

Université de Montréal

Synthèse et relâche de l'angiotensine 1 chez les patients insuffisants cardiaques et/ou diabétiques de type 2

par Elcha Charles

Département de pharmacologie et physiologie

Faculté de médecine

Université de Montréal

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

Décembre 2020

© Elcha Charles, 2020

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Synthèse et relâche de l'angiotensine 1 chez les patients
insuffisants cardiaques et/ou diabétiques de type 2

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy ROUSSEAU, Ph.D.

Président-rapporteur

Martin G. SIROIS, Ph.D.

Directeur de Recherche

Michel WHITE, M.D.

Codirecteur

Pierre HADDAD, Ph.D.

Membre du jury

Résumé

Les neutrophiles peuvent synthétiser et relâcher l'angiopoïétine 1 (Ang1), un facteur de croissance cytosolique impliqué dans l'angiogenèse, capable d'induire plusieurs activités pro-inflammatoires chez les neutrophiles. Ces derniers induisent la synthèse et la relâche de *neutrophil extracellular traps* (NETs), des filaments d'ADN nucléaires décondensés transportant des protéines telles que l'élastase, la myéloperoxydase (MPO), la protéinase (PR3) et la calprotectine (S100A8/S100A9) qui contribuent à la réponse immunitaire innée afin de combattre les pathogènes (i.e. bactéries). Les NETs ont des effets pro-inflammatoires, pro-thrombotiques, jouant un rôle dans la dysfonction endothéliale, et ont récemment été retrouvés dans l'insuffisance cardiaque (IC) et le diabète de type 2 (T2DM). Le but de cette étude est de déterminer la synthèse et la relâche d'Ang1 chez des patients T2DM et insuffisants cardiaques avec fraction d'éjection préservée (*HFpEF*) (stables ou en décompensation aigue (*ADHFpEF*)) avec ou sans T2DM en comparant à des volontaires sains (VS) comme groupe témoin. Nos résultats démontrent qu'en absence de traitement (PBS) et avec un traitement avec LPS, les niveaux de NETs augmentent chez les patients *ADHFpEF* + T2DM comparé aux VS. Nous observons également que le LPS, le PMA ou A23187 augmentent la synthèse de l'Ang1 (de 150 à 250%) chez des VS et cet effet est amplifié chez les patients T2DM et IC. L'Ang1 est relâchée à $\approx 100\%$ par les neutrophiles de tous les groupes à l'étude et ne se lie pas sur les NETs, comparé à la calprotectine. Notre étude suggère que les patients en insuffisance cardiaque aigue (*ADHFpEF* + T2DM) synthétisent et relâchent plus de NETs et que l'exocytose de l'Ang1 est indépendante de la synthèse et la relâche de NETs.

Mots-clés : neutrophiles, *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), angiopoïétine, Ang1, calprotectine (S100A8/A9), insuffisance cardiaque, diabète de type 2, inflammation

Abstract

Neutrophils can induce the synthesis and release of angiopoietin 1 (Ang1), a cytosolic growth factor involved in angiogenesis capable of inducing several neutrophil-driven pro-inflammatory activities. Neutrophils also synthesize and release neutrophil extracellular traps (NETs) composed of decondensed nuclear DNA filaments carrying proteins such as neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), proteinase 3 (PR3) and calprotectin (S100A8/S100A9) which contribute to the innate immune response to combat pathogens (e.g., bacteria). NETs are also implicated in various pathological conditions through pro-inflammatory, pro-thrombotic properties, leading to endothelial dysfunction, and have recently been found in heart failure (HF) and type 2 diabetes (T2DM). The purpose of this study is to determine the synthesis and release of Ang1 in patients with T2DM and HF with preserved ejection fraction (HFpEF) (stable or acute decompensated (ADHFpEF)) with or without T2DM, compared to healthy volunteers (HV) as control group. Our results show that in absence of agonist (PBS) and after LPS treatment, NETs levels are increased in ADHFpEF + T2DM patients compared to HV. We also observed that LPS, PMA or A23187 treatments increase the synthesis of Ang1 (from 150 to 250%) in HV and this effect is amplified in T2DM and HF patients. Ang1 is completely released (100%) by neutrophils isolated from all cohorts and does not bind to NETs compared to calprotectin. Our study suggests that severely ill patients with decompensated heart failure (ADHFpEF + T2DM) synthesize and release more NETs and that Ang1 exocytosis is independent from NETs synthesis.

Keywords : Neutrophils, Neutrophil extracellular traps, Angiopoietins, Ang1, Calprotectin (S100A8/A9), Heart failure, Type 2 diabetes mellitus, Inflammation

Table des matières

Résumé	1
Abstract	2
Table des matières	3
Liste des tableaux	6
Liste des figures	7
Liste des abréviations	8
Remerciements	12
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	13
1.1 L’insuffisance cardiaque	14
1.1.1 Phénotypes et étiologies de l’IC	14
1.1.1.1 IC avec FEVG réduite (Dysfonction systolique).....	15
1.1.1.2 IC avec FEVG préservée (Dysfonction diastolique)	16
1.1.2 Les symptômes de l’IC	17
1.1.3 Insuffisance cardiaque aiguë décompensée	18
1.1.4 Mécanismes d’adaptation de l’IC	19
1.1.4.1 Mécanisme d’adaptation au niveau cardiaque	19
1.1.4.2 Mécanisme d’adaptation au niveau des modifications neuro-hormonales et périphériques.....	23
1.1.5 Comorbidité importante de l’IC : le diabète de type 2.....	24
1.1.5.1 T2DM et IC.....	25
1.1.6 Traitements de l’IC	26
1.1.7 L’inflammation et l’IC.....	28
1.2 Les neutrophiles	28
1.2.1 La migration des neutrophiles.....	30
1.2.2 Rôle physiologique des neutrophiles dans la réponse immunitaire et l’inflammation	32
1.2.2.1 La phagocytose	32
1.2.2.2 La production de ROS	33
1.2.2.3 La dégranulation	34

1.2.2.4 La production de NETs	37
1.2.2.5 Autres mécanismes	37
1.2.3 Pathologies significatives associées aux neutrophiles	39
1.2.3.1 Les neutrophiles dans l'IC et le T2DM.....	40
1.3 Les <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	41
1.3.1 Structure et composantes des NETs.....	42
1.3.2 Mécanismes de formation des NETs	44
1.3.2.1 NETose lytique	44
1.3.2.2 NETose dépendante ou indépendante de PAD4	47
1.3.2.3 NETose vitale.....	47
1.3.3 Élimination des NETs	50
1.3.4 <i>Extracellular traps</i> non neutrophiliques	50
1.3.5 Pathologies associées aux NETs	51
1.3.5.1 NETs dans l'IC et le T2DM.....	51
1.3.5.2 NETs et autres pathologies	53
1.3.6 Stratégies thérapeutiques contre les NETs.....	54
1.4 La calprotectine.....	55
1.4.1 Structure et localisation.....	56
1.4.2 Synthèse, relâche et mécanisme d'action.....	57
1.4.3 Rôle physiologique de la calprotectine	58
1.4.4 Pathologies associées à la calprotectine.....	59
1.4.4.1 Rôle de la calprotectine dans l'IC et le T2DM	60
1.5 Les angiopoïétines	61
1.5.1 Structure et localisation d'Ang1	61
1.5.2 Angiogenèse physiologique	62
1.5.3 Angiogenèse pathologique.....	64
1.5.4 Synthèse, relâche et récepteurs	65
1.5.5 Rôle physiologique d'Ang1	66
1.5.6 Pathologies associées aux angiopoïétines	67
1.6 Objectifs de recherche	70

CHAPITRE 2: ARTICLE.....	71
2.1 Abstract.....	74
2.2 Introduction.....	76
2.3 Results	79
2.4 Discussion.....	83
2.5 Conclusions.....	89
2.6 Methods.....	90
2.7 References	94
2.8 Declarations	98
2.9 Figure and Table Legends.....	100
2.10 Figures and tables	103
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	110
3.1 Résumé de nos principales observations.....	111
3.2 La relâche de NETs par les neutrophiles humains	111
3.2.1 Rôle du LPS dans l'IC et le T2DM.....	113
3.2.2 Rôle des NETs dans la dysfonction endothéliale et la thrombo-inflammation	113
3.3 La synthèse d'Ang1 et de la calprotectine par les neutrophiles.....	114
3.4 Relâche et liaison de protéines sur les NETs	116
CHAPITRE 4 : CONCLUSION	118
4.1 Perspectives futures	120
BIBLIOGRAPHIE.....	123
ANNEXE.....	153

Liste des tableaux

Tableau I.	Principales différences entre l'IC avec FEVG réduite et préservée.....	17
Tableau II.	Classification fonctionnelle du <i>New York Heart Association</i> (NYHA).....	18
Tableau III.	Protéines sur les NETs.....	44

Article

Table 1.	Baseline patients' characteristics.
----------	-------------------------------------

Liste des figures

Figure 1.	La fonction normale du cœur.....	14
Figure 2.	IC avec FEVG réduite.....	15
Figure 3.	IC avec FEVG préservée.	16
Figure 4.	La loi de Frank-Starling.....	22
Figure 5.	Formation des neutrophiles..	29
Figure 6.	Étape de migration du neutrophile au site inflammatoire.....	32
Figure 7.	Les granules cytoplasmiques des neutrophiles..	37
Figure 8.	Formation et structure des NETs.....	43
Figure 9.	Citrullination des histones par PAD4.	46
Figure 10.	Mécanismes impliqués dans la formation des NETs.....	49
Figure 11.	Structure de la calprotectine (S100A8/A9).	56
Figure 12.	Structure des angiopoïétines..	62
Figure 13.	Angiogenèse par bourgeonnement.....	64
Figure 14.	Activités biologiques d'Ang1 sur les CE..	66

Article

Figure 1.	NETs release by neutrophils.
Figure 2.	Angiopoietin 1 release from neutrophils.
Figure 3.	Calprotectin synthesis and release from neutrophils.
Figure 4.	Angiopoietin 1 is released independently from NETs.
Figure 5.	Calprotectin (S100A8/A9) binds to NETs.
Figure 6.	Ang1 and calprotectin interaction with NETs induced by PMA and A23187.

Annexe

Figure A1.	Relâche des NETs au niveau basal par les neutrophiles d'un volontaire sain (VS) et d'un patient ADHFpEF+T2DM.
------------	---

Liste des abréviations

A23187	Calcium ionophores
ADHF	<i>Acute decompensated heart failure</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGEs	<i>Advanced glycation endproducts</i>
Ang1	Angiopoïétine 1
Ang2	Angiopoïétine 2
BPI	<i>Bactericidal/permeability-increasing protein</i>
CE	Cellule endothéliale
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COVID-19	Coronavirus
CRP	<i>C-reactive protein</i>
DLL4	<i>Delta-like ligand 4</i>
DNase	<i>Deoxyribonuclease</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
fMLP	<i>N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony– stimulating factor</i>
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
CitH3	<i>Citrullinated histone 3</i>
HF	<i>Heart failure</i>
HFpEF	<i>Heart failure with preserved ejection fraction</i>
HFrfEF	<i>Heart failure with reduced ejection fraction</i>
<i>hs-CRP</i>	<i>high sensitive CRP</i>
HTA	hypertension artérielle
HUVECs	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IC	Insuffisance cardiaque

ICAM	<i>Intercellular adhesion molecules</i>
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
IM	Infarctus du myocarde
LAM-1	<i>Leucocyte adhesion molecule-1</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LED	Lupus érythémateux disséminé
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase - métalloprotéinase matricielle</i>
MPO	Myéloperoxydase
MRP	<i>Myeloid-related protein</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NE	<i>Neutrophil elastase</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NKT	<i>Natural killer T</i>
NO	Monoxyde d'azote (<i>nitric oxide</i>)
NOX	NADPH oxydase
PAD4	<i>Protein arginine deiminase 4</i>
PAF	<i>Platelet activating factor – facteur d'activation plaquettaire</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PECAM-1	<i>Platelet endothelial-cell adhesion molecules-1</i>
PDGF- β	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PKC	Protéine kinase C
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PMN	Polymorphonucléaire

PR3	Protéinase 3
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RAGE	<i>Receptor for advanced glycation endproducts</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SGLT2	<i>Inhibitor of sodium–glucose cotransporter 2</i>
T2DM	<i>Type 2 diabetes mellitus</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tie	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor – facteur de nécrose tumorale</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecules</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R	<i>VEGF receptor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSMCs	<i>Vascular smooth muscle cells - cellules musculaires lisses vasculaires</i>
vWF	von Willebrand factor

*À mes chers parents pour leur amour, leur soutien et tous leurs sacrifices durant ces années
d'études*

*À ma famille et amis proches pour leur appui, leur encouragement et leurs prières tout
au long de mon cheminement universitaire*

Remerciements

Ce mémoire a été réalisé au sein du Centre de recherche de l'Institut de cardiologie de Montréal sous la direction du Dr Martin G. Sirois. Je tiens tout d'abord à te remercier Martin pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire, pour ta patience, ta grande disponibilité, tes conseils, tes critiques qui ont guidé mes réflexions et alimenté ma curiosité scientifique, ainsi que toutes les belles histoires que tu m'as raconté au cours de ma maîtrise. Merci pour ton soutien tout au long de ma maîtrise et pour tes encouragements pour mes projets futurs. Je tiens également à remercier toute l'équipe avec laquelle j'ai passé de beaux moments et avec laquelle j'ai fait la découverte de nouveaux restaurants et de recettes culinaires! Cette équipe a su rendre le laboratoire un espace de travail agréable. Je tiens à remercier Pauly pour son aide incroyable dans toutes les étapes de mon parcours soit avec les techniques de laboratoire, ses idées d'expériences, et durant la rédaction de cet ouvrage, mais surtout son aide grandement appréciée au niveau informatique! Je remercie Benjamin, Steven, Ariane, Marie-Élaine et aussi Bergy (Alexandre Bergeron) pour tous nos moments passés ensemble au laboratoire, à la cafétéria, au restaurant et pour tous nos belles discussions autour d'un bon café (ou thé pour moi) devant le congélateur!

Un grand merci à Dr White pour son aide précieuse dans la réalisation de ce mémoire, qui nous a aidé à recruter les patients de cette étude et qui a rendu ce projet possible. Je remercie aussi tous les autres médecins qui nous ont aidés avec le recrutement des patients ainsi que les infirmiers/infirmières pour leur gentillesse et pour avoir effectué les prélèvements sanguins.

Merci à Louis Villeneuve pour son expertise en microscopie confocale sans qui je n'aurais pas pu collaborer pour une image qui a fait la couverture d'un article scientifique! Il a toujours eu la touche magique qui rend les images exceptionnelles!

Merci à tous les volontaires (sains et patients) d'avoir accepté de donner du sang et de ce fait participé à cette étude. Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré de près ou de loin à ce travail.

Je tiens à remercier ma famille et amis proches qui m'ont supporté, encouragé et qui ont été un support moral à travers toutes ces années qui n'ont pas toujours été facile mais qui ont certainement été très enrichissantes.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 L'insuffisance cardiaque

Le cœur est un muscle qui a comme fonction principale de pomper dans la circulation le sang contenant l'oxygène et des éléments nutritifs pour le bon fonctionnement des organes (1). Lorsque le cœur se retrouve dans l'incapacité de pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins métaboliques de tous les organes du corps, suite à une atteinte au muscle ou aux valves cardiaques, nous parlons alors d'insuffisance cardiaque (IC) (en anglais- *heart failure (HF)*) (1), qui peut être soit aiguë ou chronique. Nous parlons d'IC aiguë lorsqu'elle survient de façon rapide à la suite d'un infarctus du myocarde (IM), à une insuffisance mitrale ou aortique aiguë et d'IC chronique lorsqu'elle survient de façon graduelle, se stabilise et dans laquelle le patient peut être asymptomatique ou présenter une dyspnée d'effort stable (2-4). Cette maladie est en croissance de façon mondiale et touche plus de 20 millions de personnes dans le monde, plus de 5 millions aux États-Unis et 600 000 personnes au Canada (4). L'IC peut affecter les deux côtés du cœur, soit le côté droit qui pompe le sang utilisé par le corps pour l'emmener vers les poumons (où il sera oxygéné) (circulation pulmonaire) ou bien plus souvent le côté gauche qui pompe le sang nouvellement oxygéné au reste du corps (circulation systémique).

1.1.1 Phénotypes et étiologies de l'IC

Le type d'IC est déterminé par la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) qui est défini comme le volume de sang éjecté lors de la systole par le ventricule gauche divisé par le volume maximal (télédiastolique) du ventricule multiplié par 100. Un cœur en santé a une FEVG entre 52 et 74% (6) (**Figure 1**). L'IC se manifeste de deux façons principales en utilisant la FEVG soit IC avec fraction

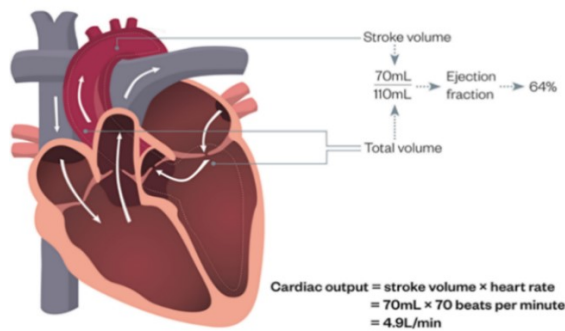


Figure 1. La fonction normale du cœur.

