi Y et al. Role of endogenous nitric oxide in airway microvascular leakage induced by inflammatory mediators. *Eur Respir J* 1997;10(1):13-19.

309. Arnhold S, Antoine D, Blaser H, Bloch W, Andressen C, Addicks K. Nitric oxide decreases microvascular permeability in bradykinin stimulated and nonstimulated conditions. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33(6):938-947.

310. Gimeno G, Carpentier PH, Desquand-Billiald S, Hanf R, Finet M. L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecule

extravasation in the microcirculation of awake hamsters. *Eur J Pharmacol* 1998;346(2-3):275-282.

311. Mayhan WG. Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2000;866(1-2):101-108.

312. Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1998;1425(1):189-203.

313. Mayhan WG. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):C1148-1153.

314. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS. Differential effects of intravenous anaesthetic agents on the response of rat mesenteric microcirculation in vivo after haemorrhage. *Br J Anaesth* 2002;88(2):255-263.

315. Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, Marletta MA. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem Sci* 2006;31(4):231-239.

316. Eskinder H, Gross GJ. 8-Bromo cyclic guanosine monophosphate mimics the actions of nitroglycerin on alpha-adrenergic mechanisms in canine saphenous vein. *Pharmacology* 1987;35(1):16-23.

317. Ishimaru RS, Leung K, Hong L, LaPolt PS. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures. *J Endocrinol* 2001;168(2):249-255.

318. Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Hasko G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(9):755-768.

319. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Deciphering vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability factor signaling to vascular permeability. Inhibition by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem* 2002;277(46):44385-44398.
320. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339(5):321-328.
321. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 2006;109(3):366-398.
322. Dickinson NT, Jang EK, Haslam RJ. Activation of cGMP-stimulated phosphodiesterase by nitroprusside limits cAMP accumulation in human platelets: effects on platelet aggregation. *Biochem J* 1997;323 ( Pt 2):371-377.
323. Duffey ME, Hainau B, Ho S, Bentzel CJ. Regulation of epithelial tight junction permeability by cyclic AMP. *Nature* 1981;294(5840):451-453.
324. Aramoto H, Breslin JW, Pappas PJ, Hobson RW, 2nd, Duran WN. Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(4):H1590-1598.
325. Phillips PG. Thrombin-induced alterations in endothelial cell cytoarchitectural and functional properties. *Semin Thromb Hemost* 1994;20(4):417-425.
326. Vouret-Craviari V, Boquet P, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell* 1998;9(9):2639-2653.

327. Cornillon J, Campos L, Guyotat D. [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)* 2003;19(6-7):743-752.
328. Wu MH, Guo M, Yuan SY, Granger HJ. Focal adhesion kinase mediates porcine venular hyperpermeability elicited by vascular endothelial growth factor. *J Physiol* 2003;552(Pt 3):691-699.
329. Yuan Y, Meng FY, Huang Q, Hawker J, Wu HM. Tyrosine phosphorylation of paxillin/pp125FAK and microvascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 1998;275(1 Pt 2):H84-93.
330. Sharifi BG, Zeng Z, Wang L, Song L, Chen H, Qin M et al. Pleiotrophin induces transdifferentiation of monocytes into functional endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(6):1273-1280.
331. Axelsson L, Hellberg C, Melander F, Smith D, Zheng L, Andersson T. Clustering of beta(2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase. *Exp Cell Res* 2000;256(1):257-263.
332. Stephens L, Ellson C, Hawkins P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(2):203-213.
333. Sadhu C, Masinovsky B, Dick K, Sowell CG, Staunton DE. Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J Immunol* 2003;170(5):2647-2654.
334. Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M, Constantin G. 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):2207-2211.

335. Gouwy M, Struyf S, Catusse J, Proost P, Van Damme J. Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *J Leukoc Biol* 2004;76(1):185-194.
336. Aplin AC, Gelati M, Fogel E, Carnevale E, Nicosia RF. Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor induce expression of inflammatory cytokines before angiogenesis. *Physiol Genomics* 2006;27(1):20-28.
337. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(33):12493-12498.

## Vascular Permeability Induced by VEGF Family Members in Vivo: Role of Endogenous PAF and NO Synthesis

Alexandre Brkovic and Martin G. Sirois\*

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

**Abstract** We previously reported that vascular endothelial growth factor (VEGF) increases vascular permeability through the synthesis of endothelial platelet-activating factor (PAF), while others reported the contribution of nitric oxide (NO). Herein, we addressed the contribution of VEGF receptors and the role played by PAF and NO in VEGF-induced plasma protein extravasation. Using a modified Miles assay, intradermal injection in mice ears of VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>121</sub>, and VEGF-C (1  $\mu$ M) which activate VEGFR-2 (Flk-1) receptor increased vascular permeability, whereas a treatment with VEGFR-1 (Flt-1) analogs; PlGF and VEGF-B (1  $\mu$ M) had no such effect. Pretreatment of mice with PAF receptor antagonist (LAU8080) or endothelial nitric oxide synthase (eNOS) inhibitor (L-NAME) abrogated protein extravasation mediated by VEGF-A<sub>165</sub>. As opposed to PAF (0.01–1  $\mu$ M), treatment with acetylcholine (ACh; up to 100  $\mu$ M; inducer of NO synthesis) or sodium nitroprusside (SNP; up to 1  $\mu$ M; NO donor) did not induce protein leakage. Simultaneous pretreatment of mice with eNOS and protein kinase A (PKA) inhibitors restored VEGF-A<sub>165</sub> vascular hyperpermeability suggesting that endogenous NO synthesis leads to PKA inhibition, which support maintenance of vascular integrity. Our data demonstrate that VEGF analogs increase vascular permeability through VEGFR-2 activation, and that both endogenous PAF and NO synthesis contribute to VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability. However, PAF but not NO directly increases vascular permeability per se, thereby, suggesting that PAF is a direct inflammatory mediator, whereas NO serves as a cofactor in VEGF-A<sub>165</sub> proinflammatory activities. *J. Cell. Biochem.* 100: 727–737, 2007. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** VEGF analogs; VEGF receptors; PAF; NO; vascular permeability

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key modulator of angiogenesis promoting endothelial cell (EC) migration, proliferation, and survival. In addition, VEGF possesses inflammatory properties by its capacity to mediate microvascular permeability increase and adhesion of leukocytes [Senger et al., 1983; Melder et al., 1996; Detmar et al., 1998]. There are at least five different VEGF homodimeric isoforms of 206, 189, 165, 145, and 121 amino acids, termed as VEGF-A<sub>206</sub>, 189, 165, 145, and 121 which are produced from a single gene by

alternative splicing [Jussila and Alitalo, 2002]. VEGF family also includes several members such as placental growth factors (PlGF-1 and -2), VEGF-A, -B, -C, -D, and a viral homolog, VEGF-E. The actions of VEGF family members are mediated by the activation of tyrosine kinase receptors including VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR), which are expressed majoritary on EC, and VEGFR-3 (Flt-4), which is mainly limited to the lymphatic endothelium [Jussila and Alitalo, 2002]. VEGF-A binds to VEGFR-1 and VEGFR-2; PlGF-1, PlGF-2 and VEGF-B bind to VEGFR-1; VEGF-C and D bind to VEGFR-2 and R-3; whereas VEGF-E interacts only with VEGFR-2 [Jussila and Alitalo, 2002]. Recent studies also reported that neuropilin-1 (NRP-1), a transmembrane receptor, acts as a coreceptor, complexing with VEGFR-1 and VEGFR-2. NRP-1 specifically enhances the binding of VEGF-A<sub>165</sub> to VEGFR-2 and potentiates various VEGF-A<sub>165</sub> biological activities [Soker et al., 1997; Bernatchez et al., 2002; Rollin et al., 2004]. Such selectivity is attributable to the presence of

Grant sponsor: Canadian Institutes of Health Research (CIHR); Grant number: MOP-43919; Grant sponsor: Heart and Stroke Foundation of Québec.

\*Correspondence to: Martin G. Sirois, PhD, Research Center, Montreal Heart Institute 5000, Belanger Street, Montreal (QC), Canada, H1T 1C8.

E-mail:

Received 26 April 2006; Accepted 1 August 2006

DOI 10.1002/jcb.21124

© 2006 Wiley-Liss, Inc.



VEGF-A exon 7 in VEGF-A<sub>165</sub>, a domain that is lacking in VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-C, VEGF-D, and PlGF-1 [Soker et al., 1997].

We previously reported that VEGF-A<sub>165</sub> increases vascular permeability through the synthesis of endothelial platelet-activating factor (PAF). Under in vivo condition, VEGF-A<sub>165</sub>-mediated protein extravasation was prevented by a pretreatment with a PAF receptor antagonist. Our observation was supported by the capacity of VEGF-A<sub>165</sub> to induce a rapid and transient PAF synthesis in cultured endothelial cells [Sirois and Edelman, 1997]. However, there is little information defining how PAF might contribute to the modulation of endothelial integrity under VEGF stimulation. The endothelial cell-cell interaction is maintained by junctional proteins and focal adhesion complexes that are anchored to the cytoskeleton. Vascular endothelial (VE)-cadherin is connecting adjacent EC through a calcium-dependent homophilic binding of its extracellular domain whereas its intracellular domain interacts with the actin cytoskeleton via a family of catenins, including  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -catenins,  $\alpha$ -actinin, and vinculin [Bazzoni and Dejana, 2004]. Interestingly, stimulation of EC either with VEGF-A<sub>165</sub> or PAF induces a rapid and transient phosphorylation of VE-cadherin and the dissociation of adherens junction leading to gap formation [Esser et al., 1998; Kevil et al., 1998; Hudry-Clergeon et al., 2005; Potter et al., 2005], thereby, suggesting that endogenous PAF formation is involved in VEGF-mediated VE-cadherin phosphorylation.

On the other hand, it has also been reported that nitric oxide (NO) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) production are contributing to VEGF-A<sub>165</sub>-induced vascular hyperpermeability [Murohara et al., 1998; Mayhan, 1999]. However, as opposed to PAF, the capacity of intracellular NO synthesis to promote vascular permeability is more ambiguous. For instance, by using NO donors, different studies reported that NO promote vascular leakage [Gimeno et al., 1998; Fujii et al., 1999], whereas others did not detect such effect [Feletou et al., 1996; Murohara et al., 1998; Klabunde and Anderson, 2000]. Similar conflicting results are also observed with cGMP analogs, which increase basal permeability in isolated vessels, but attenuate vascular hyperpermeability mediated by various inflammatory agents. Such discrepancies remain elusive, but might result

from differences in species, organs, involvement of leukocytes and hemodynamic factors.

In the present study, we wanted to define how VEGF analogs are modulating vascular permeability increase and investigate the contribution of PAF and NO.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Vascular endothelial growth factor-A<sub>165</sub> (VEGF-A<sub>165</sub>) was purchased from PeproTech, Inc., (Rocky Hill, NJ), VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, placental growth factor-1 (PlGF-1), and basic fibroblast growth factor (bFGF) were purchased from R&D (Minneapolis, MN). Sodium nitroprusside (SNP), acetylcholine (ACh), phenylephrine, Evans blue dye (EB), formamide, PAF, and the following inhibitors: H-89 (ODQ) and N<sup>m</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochlorine (L-NAME) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). SU1498 and CV3988 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and BIOMOL (Plymouth Meeting, PA), respectively. LAU8080 (formerly known as BN50730) was generously provided by Dr. Nicolas Bazan (Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, LA).

### Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated by collagenase treatment from fresh umbilical cords, seeded on gelatin-coated (0.25%) plates and cultured in endothelial growth medium-2 (EGM-2; Cambrex, Walkersville, MD) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Mediacorp, Montreal, QC, Canada) and antibiotics. HUVEC were used at passage 1.

### Vascular Permeability Studies

EB dye binds specifically to albumin and is used to study vascular permeability to macromolecules [Rogers et al., 1989]. The procedures were performed by one trained operator in accordance to the guidelines set by the Montreal Heart Institute animal care committee and the Canadian Council for Animal Protection. CD1 mice (18–22 g body weight) (Charles River Breeding Laboratories; Saint-Constant, Quebec, Canada) were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine HCl (100 mg/kg) and xylazine HCl (10 mg/kg). The mice

received a bolus injection of EB dye (20 mg/kg) in the caudal vein. This was followed 30 min later by an intradermal injection in mice ears of VEGF-A<sub>165</sub> (4, 40, or 400 ng/10  $\mu$ l; final concentration 0.01, 0.1, or 1  $\mu$ M, respectively), VEGF-A<sub>121</sub>, -B, -C, -D, PlGF-1 (1  $\mu$ M), bFGF (1  $\mu$ M), PAF (0.01, 0.1, and 1  $\mu$ M), SNP (1  $\mu$ M), ACh (up to 100  $\mu$ M), or PAF plus SNP (0.01 and 1  $\mu$ M, respectively). In another set of experiments, mice were treated with PAF receptor antagonist (LAU8080; 20 mg/kg [Ma et al., 2004]), VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 20 mg/kg; [Weis et al., 2004]), nitric oxide inhibitor (L-NAME; 20 mg/kg; [Murohara et al., 1998]), guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 20 mg/kg; [Cerwinka et al., 2002]), and protein kinase A inhibitor (H-89; 4 and 40  $\mu$ g/kg [Sanada et al., 2001]) co-administered with EB dye. Mice were sacrificed 60 min after the injection of agonists in the ears. The ears were dissected and EB dye extracted in formamide (4 ml/g wet weight for 24 h). The concentration of EB dye was determined by spectrophotometry (620 nm wavelength) against a standard curve and expressed as micrograms of EB dye.

#### Microscopy and Image Analyses

Pictures of the arteriovenous system of mice ears were taken at different magnifications (8.4 $\times$ , 12 $\times$ , 24 $\times$ , 38.4 $\times$ , and 48 $\times$ ) with a color videodigital camera (Sony DKC 5000) adapted to a stereomicroscope (Olympus SZX12). The surface of each vessel was calculated by computerized digital planimetry with a custom software (NIH image 1.6). Vascular tone was assessed at 0, 30, and 60 min following a bolus injection of L-NAME (20 mg/kg). The vasoconstrictor effect of L-NAME on the arteriovenous system of mice ears was reproduced by an intravenous infusion of phenylephrine (Phe; 0.1 mg/ml) at a constant rate (0.8 ml/h). Phenylephrine infusion was initiated, and when similar constriction was reached as compared to L-NAME, VEGF-A<sub>165</sub> was injected in mice ears.

#### Western Blot Analysis VE-Cadherin Phosphorylation

HUVEC were starved for 6 h with EBM-2 containing 1% FBS and antibiotics. HUVEC were stimulated with VEGF-A<sub>165</sub> (1 nM) or SNP (1  $\mu$ M) for various periods of time. In another set of experiments, HUVEC were pretreated with either SU1498 (10  $\mu$ M), LAU8080 (10  $\mu$ M), L-

NAME (100  $\mu$ M), or ODQ (10  $\mu$ M) for 15 min prior to stimulation with VEGF-A<sub>165</sub> (1 nM) for 45 min. Western blots analyses were performed as described previously [Rollin et al., 2004]. Briefly, cells were rinsed with cold PBS containing depolymerized Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (2 mM) and lysed in ice cold lysis buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors. Cell lysates (500  $\mu$ g) were immunoprecipitated with a mouse monoclonal VE-cadherin IgG (2  $\mu$ g; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a PVDF membrane, and probed with a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine IgG (clone 4G10, 1:1,000 dilution; Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY). Membranes were stripped using Re-Blot Plus Strong stripping solution (Chemicon International, Temecula, CA) and reprobed with a mouse monoclonal VE-cadherin IgG (1:1,000 dilution; Santa Cruz Biotechnology). Bands were visualized using LumiGlo<sup>TM</sup> (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA).

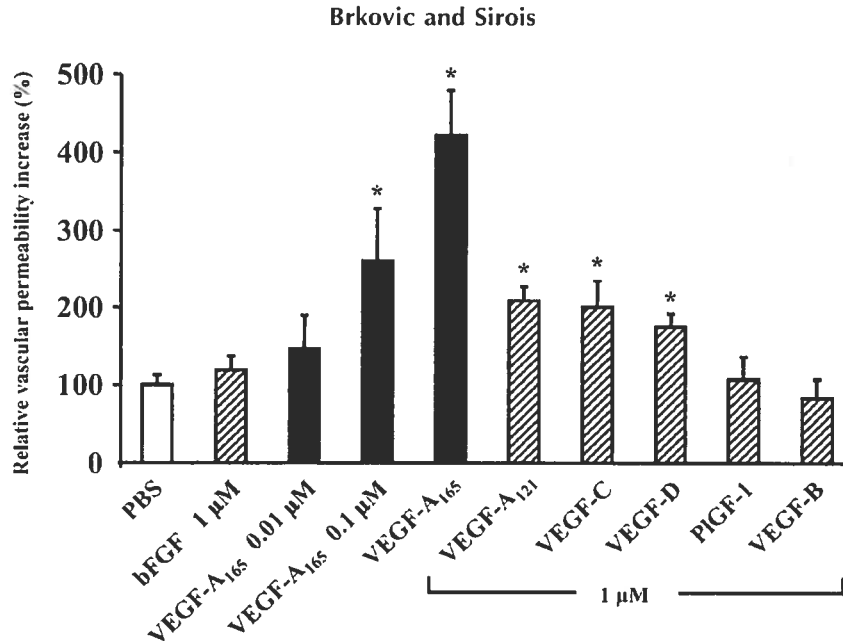
#### Statistical Analysis

Data are presented as the mean + SE. Statistical comparisons were made by analysis of variance followed by a Bonferroni's *t*-test for multiple comparisons. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Effect of VEGF Analogs and Corresponding Receptors on Microvascular Permeability

Using VEGF analogs, we assessed the contribution of VEGF receptors on the modulation of vascular permeability in a modified EB dye Miles assay. Intradermal injection of VEGF-A<sub>165</sub> (0.01, 0.1, and 1  $\mu$ M) in mice ears increased within 60 min EB dye extravasation by 47, 160, and 320% as compared to control PBS-treated mice. VEGF-A<sub>121</sub> (1  $\mu$ M), which like VEGF-A<sub>165</sub> binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 but not to NRP-1 coreceptor increased microvascular permeability by 109% (Fig. 1). Treatment with VEGF-C and VEGF-D (1  $\mu$ M; VEGFR-2 and R-3 analogs) increased EB dye exsudation by 107% and 79%, respectively, whereas a treatment with VEGF-B and PlGF-1 (1  $\mu$ M; VEGFR-1 analogs) had no significant effect. Treatment with bFGF (1  $\mu$ M) was used as negative control, and did not promote vascular permeability increase (Fig. 1).



**Fig. 1.** Vascular permeability mediated by VEGF analogs. Evans blue dye (EB; 20 mg/kg) was injected in the caudal vein of mice and 30 min later PBS (control vehicle), VEGF-A<sub>165</sub> (4, 40, or 400 ng/10  $\mu$ l; final concentration 0.01, 0.1, or 1  $\mu$ M, respectively), VEGF-A<sub>121</sub>, -B, -C, -D, PlGF-1 (1  $\mu$ M), or bFGF (negative control; 1  $\mu$ M) were injected in the ears. Animals were sacrificed 60 min after agonists injection. Values are mean  $\pm$  SEM of at least five independent experiments. \* $P$  < 0.05 compared to PBS.

### Implication of PAF and NO in VEGF-Induced Microvascular Permeability

We previously showed that PAF is involved in VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability increase whereas others showed the contribution of NO [Murohara et al., 1998; Mayhan, 1999]. In addition, VEGF-A<sub>165</sub> can promote a rapid and transient synthesis of PAF and NO in EC [Sirois and Edelman, 1997; Murohara et al., 1998; Montrucchio et al., 2000]. Thus, we wanted to delineate how PAF and NO are contributing to VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability increase. Intradermal injection of PAF (0.01, 0.1, 1  $\mu$ M) led to a concentration-dependent extravasation of EB dye by 363, 1,005, and 1,263% as compared to PBS-treated mice (Fig. 2). Treatment with PAF (0.01  $\mu$ M) resulted in a similar vascular permeability increase as observed with VEGF-A<sub>165</sub> (1  $\mu$ M), and was used for subsequent studies implying stimulation with PAF. Pretreatment with PAF receptor antagonist (LAU8080 or CV3988; 20 mg/kg, i.v.) 30 min prior to subcutaneous injection of PAF (0.01  $\mu$ M), abrogated PAF-mediated vascular permeability increase. We also wanted to assess the contribution of NO production on PAF-mediated hyperpermeability. Pretreatment with eNOS inhibitor (L-

NAME; 20 mg/kg; i.v.) 30 min prior to subcutaneous injection of PAF (0.01  $\mu$ M) abrogated as well PAF-mediated vascular permeability increase. In another set of experiments, we combined PAF (0.01  $\mu$ M) with an exogenous NO donor (SNP; 1  $\mu$ M), and observed that SNP did not synergize PAF inflammatory activity (Fig. 2).

Treatment with a nitric oxide donor (SNP up to 1  $\mu$ M) [Murohara et al., 1998] or with an inducer of NO production (ACh up to 100  $\mu$ M) [Feletou et al., 1996] were unable to promote vascular permeability increase (Fig. 3). We then assessed the contribution of PAF and NO on microvascular permeability increase mediated by VEGF analogs (VEGF-A<sub>165</sub> and VEGF-C; 1  $\mu$ M). Pretreatment with either LAU8080 (20 mg/kg) or L-NAME (20 mg/kg) prevented vascular permeability increase mediated by VEGF-A<sub>165</sub> and VEGF-C (Fig. 3).

### Assessment of L-NAME Vasoconstrictor Effect on VEGF-Induced Vascular Permeability

Inhibition of eNOS activity with L-NAME obliterates NO vasodilatory effect over basal tone and results in an arteriovenous constriction [Rees et al., 1990]. One might suggest that L-NAME inhibitory effect on vascular permeability increase was the result of L-NAME

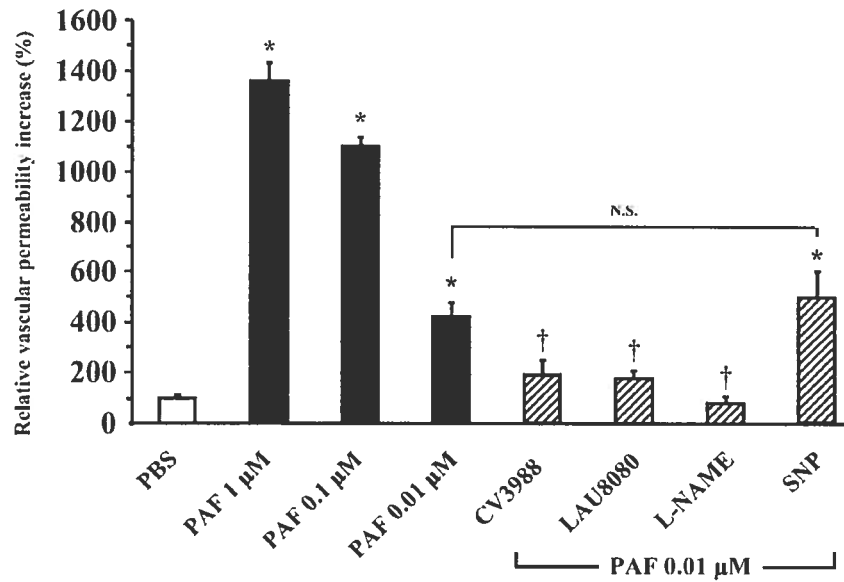


Fig. 2. Dose-dependent effect of PAF on vascular permeability. EB dye injection in the caudal vein was followed 30 min later by an intradermal injection of PBS or PAF (1, 0.1, and 0.01  $\mu$ M, respectively) or PAF (0.01  $\mu$ M) plus SNP (1  $\mu$ M). In another group, mice were pretreated with LAU8080, CV3988, or L-NAME

(20 mg/kg) by concomitant intravenous injection with EB prior to PAF injection (0.01  $\mu$ M). The animals were sacrificed 60 min upon PBS or PAF injection. Values are mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. \* $P$  < 0.05 compared to PBS, † $P$  < 0.05 compared to PAF.

vasocontractile activity. Thus, we assessed how a bolus injection of L-NAME affected the arteriovenous tone in mice ears. Thirty minutes following a bolus injection of L-NAME

(20 mg/kg, i.v.), arterioles and venules surfaces were reduced, representing  $77.0 \pm 5.5$  and  $81.0 \pm 0.5\%$  of the initial surface area, respectively. Sixty minutes post-infusion, corresponding

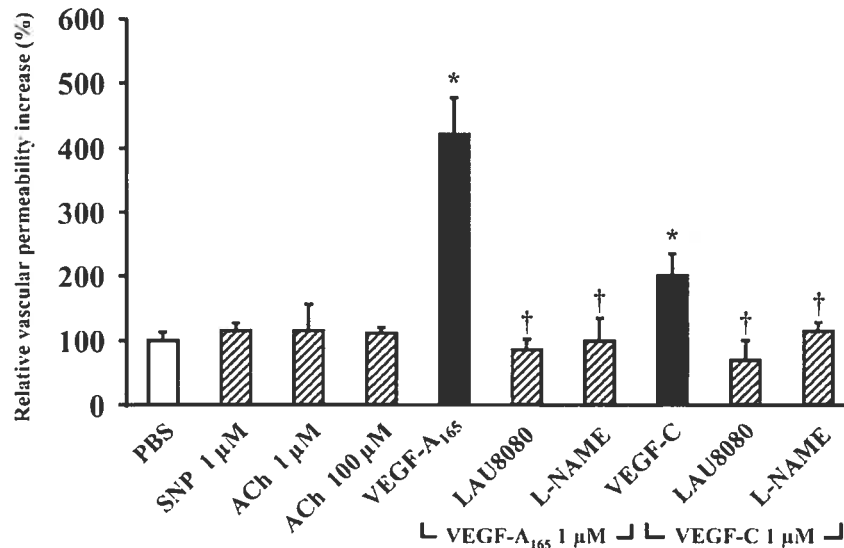


Fig. 3. Implication of NO and PAF on VEGF-induced protein extravasation. EB dye injection in the caudal vein was followed 30 min later by an intradermal injection of PBS, SNP (1  $\mu$ M), ACh (1 and 100  $\mu$ M), VEGF-A<sub>165</sub>, and VEGF-C (1  $\mu$ M). In another group, mice were pretreated with either L-NAME (20 mg/kg) or LAU8080 (20 mg/kg) combined with EB dye (20 mg/kg) and followed a subcutaneous injection of VEGF-A<sub>165</sub> or VEGF-C

(1  $\mu$ M). In another group, mice were pretreated either with L-NAME or LAU8080 (20 mg/kg, respectively) by concomitant intravenous injection with EB dye 30 min prior to VEGF-A<sub>165</sub> or VEGF-C injection (1  $\mu$ M) in mice ears. The animals were sacrificed 60 min later. Values are mean  $\pm$  SEM of at least four independent experiments. \* $P$  < 0.05 compared to PBS, † $P$  < 0.05 compared to VEGF-A<sub>165</sub> or VEGF-C.