La fraction d'éjection correspond au volume éjecté par le ventricule gauche après chaque battement du cœur (volume systolique) par rapport au volume total durant la diastole (volume télédiastolique). Adaptée de (5).

d'éjection réduite (HF_rEF; FEVG ≤ 40%) ou fraction d'éjection préservée (HF_pEF; FEVG ≥ 50%) (7). Un troisième type d'IC a été ajouté dans les nouvelles lignes directrices de la société canadienne de cardiologie, soit l'IC avec une fraction d'éjection intermédiaire (HF_{mr}EF; 41%

$\leq \text{FEVG} \leq 49\%$) (7). L'IC avec FEVG préservée représente environ 50% des cas d'IC (8) et elle semble affecter davantage les personnes âgées et les femmes, comparé à l'IC avec FEVG réduite (9-11). L'IC avec FEVG préservée est de plus en plus commune et il y a peu d'évidence concernant une thérapie efficace de ce type d'IC (12, 13). Il est important de distinguer les deux types principaux d'IC étant donné que ce sont deux maladies différentes avec des causes et des traitements différents.

Certains facteurs comme l'abus d'alcool ou de drogues ou une infection au VIH peuvent augmenter le risque de développer une IC. Parmi les personnes à risque de développer une IC, on retrouve les personnes âgées de 65 ans et plus (14), les afro-américains, les femmes (50 à 70%), les personnes souffrant d'obésité, d'insuffisance rénale, d'anémie et de diabète de type 2 (15, 16).

1.1.1.1 IC avec FEVG réduite (Dysfonction systolique)

L'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite (*heart failure with reduced ejection fraction - HFrEF*), aussi appelée insuffisance cardiaque systolique, se caractérise par une fraction d'éjection inférieure à 40% (7). Elle se caractérise par une hypertrophie excentrique pathologique des cardiomyocytes et par une dilatation de la paroi ventriculaire, se traduisant en une augmentation du volume des ventricules (augmentation du volume télédiastolique) (1) ainsi qu'une réduction de la contractilité des ventricules (affaiblissement du muscle, donc pas assez de force pour pomper le sang dans la circulation) (1) (**voir Figure 2**). Ce type d'IC peut être causé par un événement cardiovasculaire tel qu'un IM, une myocardite, une cardiomyopathie dilatée ou une condition ischémique (5).

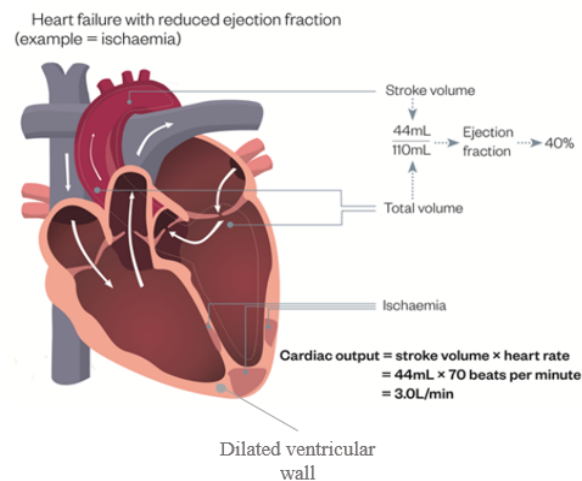


Figure 2. IC avec FEVG réduite. L'IC avec fraction d'éjection réduite est souvent causée par une condition ischémique. Le volume d'éjection est réduit et le volume télédiastolique (volume total), dû à la dilatation de la paroi ventriculaire, est augmenté ce qui induit une FEVG inférieure à 40%. Adaptée de (5).

1.1.1.2 IC avec FEVG préservée (Dysfonction diastolique)

L'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée (*heart failure with preserved ejection fraction - HFpEF*), aussi appelée insuffisance cardiaque diastolique, se caractérise par un problème de remplissage du ventricule gauche. Elle se caractérise par une rigidité du myocarde, un remodelage du VG et fréquemment par une hypertrophie concentrique pathologique des cardiomyocytes. Par ailleurs, seulement 30% des cas de HFpEF ont une hypertrophie du ventricule gauche (1, 17, 18) (**voir Figure 3**). Nous observons alors une réduction du volume dans le ventricule

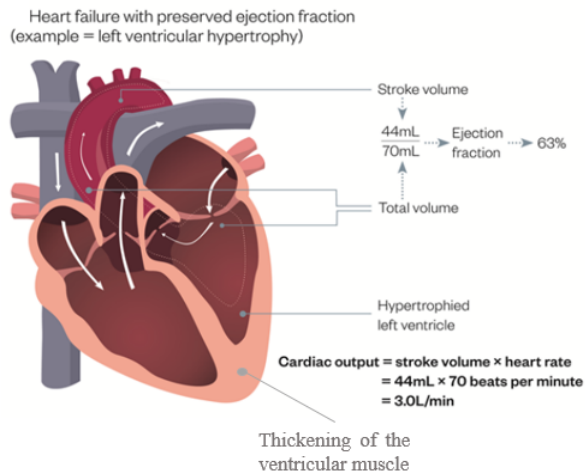


Figure 3. IC avec FEVG préservée. L'IC avec FEVG préservée est causé par une hypertrophie de la paroi du ventricule et un épaississement du muscle ventriculaire ce qui réduit le volume télédiastolique. Cependant, le volume d'éjection est le même, donc la FEVG est préservée. Adaptée de (5).

ce qui mène à une diminution du volume d'éjection ainsi que du volume télédiastolique et la fraction d'éjection est dite préservée (supérieure ou égale à 50%). Le pourcentage de sang éjecté est supérieur à 50%, comme chez une personne saine, mais la quantité de sang pompée est inférieure à la normale. Ce type d'IC peut être causé par des cardiomyopathies hypertrophiques, des hypertrophies ventriculaires secondaires à des situations telles que l'hypertension artérielle (HTA), la sténose de la valve aortique, ainsi que par une infiltration amyloïde du myocarde. Les principales causes et étiologies de HFpEF et HFmrEF sont présentées au **Tableau I**. En 2016, une troisième catégorie d'IC a été créée dans les lignes directrices de l'ESC (*European Society of Cardiology*) et de la société canadienne de cardiologie, permettant de définir la zone grise de la FEVG située entre celle réduite et préservée : l'IC avec FEVG intermédiaire, comprise entre 41 et 49% (appelée «*midrange*») (HFmrEF) (3, 7, 19). Ce groupe représente 13 à 24% des patients insuffisants cardiaques et ont des caractéristiques cliniques similaires à la population HFpEF,

bien que leur incidence de maladies coronariennes soit semblable à celle de la cohorte de patients HFrEF (20).

	HFrEF	HFpEF
	IC systolique	IC diastolique
Type de problème	Problème d'éjection	Problème de remplissage ventriculaire
Fraction d'éjection (%)	≤ 40	≥ 50
Volume d'éjection	Réduit	Réduit
Volume télédiastolique	Augmenté	Réduit
Type d'hypertrophie des cardiomyocytes	Excentrique	Concentrique
Paroi ventriculaire	Dilatation	Épaississement
Étiologies principales / Comorbidités	Infarctus du myocarde (IM) Myocardite Cardiomyopathie dilatée Cardiomyopathie ischémique Tachyarythmie (fibrillation auriculaire) Pathologies valvulaires Hypertension artérielle Diabète Asthme	Dysfonction diastolique Cardiomyopathies hypertrophiques Hypertension artérielle Sténose de la valve aortique Infiltration amyloïde du myocarde Obésité Diabète Syndrome métabolique Maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) Insuffisance rénale Fibrillation auriculaire Syndrome d'apnée/hypopnée du sommeil Dépression Anémie

Tableau I. Principales différences entre l'IC avec FEVG réduite et préservée. Ce tableau résume les principales différences entre l'IC avec FEVG réduite et préservée en fonction de la FEVG, le type de problème et des étiologies/comorbidités principales (5, 15, 16, 21, 22).

1.1.2 Les symptômes de l'IC

L'insuffisance cardiaque est un syndrome caractérisé par des symptômes tels que des difficultés respiratoires, l'œdème, la fatigue et l'intolérance à l'effort (5). Les professionnels de la santé classifient habituellement les patients insuffisants cardiaques selon la sévérité de leurs symptômes et leur limitation à pratiquer l'activité physique. Le système de classification le plus utilisé est le *New York Heart Association (NYHA) Functional Classification*. Les symptômes selon les classes du NYHA sont décrits dans le tableau ci-dessous (**Tableau II**).

Classe	Définition
I	Asymptomatique, aucune limitation lors d'activités physiques ordinaires (marche, escaliers, etc.)
II	Symptômes bénins. Limitations légères lors d'activité physique plus qu'ordinaire. Confortable au repos, mais fatigue, palpitation et dyspnée (sensation de gêne respiratoire) ressentie lors d'activités physiques plus qu'ordinaire.
III	Symptômes modérés. Limitation marquée lors d'activités physiques moins qu'ordinaire. Confortable au repos, mais fatigue, palpitation et dyspnée ressentie lors d'efforts très légers.
IV	Symptômes sévères au repos. Incapable de compléter une activité physique sans inconfort. Gêne et symptômes d'IC au repos ou lors du moindre effort physique.

Tableau II. Classification fonctionnelle du *New York Heart Association* (NYHA).
Adapté et traduit de (5, 23).

Un des outils de mesure permettant d'évaluer l'aptitude physique ainsi que la capacité fonctionnelle des patients ayant une IC chronique est le test de marche de 6 minutes (6MWT – *Six-minute walk test*) (24, 25). Ce test consiste à couvrir la plus grande distance sur une période de six minutes (sans aucun équipement spécialisé requis). Le but est d'évaluer la tolérance à l'exercice chez les individus avec des maladies respiratoires et cardiaques. Ce test permet également d'évaluer l'aptitude aérobie et est corrélé à la consommation maximale d'oxygène (VO₂ max) obtenu à partir du test CPET (*cardiopulmonary exercise testing*) (26). Les études qui ont montré une corrélation positive significative entre le *six-minute walk test* et le VO₂ max incluaient des patients HFpEF, HFrEF et souffrant d'IC chronique (27).

1.1.3 Insuffisance cardiaque aiguë décompensée

Les symptômes de l'IC peuvent se présenter *de novo* de façon aiguë mais, le plus souvent, il s'agit d'une aggravation d'une condition déjà présente qui mène à une insuffisance cardiaque aiguë décompensée (*acute decompensated heart failure - ADHF*). L'aggravation de l'IC chronique est caractérisée par une apparition soudaine ou graduelle des signes ou symptômes de l'IC (par exemple des signes congestifs pulmonaires tel qu'un œdème pulmonaire aigu) nécessitant des visites imprévues en clinique, des visites à l'urgence ou une hospitalisation (14). L'ADHF est une condition hétérogène et affecte surtout les personnes de 65 ans et plus, chez

lesquelles les comorbidités sont fréquentes (28). Les patients avec une ADHF ont une prévalence élevée de fibrillation auriculaire, valvulopathie et cardiomyopathie dilatée (29), en plus d'antécédents de diabète chez 40% de ces patients. Les patients admis avec une ADHF ayant une FEVG préservée (supérieure à 50%) ont tendance à être plus âgés, de sexe féminin, et plus susceptibles de présenter une hypertension sévère (30). La prise en charge de l'ADHF est différente de celle de l'IC plus chronique, car le traitement consiste en une stabilisation hémodynamique, un soulagement des symptômes et la prévention de la morbidité et de la mortalité à court terme (31). De plus, la prise en charge des patients ADHF est souvent invasive et implique parfois des procédures thérapeutiques relativement agressives, telles qu'une assistance circulatoire. Ultiment, cette condition pourrait nécessiter une transplantation cardiaque (28).

1.1.4 Mécanismes d'adaptation de l'IC

Le cœur développe des mécanismes d'adaptation intrinsèques et extrinsèques pour faire face à l'altération du fonctionnement cardiaque. Ces mécanismes sont appréciés au niveau cardiaque et systémique (neuro-hormonal) et sont bénéfiques à court terme. Toutefois, ils peuvent devenir excessifs et délétères à long terme et contribuer à la progression de l'IC.

1.1.4.1 Mécanisme d'adaptation au niveau cardiaque

Au niveau cardiaque, les mécanismes d'adaptation reposent sur des processus de remodelage cardiaque et suivent les lois de Frank-Starling et de Laplace. Dans le développement de l'IC, ces processus de remodelage sont complexes et conduisent à des changements morphologiques comprenant un remodelage des cardiomyocytes et de la matrice extracellulaire. La taille, la forme et la fonction du cœur sont affectées par ces changements intrinsèques de la structure cardiaque au niveau cellulaire, moléculaire et interstitiel.

Un élément clé du remodelage ventriculaire est l'hypertrophie des cardiomyocytes observée en réponse à un étirement et/ou une surcharge neuro-hormonale. Cette hypertrophie est due à une réorganisation et une synthèse de nouveaux sarcomères en série ou en parallèle conduisant respectivement à un allongement (HF_rEF) ou un épaississement (HF_pEF) des myocytes (32). En fait, chez les patients HF_rEF, nous retrouvons une hypertrophie excentrique des cardiomyocytes (allongement) contribuant à la dilatation du ventricule et à un

affaiblissement de la contractilité du muscle cardiaque. D'autre part, les cardiomyocytes chez les patients HFpEF sont plus épais donnant lieu à un remodelage concentrique qui mène à un épaississement de la paroi du ventricule et une augmentation de sa rigidité. De plus, la rigidité augmentée du myocarde est entre autres reliée à une anomalie au niveau de la titine, une protéine des cardiomyocytes qui contribue normalement à créer un effet ressort bidirectionnel lors de la contraction-relaxation du cœur (33). À long terme, les protéines structurales des cardiomyocytes (dont la titine) sont réduites, menant à la perte des sarcomères et de la fonction cardiaque (34). Toutefois, une structure ventriculaire gauche d'apparence complètement normale (pas d'hypertrophie ventriculaire gauche) à l'échographie peut être observée chez la plupart des patients HFpEF (21, 33).

Le remodelage de la matrice extracellulaire et le développement de fibrose myocardique liés à l'accumulation de collagène de type I et III, les principales protéines de structure de la matrice, sont des événements majeurs du remodelage ventriculaire observés dans l'IC avec FEVG réduite (35) et préservée (35-38). Les principaux régulateurs de ces événements sont les membres du système rénine – angiotensine – aldostérone (SRAA). En effet, l'augmentation d'angiotensine II (Ang-II) active la synthèse du TGF- β 1 dans les fibroblastes et les myocytes via les récepteurs AT1 (*angiotensin II type I*). Au niveau des fibroblastes, TGF- β 1 induit la production de collagène menant à la fibrose et au niveau des myocytes, cette cytokine contribue à l'hypertrophie cardiaque (39). Le remodelage est régulé par la balance entre les métalloprotéinases (MMPs) qui dégradent la matrice et les inhibiteurs des métalloprotéinases des tissus endogènes (*Tissue inhibitor of metalloproteinase* –TIMPs). Une activation de la MMP est observée en phase précoce de remodelage, puis à plus long terme, il y a une augmentation des TIMPs menant à l'augmentation du collagène interstitiel et périvasculaire (40). La dérégulation entre l'activité des MMPs et des TIMPs résulte en un affaiblissement de la structure de soutien du myocarde causant le glissement des cardiomyocytes (*myocytes slippage*), participant ainsi au remodelage ventriculaire. Ce phénomène est surtout observé chez les patients souffrant d'IC causée par une cardiomyopathie ischémique ou dilatée, soit les patients HF-rEF (41-43).