TABLE I. Effect of Vasoconstriction on VEGF-A<sub>165</sub>-Induced Protein Extravasation

Pretreatment	Time (min)	Vascular tone modulation			Vascular permeability (EB dye extravasation; $\mu\text{g}$ )	
		-60	-30	0	Treatment	
					PBS	VEGF-A <sub>165</sub>
None	Arteries (%)	N/A	N/A	N/A	1.34 $\pm$ 0.16	5.64 $\pm$ 0.78*
	Venules (%)	N/A	N/A	N/A		
L-NAME	Arteries (%)	100	77.0 $\pm$ 5.5	74.2 $\pm$ 4.2	0.76 $\pm$ 0.26	1.03 $\pm$ 0.16 <sup>††</sup>
	Venules (%)	100	81.0 $\pm$ 0.5	86.0 $\pm$ 5.4		
Phe	Arteries (%)	100	74.2 $\pm$ 15.1	68.4 $\pm$ 13.2	1.92 $\pm$ 0.19	5.90 $\pm$ 0.16*
	Venules (%)	100	76.1 $\pm$ 6.2	82.1 $\pm$ 10.2		

Vascular tone of arteries and venules in mice ears was assessed by taking pictures with a videocamera adapted to a stereomicroscope at 0, 30 and 60 minutes following a bolus intravenous injection of L-NAME (20 mg/kg), or sustained infusion of Phe (0.1 mg/ml; at a constant rate of 0.8 ml/h). PBS or VEGF-A<sub>165</sub> (1  $\mu\text{M}$ ) were injected subcutaneously in mice ears and the animals were sacrificed 60 min later. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

\* $P < 0.05$  compared to its control PBS.

<sup>††</sup> $P < 0.01$  compared to VEGF-A<sub>165</sub>.

surfaces were at 74.2  $\pm$  4.2 and 86.0  $\pm$  5.4%, respectively as compared to basal surface (Table I). Based on these values, we performed a similar vasoconstriction of the arteriovenous system in mice ears by performing a sustained intravenous infusion of Phe (0.1 mg/ml at 0.8 ml/h) (Table I). Treatment with Phe did not alter the basal vascular permeability as compared to control mice (1.9  $\mu\text{g} \pm 0.19$  vs. 1.34  $\mu\text{g} \pm 0.16$ , respectively), and did not affect VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability (5.90  $\mu\text{g} \pm 0.16$  vs. 5.64  $\mu\text{g} \pm 0.78$ , respectively) as opposed to L-NAME pretreatment (Table I).

To identify the contribution of NO downstream effectors, a group of mice were pretreated with a NO-sensitive guanylate cyclase inhibitor (ODQ; 20 mg/kg), which completely abolished VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular permeability. Since protein kinase A (PKA) has a barrier-tightening function on basal microvascular permeability, we assessed its role in VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein leakage. Pretreatment of mice with a PKA inhibitor (H89; 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) did not further increase VEGF-A<sub>165</sub>-induced permeability. However, coadministration of H89 (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) with L-NAME restored almost completely VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular permeability (Fig. 4). Since a treatment with H-89 restored VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular permeability in the presence of L-NAME, we wanted to assess if H-89 in presence of PAF receptor antagonist (LAU8080) would restore VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability increase. The combination of H-89 with LAU8080 did not affect the blockade of VEGF-A<sub>165</sub> hyper-

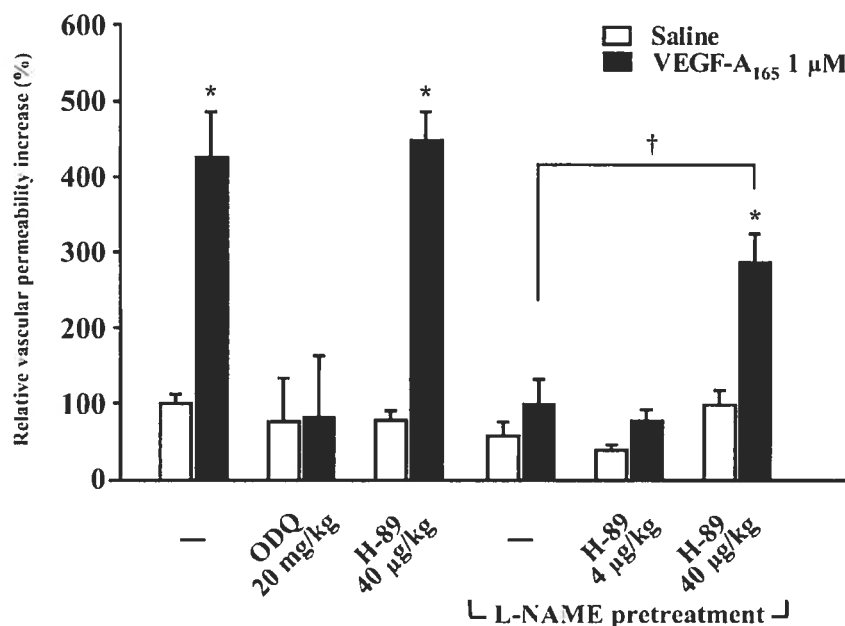
permeability mediated by LAU8080 (data not shown).

#### Role of PAF and NO in VEGF-A<sub>165</sub>-Mediated VE-Cadherin Phosphorylation

Microvascular hyperpermeability is associated with a redistribution of endothelial cell *adherens* junction proteins [Bazzoni and Dejana, 2004]. Since, both VEGF-A<sub>165</sub> and PAF can induce phosphorylation of VE-cadherin and, that NO is implicated in VEGF-A<sub>165</sub>-mediated VE-cadherin redistribution, we assessed the contribution of PAF and NO in VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF-A<sub>165</sub>. Treatment of HUVEC with VEGF-A<sub>165</sub> (10<sup>-9</sup> M) induced a transient phosphorylation of VE-cadherin starting at 30 min, reaching maximal phosphorylation at 45 min, and returning to basal level within 120 min (Fig. 5A). Treatment of HUVEC with a VEGFR-2 inhibitor (SU1498; 10<sup>-6</sup> M) 15 min prior to VEGF-A<sub>165</sub> stimulation for 45 min abrogated VE-cadherin phosphorylation (Fig. 5B). Treatment with LAU8080 (10<sup>-5</sup> M) abolished VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF-A<sub>165</sub> whereas a treatment with L-NAME (10<sup>-4</sup> M) or with ODQ (10<sup>-5</sup> M) provided a partial inhibition (68 and 62%, respectively) of VE-cadherin phosphorylation induced by VEGF-A<sub>165</sub> (Fig. 5B).

#### DISCUSSION

In the current study, we observed that the increase of vascular permeability mediated by VEGF analogs was maximal under VEGF-A<sub>165</sub>



**Fig. 4.** Implication of NO signaling pathway on VEGF-A<sub>165</sub>-induced protein extravasation. EB dye injection in the caudal vein was followed 30 min later by an intradermal injection of PBS, or VEGF-A<sub>165</sub> (1 μM) in mice ears. In a second group, mice were pretreated with L-NAME (20 mg/kg), ODQ (20 mg/kg), or H-89 (40 μg/kg). In a third group, mice were pretreated with a

combined injection of L-NAME (20 mg/kg) and H-89 (4 or 40 μg/kg) prior to intradermal injection of VEGF-A<sub>165</sub> (1 μM), and the animals were sacrificed 60 min later. Values are mean ± SEM of at four independent experiments. \**P* < 0.05 compared to PBS, †*P* < 0.05 compared to VEGF-A<sub>165</sub> pretreated with L-NAME.

stimulation through the activation of VEGFR-2/NRP-1 complex. Using selective PAF receptor antagonists and inhibitors of NO/cGMP pathway, we observed that both PAF and NO are essential to VEGF-mediated vascular hyperpermeability, despite that only PAF showed a direct inflammatory activity.

#### Contribution of VEGF Receptors in Vascular Hyperpermeability

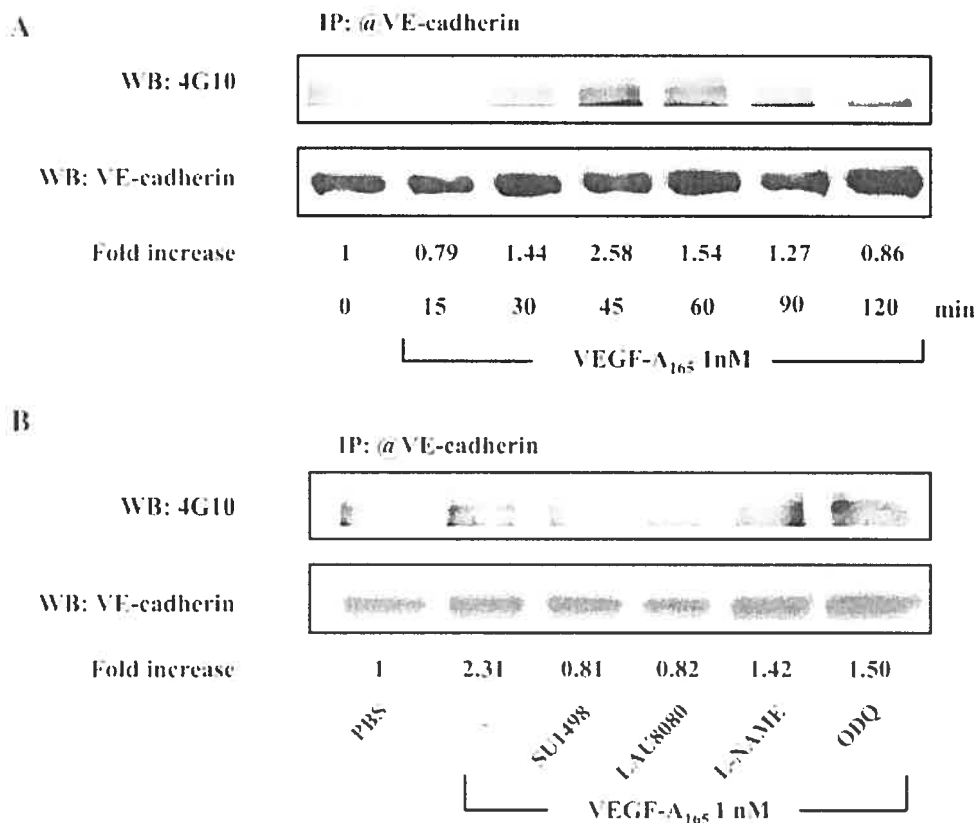
To assess the contribution of VEGF receptors and NRP-1 coreceptor in VEGF-induced vascular permeability, we used a selective receptor-agonist approach. Intradermal injection of VEGFR-2 agonists (VEGF-A<sub>165</sub>, -A<sub>121</sub>, -C, and -D) promoted exudation of vascular macromolecules, whereas a treatment with selective VEGFR-1 agonists (PlGF-1 and VEGF-B) had no such effect. Since VEGF-C and -D have the capacity to bind as well to VEGFR-3, one might suggest that VEGF-C and -D inflammatory activities can be mediated through VEGFR-3 activation. However, it has been reported that VEGF-C mutant (ΔNΔC156S-VEGF), a selective VEGFR-3 agonist, lost its property to promote vascular permeability [Joukov et al.,

1998]. Thus, our data and previous reports demonstrate that VEGFR-2 activation is essential to vascular permeability increase [Kondo et al., 1995; Joukov et al., 1998; Cao et al., 2004].

Intradermal injection of VEGF-A<sub>165</sub> was about three times more potent than VEGF-A<sub>121</sub>, -C, and -D to promote EB dye leakage, demonstrating that NRP-1 enhances VEGF-A<sub>165</sub>-induced microvascular hyperpermeability. Our data are in agreement with previous reports demonstrating that NRP-1 potentiates VEGF-A<sub>165</sub> effects upon VEGFR-2 activation, such as EC migration, proliferation, PGI<sub>2</sub>, and PAF synthesis [Soker et al., 1997; Bernatchez et al., 2002; Neagoe et al., 2005].