Suite à la perte des cardiomyocytes, à la formation de fibrose et aux anomalies de la contractilité qui en résulte, il résulte des anomalies significatives dans la loi de Frank-Starling

et la loi de Laplace. Ces anomalies peuvent à leur tour contribuer au remodelage et ainsi à la progression de l'IC. La loi de Frank-Starling (**Figure 4**) met en relation le débit cardiaque et la tension dans la paroi du ventricule gauche en fin de diastole (volume ou pression télédiastolique). Le débit cardiaque, qui est la quantité de sang pompée par le cœur en 1 minute (L/min), est le produit de la fréquence cardiaque (le nombre de battement par minute (batt/min)) et le volume d'éjection systolique (le volume de sang pompé par chaque ventricule à chaque battement du cœur (L/batt)). Selon la loi de Frank-Starling, la quantité de sang entrant dans les ventricules (volume télédiastolique, pré-charge) équivaut à la quantité qui est éjecté par les ventricules (volume systolique, post-charge). En d'autres termes, plus la fibre musculaire ventriculaire est étirée suite à une surcharge du volume télédiastolique, plus sa contractilité augmente et donc plus la performance cardiaque augmente (44). Le mécanisme de Frank-Starling joue un rôle dans la compensation de l'IC systolique (HFrEF) en tamponnant la chute du débit cardiaque pour aider à préserver une pression artérielle suffisante pour perfuser les organes vitaux. L'IC causée par une altération de la fonction contractile du ventricule gauche entraîne un déplacement vers le bas de la courbe de la performance ventriculaire gauche. Pour une pré-charge donnée, le volume d'éjection systolique est réduit par rapport à la normale et cette réduction entraîne une vidange incomplète du ventricule gauche. Par conséquent, le volume de sang qui s'accumule dans le ventricule pendant la diastole est supérieur à la normale. Le volume résiduel amplifié augmente l'étirement des fibres du myocarde et induit un volume d'éjection systolique plus important lors de la prochaine contraction, selon la loi de Frank-Starling (45). Dans le cas d'une IC sévère avec une plus grande dysfonction de la contractilité, la courbe de la performance ventriculaire peut être presque plate pour des volumes télédiastoliques plus élevés, ce qui réduit davantage l'augmentation du débit cardiaque avec des augmentations du volume résiduel. Ces augmentations peuvent entraîner une congestion pulmonaire (46).

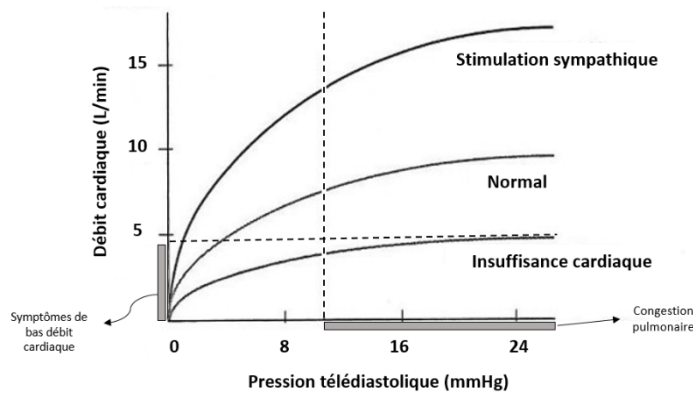


Figure 4. La loi de Frank-Starling est représentée par une courbe de la performance ventriculaire. Lorsque les dimensions du ventricule gauche (VG) augmentent, le débit cardiaque augmente jusqu'à atteindre un plateau. Dans l'IC, les dimensions du VG augmentent, mais le débit cardiaque est faible. Il y a un affaissement de la courbe en raison de la diminution de la réserve contractile du cœur. En dessous d'un certain seuil de débit cardiaque, cela peut entraîner des symptômes associés à un faible débit cardiaque tels que la fatigue et la dyspnée. Au-dessus d'un certain volume télédiastolique, cela peut entraîner de la congestion pulmonaire. Adaptée de (47). <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Pour ce qui est de la loi de Laplace, celle-ci définit la tension pariétale (ou stress de la paroi ventriculaire) (H : *wall stress*) en relation avec la pression du VG (P), le rayon du VG (r) et l'épaisseur de la paroi (T : *wall thickness*) à l'aide de l'équation suivante :

$$H = \frac{P \times r}{2T}$$

Lorsqu'il y a une augmentation de la post-charge, soit la résistance que les ventricules doivent surpasser pour pomper le sang vers les organes du corps (48), ces paramètres vont augmenter, ce qui va entraîner une hypertrophie du ventricule afin de maintenir une tension pariétale normale. Il a été démontré que l'augmentation de la tension pariétale induit des changements dans les protéines, la synthèse des éléments contractiles et l'expression des gènes qui soutiennent le processus de remodelage défavorable dans lequel les ventricules se dilatent progressivement, conduisant finalement à une IC (49-51) et est un prédicteur indépendant du remodelage ultérieur du ventricule gauche (52, 53). La dilatation ventriculaire gauche en réponse à une surcharge volumique du ventricule et l'hypertrophie ventriculaire en réponse à une surcharge aigue sont initialement des mécanismes compensateurs, mais peuvent progressivement devenir délétères et mener à l'IC. La dilatation du ventricule gauche est

classiquement associée à une dysfonction systolique (HFrEF) tandis que l'hypertrophie du VG est associée à une dysfonction diastolique (HFpEF) (54).

1.1.4.2 Mécanisme d'adaptation au niveau des modifications neuro-hormonales et périphériques

La stimulation neuro-hormonale est un autre mécanisme compensateur, facilitant le maintien de la fonction cardio-vasculaire après une insulte myocardique. Toutefois cette stimulation devient délétère lorsque la condition devient chronique (55). L'augmentation de plusieurs neuro-hormones est nécessaire pour soutenir la contractilité, la pression et la volémie en présence d'IC. Toutefois, l'activation soutenue et inappropriée de ces mécanismes contribuent à la progression de l'IC par plusieurs mécanismes (55). En fait, les mécanismes adaptatifs neuro-hormonaux mettent en jeu les systèmes vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Les systèmes vasoconstricteurs incluant le système nerveux sympathique (SNS), le SRAA, la vasopressine et l'endothéline (ET-1), visent à maintenir un débit systémique normal. L'activation du SNS a des effets inotrope et chronotrope positifs entraînant ainsi une augmentation de la contraction musculaire cardiaque et accélération de la fréquence cardiaque (56, 57). Il permet également la vasoconstriction en périphérie permettant ainsi une redistribution vasculaire aux organes tels que le cerveau et le cœur (56, 57). Cependant, la vasoconstriction en périphérie entraîne également une augmentation de la post-charge et du travail cardiaque et peut par conséquent aggraver l'IC (58, 59). Pour ce qui est de la stimulation du SRAA, celle-ci entraîne essentiellement une rétention hydrosodée qui contribue à l'augmentation de la précharge et du volume sanguin total mais peut être également responsable de l'apparition de signes congestifs de l'IC (60). En effet, l'activité du SRAA est accrue chez les patients souffrant d'IC en particulier chez ceux avec FEVG réduite (61), et ses mécanismes inadaptés peuvent entraîner des effets indésirables tels que le remodelage cardiaque ventriculaire tel que mentionné précédemment et l'activation sympathique (62). La vasopressine (*arginine vasopressin* - AVP) ou également appelée hormone antidiurétique (*antidiuretic hormone* – ADH), est un vasoconstricteur puissant pouvant favoriser la rétention hydrique et l'hyponatrémie (63, 64). L'endothéline est un peptide sécrété par l'endothélium ayant également un effet vasoconstricteur puissant sur les cellules musculaires lisses et jouant un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire et de la pression artérielle chez les sujets en bonne santé (65). Toutefois, la sécrétion de ces deux

molécules est stimulée et des concentrations élevées sont retrouvées dans le plasma des patients insuffisants cardiaques (66-71). La vasoconstriction périphérique contribue donc à augmenter la post-charge et le travail du ventricule gauche et, à long terme, devient délétère et aggrave l'IC (65).

Les systèmes vasodilatateurs incluant le NO, les prostacyclines (PGI₂), et les peptides natriurétiques, jouent également un rôle dans l'IC et sont activés pour contrer l'activation significative des systèmes vasoconstricteurs. Par exemple, les peptides natriurétiques tels que le peptide natriurétique auriculaire, ANP (*atrial natriuric peptide*) et le peptide natriurétique B, BNP (*brain natriuric peptide*) sont normalement produits sous l'effet de l'étirement mécanique de la paroi de l'oreillette droite du cœur (par les myocytes). Ces peptides favorisent l'augmentation de l'élimination urinaire de sodium et ont un effet vasodilatateur en inhibant l'activation du SRAA et la stimulation du SNS (72). Les peptides natriurétiques circulants dont l'ANP et le BNP sont considérablement augmentés en raison d'une synthèse accrue et de la relâche de ces hormones suite à une augmentation des pressions ventriculaires gauche et auriculaires (72). Le peptide BNP et le N-terminal pro-BNP (NT-proBNP) sont bien établis comme biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et la prise en charge de l'IC (73).

1.1.5 Comorbidité importante de l'IC : le diabète de type 2

L'incidence du diabète augmente année après année de façon globale. Sur le plan mondial, la Fédération internationale du diabète prévoit que le nombre de diabétiques pourrait passer de 463 millions en 2019 à 700 millions en 2045 (74). Au Canada, on estime à près de trois millions de Canadiens adultes souffrant de diabète (75), dont environ un tiers (37,3%) qui ne sont pas encore diagnostiqués (76). Plus de 880 000 Québécois vivent avec le diabète, soit plus de 10% de la population (77). Nous distinguons deux types de diabète soit le diabète de type 1 (T1D) et le diabète de type 2 (T2DM – *type 2 diabetes mellitus*), tous deux caractérisés par une hyperglycémie chronique. Le T2DM est la forme la plus fréquente de diabète (90-95% des cas) (78). Ce qui est encore plus inquiétant, c'est que cette maladie devient plus courante chez les jeunes adolescents voire même chez les enfants à l'échelle mondiale, et ce, en grande partie en raison de l'augmentation de l'obésité (79). À cet égard, le surpoids et la croissance rapide pendant la petite enfance ont des conséquences importantes à long terme et sont associés à l'obésité adulte et ses comorbidités, dont l'HTA, les maladies coronariennes et T2DM (80).

Contrairement au T1D qui est principalement causé par la destruction des cellules bêta du pancréas (81), le T2DM est caractérisé par une combinaison d'un déficit relatif de la production d'insuline par les cellules β -pancréatiques et une résistance périphérique à l'insuline (82).

Les causes du T2DM sont nombreuses et complexes et aucun facteur de risque ne peut à lui seul expliquer sa progression. Le vieillissement (40 ans et plus), l'obésité, l'inactivité physique, l'HTA, certaines origines ethniques et des antécédents familiaux de diabète (ou de diabète gestationnel dans le cas des femmes) sont tous des facteurs de risque importants (83-85).

1.1.5.1 T2DM et IC

Une hyperglycémie prolongée peut entraîner des complications graves à long terme. La concentration excessive et prolongée de glucose dans le sang peut induire des lésions aux niveaux des artères et des microvaisseaux du cœur. Le T2DM est fréquemment accompagné par des facteurs de risque cardiovasculaires (CV) tels que l'HTA, la dyslipidémie, le tabagisme et l'obésité. L'ensemble de ces facteurs sont fortement associés à la survenue de l'athérosclérose, la cardiopathie ischémique et la dysfonction ventriculaire gauche menant à une IC. Le T2DM est également un facteur de risque et de comorbidité associé au développement de l'IC (16, 86). Les diabétiques sont deux fois plus à risque de développer une IC (avec FEVG réduite et préservée) (83) et une étude récente a mentionné que 44% des patients hospitalisés pour une IC avaient le T2DM (87). Les diabétiques sont à risque de développer une IC en raison d'une altération dans le métabolisme des lipides par le corps, du niveau élevé de glucose et d'insuline dans le sang (16, 86) qui cause des dommages au niveau des vaisseaux sanguins. L'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et l'excès d'acides gras augmentent le stress oxydatif, perturbent la signalisation de la protéine kinase C (PKC) et augmentent les produits de glycation avancé (*advanced glycation end products - AGEs*) qui entraînent l'inflammation vasculaire, la vasoconstriction, la thrombose et le développement de l'athérosclérose (78). Ces conditions peuvent également entraîner une ischémie myocardique et un IM (15). L'obstruction des vaisseaux sanguins mène à une diminution de la circulation sanguine, puis entraîne une diminution de la fonction du myocarde et potentiellement la mort des cellules myocardiques. De plus, l'ischémie associée à ces conditions mène à une perte contractile au niveau du muscle cardiaque, un remodelage au niveau des ventricules et ultimement à une IC (16).

Particulièrement, chez les patients HFpEF, nous retrouvons une prévalence élevée de T2DM, d'obésité, de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et d'HTA (15, 16). Ces comorbidités de l'IC induisent un état pro-inflammatoire systémique, avec des niveaux plasmatiques élevés d'interleukine 6 (IL)-6, d'IL-1 β , de TNF- α et de CRP (*C-reactive protein*) (88-92). Cet état inflammatoire entraîne un stress oxydatif et une dysfonction endothéliale. L'inflammation endothéliale microvasculaire coronarienne (*coronary microvascular endothelial inflammation*) engendre ainsi une diminution de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO – *nitric oxide*), du contenu en guanine monophosphate cyclique (GMP cyclique ou GMPc) et de l'activité de la protéine kinase G (PKG) dans les cardiomyocytes adjacents. Une faible activité de la PKG favorise le développement de l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ces cardiomyocytes hypertrophiés et la présence de fibrose interstitielle contribuent à la rigidité de la paroi ventriculaire et au développement de l'IC (93). Ces cytokines produites principalement par les macrophages et les neutrophiles infiltrés (les neutrophiles seront discutés plus en détails dans la **Section 1.2 Les neutrophiles**), en plus du stress oxydatif, jouent rôle majeur dans la résistance à l'insuline associée à l'obésité et dans la progression du T2DM. L'obésité, la résistance à l'insuline et le T2DM entraînent une inflammation de bas grade (94, 95) étant donné que celle-ci évolue silencieusement et qu'il n'y a pas de foyer inflammatoire précis, ce qui complique le traitement du T2DM.

1.1.6 Traitements de l'IC

Il a été démontré qu'une mauvaise alimentation, y compris un apport calorique excessif et des choix alimentaires malsains, une activité physique insuffisante et un stress mental, sont des facteurs de mode de vie modifiables importants qui contribuent vraisemblablement au développement ainsi qu'à l'évolution défavorable de l'IC (96). Aussi, la prise en charge de l'IC débute d'abord par un traitement non pharmacologique, visant l'amélioration de l'alimentation (diète à base de plante, antioxydants, repas moins copieux et moins salés, moins de viandes rouges) (97-99), des habitudes de vie (e.g. perte de poids, exercice physique) (100-103) et de la gestion du stress (activités sociales, spirituelle, yoga) (104). Une amélioration du mode de vie a démontré une amélioration des facteurs de risques associés à l'IC tels que l'HTA, le T2DM, la dyslipidémie et la dyspnée réduisant le remodelage cardiaque et le risque d'athérosclérose, ce qui retarde la progression de l'IC (105).

Le traitement pharmacologique de l'IC a pour objectif d'éliminer les œdèmes, diminuer le travail du cœur, réduire le remodelage néfaste et/ou contrôler la cause ou les comorbidités associées à l'IC avec des antidiabétiques ou des antihypertenseurs. Les classes de médicaments permettant la prise en charge à long terme de la maladie et l'amélioration de la survie des patients sont les suivants : les modulateurs du SRAA, les β -bloqueurs, les antagonistes du récepteur minéralocorticoïde, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II ou les inhibiteurs du récepteur de l'angiotensine et de la néprilysine (106). Toutes ces classes de médicaments ont été étudiées dans l'IC avec FEVG réduite et ont montré un effet bénéfique à long terme (107). Les inhibiteurs de l'IECA, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II et les β -bloqueurs sont généralement utilisés pour traiter l'IC avec FEVG préservée (12, 13). Cependant, l'utilisation de ces diverses classes de médicaments n'a pas démontré d'effets bénéfiques significatifs sur les taux d'hospitalisation et la survie des patients (12, 13). Les inhibiteurs du récepteur de l'angiotensine et de la néprilysine ont fait l'objet d'études récentes et n'ont montré aucun effet bénéfique concluant pour les patients HFpEF. En effet, des études ont montré que le sacubitril-valsartan, un inhibiteur du récepteur de l'angiotensine et de la néprilysine n'a pas permis de réduire le taux d'hospitalisation et de mortalité chez les patients avec une IC avec FEVG préservée (12, 13). La prise en charge de l'IC avec FEVG préservée se concentre donc sur la diminution des symptômes et de l'effet des comorbidités sous-jacentes comme le T2DM, l'HTA et la cardiopathie ischémique (108). Il est donc important d'étudier cette pathologie plus en détails afin de trouver un traitement potentiel pour ces patients.

L'optimisation du contrôle de la glycémie chez les patients insuffisants cardiaques avec présence de T2DM a montré une réduction des complications microvasculaires, mais pas macrovasculaires (5). La metformine est couramment utilisée comme agent anti-hyperglycémique et est la thérapie de première ligne chez les T2DM, employée en monothérapie ou en combinaison avec d'autres agents antidiabétiques et/ou l'insuline. La metformine est également associée à un meilleur pronostic à court et à long terme que les autres traitements antidiabétiques chez les patients atteints d'IC (109). Par ailleurs, de récentes études ont montré le rôle potentiel des inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose 2 (*inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2* - iSGLT2) dans la prise en charge de l'IC. Récemment, l'empagliflozin a été le premier iSGLT2 à permettre une réduction de la mortalité cardiovasculaire et une

réduction de l'hospitalisation pour l'IC accompagnée de T2DM (110). Des études randomisées ont également été effectuées récemment avec des patients HFrEF pour l'utilisation de l'inhibiteur du SGLT2 afin de voir les effets sur la réduction de l'hospitalisation et de la mortalité cardiovasculaire. L'étude *EMPEROR-Reduced trial* a démontré l'effet bénéfique de l'empagliflozin chez des patients HFrEF en observant une réduction significative de la mort cardiovasculaire et d'hospitalisation pour l'IC dans ce groupe de patients comparé au groupe placebo (111). Également, l'étude *DAPA-HF trial* a montré une réduction de la mort cardiovasculaire et de l'aggravation de l'IC chez les patients HFrEF qui prenait un autre inhibiteur de SGLT2, le dagaglifozin, comparé au groupe placebo (112). Dans les deux études, le résultat bénéfique observé chez les patients insuffisants cardiaques était indépendant du diabète.