#### Contribution of PAF and NO/cGMP Pathway in VEGF Vascular Hyperpermeability

We previously showed that a pretreatment of rats with PAF receptor antagonist BN52021 (10 mg/kg) abolished EB dye leakage mediated by VEGF-A<sub>165</sub> intravenous injection. On the other hand, Murohara et al. [1998] reported that another PAF receptor antagonist, CV6209 (2 mg/kg) failed to prevent vascular permeability increase upon intradermal injection of



**Fig. 5.** Phosphorylation of VE-cadherin by VEGF-A<sub>165</sub>. **A:** HUVEC were stimulated with PBS or VEGF-A<sub>165</sub> (1 nM; 0–120 min). Cell lysates were immunoprecipitated with anti-VE-cadherin IgG. PhosphoVE-cadherin was detected by immunoblotting using an anti-phosphotyrosine IgG (**upper bands**). Membranes were stripped and the detection VE-cadherin protein

expression was performed with an anti-VE-cadherin IgG. **B:** HUVEC were pretreated with SU1498 (10  $\mu$ M), LAU8080 (10  $\mu$ M), L-NAME (100  $\mu$ M), or ODQ (10  $\mu$ M) for 15 min prior to stimulation with VEGF (10<sup>-9</sup> M). WB, Western blotting, IP immunoprecipitation.

VEGF-A<sub>165</sub> in guiney pig skin. In the present study, two additional PAF receptor antagonists, CV-3988 and LAU8080 (20 mg/kg) (Figs. 2 and 3) were used prior to VEGF-A<sub>165</sub> intradermal injection in mice ears, and both antagonists abrogated the hyperpermeability. The difference between our previous and current findings as compared to Murohara et al., observations might be explained by the type, the dosage, and the potency of PAF receptor antagonist selected. Another explanation may reside in the species and/or tissues investigated in those studies.

Considering the discrepancies regarding the capacity of NO to modulate vascular permeability, we assessed the contribution of NO donor (SNP) and inducer (ACh) in our vascular permeability model and observed that intradermal injection of SNP or ACh did not alter basal vascular permeability. However, pretreatment with L-NAME prevented EB dye exsudation

mediated by VEGF-A<sub>165</sub> and PAF. Since L-NAME abrogated protein extravasation mediated by VEGF-A<sub>165</sub> and PAF, and that NO per se had no such effect, our data suggest that NO is a cofactor in the signaling pathway of vascular hyperpermeability.

Since the basal formation of NO maintains an arteriovenous dilation, we delineated if the blockade of VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability by a pretreatment with L-NAME was due to vasoconstrictile or anti-inflammatory properties. To do so, we reproduced L-NAME-mediated vasoconstriction with Phe, which is deprived of inflammatory properties. Our data showed that a similar arteriovenous constriction mediated by phenylephrine as compared to L-NAME did not reduce VEGF-A<sub>165</sub>-mediated microvascular hyperpermeability. These data are strengthening our hypothesis that NO serves as an intracellular cofactor of VEGF-

A<sub>165</sub> inflammatory effect, independently from the modulation of the vasomotor tone.

The proinflammatory contribution of NO resides in its capacity to activate endothelial soluble guanylate cyclase (sGC) to produce cGMP which participate in vascular hyperpermeability induced by inflammatory mediators [Michel and Curry, 1999]. Thus, we pretreated mice with a sGC inhibitor (ODQ). Selective inhibition of sGC prevented protein leakage mediated by VEGF-A<sub>165</sub> supporting that an intact eNOS/NO/sGC/cGMP pathway is essential to support VEGF-A<sub>165</sub> hyperpermeability activity.

It is proposed that cGMP production induced by inflammatory mediators increases vascular permeability by a mechanism reducing cAMP level through activation of phosphodiesterase subtypes. The protective effect of cAMP is mediated by PKA activation which modulates cytoskeletal rearrangement associated with microvascular leakage [Liu et al., 2001; Birukova et al., 2004]. Thus, we hypothesized that the activation of NO/cGMP pathway by VEGF-A<sub>165</sub> leads to the inhibition of cAMP/PKA activity, thereby setting a proinflammatory environment. We observed that the blockade of NO/cGMP production and PKA activity under quiescent conditions did not modulate basal vascular permeability. However, the blockade of NO or cGMP production, with L-NAME or ODQ abrogated VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability, whereas the blockade of PKA activity with H-89 did not alter VEGF-A<sub>165</sub> inflammatory activity. One might suggest that blockade of PKA activation should have increased VEGF-A<sub>165</sub>-mediated vascular permeability, however based on our hypothesis, PKA inhibition is already warranted by endogenous cGMP production. To confirm our hypothesis, mice were pretreated with a concomitant injection of L-NAME and H-89, which restored the capacity of VEGF-A<sub>165</sub> to increase vascular permeability. This series of experiments supports our hypothesis that the activation of NO/cGMP pathway is inhibiting cAMP/PKA pathway, thereby permitting the development of an inflammatory response.

Since a treatment with H-89 in presence of L-NAME restored VEGF-A<sub>165</sub>-hyperpermeability activity, we assessed if H-89 would restore VEGF-A<sub>165</sub> inflammatory activity in presence of LAU8080. H-89 did not rescue VEGF-A<sub>165</sub>-hyperpermeability activity, suggesting that

PAF activity is not mediated through the inhibition of cAMP/PKA pathway.

#### Contribution of PAF and NO in VEGF-Induced VE-Cadherin Phosphorylation

The induction of VE-cadherin phosphorylation by VEGF-A<sub>165</sub> and PAF is leading to an intercellular redistribution of VE-cadherin, a disruption of cell-cell barrier function and vascular permeability increase [Esser et al., 1998; Dejana et al., 1999; Hudry-Clergeon et al., 2005]. However, there are no studies reporting whether PAF or NO/cGMP contribute to VE-cadherin phosphorylation upon VEGF-A<sub>165</sub> stimulation. Pretreatment of HUVEC with LAU8080 abrogated VEGF-A<sub>165</sub>-mediated VE-cadherin phosphorylation, whereas a pretreatment with L-NAME or ODQ had an intermediate effect. This latter observation is in agreement with Aramoto et al. [2004] who reported that the blockade of NO synthesis attenuated VEGF-A<sub>165</sub>-mediated VE-cadherin redistribution. In addition, we observed that a treatment of HUVEC with SNP was unable to promote VE-cadherin phosphorylation (data not shown), as compared to PAF [Hudry-Clergeon et al., 2005]. Our data, might explain why SNP itself as opposed to PAF is unable to provide a direct vascular permeability increase. Thus, suggesting that NO serves as cofactor of VEGF-A<sub>165</sub>-mediated permeability increase.

In conclusion, VEGF analogs increase vascular permeability through VEGFR-2 activation, maximal protein leakage is induced under VEGF-A<sub>165</sub> stimulation, and involves NRP-1/VEGFR-2 complex formation. The blockade of PAF and NO/cGMP pathway abolished VEGF-A<sub>165</sub>-mediated permeability, however, PAF but not NO directly increases vascular permeability per se, thereby, suggesting that PAF is a direct inflammatory mediator, whereas NO serves as a cofactor in VEGF-A<sub>165</sub> proinflammatory activities.

#### ACKNOWLEDGMENTS

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. Alexandre Brkovic is recipient of doctoral studentship from Fonds de la recherche en santé du Québec, Dr. Sirois is recipient of a scholarship from CIHR.



## REFERENCES

- Aramoto H, Breslin JW, Pappas PJ, Hobson RW 2nd, Duran WN. 2004. Vascular endothelial growth factor stimulates differential signaling pathways in in vivo microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1590–H1598.
- Bazzoni G, Dejana E. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869–901.
- Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, Sirois MG. 2002. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem* 85:629–639.
- Birukova AA, Liu F, Garcia JG, Verin AD. 2004. Protein kinase A attenuates endothelial cell barrier dysfunction induced by microtubule disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L86–L93.
- Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. 2004. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res* 94:664–670.
- Cerwinka WH, Cooper D, Krieglstein CF, Feelisch M, Granger DN. 2002. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1111–H1117.
- Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. 1999. Vascular endothelial (VE)-cadherin: Only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252:13–19.
- Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK. 1998. Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol* 111:1–6.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111(Pt 13):1853–1865.
- Feletou M, Bonnardel E, Canet E. 1996. Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: Role of nitric oxide. *Br J Pharmacol* 118:1371–1376.
- Fujii E, Wada K, Ishida H, Yoshioka T, Muraki T. 1999. Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin. *Eur J Pharmacol* 377:219–222.
- Gimeno G, Carpentier PH, Desquand-Billiald S, Hanf R, Finet M. 1998. L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecule extravasation in the microcirculation of awake hamsters. *Eur J Pharmacol* 346:275–282.
- Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I. 2005. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* 19:512–520.
- Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K. 1998. A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. *J Biol Chem* 273:6599–6602.
- Jussila L, Alitalo K. 2002. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 82:673–700.
- Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 273:15099–15103.
- Klabunde RE, Anderson DE. 2000. Obligatory role of nitric oxide in platelet-activating factor-induced microvascular leakage. *Eur J Pharmacol* 404:387–394.
- Kondo S, Matsumoto T, Yokoyama Y, Ohmori I, Suzuki H. 1995. The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF121) produced by *Saccharomyces cerevisiae* promotes both angiogenesis and vascular permeability. *Biochim Biophys Acta* 1243:195–202.
- Liu F, Verin AD, Borbiev T, Garcia JG. 2001. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L1309–L1317.
- Ma X, Ottino P, Bazan HE, Bazan NG. 2004. Platelet-activating factor (PAF) induces corneal neovascularization and upregulates VEGF expression in endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2915–2921.
- Mayhan WG. 1999. VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol* 276:C1148–C1153.
- Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. 1996. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 2:992–997.
- Michel CC, Curry FE. 1999. Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79:703–761.
- Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Biancone L, Emanuelli G, Camussi G. 2000. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:80–88.
- Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. 1998. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97:99–107.
- Neagoe PE, Lemieux C, Sirois MG. 2005. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem* 280:9904–9912.
- Potter MD, Barbero S, Cheresh DA. 2005. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 280:31906–31912.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746–752.
- Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. 1989. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods* 21:309–315.
- Rollin S, Lemieux C, Maliba R, Favier J, Villeneuve LR, Allen BG, Soker S, Bazan NG, Merhi Y, Sirois MG. 2004. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: Role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood* 103:3789–3797.

## VEGF Increases Vascular Permeability through PAF and NO Synthesis

737

- Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Asanuma H, Node K, Takashima S, Asakura M, Ogita H, Liao Y, Sakata Y, Ogai A, Fukushima T, Yamada J, Shinozaki Y, Kuzuya T, Mori H, Terada N, Hori M. 2001. Cardioprotective effect afforded by transient exposure to phosphodiesterase III inhibitors: The role of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase. *Circulation* 104:705–710.
- 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* 219:983–985.
- Sirois MG, Edelman ER. 1997. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 272:H2746–H2756.
- Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler IJ, Charnahelli H, Klagsbrun M. 1997. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem* 272:31582–31588.
- Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D. 2004. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 167:223–229.

## Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation

Alexandre Brkovic,\* Martin Pelletier,<sup>†</sup> Denis Girard,<sup>†</sup> and Martin G. Sirois\*<sup>1</sup>

\*Research Center, Montreal Heart Institute, Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; and <sup>†</sup>INRS-Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Quebec, Canada

**Abstract:** Angiopoietins (Ang1 and Ang2) modulate blood vessel integrity during the angiogenic process through the activation of tyrosine kinase receptor (Tie2). We recently detected Tie2 expression on neutrophils and reported that angiopoietins induce acute proinflammatory events including neutrophil  $\beta_2$ -integrin activation and their adhesion onto endothelial cells. Herein, we investigated the effect of angiopoietins on neutrophil migration and their capacity to modulate CXCL8/IL-8 chemotactic properties. Using a Boyden chamber assay, we observed that Ang1 and Ang2 (up to 10 nM; 60 min) increased the migration of neutrophils, and the maximal effect was achieved at 1 nM (72% and 114% increase, respectively) as compared with untreated cells. Angiopoietins induce a rapid and transient Akt phosphorylation, and pretreatment of neutrophils with PI-3K inhibitors, wortmannin (100 nM) and LY294002 (500 nM), reduced Ang1-mediated neutrophil migration by 100% and 78% and Ang2 chemotactic activity by 100% and 71%, respectively. Treatment of neutrophils with CXCL8/IL-8 (up to 50 nM; 60 min) increased basal neutrophil migration by 257% at its optimal concentration (10 nM), and pretreatment of neutrophils with corresponding PI-3K inhibitors reduced the CXCL8/IL-8 (1 nM) chemotactic effect. Pretreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 (10 nM; 15 min) potentiated neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (1 or 10 nM; 60 min) by 263% and 238% and by 177% and 164%, respectively. Finally, both angiopoietins showed a synergistic effect on the induction of Akt phosphorylation mediated by CXCL8/IL-8. In summary, our data demonstrate that angiopoietins increase neutrophil migration through PI-3K activation and can enhance proinflammatory activities of other cytokines. *J. Leukoc. Biol.* 81: 000–000; 2007.

**Key Words:** cytokines · polymorphonuclear cells · migration · Tie2 receptor

### INTRODUCTION

Angiogenesis is characterized by the formation of new blood vessels from a pre-existing vasculature. This process is tightly

regulated and requires the coordinated action of numerous growth factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins, and angiopoietins (Ang1 and Ang2) are structurally related endothelial growth factors, having similar binding affinity for tyrosine kinase receptor (Tie2). Ang1 has been shown to act as a Tie2 agonist, promoting endothelial cell (EC) survival, migration, and proliferation [1, 2]. Conversely, Ang2 has been characterized initially as an endogenous Tie2 antagonist, thereby counteracting Ang1 activities [1, 3]. However, recent evidences suggest that Ang2, under certain circumstances, has a more complex role and may act as a Tie2 agonist. This hypothesis is supported by the capacity of Ang2 to induce Tie2 phosphorylation, EC chemotaxis, and in vitro capillary-like tube formation [4–6]. Furthermore, we reported that Ang1 and Ang2, upon endothelial Tie2 activation, can induce platelet-activating factor (PAF) synthesis and transient P-selectin translocation, which support neutrophil adhesion onto activated EC [7, 8]. Recent studies revealed that angiopoietins can also modulate the responsiveness of EC toward proinflammatory cytokines. For instance, Ang2 was shown to serve as a priming factor for TNF- $\alpha$  at low concentrations [9]. Moreover, Ang1 and Ang2 were shown to potentiate VEGF-mediated angiogenesis in a mouse cornea model [10].

Postnatal angiogenesis is associated with numerous inflammatory conditions such as atherosclerosis, rheumatoid arthritis, retinopathy, and tumor growth [11]. It has been reported that inflammation precedes and accompanies pathological angiogenesis, as evidenced by increased vascular permeability and recruitment of inflammatory cells at angiogenic sites [12, 13].

Among inflammatory cells, neutrophils are the first ones recruited to the site of inflammation and have been suggested to participate in pathological angiogenesis [14, 15]. Neutrophils produce several proangiogenic cytokines, including VEGF, TNF- $\alpha$ , and ILs (IL-1, IL-6, and IL-8), as well as matrix-degrading enzymes, which together, contribute to trigger and support angiogenic activities. Recruitment of neutrophils is a multistep process implying neutrophil tethering, rolling, and firm adhesion to EC, followed by the migration of

<sup>1</sup> Correspondence: Research Center, Montreal Heart Institute, 5000

Received September 20, 2006; revised November 14, 2006; accepted December 11, 2006.

doi: 10.1189/jlb.0906580

neutrophils across the vasculature toward the subendothelial chemoattractant source.

Recently, we detected Tie2 expression on the cell surface of polymorphonuclear cells, which has been confirmed later by independent groups [7, 16, 17]. Stimulation of neutrophils with Ang1 or Ang2 induces PAF synthesis and  $\beta_2$ -integrin-dependent neutrophil adhesion to extracellular matrix (ECM) [7, 8]. Taken together, these observations suggest that the angiopoietin/Tie2 system can modulate leukocyte trafficking. In agreement, recent studies showed that angiopoietins can induce neutrophil and eosinophil chemotaxis, an important component of the acute inflammatory response [16, 17]. However, little is known about the cellular pathways involved in angiopoietin-mediated neutrophil migration. In the present study, we thus wanted to define the cellular pathways involved in angiopoietin-mediated neutrophil migration. In addition, as angiopoietins can modulate the effect of proinflammatory cytokines in EC, we were led to investigate if angiopoietins could modulate cytokine activities in neutrophils.

## MATERIALS AND METHODS

### Neutrophil purification

Venous blood was obtained from healthy donors free from medication for at least 10 days prior to the experiments. Neutrophils were isolated as described previously [7]. Briefly, upon a 2% dextran sedimentation, neutrophils were isolated under sterile conditions using the Ficoll-Paque gradient, and contaminating erythrocytes were removed by hypotonic shock. Unless otherwise noted, neutrophils were resuspended in RPMI containing 25 mM HEPES and 1% of antibiotics. Ninety-five 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. To characterize the ratio of neutrophils and eosinophils in our polymorphonuclear population, cells were centrifuged, spread onto microscope slides, and stained with Diff-Quick solution. Only the populations of polymorphonuclear cells consisting of at least 95% of neutrophils were used in our study.

### Cell-surface expression of Tie2

Neutrophils ( $10^7$  cells/ml) were rinsed and resuspended in RPMI, and bovine IgG (150  $\mu$ g/ml) was added for 30 min to prevent nonspecific binding via FcRs. Neutrophils were centrifuged, rinsed, resuspended in RPMI ( $10^6$  cells/ml), and incubated with mouse monoclonal Tie2 IgG<sub>1</sub> (1–10  $\mu$ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) or with mouse IgG<sub>1</sub> isotype control (1–10  $\mu$ g/ml, R&D Systems) for 60 min at 4°C. Upon additional rinses, neutrophils were incubated with goat antimouse, FITC-conjugated, secondary IgG (1:100). Cells were rinsed and fixed with 0.5% paraformaldehyde. Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

### Neutrophil migration

In vitro chemotaxis was performed in a 48-well microchamber (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA) using a 3- $\mu$ m polycarbonate membrane filter as described previously [18, 19]. The bottom wells were loaded with RPMI, with or without agonists (final volume, 25  $\mu$ l), the polycarbonate membrane was placed over the wells, and the top layer of the chamber was added over the membrane. Neutrophils (50  $\mu$ l from a RPMI suspension;  $10^6$  cells/ml) were added into the upper wells. The chamber was incubated at 37°C for 60 min in a humidified incubator in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Upon the incubation period, the top of the chamber was removed, and the upper side of the membrane was wiped carefully with the rubber scraper provided by the manufacturer. The polycarbonate membrane was fixed in methanol, colored with the Diff-Quick staining kit, mounted on a glass slide, and examined with a light microscope under 400 $\times$  magnification. The number of cells in five random fields was

counted, and the results were expressed as relative neutrophil migration (number of cells from tested group/number of cells from corresponding control vehicles). Treatment with the chemoattractant CXCL8/IL-8 (25 nM) was used as a positive control.

In another set of experiments, cells were pretreated for 15 min with a blocking goat polyclonal antihuman Tie2 (anti-hTie2) IgG (R&D Systems) or isotypic goat IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) before cell migration toward angiopoietins (1 nM). In some experiments, cells were pretreated for 15 min with PI-3K inhibitors (wortmannin, 10 and 100 nM [20]; LY294002, 0.5 or 5  $\mu$ M [21]), p38 MAPK (SB203580, 10  $\mu$ M [22]), p42/44 MAPK (PD98059, 50  $\mu$ M [23]), or angiopoietins (0.1–10 nM) prior to neutrophil migration toward agonists. In studies implying the use of inhibitors, the latter was also added into the bottom wells.

### Akt Western blot analyses

Neutrophils were resuspended at a concentration of  $4 \times 10^7$  cells/ml, and 100  $\mu$ l cell suspension was stimulated with control vehicle, angiopoietins, CXCL8/IL-8, and angiopoietins plus CXCL8/IL-8 at room temperature. Neutrophils were lysed in 4 $\times$  Laemmli's buffer and boiled for 10 min. An equal volume of samples was loaded in a 7.5% SDS-PAGE, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane, and membranes were probed with a rabbit polyclonal phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) IgG (1:750, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA). PVDF membranes were subsequently stripped in glycine stripping buffer, and total Akt protein expression was determined with a rabbit polyclonal anti-Akt IgG (1:1000). Immunoreactive bands were visualized by using LumiGlo™ (Cell Signaling Technology Inc.), digitized using a two-dimensional gel scanner, and quantified using Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### Statistical analysis

Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical comparisons were made by one-way ANOVA, followed by a Tukey *t*-test for multiple comparisons. Data were considered significantly different if values of *P* < 0.05 were observed.

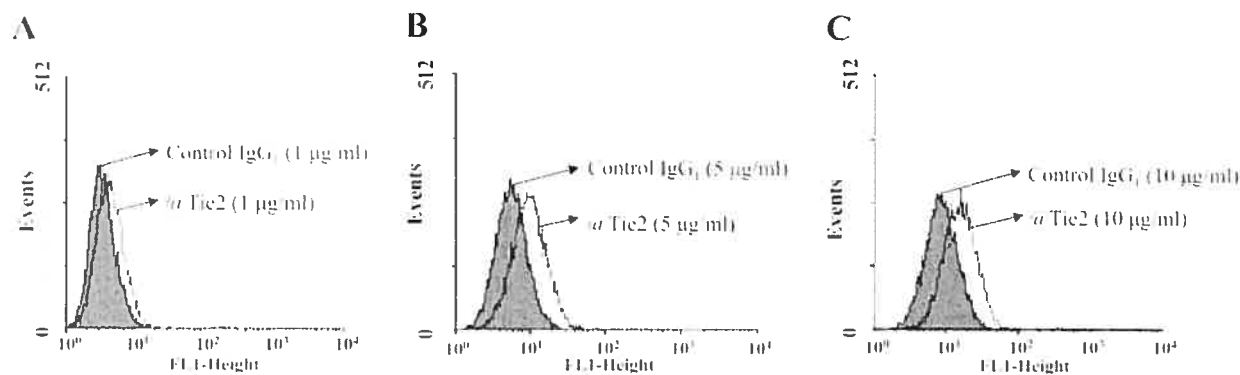
## RESULTS

### Expression of Tie2 in neutrophils

We recently reported by RT-PCR, confocal microscopy, and immunocytochemistry that Tie2 is expressed at the cell surface of neutrophils, and others demonstrated by RT-PCR and by flow cytometric analysis that Tie2 is expressed on eosinophils [7, 16, 17]. To confirm that the detection of Tie2 on neutrophils in our initial study was not a result of a marginal cross-contamination by eosinophils, we performed a FACS analysis directed against Tie2 expression in a population of purified polymorphonuclear cells containing at least 95% of neutrophils (**Fig. 1**).

### Ang1 and Ang2 mediate neutrophil migration

Using a modified Boyden chamber assay, we tested the capacity of angiopoietins to modulate neutrophil migration. Ang1 and Ang2 increased concentration-dependently the migration of neutrophils in a bell-shaped manner. The maximal effect mediated by Ang1 and Ang2 was achieved at 1 nM (72% and 114% increase, respectively) as compared with PBS-treated cells (**Fig. 2A**), whereas at 5 and 10 nM, the effect of both angiopoietins resumed to basal level. To assess if the migration of neutrophils mediated by Ang1 and Ang2 were Tie2-dependent, we pretreated the neutrophils with different concentrations of anti-hTie2 IgG (5 and 10  $\mu$ g/ml; 15 min) capable of blocking the angiopoietin/Tie2 interaction. Such pretreatment prevented neutrophil migration induced by Ang1 or Ang2 (1 nM), whereas a pretreatment with equivalent concentrations of



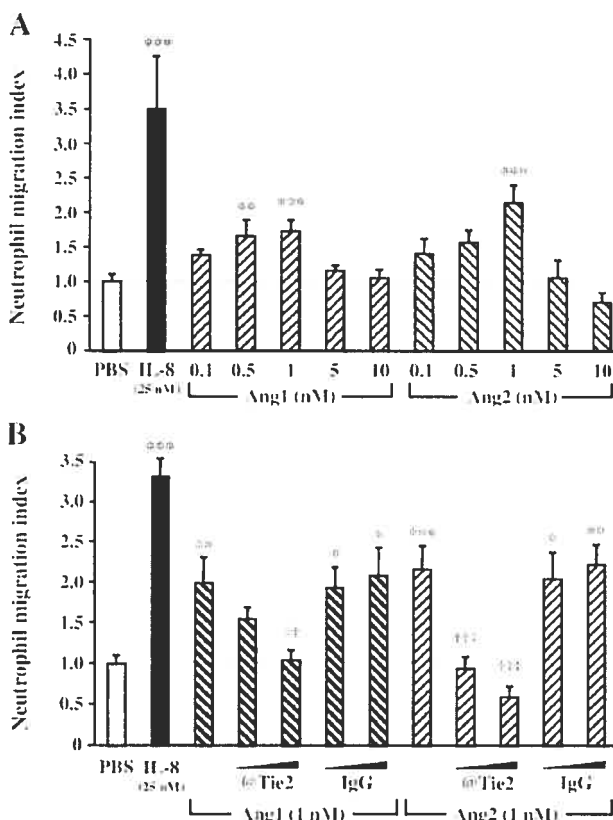
**Fig. 1.** Detection of Tie2 expression on neutrophil cell surface by FACS analysis. Neutrophils were incubated with mouse monoclonal Tie2 IgG<sub>1</sub> ( $\alpha$ Tie2; 1, 5, or 10  $\mu$ g/ml) or with control mouse isotypic IgG<sub>1</sub> (Control IgG<sub>1</sub>; 1, 5, or 10  $\mu$ g/ml). Neutrophils were then incubated with a secondary, goat antimouse, FITC-conjugated IgG (1:100). Flow cytometric analysis (10,000 events) was performed using a FACSscan. Representative analysis of three independent experiments.

control isotypic IgG had no such effect (Fig. 2B). In all studies, treatments with CXCL8/IL-8 (10 or 25 nM) were included as a positive control, increasing neutrophil migration by over 200% as compared with PBS-treated cells.