1.1.7 L'inflammation et l'IC

Chez les patients HFrEF et HFpEF, nous retrouvons une présence d'inflammation chronique médiée par la surexpression de cytokines inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1, l'IL-6 ainsi que la hsCRP (*high sensitive C-reactive protein*) qui sont des éléments clés dans la progression de l'atteinte cardiaque (88-92). Cette inflammation est médiée entre autres par la présence de neutrophiles au niveau de l'endothélium (113, 114), responsable de la dysfonction endothéliale qui se caractérise par un déséquilibre dans la production des facteurs vasodilatateurs (NO, PGI₂) et vasoconstricteurs (ET-1, Ang-II et prostaglandines (PGH₂)). Lorsque cet équilibre est perturbé, il prédispose la vascularisation aux effets pro-thrombotiques et pro-athérogènes. Il en résulte une vasoconstriction, une adhésion des leucocytes, une activation plaquettaire, une mitogénèse, une pro-oxydation, une coagulation altérée, une inflammation vasculaire, une athérosclérose et une thrombose (115), tout cela menant à une IC.

1.2 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont des granulocytes polymorphonucléaires (PMN) représentant la première ligne de défense de l'organisme. Dans les années 1900, ces cellules ont été découvertes par Paul Ehrlich, un scientifique allemand reconnu pour ses travaux en hématologie, immunologie et pharmacologie, ce qui lui a valu le prix Nobel en 1908 (116). Les PMN ont un diamètre de ≈ 10 μm , représentent 70% des leucocytes (globules blancs) et entre 95 et 99% des granulocytes; les

autres granulocytes étant les éosinophiles et les basophiles, représentant respectivement moins de 5% et 1% (117-119). Comme nous pouvons observer à la **Figure 5**, les neutrophiles sont formés dans la moelle osseuse durant l'hématopoïèse à partir de cellules souches hématopoïétiques (totipotente) qui se divisent en progéniteurs communs myéloïdes (pluripotente). En réponse au GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*), ces progéniteurs se différencient en deuxième progéniteurs communs granulocytaires/monocytaires. Puis, en réponse au GM-CSF et au G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), ces seconds progéniteurs se différencient en cellules précurseurs immatures, soit en myéloblastes, promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes. Puis finalement, ces dernières se différencient dans le sang en cellules matures, les neutrophiles (120). La production de neutrophiles est initiée en réponse à diverses cytokines, principalement le G-CSF (121, 122), qui est un facteur de croissance permettant non seulement la production et la maturation des neutrophiles, mais qui joue un rôle important dans la relâche des neutrophiles dans le sang périphérique (121). Le G-CSF est induit par l'interleukine-23 (IL-23), qui à son tour induit l'IL-17 produite par les lymphocytes T, les cellules NK (*natural killer*) et les cellules NKT (*natural killer T*) qui finalement induit la production de G-CSF et GM-CSF par les cellules stromales conduisant ainsi à la granulopoïèse (la formation de granules) et l'inflammation (123).

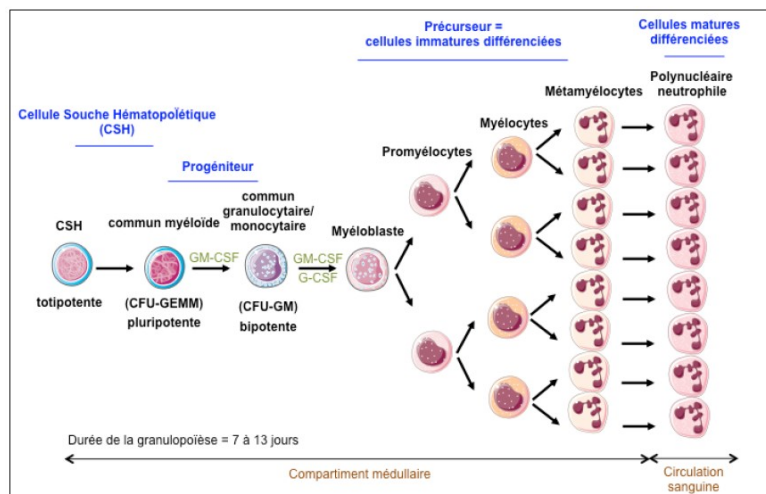


Figure 5. Formation des neutrophiles. Image tirée de la thèse intitulée Étiopathologie du TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury): anticorps anti-HLA et NADPH oxydase phagocytaire (120).

Chez les individus en santé, le nombre de neutrophiles est relativement stable dans le sang (3 à 5×10^6 cellules/mL) et cette concentration peut augmenter jusqu'à 10 fois lors d'une infection bactérienne (124). Les neutrophiles ont une demi-vie relativement courte dans la circulation sanguine (8-12h) et peuvent survivre 1 à 2 jours dans les tissus, avec un renouvellement (*turn-over*) retardé ou accéléré durant l'inflammation (121, 125). Les neutrophiles sont éliminés des tissus par apoptose et ensuite par phagocytose par les macrophages, ce qui permet d'arrêter la réponse inflammatoire (126, 127). Les neutrophiles ont comme rôle principal d'être recrutés aux sites d'infection, de reconnaître les microbes et les pathogènes et de les tuer en utilisant la phagocytose ainsi que des mécanismes cytotoxiques, comme la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS - *Reactive oxygen species*), la dégranulation, la relâche de peptides antimicrobiens et l'expulsion de *Neutrophil extracellular traps* (NETs) (125). Ces différentes activités leur procurent un rôle important dans la réponse immunitaire et l'inflammatoire.

1.2.1 La migration des neutrophiles

En conditions normales, les neutrophiles circulants sont quiescents. En réponse aux stimuli inflammatoires, les neutrophiles sont recrutés aux sites d'infection via un processus appelé diapédèse, mécanisme par lequel les neutrophiles adhèrent aux cellules endothéliales (CE) et migrent pour se rendre au tissu infecté, où ils deviennent activés. La cascade de recrutement des neutrophiles se fait en plusieurs étapes : leur capture et roulement sur l'endothélium suivi par leur adhésion ferme et finalement, leur transmigration dans les tissus (128).

La première étape (**Figure 6**) consiste en la capture et le roulement des neutrophiles sur les CE à l'aide de récepteurs de surface, telles les sélectines (L-, P- et E-sélectine) et les β 2-intégrines. Parmi les sélectines, nous retrouvons la L-sélectine (LAM-1 ou CD62L), exprimée de façon constitutive à la surface des leucocytes, qui interagit avec les CE stimulées par divers agonistes pro-inflammatoires tels que : le TNF α (*Tumor necrosis factor*), l'IL-1 β et l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS), une composante de la paroi des bactéries gram négative. La P-sélectine (GMP-140 ou CD62P) (aussi exprimée sur les plaquettes) et la E-sélectine (ELAM-1 ou CD62E) sont exprimées de façon transitoire à la surface des CE. Lors de l'inflammation, le tissu endommagé et les cellules sanguines activées produisent des médiateurs inflammatoires dont la thrombine, l'histamine et diverses cytokines inflammatoires (IL-1, TNF α), qui

augmentent l'expression des E- et P-sélectines sur les CE (129, 130). Sur les neutrophiles, la P-sélectine se lie à son ligand, le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) et la E-sélectine se lie sur la *E-selectin ligand-1* (ESL-1) et les deux sélectines peuvent également se lier à des glucides sialiques présents à la surface des leucocytes (Sialyl-Lewis^x). Ces interactions de faible affinité ralentissent le mouvement des neutrophiles ce qui permet leur roulement sur l'endothélium (125).

Les récepteurs β 2-intégrines se retrouvent à la surface des neutrophiles et jouent un rôle essentiel lors de la diapédèse. Elles interagissent avec des molécules d'adhésion intracellulaires et vasculaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines : ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et VCAM-1, exprimées à la surface des CE (122). ICAM-1 est davantage exprimé lorsque les CE sont stimulées par le LPS, le TNF α et/ou IL-1 β (131). Cette interaction permet l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium vasculaire. Une fois adhérents, les neutrophiles rampent, puis migrent à travers la barrière endothéliale à l'aide de PECAM-1 (*platelet endothelial-cell adhesion molecules-1*), exprimé à la fois sur les neutrophiles et les CE et qui permet aux neutrophiles de traverser l'endothélium. La migration se fait de deux façons : soit intercellulaire (entre les CE) (**Figure 6a**) ou transcellulaire (à travers les CE) (**Figure 6b**). La diapédèse des neutrophiles débute aux niveaux des jonctions tricellulaires des CE, aux endroits où l'expression d'ICAM-1 est plus élevée (132).

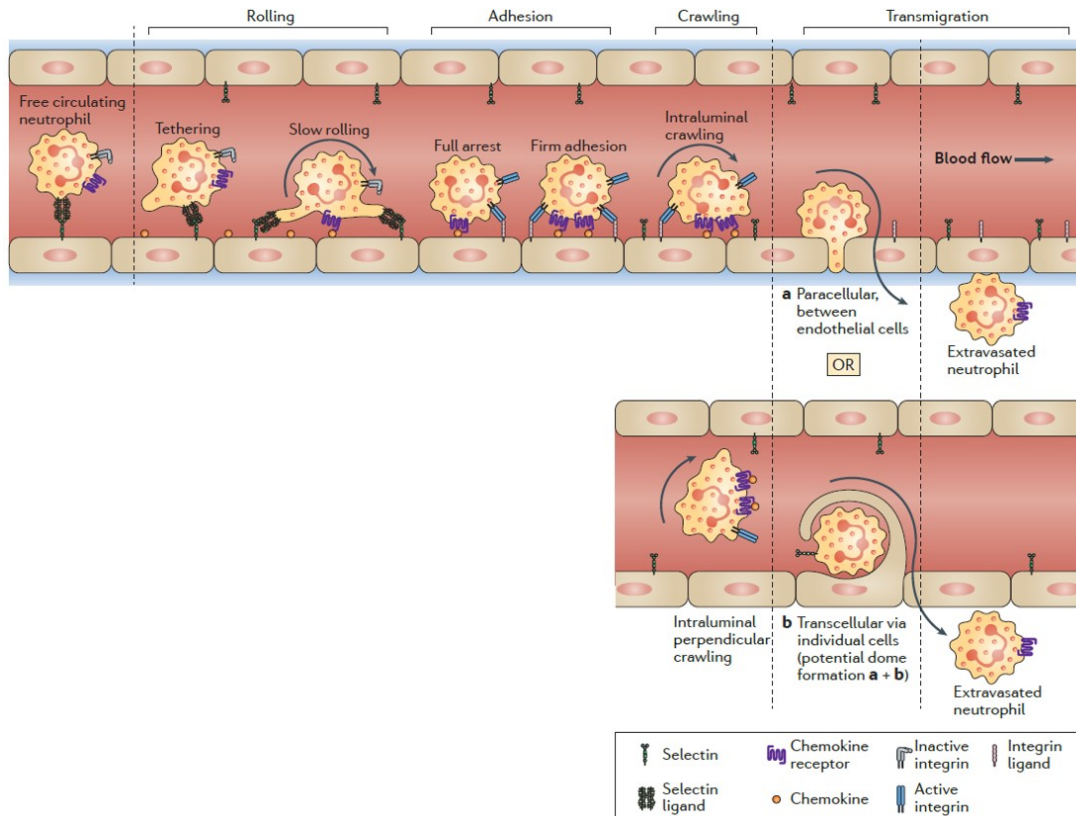


Figure 6. Étape de migration du neutrophile au site inflammatoire. Deux méthodes de transmigration sont possibles : a) intercellulaire (entre les CE); et b) transcellulaire (à travers les CE). L'étape de roulement dépend principalement des sélectines tandis que l'adhésion, le rampage et la transmigration dépendent des interactions des intégrines. Les chimiokines qui tapissent la partie luminale de l'endothélium activent les neutrophiles roulants, induisant ainsi des changements conformationnels des intégrines de surfaces des neutrophiles et permettant les événements subséquents. Les neutrophiles rampants suivent le gradient de chimiokines le long de l'endothélium qui les guide vers les sites préférentiels de transmigration. Traduit de (128).

1.2.2 Rôle physiologique des neutrophiles dans la réponse immunitaire et l'inflammation

1.2.2.1 La phagocytose

L'inflammation est vitale pour la défense contre les pathogènes. En réponse à une infection, une cascade de signaux mène au recrutement de cellules inflammatoires, particulièrement les cellules du système immunitaire, soit les neutrophiles et les monocytes (qui se différencient en macrophage en condition extravasculaire) (133). Les neutrophiles sont attirés au site inflammatoire par des chimiokines (ex : IL-8) (134), et éliminent par un processus appelé phagocytose les pathogènes et les particules étrangères afin de limiter l'invasion du tissu sain.

Les neutrophiles reconnaissent d'abord des opsonines ou peptides microbiens à la surface des microorganismes qui favorisent leur phagocytose (opsonisation) en se basant sur le processus de chimiotaxie. Les éléments reconnus (antigène, bactérie, particules insolubles, débris cellulaires, cellules hôtes lésées ou mortes) adhèrent aux récepteurs spécifiques à ces éléments situés à la membrane du neutrophile (135). La formation de pseudopodes créera des phagosomes qui vont fusionner au lysosome (phagolysosome). Les éléments sont alors enrobés, emprisonnés et digérés par les enzymes lysosomaux, puis les éléments digérés sont relâchés par la cellule (136). Ces éléments digérés (antigènes peptidiques) peuvent également être transportés du côté extérieur de la membrane des neutrophiles et être présentés aux cellules lymphocytaires (cellules T et B) à travers le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (137). Lorsque le neutrophile est au repos (non activé), celui-ci exprime seulement le CMH de classe I, alors que s'il est activé par l'IFN- γ , le GM-CSF, le TNF- α , et autres, le CMH de classe II est transloqué et le neutrophile devient une "cellule présentatrice d'antigène" capable d'activer les lymphocytes T (138) et jouant un rôle dans l'immunité adaptative aussi. Les neutrophiles tuent les pathogènes phagocytés en utilisant les mécanismes dépendants de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH oxydase ou NOX) (production de ROS) ou en relâchant des granules contenant des protéines antimicrobiennes (cathepsines, défensines, lactoferrine et lysozyme) dans le phagosome ou dans le milieu extracellulaire (122, 139). Les neutrophiles hautement activés peuvent également éliminer les microorganismes extracellulaires par la relâche de NETs (**Section 1.3 Les *Neutrophil extracellular traps***) (128).

1.2.2.2 La production de ROS

L'oxygène est d'une part un élément essentiel pour la vie et d'autre part peut avoir des effets délétères. En effet, cette molécule peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui participent à des réactions d'oxydation physiologiquement indispensables mais qui, dans certaines conditions, peuvent être néfastes pour les tissus. Ils contribuent entre autres à leur sénescence et au développement de maladies telles que certains cancers, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires incluant le diabète et l'athérosclérose (140).

Les ROS (peroxydes, radicaux libres et ions oxygénés) sont des molécules chimiquement oxygénées. Les ROS peuvent être d'origine exogène ou endogène et produits par des rayonnements ionisants ou par le métabolisme cellulaire (141). En période de stress, leur

concentration peut augmenter significativement et endommager les structures cellulaires, un mécanisme appelé le stress oxydant (ou stress oxydatif).

Une enzyme clé dans la formation de ROS est la NADPH oxydase ou NOX, constituée de six sous-unités séparées et éparpillées dans le cytosol et à la membrane en condition physiologique, lorsque la cellule est quiescente, afin de prévenir la production de ROS et conséquemment les dommages cellulaires (142, 143). Ainsi, suite à l'activation des neutrophiles, les sous-unités sont assemblées pour former un complexe multiprotéique afin d'être activées, permettant de catalyser la réduction de l' O_2 pour former des anions superoxydes ($O_2^{\circ-}$) et générer des agents oxydants dont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) et l'acide hypochloreux ($HClO^{\cdot}$) à partir d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et de la myéloperoxidase (MPO) (144). Les ROS produits sont ensuite largués dans l'espace extracellulaire ou dans les phagosomes contenant les bactéries ou autres particules phagocytés permettant de tuer et dégrader les micro-organismes (145).

1.2.2.3 La dégranulation

Les granules cytoplasmiques jouent un rôle physiologique central dans les neutrophiles. La formation des granules (granulopoïèse) est initiée durant la différenciation des cellules myéloïdes. Toutes les granules ont en commun une bicouche membranaire de phospholipides et une matrice intragranulaire contenant des protéines destinées à l'exocytose ou à être envoyées dans le phagosome (146). Les neutrophiles possèdent trois types de granules : les granules azurophiles (ou primaires), les granules spécifiques (ou secondaires) et les granules gélatinases (ou tertiaires) (147). Cependant, elles diffèrent dans leur contenu et leur mobilisation suite à l'activation des neutrophiles (148).

Les **granules azurophiles (granules primaires)** sont exocytés en réponse à une stimulation (149-151) et contribuent à tuer et dégrader les microorganismes engloutis dans le phagolysosome (151). Elles sont impliquées dans la phagocytose et contiennent principalement des enzymes lytiques, dont la MPO, une enzyme antibactérienne et microbicide. Suite à l'activation des neutrophiles, la MPO relâchée dans le phagosome ou dans l'espace extracellulaire réagit avec H_2O_2 , formé par la NADPH oxydase et augmente le potentiel toxique de cet oxydant. De plus, la forme induite (iNOS) est présente dans ce type de granules. À travers l'oxydation de chlorure, tyrosine et nitrite, le système H_2O_2 -MPO induit la formation de l'acide

hypochlorure (HOCl). Cette production de ROS permet de détruire la membrane des microorganismes et ainsi de les tuer. (146, 152, 153). Dans les granules primaires, nous retrouvons aussi des peptides antimicrobiens, comme les défensines, de petits (~3.5 kDa) peptides cytotoxiques et antimicrobiens (154) qui agissent contre les bactéries, les champignons, les virus et les protozoaires (146, 155, 156). Nous retrouvons également la protéine BPI (~50 kDa) (*bactericidal/permeability-increasing protein*), qui est bactériostatique et bactéricide (157). De plus, nous retrouvons les protéases sérines telles que l'élastase (*neutrophil elastase - NE*), la cathepsine G et la protéinase 3 (PR3), qui ont une activité microbicide et qui possèdent des propriétés antimicrobiennes (146). Ces polypeptides cationiques de 25-29 kDa possèdent des activités protéolytiques contre les composantes de la matrice extracellulaire, telles que l'élastine, la fibronectine, la laminine, le collagène de type IV et la vitronectine (158-160).

Les granules spécifiques (secondaires) et gélatinases (tertiaires) contiennent plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion et l'extravasation des neutrophiles et sont enclines à fusionner avec la membrane plasmique. Cependant, la concentration de certaines protéines et leur mode de sécrétion diffère. **Les granules spécifiques** contiennent le lysozyme, la collagénase et/ou la MMP (e.g. MMP-8), la lactoferrine et la gélatinase (161-163). **Les granules gélatinases** ressemblent aux granules spécifiques mais présentent une plus faible quantité de lactoferrine et une concentration plus élevée de gélatinase (146) et certaines collagénases (MMP-9 (164)). Pour ce qui est de la leukolysin (MT6-MMP/MMP-25), celle-ci est distribuée dans les granules spécifiques (10%), les granules gélatinases (40%), les vésicules sécrétoires (30%) et la membrane plasmique (20%) (165, 166). Les granules de gélatinase sont plus facilement exocytés que les granules spécifiques (167) et jouent le rôle de réservoir d'enzymes dégradant la matrice (ex, les MMPs) et de récepteurs nécessaires à l'extravasation et la diapédèse des neutrophiles, tandis que les granules spécifiques participent principalement aux activités antimicrobiennes du neutrophile en mobilisant leur arsenal de substances antimicrobiennes vers le phagosome ou bien vers l'extérieur de la cellule (168).

Les vésicules sécrétoires ou endocytaires constituent un réservoir de récepteurs associés à la membrane nécessaires aux premières phases de la réponse inflammatoires médiée par les neutrophiles. Divers stimuli inflammatoires tels le *phorbol myristate acetate* PMA, l'ionomycine et le *N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine* fMLP, peuvent mobiliser les vésicules sécrétoires (149, 169). À la surface de ces vésicules, nous retrouvons la β 2-intégrine

CD11b/CD18 (Mac-1, CR3) (169), le complément récepteur 1 (CR1) (170), les récepteurs de fMLP (171), le récepteur du LPS, TLR-4 (172), le récepteur du Fc γ III, CD16 (172) et une métalloprotéase (la leukolysin) (166). Toutes ces protéines sont incorporées dans la membrane plasmique suite à l'exocytose, facilitant le contact ferme du neutrophile avec l'endothélium vasculaire activé (grâce à la β 2-intégrine comme décrit précédemment), jouant ainsi un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire en infiltrant les tissus inflammés.

Les vésicules sécrétoires sont les plus propices à être libérées en premier lieu, suivies par les granules gélatinases, les granules spécifiques puis les granules azurophiles (167, 169). Différents stimuli induisent l'exocytose de différents granules. En effet, une stimulation *in vitro* avec le fMLP par exemple induit une décharge rapide et presque complète des vésicules sécrétoires sans relâche significative de granules (169) tandis qu'une stimulation avec des agonistes plus puissants tels que le PMA, induit la relâche exhaustive des granules gélatinases (81%), une relâche modérée des granules spécifiques (68%) et une très faible exocytose des granules azurophiles (moins de 5%) (150, 164, 173). La protéine rab27, exprimée dans le neutrophile humain, est une petite GTPase qui joue un rôle central dans les processus de sécrétion dans différents types de cellules (174, 175) et est impliquée dans l'exocytose des granules secondaires (spécifiques) et tertiaires (gélatinases) (148).

Il y a une hiérarchie bien spécifique dans la libération ou l'exocytose des granules. Ainsi, l'appel des neutrophiles est régulé afin d'éviter les dommages aux tissus avoisinants s'ils sont mobilisés de façon incontrôlée et afin de maintenir la fonction cellulaire dans la surveillance de l'hôte (148). Cette mobilisation est influencée par la concentration intracellulaire de calcium (Ca^{2+}) (149). Lorsque les neutrophiles sont en contact avec une bactérie, ils activent leurs systèmes antimicrobiens en relâchant les granules azurophiles et spécifiques au phagosome ou à l'extérieur de la cellule. Lors de la dégranulation, les constituants de ces granules vont permettre d'attaquer les bactéries en détruisant la membrane bactérienne (ex, défensines (176), BPI (177), lactoferrine (178), lysozyme (179)), en inhibant les voies métaboliques bactériennes (ex, lactoferrine (180)) ou en participant à la production de ROS (146). La **Figure 7** résume les principales composantes des différents types de granules des neutrophiles.

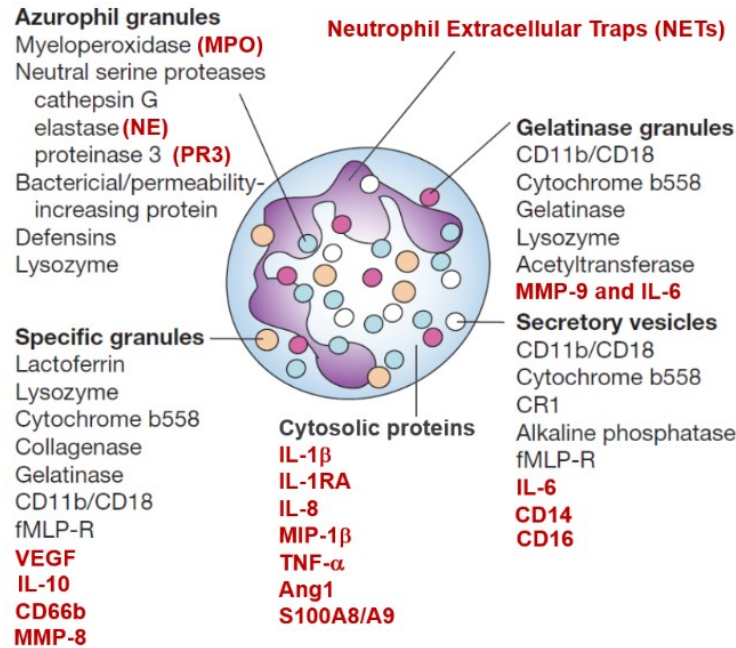


Figure 7. Les granules cytoplasmiques des neutrophiles. Les principales protéines contenues les différents types de granules, soit les granules azurophiles (ou primaires), les granules spécifiques (ou secondaires) et les granules gélatinases (ou tertiaires), dans les vésicules sécrétoires et dans le cytoplasme des neutrophiles. Adaptée à partir de (181).

1.2.2.4 La production de NETs

Un autre mécanisme utilisé par les neutrophiles pour contrer les pathogènes est la relâche de NETs. Ceux-ci sont composés d'éléments provenant de l'ADN et sur lesquels s'attachent des protéines et enzymes provenant des granules et du cytoplasme du neutrophile (182). Les NETs immobilisent les pathogènes, limitant ainsi leur propagation et facilitant leur phagocytose. Ils peuvent également directement tuer les pathogènes à l'aide de protéines antimicrobiennes et de protéases (183, 184). Les NETs seront décrits plus en détail dans la section 1.3.

1.2.2.5 Autres mécanismes

Outre les mécanismes présentés précédemment, les neutrophiles ont également la capacité de relâcher des microvésicules, soit des vésicules extracellulaires de 100-1000 nm de diamètre. Ces vésicules jouent un rôle important dans la communication intercellulaire en effectuant des interactions cellule-cellule et en transférant leur contenu trans-membranaire ou intracellulaire. Elles sont impliquées dans l'homéostasie, la réponse immunitaire, l'inflammation et

l'angiogenèse entre autres. Elles jouent également un rôle dans certaines pathologies telles que l'athérosclérose, la thrombose et le cancer (185-187).

Les neutrophiles jouent un rôle dans la régulation d'autres cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques, les cellules T et B, les cellules tueuses naturelles (*Natural killer (NK) cells*), les monocytes et macrophages ainsi que les CE et épithéliales, via la production de cytokines ou leur interaction directe (125). Les neutrophiles activés sont en mesure de produire et relâcher une panoplie de cytokines ou protéines inflammatoires (188) et selon le type de stimulation, leur production de cytokines peut varier afin d'agir sur différents types cellulaires. À titre d'exemple, les principales cytokines produites par les neutrophiles sont la famille d'IL-1, de *macrophage inflammatory protein-1* (MIP-1), le TNF- α , l'IL-8 et l'IL-6. La famille de l'IL-1 comprend 11 membres, mais ceux importants dans les neutrophiles sont l'IL-1 α , IL-1 β et IL-1RA (*IL-1 receptor antagonist*) (189, 190). L'IL-1 α et IL-1 β sont des cytokines pro-inflammatoires tandis que l'IL-1RA, comme son nom l'indique, est leur antagoniste naturel et se lie au même récepteur agissant ainsi comme un antagoniste compétitif (191). Les IL-1 relâchées par les neutrophiles jouent entre autres un rôle dans l'expression des molécules d'adhésion des CEs afin de favoriser la diapédèse des neutrophiles et d'autres types cellulaires (192). Pour ce qui est de la famille des MIP-1, incluant MIP-1 α et MIP-1 β , ces cytokines sont de très puissantes chimiokines et jouent principalement un rôle dans la migration de leucocytes, mais peuvent aussi induire la production d'autres cytokines (193, 194).

Bien que relâché par d'autres types cellulaires, le TNF- α est également relâché par les neutrophiles et, en se liant à leurs récepteurs, les *tumor necrosis factor receptor-1* et -2 (TNFR1 et TNFR2) retrouvés sur la plupart des types cellulaires, joue un rôle dans la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire, via la signalisation des MAPK. D'un autre côté, le TNF- α peut également activer le *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) et induire la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire, l'inflammation et la production de facteurs anti-apoptotiques (195, 196). Une autre molécule chimiotactique est l'IL-8 et celle-ci favorise la chimiotaxie des leucocytes, l'influx de calcium, la prolifération et la migration cellulaire, la phagocytose et régule l'angiogenèse via les récepteurs CXCR1 et CXCR2 (197) retrouvés particulièrement sur les neutrophiles. De plus, elle engendre la dégranulation, la production de ROS, l'expression d'intégrines et la production et la relâche d'autres cytokines (198). L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire relâchée en

phase aigüe de l'inflammation et joue un rôle dans l'hématopoïèse et les réactions immunitaires, suite à une infection ou dommage aux tissus. De plus, l'IL-1, le TNF- α et l'IL-6 jouent un rôle majeur dans l'induction de l'expression de diverses protéines inflammatoires dont la CRP par les cellules du foie (199) et la concentration de toutes ces cytokines dans le sang est associée à plusieurs pathologies dont l'IC et le T2DM (88).

Les neutrophiles relâchent également d'autres protéines jouant un rôle dans l'inflammation telles que la calprotectine et les angiopoïétines. La calprotectine est une protéine pro-inflammatoire et antimicrobienne tandis que les angiopoïétines sont des facteurs de croissance jouant un rôle dans l'angiogenèse. Ces deux types de protéines sont impliquées indépendamment dans l'IC et le T2DM. Ces protéines seront discutées plus en détail dans des sections ultérieures de cet ouvrage.

1.2.3 Pathologies significatives associées aux neutrophiles

Malgré son rôle protecteur face à diverses infections microbiennes, les neutrophiles peuvent contribuer à diverses pathologies. Les désordres associés aux neutrophiles sont nombreux et peuvent être responsable de l'inflammation aigüe et chronique.

D'abord, les désordres peuvent être associés au nombre de neutrophiles présents dans le sang. La neutropénie est caractérisée par une baisse anormale du nombre de neutrophiles (inférieur à 500 cellules/ μ L de sang ou $1.5 \times 10^9/L$) pour au moins trois mois (200). La neutropénie congénitale sévère peut être causée par des mutations dominantes de la neutrophile élastase (NE; 60% des cas), une protéine microbicide, ou par des mutations récessives dans la HAX-1 (*hematopoietic cell specific Lyn substrate 1 (HCLS1) -associated protein X-1*) (201) ou la G6PC3 (*glucose 6-phosphatase 3*) (30% des cas) (202, 203). D'autres causes peuvent induire la neutropénie telles la leucémie (204) ou certains médicaments (ex : agents anti-cancéreux). Les personnes avec une neutropénie sont bien évidemment plus susceptibles aux infections récurrentes (bactériennes ou fongiques) et le traitement de la neutropénie dépend de la cause et de la sévérité du désordre (202). Dans certains cas, des médicaments pour induire la production de neutrophiles par l'organisme peuvent être administrés, soit des facteurs stimulants de colonies de granulocytes humains (G-CSF; ex : neupogen (filgrastim)) (205, 206). La neutrophilie, quant à elle, est une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang. Une hausse des neutrophiles est normale lors d'une infection bactérienne (207), cependant une

hausse chronique des neutrophiles peut être associée à des conditions inflammatoires chroniques ou aiguës telles que la polyarthrite rhumatoïde, la vascularite, un IM, et autres, ou bien des maladies myéloprolifératives telles que la leucémie myéloïde chronique (208).

Un désordre peut être observé au niveau de la régulation du contenu des granules. Par exemple, une activité non contrôlée de l'élastase (NE) menant à son augmentation pourrait jouer un rôle important dans l'emphysème pulmonaire, spécialement chez les patients ayant un déficit en $\alpha 1$ -antitrypsine, un inhibiteur des protéases sérines (209).

Différentes infections peuvent survenir suite à un défaut du recrutement des neutrophiles (défaut au niveau des $\beta 2$ -intégrines, des sélectines) (210) ou de leur activation (défaut au niveau des récepteurs de reconnaissance de pathogènes (TLR – *Toll like receptor*)) (211). À titre d'exemple, une mutation des TLR3, principaux récepteurs de virus, augmente la susceptibilité à une encéphalite causée par le virus Herpès simplex (211).

La NADPH oxydase est cruciale dans la défense contre les pathogènes. Une déficience au niveau des sous-unités de cette enzyme est associée à la maladie granulomateuse sceptique chronique (CGD - *chronic granulomatous disease*). En fait, c'est en 1978 que l'équipe de Segal a montré qu'un défaut de la production de ROS par la NADPH oxydase était à l'origine de cette maladie (212). Les patients avec une CGD développent une inflammation intestinale chronique causée par une augmentation de la croissance bactérienne et une incapacité de maintenir la fonction de la barrière intestinale (213). Une production excessive de ROS peut causer un stress oxydatif et endommager l'endothélium (214). Ce stress oxydatif peut conduire à la mort des cellules par apoptose (stress modéré) ou par nécrose (stress intense) (215). Par exemple, un excès de ONOO- est détecté dans les organes durant un choc septique (216-218), dans l'infarctus du myocarde (216) et dans l'IC chronique (219).