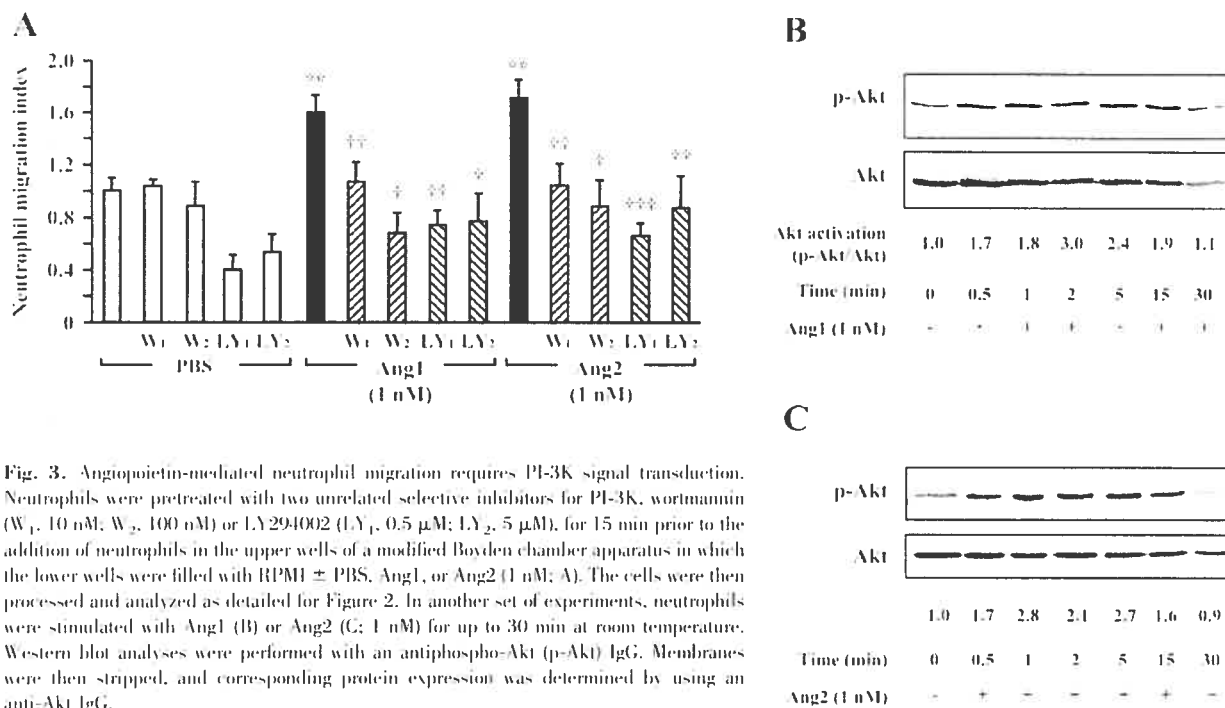
### Role of the PI-3K pathway in angiotensin-mediated neutrophil migration

Previous studies reported that angiotensins possess the capacity to activate PI-3K/Akt, p38, and p42/44 MAPK pathways [4, 8, 24–26]. Thus, we wanted to address the signaling pathway(s) involved in neutrophil migration mediated by angiotensins. Neutrophils were pretreated with inhibitors of PI-3K (wortmannin and LY294002), p38 MAPK (SB203580), and p42/44 MAPK (PD98059) pathways. Pretreatment of neutrophils with wortmannin (10 and 100 nM) for 15 min prior to their addition in the upper chamber did not affect basal migration mediated under PBS condition but prevented by over 90% the migration of neutrophils mediated by Ang1 and Ang2 (1 nM; 60 min; Fig. 3A). The contribution of the PI-3K pathway was confirmed by using a second independent inhibitor LY294002. Pretreatment of neutrophils with LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) reduced basal PBS-mediated migration by 40% and 53%, respectively. Pretreatment of neutrophils with LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) decreased by 72% and 78% the migration of neutrophil-mediated by Ang1 (1 nM) and by 80% and 71% under Ang2 (1 nM) stimulation, respectively, as compared with PBS-treated cells in the presence of LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M; Fig. 3A). In another set of experiments, neutrophils were pretreated with PD98059 (50  $\mu$ M) or SB203580 (10  $\mu$ M) as defined above, and both did not affect neutrophil migration induced by Ang1 or Ang2 (1 nM; data not shown).

As the migration of neutrophils induced by angiotensins was sensitive to PI-3K inhibitors, we therefore tested the capacity of angiotensins to increase Akt phosphorylation in neutrophils. Treatment of neutrophils with Ang1 and Ang2 (1 nM) induced a rapid and transient Akt phosphorylation, which was maximal within 2 min (3.0- and 2.8-fold of increase, respectively), as compared with control, PBS-treated cells, and returning to basal level within 30 min (Fig. 3. B and C).



**Fig. 2.** Ang1 and Ang2 mediate neutrophil migration through Tie2 activation. Neutrophils were added to the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus, and the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS, Ang1, or Ang2 (0.1–10 nM; A). In another series of experiments, neutrophils were pretreated with a blocking goat anti-hTie2 IgG ( $\alpha$ Tie2; 5 or 10  $\mu$ g/ml) or control goat isotypic IgG (IgG; 5 or 10  $\mu$ g/ml) for 15 min prior to the addition of neutrophils in the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus in which the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS, Ang1, or Ang2 (1 nM; B). Treatment with CXCL8/IL-8 (25 nM; lower wells) was used as a positive control. Migrating cells were fixed, stained, and counted under light microscopy at 400 $\times$  original magnification. Values are means  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ , compared with PBS.  $\nabla$ ,  $P < 0.05$ ;  $\nabla\text{---}$ ,  $P < 0.01$ ;  $\nabla\text{---}\text{---}$ ,  $P < 0.001$ , as compared with corresponding agonist.



**Fig. 3.** Angiopoietin-mediated neutrophil migration requires PI-3K signal transduction. Neutrophils were pretreated with two unrelated selective inhibitors for PI-3K, wortmannin (W<sub>1</sub>, 10 nM; W<sub>2</sub>, 100 nM) or LY294002 (LY<sub>1</sub>, 0.5  $\mu$ M; LY<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M), for 15 min prior to the addition of neutrophils in the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus in which the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS, Ang1, or Ang2 (1 nM; A). The cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. In another set of experiments, neutrophils were stimulated with Ang1 (B) or Ang2 (C; 1 nM) for up to 30 min at room temperature. Western blot analyses were performed with an antiphospho-Akt (p-Akt) IgG. Membranes were then stripped, and corresponding protein expression was determined by using an anti-Akt IgG.

### Enhancing activity of angiopoietins on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration

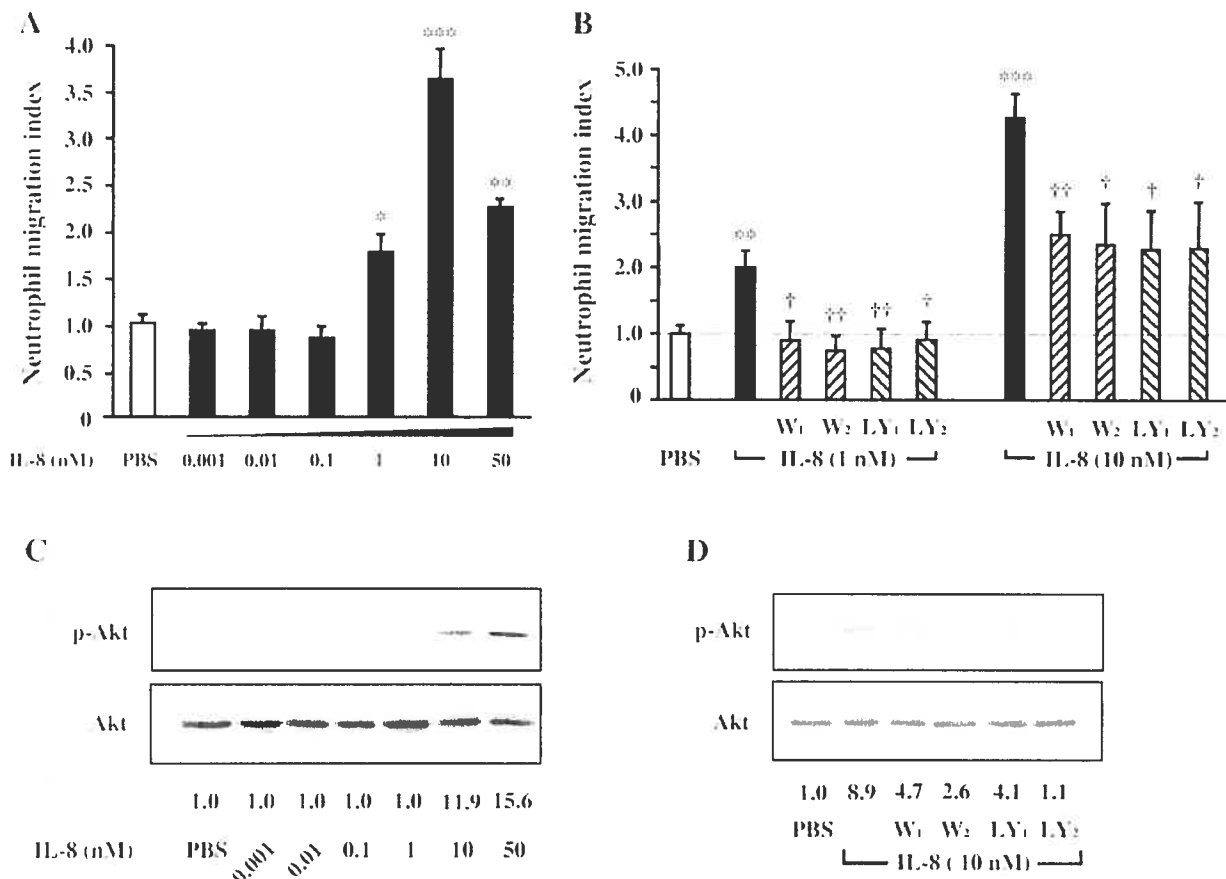
A recent report revealed that angiopoietins can modulate EC responsiveness to proinflammatory cytokines [9]. Different studies provided evidence that PI-3K activation contributes to CXCL8/IL-8 chemotactic properties [22, 27]. Our data suggest as well that PI-3K activation contributes to angiopoietin chemotactic activity on neutrophils; thus, we wanted to assess if angiopoietins can modulate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. In a first series of experiments, we performed a CXCL8/IL-8 concentration-dependent assay (0.001–50 nM) on neutrophil migration and assessed the extent of PI-3K contribution. CXCL8/IL-8 induced a significant neutrophil migration at 1, 10, and 50 nM, and a maximal effect was achieved at 10 nM (257% increase as compared with PBS-treated cells; **Fig. 4A**). Pretreatment of neutrophils with wortmannin (10 and 100 nM) or LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) for 15 min prevented neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (1 nM), whereas at a higher concentration of CXCL8/IL-8 (10 nM), wortmannin (10 and 100 nM) or LY294002 (0.5 and 5  $\mu$ M) provided a partial inhibitory effect (52–59% inhibition) on neutrophil migration (**Fig. 4B**). In another set of experiments, neutrophils were pretreated with PD93059 (50  $\mu$ M) or SB203580 (10  $\mu$ M), which did not affect neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (10 nM; data not shown).

As the migration of neutrophils induced by CXCL8/IL-8 was sensitive to PI-3K inhibitors, we therefore tested the capacity of CXCL8/IL-8 to increase Akt phosphorylation in neutrophils, which were treated with CXCL8/IL-8 (0.001–50 nM) for 2 min [22, 28], and we observed Akt phosphorylation at 10 and 50 nM—11.9- and 15.6-fold of increase, respectively—as compared with control, PBS-treated cells (**Fig. 4C**). Pretreatment of neutrophils with increasing concentrations of PI-3K inhibitors

(wortmannin, 10 and 100 nM; LY294002, 0.5 and 5  $\mu$ M) for 15 min prior to stimulation with CXCL8/IL-8 (10 nM; 2 min) reduced Akt phosphorylation, and maximal inhibition reached 80% and 99% under wortmannin and LY294002 pretreatment, respectively (**Fig. 4D**).

We then assessed the capacity of angiopoietins to modulate CXCL8/IL-8 chemotactic activities on neutrophils. Pretreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 (0.1, 1, and 10 nM) for 15 min prior to the addition of neutrophils in the upper wells with their corresponding Ang1- or Ang2-conditioned media did not modulate basal neutrophil migration toward control PBS (lower wells). However, pretreatment of neutrophils with Ang1 (10 nM) under the same condition potentiated neutrophil migration toward a CXCL8/IL-8 concentration gradient (0.1, 1, or 10 nM) for 60 min. For instance, addition of CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM) alone in the lower wells increased neutrophil migration by 35%, 101%, and 286%, and the pretreatment of neutrophils with Ang1 (10 nM) prior to the addition of CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM) in the lower wells raised the migration of neutrophils to 154%, 266%, and 507%, respectively (**Fig. 5A**). Similarly, in another series of experiments, basal migration of neutrophils under CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM) exposure alone increased by 27%, 63%, and 222%, respectively, and a pretreatment of neutrophils with Ang2 increased those mediated toward CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM) by 41%, 150%, and 363%, respectively (**Fig. 5B**).