1.2.3.1 Les neutrophiles dans l'IC et le T2DM

Les neutrophiles jouent aussi un rôle dans les pathologies inflammatoires chroniques telles les maladies auto-immunes (le lupus érythémateux disséminé (LED) ou lupus érythémateux systémique) (220, 221), les cancers (222, 223) mais aussi l'athérosclérose (224), le T2DM et l'IC (88). Des techniques d'immunohistochimie sensibles permettent d'observer les neutrophiles dans les lésions athérosclérotiques chez l'humain (224) et dans des modèles de souris (225-227). Les ROS générées par la MPO des neutrophiles favorisent l'apoptose des CE,

l'expression des facteurs tissulaires, la nitration des lipoprotéines de faible densité (LDL – *Low-density lipoprotein*) et la peroxydation des lipides, qui tous ensemble, contribuent au développement des lésions athérosclérotiques. Les protéines des granules, telles que la α -défensine, l'azurocidine et LL-37 (cathelicidin), sont également retrouvées au niveau des lésions ce qui suggère que les neutrophiles activés contribuent au développement de l'athérosclérose (228, 229). D'autres protéines telles que la PR3 et les MMPs favorisent la dégradation de la matrice qui ont pour conséquence d'affaiblir la coiffe fibreuse au niveau des lésions athérosclérotiques (230) et favorise ainsi la rupture de la plaque. Cette rupture peut entraîner la formation de caillots (thrombus), qui bloquent la circulation et provoquent une ischémie. Cela peut mener au développement de l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral (AVC) et l'IC. De plus, l'hyperglycémie associée au T2DM stimule la myélopoïèse ce qui augmente les niveaux circulants de monocytes et de neutrophiles et leur entrée dans la plaque athérosclérotique (231, 232). Ceci indique donc que les neutrophiles sont impliqués dans la progression de la plaque qui peut mener au développement de l'IC. De surplús, des évidences ont montré des niveaux élevés de neutrophiles circulants associé à la sévérité de l'IC (233). Le T2DM est également associé à une inflammation de bas grade vasculaire et a des effets toxiques et néfastes sur l'endothélium dû au stress oxydatif (production de ROS) et aux produits AGEs (234). De plus, la production anormale de cytokines pro-inflammatoires dont IL-1 β , IL-6, TNF- α et la CRP (88, 233), ainsi que l'activation des voies de signalisation de l'inflammation (NF- κ B) sont associés au syndrome métabolique (défini comme tous les facteurs prédisposants aux maladies cardiovasculaires (ex : HTA, dyslipidémie, hyperglycémie, résistance à l'insuline) (235)), au développement du T2DM et à l'IC (88).

1.3 Les *Neutrophil Extracellular Traps*

Les *Neutrophil extracellular traps* (NETs) sont des filaments d'ADN (acide désoxyribonucléique) décondensés et relâchés par les neutrophiles par un processus appelé la NETose. Ces filets d'ADN extracellulaire sont formés suite à divers stimuli inflammatoires et transportent des composantes cytoplasmiques, granulaires et nucléaires des neutrophiles (236) telles que : la calprotectine (S100A8/A9), la NE, le MPO, la PR3 et les histones, qui contribuent à la réponse immunitaire innée afin de combattre les pathogènes dont les bactéries (182) et les champignons (237, 238). De plus, les NETs ont des propriétés pro-inflammatoires et

thrombogéniques au niveau de la microcirculation vasculaire (239). Pendant plusieurs décennies, deux types de mort cellulaire étaient connus, l'apoptose et la nécrose. Les NETs ont été étudiés pour la première fois en 1996 par Takei et al., lorsque ce groupe a découvert une nouvelle forme de mort cellulaire par NETose (240). Lorsque ce groupe a stimulé les neutrophiles avec du *Phorbol myristate acetate* - PMA, il a remarqué que les neutrophiles meurent en décondensant leur chromatine, qui, suivant le bris de la membrane nucléaire et cellulaire est relâchée à l'extérieur de la cellule avec diverses protéines s'y attachant (NETs) (240). Ces NETs piègent les bactéries, préviennent leur diffusion et, grâce aux protéines antimicrobiennes associées, les NETs peuvent tuer les pathogènes ou diminuer leur croissance ou leur virulence (182, 237, 238, 241). Cependant, la formation de NETs dérégulée peut avoir des conséquences nuisibles ayant une contribution dans plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes (242-244).

1.3.1 Structure et composantes des NETs

Dans le noyau des cellules eucaryotes (entre 1 et 10 μm), l'ADN double brin est retrouvé sous forme de nucléosomes, composés de 147 paires de nucléotides chargées négativement enroulés 1.7 fois autour d'un octamère d'histones composé d'une paire de chacune des quatre principales histones du noyau H2A, H2B, H3 et H4 (245), chargées positivement par la présence d'acides aminés arginine et lysine. Les nucléosomes sont liés par une cinquième histone (H1) (histone de liaison) et forment des chromatosomes (246, 247). Chaque chromatosome de 160 paires de bases est séparé par un linker DNA d'environ 45 paires de base. L'interaction des histones contribue à la compaction des nucléosomes pour former une fibre de 30 nm et le compactage de l'ADN avec les protéines forme la chromatine (248). La décondensation de la chromatine suite à l'activation des neutrophiles mène la relâche de celle-ci sous forme de NETs via un processus appelé NETose. Ces filaments de NETs n'ont pas de membrane et sont extrêmement fragiles (182). La **Figure 8** permet de visualiser la formation et les composantes des NETs.

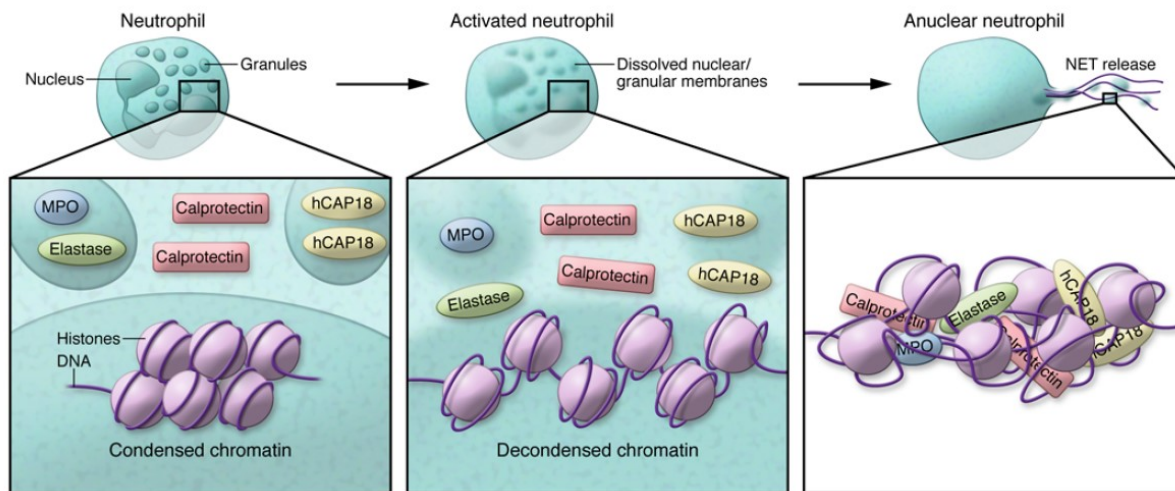


Figure 8. Formation et structure des NETs. Dans le neutrophile activé, la liaison entre l'ADN et les histones dans le nucléosome est affaiblie. La membrane du noyau et des granules est dissoute et les protéines se lient à la chromatine décondensée et est relâchée sous forme de NETs (249).

La charge électrostatique négative de l'ADN qui compose les NETs est propice à la liaison de protéines le long des filaments de NETs (249). En 2009, 24 protéines incluant les histones ont été identifiées sur les NETs en stimulant les neutrophiles avec du PMA (237). Les histones (H2A, H2B, H3 et H4) sont les protéines les plus abondantes et représentent 70% des protéines totales composant les NETs. La NE compte pour 5.24% et la catalase pour 0.02%, cette dernière représentant la protéine la moins abondante sur les NETs. Nous retrouvons d'autres protéines pro-inflammatoires cytosoliques et granulaires telles que la S100A8, la S100A9, la calprotectine (S100A8/A9), la MPO, la lactotransferrine, l'azurocidine, le cathepsin G, la PR3, l'actine, et le lysozyme C (241, 250). Le **tableau III** résume les principales protéines présentes sur les NETs et leur localisation dans le neutrophile. Les protéines sur les NETs permettent essentiellement d'identifier les NETs et de les distinguer de l'ADN libre circulant. Dépendamment du stimulus, la composition des protéines sur les NETs peut varier (251). Par exemple, différentes souches de *P. aeruginosa* induisent la formation de NETs contenant 33 protéines communes et jusqu'à 50 protéines variables (252). La composition des NETs pourrait avoir un impact, qui reste à déterminer, sur leurs fonctions.

Cytoplasmique		Nucléaire	Granulaire
	S100A8	Histone H2A	NE
	S100A9	Histone H2B	Lactotransferrine
	S100A12	Histone 3	Azurocidine
	S100A8/A9	Histone 4	Cathepsin G
Cytosquelette	Actin β et/ou γ	Myeloid cell nuclear differentiation antigen (MMDA)	MPO
	Myosin-9		PR3
	Alpha-actinin (1 et/ou 4)		Lysozyme C
	Plastin-2		Defensine 1 and 3
	Cytkeratin-10		hCAP18
Peroxisomes	Catalase		
Enzymes glycolytiques	Alpha-enolase		
	Transketolase		

Tableau III. Protéines sur les NETs. Liste des principales protéines co-localisées sur les NETs selon leur localisation intracellulaire dans le neutrophile. NE; Neutrophil elastase, MPO; Myéloperoxydase, PR3; Protéinase 3, hCAP18; *human cationic antimicrobial protein* (182, 237).

1.3.2 Mécanismes de formation des NETs

À ce jour, deux types de NETose (lytique et vitale) sont décrits. La NETose lytique ou suicidaire est une mort cellulaire lente (heures) différente de l'apoptose et de la nécrose, tandis que la NETose vitale est rapide (minutes). Dans les deux types de NETose, il peut y avoir deux mécanismes possibles, soit la NETose NOX-dépendante ou NOX-indépendante.

1.3.2.1 NETose lytique

En 2004, les NETs étaient considérés comme une structure extracellulaire antibactérienne et des médiateurs inflammatoires tels que LPS et IL-8 pouvaient induire la relâche de NETs (182). Les études initiales de Brinkmann (182) ont démontré que les NETs étaient relâchés après quelques minutes de stimulation sans la mort des neutrophiles. Cependant, en 2007, dans le même laboratoire, leurs études ont montré que seulement les neutrophiles morts relâchaient des NETs entre 3 et 4 heures après stimulation (253). D'autres laboratoires ont également observé que la majorité des neutrophiles meurent en relâchant des NETs entre 2 et 4 heures post-stimulation (254-257). Initialement, cette forme de formation de NETs appelée NETose ou formation de

NETs lytique ou suicidaire observée par (253) était considérée comme étant **dépendante de la NADPH-oxydase (NOX)**. La plupart des travaux étudiant les mécanismes de ce type de NETose ont été réalisées avec des neutrophiles isolés traités avec du PMA ou du LPS *in vitro*. Cependant, des études ont montré des différences dans la formation de NETs NOX-dépendante utilisant deux mécanismes différents (182, 258). Comme nous pouvons observer à la **Figure 10**, lorsque les neutrophiles sont activés par le PMA, celui-ci active la libération rapide de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique augmentant l'activité de la PKC, qui par la suite phosphoryle NOX. L'activation de NOX mène à la production de ROS, qui libère le contenu nucléaire et granulaire relâchant la NE et le MPO, des protéines qui dégradent les liaisons entre les histones, favorisant ainsi la décondensation de la chromatine (259) puis sa relâche par les pores formés par la Gasdermin D (260). Cet ADN extracellulaire décoré de protéines nucléaires, cytosoliques et granulaires, dont les histones, la calprotectine, la NE et la MPO, est relâché dans le milieu extracellulaire et peut ainsi exercer ses fonctions antimicrobiennes.

Il n'y a pas de consensus sur le fait que l'augmentation de Ca^{2+} soit suffisante pour activer la PAD4, permettant la citrullination des histones (261-263). Toutefois, d'autres stimuli tels que des microbes, des facteurs inflammatoires (IL-8, IFN- γ , TNF- α) et des stimuli endogènes stériles (NO, MSU (*monosodium urate crystals* ou acide urique), plaquettes, complément)), en se liant à des récepteurs de surface sur les neutrophiles, augmentent la relâche du Ca^{2+} . Cette dernière active la NOX et la production de ROS ce qui permet ensuite d'activer la PAD4 présente dans le cytosol. Celle-ci est transloquée dans le noyau du neutrophile où elle catalyse l'hypercitrullination des histones 3 et 4. La PAD4 convertit une H3-Arginine (H3-Arg⁺) chargée positivement en H3-citrulline (*citrullinated histone 3* - CitH3) neutre (**Figure 9**). Sous cette configuration, la CitH3 perd son affinité de liaison à l'ADN qui contribue à la décondensation de la chromatine (264).

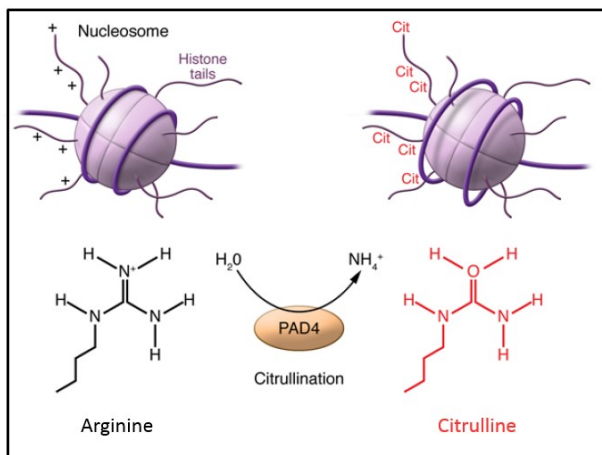


Figure 9. Citrullination des histones par PAD4. L'enzyme PAD4 permet la conversion de l'histone H3 arginine chargée positivement en H3 citrulline (*citrullinated histone 3 - CitH3*) neutre. Adaptée de (249).

Le LPS, un composant de la paroi des bactéries gram négatif, est un autre agoniste qui induit la formation des NETs. Il est souvent utilisé comme modèle expérimental afin d'imiter les conditions *in vivo* d'une infection par des bactéries gram négatif (265). La formation de NETs induite par le LPS est également dépendante de NOX, mais utilise un mécanisme différent de celui du PMA. Les premières étapes avant l'activation de NOX sont différentes de celles du PMA. En effet, le LPS active une voie de signalisation médié par les c-Jun N-terminal kinases (JNK) et se lie au récepteur TLR4 sur la surface des neutrophiles, active la production de ROS et NOX et conséquemment induit la formation de NETs de manière dose dépendante et NOX dépendante (265). L'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation de TLR4 (TAK242) ou de l'activité de JNK (c-Jun N-terminal kinases) (SP600125 et TCSJNK6o) supprime la formation de NETs induit par LPS mais pas par le PMA (265).

Des études récentes ont montré que dépendamment du stimulus, la production de NETs ne requièrent pas nécessairement l'implication de NOX. Au cours des dernières années, différents mécanismes ont été suggérés pour la formation de NETs (266). En effet, en 2012, les travaux de Parker et al. ont mis en évidence la **formation de NETs indépendante de NOX (Figure 10)** qui se fait principalement à travers l'influx de calcium et la production mitochondriale de ROS (267). Leurs travaux ont suggéré que les agents ionophores de calcium, qui facilitent l'influx de Ca²⁺ dans la cellule, tels que l'ionomycine et A23187, peuvent induire la relâche de NETs de manière NOX indépendante (267). Dans ce mécanisme, le Ca²⁺ se lie directement à la PAD4 qui permet l'hypercitrullination de la H3 et la décondensation de la chromatine, telle que décrite précédemment.

1.3.2.2 NETose dépendante ou indépendante de PAD4

Bien que plusieurs études aient démontré le rôle de la PAD4 dans le processus de NETose (249, 268, 269), à ce jour, il n'y a pas de consensus sur le rôle de cette enzyme dans la NETose dépendante de NOX (260). Le groupe de Ravidran a démontré que la PAD4, qui est requise dans la NETose indépendante de NOX, ne joue pas de rôle dans la NETose dépendante de NOX. En effet, par microscopie confocale, ce groupe a montré qu'il n'y a pas de déimination des histones détectables lorsque la formation de NETs est induite par PMA (261, 266, 270). Cependant, d'autres études ont montré que la formation de NETs médiée par LPS et PMA pouvait en effet impliquer la PAD4 (262, 263). Ces études ont montré entre autres que les neutrophiles de souris PAD4 knockout (PAD4^{-/-}) étaient incapables de produire des NETs en réponse au LPS ou PMA (262, 263). Un autre groupe a montré que le champignon *Candida albicans* (*C. albicans*) pouvait induire la synthèse de NETs indépendamment de la PAD4 (271). De plus, ce groupe a montré que même si la PAD4 était impliquée dans la citrullination de H3, elle ne contribuait pas à la relâche de NETs par les neutrophiles stimulés par *C. albicans*, puisque la déficience en PAD4 n'a pas affecté la relâche de NETs des neutrophiles murins. Le même résultat était observé chez les neutrophiles humains traités avec l'inhibiteur de l'activité de la PAD4, la Cl-amidine et stimulés avec *C. albicans* et PMA (271).