As angiopoietins and CXCL8/IL-8 increase neutrophil migration through the activation of a PI-3K pathway, we hypothesized that it could be implicated in the priming effect of angiopoietins on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. To address this issue, neutrophils were pretreated initially for 15 min with wortmannin (100 nM) or LY294002 (5  $\mu$ M) prior to the addition of PBS, Ang1, or Ang2 (10 nM) for an additional



**Fig. 4.** CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration requires PI-3K/Akt signal transduction. Neutrophils were added to the upper wells of a modified Boyden chamber; the lower wells were filled with RPMI ± PBS or CXCL8/IL-8 (0.001–50 nM; A). In a second set of experiments, neutrophils were pretreated with wortmannin (W<sub>1</sub>, 10 nM; W<sub>2</sub>, 100 nM) or LY294002 (LY<sub>1</sub>, 0.5 μM; LY<sub>2</sub>, 5 μM) for 15 min prior to the addition of neutrophils in the upper wells, and the lower wells were filled with RPMI ± PBS or CXCL8/IL-8 (1 or 10 nM; B). The cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. In another set of experiments, neutrophils were stimulated with PBS or CXCL8/IL-8 (0.001–50 nM) for 2 min (C), and neutrophils were also pretreated with wortmannin (W<sub>1</sub>, 10 nM; W<sub>2</sub>, 100 nM) or LY294002 (LY<sub>1</sub>, 0.5 μM; LY<sub>2</sub>, 5 μM) for 15 min prior to stimulation with PBS or CXCL8/IL-8 (10 nM; 2 min; D). Western blot analyses of Akt activation were performed as detailed for Figure 3.

15-min exposure. Then, neutrophils were added to the upper chambers allowing them to migrate toward the CXCL8/IL-8 (10 nM) gradient for 60 min.

In the current set of experiments, pretreatment of neutrophils with wortmannin and LY294002 partially blocked (50% and 51%, respectively) CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. If the priming effect of angiopoietins on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration is PI-3K-dependent, thus the inhibition of the angiopoietin priming effect by PI-3K inhibitors should decrease the migration of neutrophils to the level mediated by CXCL8/IL-8 in the presence of PI-3K inhibitors (Fig. 6A, dotted line). Pretreatment of neutrophils with wortmannin or LY294002 decreased by 70% and 79% the priming effect of Ang1 and by 88% and 82% the priming effect of Ang2 on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration (Fig. 6A).

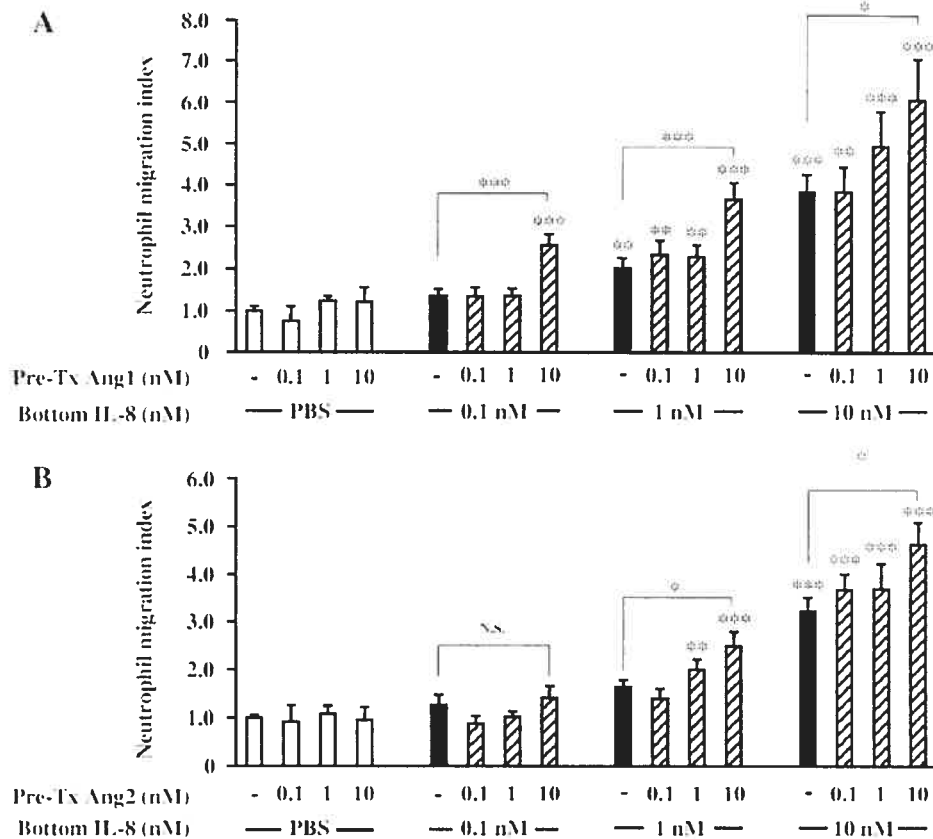
As the activation of the PI-3K pathway is involved in the angiopoietin priming effect on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration, we then tested the capacity of angiopoietins to potentiate CXCL8/IL-8-mediated Akt phosphorylation. Treatment of neutrophils with CXCL8/IL-8 (0.1 and 1 nM; 2 min) did not

mediate Akt phosphorylation, whereas a treatment with CXCL8/IL-8 (10 nM) induced Akt phosphorylation (28-fold increase) as compared with PBS-treated cells (Fig. 6, B and C). A combination of Ang1 (0.1, 1, and 10 nM) to suboptimal CXCL8/IL-8 (1 nM) concentration potentiated Akt phosphorylation by 2.1-, 3.9-, and 7.0-fold, respectively, as compared with CXCL8/IL-8 alone (1 nM; Fig. 6B). Similarly, cotreatment of neutrophils with increasing concentrations of Ang2 (0.1, 1, and 10 nM) plus CXCL8/IL-8 (1 nM) potentiated as well by 1.3-, 5.1-, and 4.8-fold, respectively, the phosphorylation of Akt mediated by CXCL8/IL-8. Cotreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2 (0.1, 1, and 10 nM) did not provide a synergistic effect on Akt phosphorylation mediated by the lowest and the highest concentrations of CXCL8/IL-8 (0.1 and 10 nM; Fig. 6, B and C).

## DISCUSSION

In the present study, we showed that Ang1 and Ang2 possess a similar agonistic capacity to mediate neutrophil migration through the activation of the PI-3K pathway. These data are in

**Fig. 5.** Angiopoietins enhance CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration. Neutrophils were pretreated (Pre-Tx) with Ang1 (A) or Ang2 (B; 0.1, 1, or 10 nM) for 15 min prior to the addition of neutrophils in the presence of corresponding Ang1- or Ang2-conditioned media in the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus in which the lower wells (Bottom IL-8) were filled with RPMI  $\pm$  PBS or CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM). Following a 60-min incubation period at 37°C, the cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. \*,  $P < 0.05$ , compared with PBS or CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM). N.S., Not significant.



accordance with our previous findings in which we defined proinflammatory activities of angiopoietins in neutrophils. Furthermore, we have observed that both angiopoietins can potentiate the effect of CXCL8/IL-8 on neutrophil migration.

### Ang1 and Ang2 promote neutrophil migration through Tie2 activation

Classically, Tie2 was recognized as being expressed on endothelial and hematopoietic stem cells [29]. However, we recently detected Tie2 expression on neutrophils by RT-PCR, confocal microscopy, and immunocytochemistry and reported the capacity of Ang1 and Ang2 to induce PAF synthesis,  $\beta_2$ -integrin functional up-regulation, and neutrophil adhesion onto ECM and EC [7]. During the same time, Tie2 receptor expression was observed on eosinophils and neutrophils by RT-PCR and flow cytometry [16, 17]. In eosinophils, Feistritzer et al. [16] observed that Ang1 has a chemotactic activity, which is partially driven through PI-3K activation, whereas Ang2 has no or a marginal effect. In neutrophils, Sturn et al. [17] reported that both angiopoietins promote chemotaxis; however, they did not address the contribution of the PI-3K pathway. By FACS analysis, we confirmed our initial data demonstrating Tie2 expression on neutrophils [7], which is in agreement with the observation made by Sturn and colleagues [17].

Using a modified Boyden chamber assay, we demonstrate that angiopoietins increase concentration-dependently the migration of neutrophils in a bell-shaped manner. Maximal agonistic activity is observed at 1 nM, whereas at a higher concentration (10 nM), Ang1 and Ang2 lose their capacity to

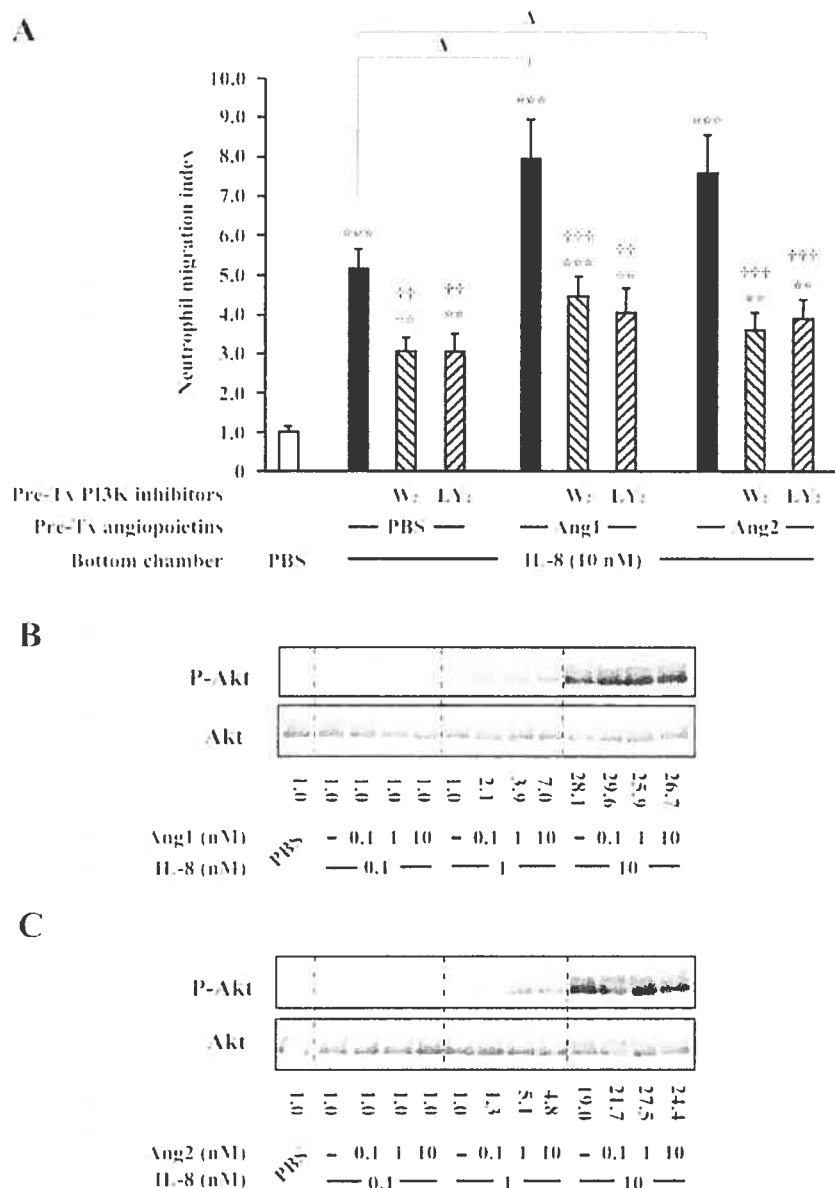
promote neutrophil migration. This latter observation is in line with previous studies, where we observed a similar bell-shaped response, namely VEGF-A<sub>165</sub>- and angiopoietin-mediated endothelial P-selectin translocation, angiopoietin-mediated PAF synthesis [7, 8]. This phenomenon can be explained by the fact that the binding of a ligand to a receptor tyrosine kinase induces receptor hetero- and homodimerization, which is essential to trigger receptor autophosphorylation and signal transduction [8, 30]. However, an overabundance of ligands impedes receptor dimerization [31]. In addition, by using an antibody capable of blocking the angiopoietin/Tie2 interaction, we demonstrate that neutrophil migration mediated by both angiopoietins is Tie2-dependent.

### The PI-3K activation pathway is essential to angiopoietin-mediated neutrophil migration

In EC, the Ang1/Tie2 interaction activates PI-3K/Akt, p42/44, and p38 MAPK pathways [25, 33–38], and Ang2/Tie2 interaction mediates PI-3K/Akt signal transduction [4]. More recently, we observed that Ang2 is also capable of activating p38 and p42/44 MAPK pathways with a similar kinetic as induced by Ang1 [8]. Furthermore, we reported that both angiopoietins promote a similar endothelial PAF synthesis, and the aforementioned intracellular pathways are contributing to angiopoietin-mediated PAF synthesis [8].