1.3.2.3 NETose vitale

La NETose vitale, récemment découverte, est décrite comme un processus rapide (minutes) *in vivo* chez l'humain et la souris. Lors de cette NETose, la cellule survit et ses fonctions sont maintenues. Par le passé, il avait été démontré que des neutrophiles sans noyau (appelés cytoplates) pouvaient garder leurs fonctions antimicrobiennes et chimiotactiques, indiquant que l'ADN n'était pas essentiel pour la survie et les fonctions des neutrophiles (272). Deux types de NETose vitale ont été proposés impliquant soit l'ADN nucléaire ou mitochondrial (273-275).

La NETose vitale impliquant l'ADN nucléaire a été proposée par Yipp et Kubes et implique principalement les plaquettes (275). En fait, le LPS (gram négatif) se lie sur les récepteurs TLR4 des plaquettes et ces dernières activent les neutrophiles pour induire la **formation de NETs vitale indépendante de NOX** (274, 275). Pour ce qui est des bactéries gram positif, celles-ci activent les récepteurs TLR2 et le récepteur du complément 3. Afin de démontrer que la formation de NETs est en effet vitale dans ce cas, Yipp et Kubes ont visualisé

des neutrophiles de souris infectés par microscopie intravital et ont observé que ces neutrophiles étaient capables de se déplacer et de phagocyter les bactéries suite à la NETose (274, 275). En 2009, le groupe de Yousefi et al. avait proposé la formation de NETs impliquant l'ADN mitochondriale en réponse à l'activation des composantes du complément (protéines du complément C5a) et autres agonistes tels que GM-CSF et LPS. Cette activation nécessitait la production de ROS mitochondriale et étaient NOX-dépendante (273).

Différents stimuli peuvent induire la NETose vitale tels que les microorganismes LPS – *Staphylococcus aureus* (276), *Candida albicans* (277) qui se lient aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs - *pattern recognition receptors*). Dans ce cas, la relâche du matériel nucléaire se fait par la formation de « bulles » et de vésicules et ne dépend pas nécessairement de NOX. Les neutrophiles maintenant anucléés gardent l'intégrité de leur membre plasmique et gardent leurs granules (275-277). Comme nous pouvons le constater, le LPS peut activer la formation de NETs lytique ou vitale dépendamment de la souche bactérienne. Une même bactérie peut donc déclencher des mécanismes différents de NETose. En fait, des études ont montré que *Staphylococcus aureus* induit la formation de NETs de manière NOX-dépendante (254, 256, 266), tandis d'autres études ont montré que cette bactérie induit la formation de NETs NOX-indépendante (276, 278).

L'apoptose et la formation de NETs ont des caractéristiques communes telles que la production de ROS en réponse à différents stimuli, tandis que les différences entre ces deux types de mécanismes restent encore à être déterminées. L'amplitude ou la durée des ROS, ainsi que la nature du stimulus pourrait être des facteurs déterminants pour le sort des neutrophiles. Comprendre les mécanismes faisant pencher la balance entre l'apoptose et la formation de NETs permettrait de prédire les conséquences de l'inflammation et pourrait faire le fruit de projets futurs (125).

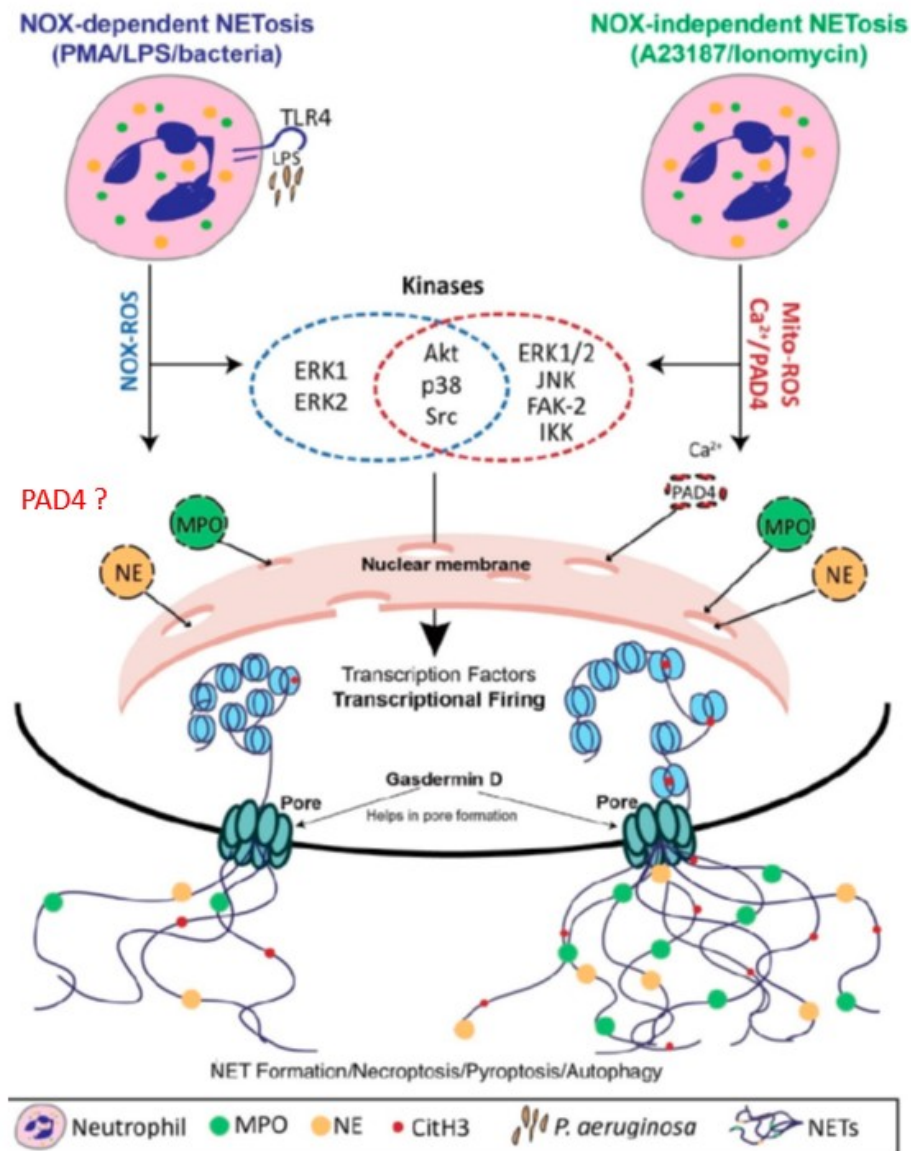


Figure 10. Mécanismes impliqués dans la formation des NETs. Différents agonistes induisent soit la formation de NETs NOX-dépendant (agonistes : PMA, LPS, et autres) ou NOX-indépendant (agonistes : A23187, ionomycin, et autres). Ces agonistes induisent différentes formes de ROS (ROS-NOX et ROS mitochondriales). Les ROS activent différentes kinases spécifiques à la formation de NETs NOX-dépendant ou NOX-indépendant. Ces kinases activent ensuite des facteurs de transcription. Ce processus permet la décondensation de la chromatine, facilitée par la citrullination des histones H3 (CitH3) et médiée par la PAD4 dans la formation de NETs indépendante de NOX. Il n’y a cependant pas de consensus sur le rôle de la PAD4 dans la NETose dépendante de NOX. Les enzymes telles que la NE et la MPO entrent dans le noyau et se lient à la chromatine. Finalement, dans certaines formes de NETose, le noyau se désintègre et les NETs sont relâchés, tandis que dans d’autres formes de NETose, la protéine gasdermin-D aide à former des pores pour permettre la relâche de NETs. Traduit et adapté de (260).

1.3.3 Élimination des NETs

L'élimination des NETs est dépendante de la désoxyribonucléase I (DNase I) et des macrophages (279). Chez l'humain, la DNase I, qui est principalement produite par le pancréas et les reins, hydrolyse l'ADN double brin dans des conditions physiologiques. La DNase I a été montrée comme étant vitale pour la clairance des NETs et une carence en cette enzyme a été liée au développement du lupus érythémateux disséminé (LED) (280). Plusieurs études ont montré que cette enzyme peut dégrader les NETs et que certaines souches bactériennes utilisent leur DNase pour échapper aux NETs (281-284). L'étude de Farrera et Fadeel a montré que la concentration sanguine physiologique de DNase I de 20 ng/mL n'était pas suffisante pour dégrader efficacement et complètement les NETs, alors que les NETs étaient dégradés de manière efficace lors de l'utilisation d'une concentration supraphysiologique de DNase I (279).

Durant l'inflammation, les macrophages sont recrutés peu de temps après le recrutement initial des neutrophiles pour aider à éliminer les pathogènes et les débris cellulaires. Il a également été démontré par Farrera et Fadeel que les macrophages phagocytent les NETs de façon efficace par un processus d'endocytose menant à leur dégradation dans le lysosome (279).

Ces deux mécanismes se complètent afin d'éliminer les NETs. En effet, étant donné que les NETs sont physiquement plus larges que les macrophages, la DNase I dégraderait dans un premier temps les NETs en plus petits fragments facilitant et accélérant ainsi leur phagocytose par les macrophages (279). Une formation excessive de NETs ou une dysfonction de la clairance des NETs peut avoir des conséquences néfastes et peut mener à des pathologies telles que le sepsis, le LED (281), la granulomatose avec polyangéite (GPA) (anciennement appelé maladie de Wegener), la fibrose kystique (250, 255) et des pathologies cardiovasculaires (250, 285).

1.3.4 *Extracellular traps* non neutrophiliques

Par définition, les NETs peuvent seulement être formés à partir des neutrophiles. Toutefois, d'autres types cellulaires peuvent aussi induire la synthèse et la relâche d'*Extracellular Traps* (ETs), sous un processus appelé dans ce cas ETose, incluant les éosinophiles (286), les basophiles, les mastocytes (287) et les monocytes/macrophages (288). Pour générer la NETose classique par les neutrophiles stimulés par le PMA, les éléments suivants sont requis : un métabolisme respiratoire, la NE et le la MPO provenant des granules – qui peuvent seulement

provenir des neutrophiles. Toutefois, les éosinophiles ont la capacité de générer des espèces réactives oxydatives, tout comme les neutrophiles, et ainsi, ils relâchent des EETs de façon NOX-dépendante associés avec la production de ROS (289, 290). Les basophiles ont également la capacité de produire des ETs, nommés les *basophil extracellular traps* (BETs), pouvant éliminer des bactéries, par un mécanisme similaire à celui de la NETose vitale mitochondriale. Les BETs sont cependant relâchés par un mécanisme NOX-indépendant (contrairement à la NETose vital mitochondriale dépendante de NOX) (273, 286, 291). De leur côté, les mastocytes relâchent des MCETs (*mast cell extracellular traps*) *in vitro* par un mécanisme NOX-dépendante associé à la production de ROS et résultant en la mort de ces cellules lorsque stimulés par *Streptococcus pyogenes* ou le PMA (182, 287, 292, 293). Les monocytes et macrophages relâchent également des ETs ayant une morphologie similaire à celle des NETs et sont associés avec le MPO, la lactoferrine, les histones citrullinées et l'élastase. Leur synthèse et relâche dépendent de la production de ROS, mais pas de l'activité du MPO, contrairement aux neutrophiles (294).

1.3.5 Pathologies associées aux NETs

Les NETs ont été longtemps considérés comme simplement impliqués dans des pathologies infectieuses (surtout de type bactérienne) et pour leur rôle protecteur face à de nombreux pathogènes. Cependant, le rôle des NETs n'est pas seulement limité à des activités antimicrobiennes puisqu'ils sont également reconnus pour leurs effets délétères dans l'induction et la progression de diverses conditions pathologiques en exerçant des effets pro-inflammatoires (295), pro-thrombotiques (296) et induisant une dysfonction endothéliale (297). En effet, de nombreuses maladies auto-immunes caractérisées par de l'inflammation stérile sont médiées par les NETs, incluant le LED, le psoriasis, la vascularite des petits vaisseaux, l'arthrite rhumatoïde et la goutte (236, 242, 296, 298). Les NETs jouent également un rôle dans plusieurs maladies métaboliques et néoplasiques (cancers) (236). La formation excessive de NETs est également liée à différentes pathologies infectieuses telles que la fibrose kystique (250, 299).

1.3.5.1 NETs dans l'IC et le T2DM

Outre leur implication dans des pathologies immunes nommées précédemment, de façon intéressante, les NETs ont aussi acquis un rôle important dans la pathophysiologie de

nombreuses maladies cardiovasculaires telles que la thrombose, l'athérosclérose, l'IC et le T2DM (233, 250).

En effet, la dysfonction endothéliale accompagnée de NETose peut favoriser les dommages vasculaires (239), alors que la contribution des NETs dans la formation de thrombose est bien établie (296, 300). En effet, les NETs peuvent capturer les plaquettes et les activer afin de déclencher la voie de coagulation intrinsèque, principalement à l'aide de l'ADN double brin (301). Les NETs activent les plaquettes par leur liaison aux CEs à travers le facteur von Willebrand (vWF) et la P-sélectine, fournissant ainsi un échafaudage pour la liaison des plaquettes, des neutrophiles et des érythrocytes. De plus, les NETs peuvent induire la liaison des plaquettes aux CEs et leur agrégation ce qui mène à la déposition de fibrine, la formation de thrombose (296, 300) et de lésions vasculaires (302).

Comme expliqué à la **section 1.2.3.1**, les neutrophiles et les NETs sont d'importants protagonistes à la progression de la plaque, s'infiltrant dans la plaque athérosclérotique à la suite de stimuli tels que l'hyperglycémie associée au T2DM (303). En effet, des NETs ont été détectés dans des lésions athérosclérotiques chez la souris et l'humain (304, 305). De plus, il a été démontré que le cholestérol cristallisé déclenche la formation de NETs. Ces derniers stimulent les macrophages qui relâchent des cytokines activant les cellules T helper 17, amplifiant ainsi le recrutement de cellules immunitaires dans la plaque d'athérome (304).

Dans l'IC, nous avons récemment démontré que les neutrophiles et les NETs jouent un rôle important (233). Impliqués dans le développement de l'IC, les niveaux de NETs circulants sont fortement prédictifs d'évènements cardiaques d'origine athérosclérotique chez une population de patients avec maladies coronariennes suspectées (305). En période post-infarctus myocardique, les NETs jouent probablement un rôle dans le remodelage ventriculaire, mais les mécanismes sont inconnus et mériteraient davantage de recherche (306). Dans la progression de l'IC, quoique le rôle de NETs vienne de commencer à être étudié (233), une augmentation du nombre de neutrophiles est associée à la progression de la maladie. Chez les patients insuffisants cardiaques inclus dans l'étude SOLVD (*Studies Of Left Ventricular Dysfunction*), des niveaux plus élevés de neutrophiles circulants ont été trouvés chez les patients décédés en comparaison aux patients toujours vivants aux termes de l'étude (307). Des études récentes ont aussi montré une corrélation positive entre les niveaux de neutrophiles circulants, la sévérité de l'IC et les niveaux de CRP (308). De plus, nous avons démontré récemment que la CRP induit la NETose

chez les patients insuffisants cardiaques avec ou sans diabète par l'entremise de la relâche d'IL-6 (233). Ceci dit, le rôle des NETs dans le développement de l'IC est non-négligeable, mais davantage de travaux sont nécessaires pour mieux comprendre leur rôle dans la progression de la maladie.

L'hyperglycémie est également un facteur pouvant influencer la formation de NET par les neutrophiles (309), d'où l'importance d'étudier les NETs dans le diabète. En effet, plusieurs études ont montré des taux sanguins élevés de NETs chez les patients diabétiques de type 2 (310-312). De plus, chez les patients T2DM, des complications graves telles que les ulcères du pied et la rétinopathie diabétique peuvent survenir et des études ont démontré que la PAD4 et la citrullination des histones étaient élevées dans les plaies de ces patients (310, 313). Des études ont également montré que chez les patients diabétiques, il y a une augmentation des niveaux de protéines sur les NETs dans le plasma, telles que la NE et les histones, comparé aux individus non diabétiques (312), la NE circulante élevée étant un prédicteur de guérison retardée (313). Toutefois, les mécanismes demeurent encore inconnus. Ceci dit, l'étude des différentes protéines sur les NETs et des mécanismes impliqués pourraient être une piste permettant de mieux comprendre la physiopathologie de l'IC et du diabète.

1.3.5.2 NETs et autres pathologies

Les NETs ont été également retrouvés dans des pathologies pulmonaires telles l'asthme (251, 314), la bronchopneumopathie chronique obstructive (315) et plus récemment la COVID-19 (316). En effet, en date du 13 janvier 2021, la pandémie du coronavirus SARS-CoV-2 (COVID-19) a touché 60 534 526 personnes et a causé 1 426 101 décès à travers le monde (317). Au Canada, on compte 347 466 cas de COVID-19 parmi lesquels il y a 11 710 morts et 277 232 rétablis (318).