In the current study, we observed that a pretreatment with two PI-3K inhibitors prevented angiopoietin-mediated neutrophil migration, whereas the blockade of p38 and p42/44 MAPK activity had no such effect. Our data are in line with previous





**Fig. 6.** Angiopoietins potentiate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration through PI-3K/Akt activation pathway. Neutrophils were pretreated initially with wortmannin (W<sub>2</sub>, 100 nM) or LY294002 (LY<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M) for 15 min, which was followed by the addition of PBS, Ang1, or Ang2 (10 nM) for an additional 15 min of pretreatment. Neutrophils were then added to the upper wells of a modified Boyden chamber apparatus, and the lower wells were filled with RPMI  $\pm$  PBS or CXCL8/IL-8 (10 nM; A). Following a 60-min incubation period at 37°C, the cells were then processed and analyzed as detailed for Figure 2. \*,  $P < 0.05$ , compared with PBS; †,  $P < 0.05$ , compared with CXCL8/IL-8 (10 nM)  $\pm$  PBS, Ang1, or Ang2;  $\Delta$ ,  $P < 0.05$ , compared with CXCL8/IL-8 (10 nM) + PBS. In another set of experiments, neutrophils were stimulated with PBS, CXCL8/IL-8 (0.1, 1, or 10 nM)  $\pm$  Ang1 (0.1, 1, or 10 nM; B), or Ang2 (0.1, 1, or 10 nM; C) for 2 min at room temperature. Western blot analyses of Akt activation were performed as detailed for Figure 3.

studies reporting that PI-3K activation is essential for Ang1- and Ang2-mediated EC survival, migration, and sprouting [4, 5, 26, 39, 40], whereas the activation of p38 and p42/44 MAPKs by angiopoietins modulates cell survival [25]. In addition, our data demonstrate that in neutrophils, PI-3K activation is essential to Ang1 and Ang2 chemotactic properties, whereas in eosinophils, Ang1 chemotactic activity is predominant and partially dependent on PI-3K activation [16].

As Akt is a target of PI-3K signaling upon stimulation of neutrophils with various proinflammatory cytokines [41], we assessed the capacity of angiopoietins to induce Akt phosphorylation. We observed that Ang1 and Ang2 can induce a rapid and transient phosphorylation of Akt in neutrophils. Our data are in agreement with the previous study, in which a similar Akt kinetic activation was observed upon stimulation of neutrophils with chemoattractants including CXCL8/IL-8 and fMLP [41].

### Ang1 and Ang2 potentiate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration

Stimulation of EC by proinflammatory mediators can induce the release of Ang2 and CXCL8/IL-8 from Weibel-Palade bodies, which promotes neutrophil migration and their adhesion onto EC [7, 42, 43]. As we observed that PI-3K activation contributes to angiopoietin chemotactic activity on neutrophils and that different studies provided evidence that PI-3K activation contributes to CXCL8/IL-8 chemotactic properties [22, 27], we thus hypothesized that angiopoietins might modulate CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration.

Herein, we show that CXCL8/IL-8 increases migration of neutrophils in a bell-shaped manner, which is in agreement with previous reports [44–46]. Our data are in line with previous studies indicating that PI-3K pathway activation contributes to CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration [22,

27]. We observed that a pretreatment with PI-3K inhibitors prevented neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 (1 nM). However, identical pretreatment reduced by ~50% the migration of neutrophils mediated by CXCL8/IL-8 (10 nM), despite the fact that those PI-3K inhibitors were capable of preventing CXCL8/IL-8 (10 nM)-mediated Akt phosphorylation. The difference between the effects of PI-3K inhibition on neutrophil migration induced by CXCL8/IL-8 at 1 nM versus 10 nM might be explained by the stimulation of additional pathway(s) independently from PI-3K/Akt activation. However, based on our current data, we can discard the contribution of p38 and p42/44 MAPK pathways, as their inhibition had no effect on CXCL8/IL-8 (10 nM) chemotactic activity.

Our data showed that a pretreatment of neutrophils with Ang1 or Ang2, even at the highest concentration, did not promote their migration in the absence of chemotactic mediators but potentiated a neutrophil migration response toward CXCL8/IL-8 (Fig. 5, A and B). These data suggest that neutrophil activation by Ang1 and Ang2 is priming their migration toward chemotactic mediators such as CXCL8/IL-8. By Western blot analyses, we also observed the capacity of Ang1 and Ang2 to potentiate Akt phosphorylation mediated by a suboptimal CXCL8/IL-8 concentration, which per se, is insufficient to increase the basal level of Akt phosphorylation. Finally, by using selective PI-3K inhibitors, we observed that the potentiating activity of Ang1 and Ang2 on CXCL8/IL-8-mediated neutrophil migration is driven through PI-3K activation.

In a recent study, we observed under an in vitro condition that Ang1 and Ang2 can promote a rapid and transient endothelial P-selectin translocation and neutrophil adhesion onto activated EC. Under in vivo condition, Roviezzo et al. [6] reported that a s.c. injection of Ang2 in a mouse air pouch model promoted transmigration of circulating leukocytes, whereas Ang1 did not induce such effect. Taken together, these data show that under in vitro conditions, both angiopoietins can share common, proinflammatory activities. However, under in vivo conditions, Ang1 and Ang2 may have a different capacity to support a prolonged adhesion of leukocytes onto EC and subsequently, their transmigration.

In summary, we observed that both angiopoietins promote neutrophil chemotaxis through the activation of a PI-3K pathway. In addition, both angiopoietins have the capacity to potentiate CXCL8/IL-8 chemotactic activity on neutrophils.

## ACKNOWLEDGMENTS

A. B. was a recipient of a Ph.D. studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ); M. G. S. is a recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and this work was supported by grants from CIHR (MOP-43919) and Heart and Stroke Foundation of Quebec to M. G. S. D. G. is a scholar from FRSQ, and this work was supported in part by a CIHR grant (MOP-14416). M. P. was a recipient of a Ph.D. studentship from CIHR. We thank Mr. Haissam Abou Saleh and Dr. Yahye Merhi for their technical assistance.

## REFERENCES

1. Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., McDonald, D. M. (1999) Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* **286**, 2511–2514.
2. Kanda, S., Miyata, Y., Mochizuki, Y., Matsuyama, T., Kanetake, H. (2005) Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells. *Cancer Res.* **65**, 6820–6827.
3. Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55–60.
4. Kim, I., Kim, J. H., Moon, S. O., Kwak, H. J., Kim, N. G., Koh, G. Y. (2000) Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* **19**, 4549–4552.
5. 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 e-Fes and e-Fyn. *J. Cell Sci.* **115**, 175–183.
6. 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**, 738–744.
7. Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Theoret, J. F., Merhi, Y., Sirois, M. G. (2005) Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* **105**, 1523–1530.
8. Maliba, R., Lapointe, S., Neagoe, P. E., Brkovic, A., Sirois, M. G. (2006) Angiopoietins-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signaling pathways. *Cell Signal.* **18**, 1947–1957.
9. Fiedler, U., Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N. W., Witzenerath, M., Rosseau, S., Suttrop, N., Sobke, A., Herrmann, M., Preissner, K. T., Vajkoczy, P., Augustin, H. G. (2006) Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- $\alpha$  and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat. Med.* **12**, 235–239.
10. Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G. D., Isner, J. M. (1998) Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ. Res.* **83**, 233–240.
11. Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936.
12. Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., Dvorak, A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029–1039.
13. Jackson, J. R., Seed, M. P., Kircher, C. H., Willoughby, D. A., Winkler, J. D. (1997) The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* **11**, 457–465.
14. McCourt, M., Wang, J. H., Sookhai, S., Redmond, H. P. (1999) Proinflammatory mediators stimulate neutrophil-directed angiogenesis. *Arch. Surg.* **134**, 1325–1331.
15. Shaw, J. P., Chuang, N., Yee, H., Shamamian, P. (2003) Polymorphonuclear neutrophils promote rFGF-2-induced angiogenesis in vivo. *J. Surg. Res.* **109**, 37–42.
16. Feistritzer, C., Mosheimer, B. A., Sturn, D. H., Bijuklic, K., Patsch, J. R., Wiedermann, C. J. (2004) Expression and function of the angiopoietin receptor Tie-2 in human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 1077–1084.
17. Sturn, D. H., Feistritzer, C., Mosheimer, B. A., Djanani, A., Bijuklic, K., Patsch, J. R., Wiedermann, C. J. (2005) Angiopoietin affects neutrophil migration. *Microcirculation* **12**, 393–403.
18. Miyagi, T., Lam, K. M., Chuang, I. F., Chuang, R. Y. (1998) Suppression of chemokine-induced chemotaxis of monkey neutrophils and monocytes by chlorinated hydrocarbon insecticides. *In Vivo* **12**, 441–446.
19. Rathe, C., Pelletier, M., Roberge, C. J., Girard, D. (2002) Activation of human neutrophils by the pollutant sodium sulfite: effect on cytokine production, chemotaxis, and cell surface expression of cell adhesion molecules. *Clin. Immunol.* **105**, 169–175.
20. Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y., Matsuda, Y. (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25846–25856.
21. Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1,4-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241–5248.

22. Heit, B., Tavener, S., Baharjoo, E., Kubek, P. (2002) An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J. Cell Biol.* **159**, 91–102.
23. Knall, C., Young, S., Niek, J. A., Buhl, A. M., Worthen, G. S., Johnson, G. L. (1996) Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271**, 2832–2838.
24. Harfouche, R., Hussam, S. N. (2006) Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiotensin II. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1635–H1645.
25. Harfouche, R., Gratton, J. P., Yancopoulos, G. D., Nosedá, M., Karsan, A., Hussam, S. N. (2003) Angiotensin II activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *FASEB J.* **17**, 1523–1525.
26. Kim, I., Kim, H. G., So, J. N., Kim, J. H., Kwak, H. J., Koh, G. Y. (2000) Angiotensin II regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ. Res.* **86**, 24–29.
27. Knall, C., Worthen, G. S., Johnson, G. L. (1997) 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. USA* **94**, 3052–3057.
28. Klein, J. B., Rane, M. J., Scherzer, J. A., Coxon, P. Y., Ketritz, R., Mathisen, J. M., Burdick, A., McLeish, K. R. (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.* **164**, 4286–4291.
29. Dumont, D. J., Yamaguchi, T. P., Conlon, R. A., Rossant, J., Breitman, M. L. (1992) *tek*, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* **7**, 1471–1480.
30. van der Geer, P., Hunter, T., Lindberg, R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251–337.
31. Gruber, B. L., Marchese, M. J., Kew, R. (1995) Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* **86**, 2488–2493.
32. Falk, W., Goodwin Jr., R. H., Leonard, E. J. (1980) A 48-well microchemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J. Immunol. Methods* **33**, 239–247.
33. Eklund, L., Olsen, B. R. (2006) Tie receptors and their angiotensin II ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp. Cell Res.* **312**, 630–641.
34. Fujikawa, K., de Aas Scherpenseel, I., Jain, S. K., Presman, E., Christensen, R. A., Varticovski, L. (1999) Role of PI 3-kinase in angiotensin II-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **253**, 663–672.
35. Kim, I., Ryu, Y. S., Kwak, H. J., Ahn, S. Y., Oh, J. L., Yancopoulos, G. D., Gale, N. W., Koh, G. Y. (2002) EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiotensin II-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells. *FASEB J.* **16**, 1126–1128.
36. Tournaire, R., Simon, M. P., le Noble, F., Eichmann, A., England, P., Pouyssegur, J. (2004) A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep.* **5**, 262–267.
37. Zhu, W. H., MacIntyre, A., Nicosia, R. F. (2002) Regulation of angiogenesis by vascular endothelial growth factor and angiotensin II in the rat aorta model: distinct temporal patterns of intracellular signaling correlate with induction of angiogenic sprouting. *Am. J. Pathol.* **161**, 823–830.
38. Yoon, M. J., Cho, C. H., Lee, C. S., Jang, I. H., Ryu, S. H., Koh, G. Y. (2003) Localization of Tie2 and phospholipase D in endothelial caveolae is involved in angiotensin II-induced MEK/ERK phosphorylation and migration in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 101–105.
39. DeBusk, L. M., Hallahan, D. E., Lin, P. C. (2004) Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. *Exp. Cell Res.* **298**, 167–177.
40. Chen, J. X., Lawrence, M. L., Cunningham, G., Christman, B. W., Meyrick, B. (2004) HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J. Appl. Physiol.* **96**, 612–620.
41. Tilton, B., Andjelkovic, M., Didichenko, S. A., Hennings, B. A., Thelen, M. (1997) G-Protein-coupled receptors and Fcγ-receptors mediate activation of Akt/protein kinase B in human phagocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 28096–28101.
42. Lowenstein, C. J., Morrell, C. N., Yamakuchi, M. (2005) Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 302–308.
43. Fiedler, U., Scharpfenecker, M., Koidl, S., Hegen, A., Grunow, V., Schmidt, J. M., Kriz, W., Thurston, G., Augustin, H. G. (2004) The Tie-2 ligand angiotensin II is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood* **103**, 4150–4156.
44. Grob, P. M., David, E., Warren, T. C., DeLeon, R. P., Farina, P. R., Homon, C. A. (1990) Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J. Biol. Chem.* **265**, 8311–8316.
45. Tanaka, S., Robinson, E. A., Yoshimura, T., Matsushima, K., Leonard, E. J., Appella, E. (1988) Synthesis and biological characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor. *FEBS Lett.* **236**, 467–470.
46. Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J., Leonard, E. J. (1987) Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9233–9237.