La plupart des symptômes ressentis par les individus atteints de la COVID-19 sont de la fièvre, la toux sèche et la fatigue et de façon moins fréquente, des maux de gorge, maux de tête, de la diarrhée, des courbatures, etc. Dans les cas sévères et lors des décès, les patients atteints de COVID-19 souffraient d'hypoxie progressive, du syndrome de détresse respiratoire aiguë (*acute respiratory distress syndrome* - ARDS) et d'une défaillance multi-organes (319).

Une étude a reporté une concentration élevée de NETs dans le sérum de patients hospitalisés, avec un niveau élevé d'ADN libre, de complexe MPO-ADN et de CitH3 associés

à une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang (316). De plus, une seconde étude effectuée par cette même équipe a démontré une augmentation des niveaux de calprotectine dans le sang de patients ayant la COVID-19 comparé aux volontaires sains. Les niveaux de calprotectine semblaient augmenter avec la détérioration du statut clinique (oxygénation détériorée) et étaient plus élevés chez les patients nécessitant la ventilation mécanique (320). Une autre étude a montré la présence de calprotectine fécale chez 28% des patients COVID-19 qui présentaient des symptômes gastro-intestinaux tels que de la diarrhée, des nausées et des vomissements (319, 321-324). À ce jour, de nombreux efforts ont été déployés pour mettre au point des vaccins contre la COVID-19 afin de contrôler la pandémie. Actuellement, l'ARNm-1273 (Moderna), le Ad5-nCoV (CanSino Biologicals), l'INO-4800 (Inovio, Inc.), le LV-SMENP-DC, l'aAPC spécifique aux agents pathogènes (ShinzenGeno-Immune Medical Institute) et le ChAdOx1 (University of Oxford) sont entrés dans les essais cliniques de phase I/II (325).

1.3.6 Stratégies thérapeutiques contre les NETs

Différentes stratégies pour éliminer les NETs affectent soit la formation, l'intégrité des NETs, ou l'expression des protéines sur les NETs (236). Comme inhibiteurs de la formation des NETs, nous retrouvons le glycogène synthase kinase (GSK - *glycogen synthase kinase*) GSK484 ou GSK199, des molécules inhibant la PAD4. Des études effectuées chez la souris ont permis de confirmer *in vivo* l'inhibition de l'activité de la PAD4 et de la formation de NETs avec le GSK484 et GSK199 (326). L'utilisation de cette molécule dans des modèles de souris s'est trouvée efficace contre diverses pathologies impliquant les NETs tels que le cancer (327). Cependant, aucune étude clinique à ce jour n'a débuté avec ces inhibiteurs (326).

Parmi les agents permettant de détruire l'intégrité des NETs, nous retrouvons la DNase I. Tel que mentionné, la DNase I physiologique permet d'éliminer de base les NETs en hydrolysant l'ADN double-brin de manière non spécifique (328). Cependant, lors d'un excès de NETs, une dose supra physiologique (plus de 20 ng/mL) est requise pour éliminer de façon efficace les NETs. La DNase I est utilisée dans le traitement de la fibrose kystique (250) et elle permet d'améliorer la fonction pulmonaire et de réduire les exacerbations de la maladie (329). Dans une expérience chez des souris de type sauvage et des souris diabétiques, des chercheurs ont constaté que l'administration de DNase I accélérât la guérison de l'ulcère du pied diabétique

(310). L'héparine joue un rôle dans la destruction des NETs (302). Cependant, une récente étude a démontré que l'héparine serait également impliquée dans l'induction de NETs (330), donc l'effet de l'héparine sur les NETs reste à être élucidé.

Parmi les antagonistes des composantes des NETs, nous retrouvons par exemple la molécule Secukinumab qui inhibe l'IL-17, impliquée dans plusieurs processus pathologiques (le psoriasis et le polyarthrite rhumatoïde) et dans l'activation des cellules immunitaires (331) ainsi que les molécules Anakinra et Canakinumab qui inhibent l'IL-1 β , impliqué dans la goutte et la fièvre méditerranéenne familiale (332-334).

Récemment, des études ont montré que la colchicine peut inhiber la formation des NETs. La colchicine est un puissant agent anti-inflammatoire bien connu et aurait des effets thérapeutiques potentiels chez les patients souffrants de maladies coronariennes (335, 336). Elle s'est d'ailleurs montrée efficace pour inhiber la formation des NETs chez les patients avec un syndrome coronarien aigu (337). De plus amples études sont nécessaires pour montrer son efficacité chez les patients insuffisants cardiaques et les diabétiques (étude à venir COLCOT T2D).

1.4 La calprotectine

La calprotectine (S100A8/A9) est une glycoprotéine de 36 kDa appartenant à la famille des protéines S100, des protéines de faible poids moléculaire. C'est une protéine cytosolique et une des premières protéines identifiées sur les NETs (237). La calprotectine a été isolée pour la première fois dans les années 70 et a été retrouvée dans les cellules myéloïdes, soit les neutrophiles, les monocytes et les macrophages différenciés (338-340). Suite à l'activation des neutrophiles ou à l'adhésion des monocytes aux CE, la calprotectine est sécrétée par un mécanisme médié par les microtubules et de ce fait, peut être utilisée comme marqueur de l'influx de phagocytes au site inflammatoire (341). La calprotectine est utilisée comme biomarqueur diagnostique de l'inflammation intestinale chez l'adulte et l'enfant, puisqu'on observe une calprotectine sérique élevée chez les patients avec une maladie inflammatoire de l'intestin (e.g. la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) (342). Également, la calprotectine est une protéine retrouvée dans le sang, la salive, le liquide cébrospinal, le liquide synovial et dans l'urine lorsque certaines parties du corps sont en condition inflammatoire. Cependant, le test utilisant ces fluides n'est pas toujours un bon indicateur de la localisation de l'inflammation.

Lorsque la calprotectine est détectée à un niveau élevé dans les selles, cette hausse est associée à la dégranulation des neutrophiles et aux dommages de la muqueuse intestinale, caractéristique de maladie inflammatoire de l'intestin. La calprotectine fécale est présente seulement dans les maladies inflammatoires de l'intestin permettant la distinction avec le syndrome du côlon irritable (342, 343). Des études ont également montré l'implication de la calprotectine dans l'inflammation (autres qu'intestinale), la réponse immunitaire et dans des pathologies cardiovasculaires. L'étude de la calprotectine est un sujet d'intérêt, car celle-ci serait en partie responsable de l'inflammation de bas grade associée aux maladies cardiovasculaires, l'IC et le T2D (344, 345) (que nous discuterons plus en détail dans les prochaines sections).

1.4.1 Structure et localisation

Les protéines S100 sont des molécules liant le calcium (Ca^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}). Le gène des S100 est localisé sur le chromosome 1q21. Les protéines S100 sont sous forme monomérique, soit la S100A8, une chaîne légère (aussi connu sous le nom de *migration inhibitory factor-related protein* MRP8, L1_{Light}, *Calgranulin A* et p8) ou la S100A9, une chaîne lourde, (aussi nommé MRP14, L1_{Heavy}, *Calgranulin B* et p14). En présence de calcium, la S100A8 et la S100A9 forment un hétérodimère ou un hétérotétramère S100A8/A9, également appelé calprotectine. Cette protéine est abondante dans le cytosol du neutrophile, représentant entre 30 et 60% des protéines cytosoliques (339, 346, 347) (343, 348). La **Figure 11** permet de visualiser la structure de la calprotectine.

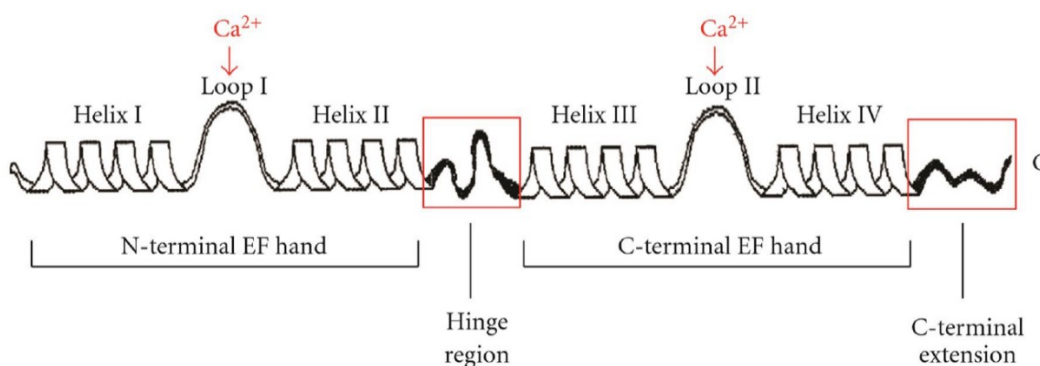


Figure 11. Structure de la calprotectine (S100A8/A9). Cette figure représente la structure secondaire des monomères S100A8 et S100A9. Chaque monomère comprend 4 hélices α (HI, HII, HIII et HIV) et 2 boucles (Boucle 1 et Boucle 2) qui lient le Ca^{2+} (349) (349).

Cette protéine, exprimée constitutivement par les neutrophiles et les monocytes (comme des capteurs de Ca^{2+}), participe entre autres au réarrangement du cytosquelette (350) et au métabolisme de l'acide arachidonique (351) et joue également un rôle dans l'inflammation (352). En effet, suite à sa relâche active, elle module la réponse inflammatoire en stimulant le recrutement des leucocytes et en induisant la sécrétion de cytokines, de ROS et de NO (353). Bien que la calprotectine soit utilisée comme marqueur spécifique de neutrophiles activés et de macrophages, cette protéine a été détectée dans d'autres cellules myéloïdes. Son expression peut être induite dans les kératinocytes et les cellules épithéliales dans des conditions inflammatoires (354), ainsi que dans certains types de cellules cardiovasculaires non myéloïdes telles que les CE et les cellules musculaires lisses (VSMCs – *vascular smooth muscle cells*) dans des conditions normales. L'expression dans les CE peut être induite suite à leur activation par le LPS, l'IL-1 β , ou le TNF- α (355, 356) ou après une exposition à des concentrations élevées de glucose *in vitro* ou chez les diabétiques *in vivo* (357).

1.4.2 Synthèse, relâche et mécanisme d'action

Plusieurs molécules inflammatoires peuvent induire la synthèse de la calprotectine incluant le LPS, le PMA, le TNF- α et les interleukines IL-1 α , IL-1 β , IL-10 et IL-22 (358-360) et sa sécrétion dépend de la production de ROS et de l'efflux du potassium (K^+) à travers le canal potassique sensible à l'ATP (*ATP-sensitive K^+ channel*) (360). La calprotectine est produite et relâchée localement, dans la plupart des cas, en phase aiguë de l'inflammation et sa concentration dans le sang peut augmenter de 40 à 130 fois durant l'inflammation (341, 361). Suite à l'activation des neutrophiles ou des monocytes adhérents aux CE, la calprotectine est sécrétée par un mécanisme médié par les microtubules, et par ce fait, elle peut être utilisée comme marqueur de l'influx de phagocytes au site inflammatoire (359).

La calprotectine relâchée peut agir sur trois types de récepteur membranaires, soit le récepteur EMMPRIN (*the extracellular matrix metalloprotease inducer*), TLR4 et RAGE (*receptor of advanced glycation end products*). Le récepteur EMMPRIN (CD147 ou Basigin) est retrouvé sur les cellules épithéliales, CE et les leucocytes (362) et entraîne la production de cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) jouant un rôle dans l'inflammation, la différenciation, la migration, l'angiogenèse, l'apoptose et la défense de l'hôte (363). Il induit également la production de MMPs requis pour l'invasion tumorale et la métastase (364, 365). Les récepteurs

TLR reconnaissent les modèles moléculaires associés aux pathogènes (*PAMP – Pathogen-associated molecular pattern*) et ils activent la voie de signalisation de la NF- κ B – il y a transduction de signaux pro-inflammatoires ce qui mène à l'activation du système immunitaire inné. Les TLR4, principalement exprimés sur les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) (366), sont surtout reconnus pour leur affinité envers le LPS retrouvé principalement dans la membrane des bactéries gram négatif (367). La liaison de la calprotectine au récepteur TLR4 déclenche une voie de signalisation spécifique qui se traduit par une boucle de rétroaction positive autocrine et une amplification de l'induction de facteurs inflammatoires tels que des cytokines, chimiokines et TNF- α (368-370). Le récepteur RAGE, exprimé sur les CE, les cellules musculaires lisses, les lymphocytes, monocytes et les neurones (371), mène à l'activation des voies de signalisation des MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) et la translocation de NF- κ B du cytosol au noyau ce qui entraîne une hausse de la transcription des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération et l'inflammation (372-375).

1.4.3 Rôle physiologique de la calprotectine

La calprotectine est impliquée dans plusieurs activités intra- et extracellulaires. Au niveau des activités intracellulaires, la calprotectine joue un rôle dans la signalisation cellulaire, la régulation homéostatique du calcium et dans la phosphorylation de protéines. Elle est également impliquée dans la modulation du cytosquelette. En effet, la calprotectine effectue des interactions spécifiques avec les microtubules, le vimentin, la kératine, et les filaments d'actine contribuant à la migration cellulaire (de manière calcium dépendante) (349). Elle joue également un rôle dans le transfert d'acides gras polyinsaturés, l'activation de la NADPH oxydase et la production de ROS, la résistance aux pathogènes, la différenciation cellulaire, la régulation immunitaire, la tumorigenèse, l'apoptose et la régulation de la réponse immunitaire et inflammatoire (376, 377). Au niveau des activités extracellulaires, la calprotectine joue un rôle dans le recrutement des leucocytes et stimule l'expression et la relâche de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF α et COX2 (cyclooxygénase)). Elle a des activités antiprolifératives, antitumorales, antimicrobiennes (378-380), anti-nociceptives et anti- et/ou pro-inflammatoires (339).

La fonction antimicrobienne de la calprotectine se fait essentiellement par une compétition hôte-pathogène pour les nutriments essentiels. En effet, lorsque relâchée dans le milieu extracellulaire, la calprotectine a la capacité de priver les microbes de nutriments métalliques essentiels. Elle inhibe la croissance d'une variété de microorganismes en séquestrant des ions métalliques tels que le manganèse (Mn^{2+}) et le zinc (Zn^{2+}) (381). La calprotectine se lie avec une grande affinité au Zn^{2+} et sa chélation contribue aux effets bactériostatiques et fongistatiques (347). La calprotectine est également la seule protéine connue pour séquestrer le Mn^{2+} en s'y liant avec une grande affinité (378, 379, 382-386). Ce dernier est important pour la virulence d'une variété de bactéries pathogènes et sa séquestration prévient la croissance microbienne.

La calprotectine retrouvée dans le fluide mucosal (mucus), les sécrétions des voies respiratoires, le liquide gingival crévulaire et dans les abcès tissulaires contribue à limiter la croissance de microorganismes commensaux et à prévenir l'intrusion de pathogènes (387). Une étude a montré qu'une absence de S100A8/A9 chez la souris mène à une augmentation significative de bactéries dans le sang, le foie et la rate (388). Par conséquent, S100A8/A9 inhibe la croissance de pathogènes aux sites infectieux durant la phase initiale d'infection, permettant d'avoir du temps pour le recrutement des phagocytes. Par la suite, S100A9 augmente l'activité phagocytaire des leucocytes infiltrés, accélérant ainsi la clairance bactérienne (353).

1.4.4 Pathologies associées à la calprotectine

Une mauvaise régulation de la synthèse de calprotectine peut mener à des pathologies inflammatoires. En effet, une hypercalprotectinémie peut engendrer une déficience en zinc et de ce fait causer des infections récurrentes, une hépatosplénomégalie, l'anémie ou une inflammation systémique (389).

La calprotectine est aussi impliquée dans le cancer. Une augmentation de l'expression de la calprotectine a été identifiée dans une variété de cancers incluant le cancer du sein, de la peau, des poumons, du pancréas, de la prostate, gastrique et colorectal. Dans les tumeurs malignes, cette protéine est hautement exprimée dans les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires infiltrées (358). En fait, en conditions physiologiques normales, la concentration extracellulaire de la calprotectine est extrêmement faible dans le sang mais, en conditions inflammatoires (dans les cancers par exemple), les cellules immunitaires activées sécrètent cette

protéine de façon continue et activent plusieurs voies de signalisation menant à la progression d'un cancer et à la métastase (349).

La calprotectine est un marqueur inflammatoire utilisé dans le diagnostic de pathologies non infectieuses telles l'arthrite, la maladie chronique inflammatoire des poumons et une maladie intestinale (e.g. maladie de Crohn et colite ulcéreuse) (8, 354). De plus, une sécrétion locale de MRPs (calprotectine) (339) a été détectée dans les infections de périodonties chroniques et dans le sérum de patients souffrant d'infections et/ou de pathologies inflammatoires. Des concentrations élevées de calprotectine ont été retrouvées dans des infections au VIH avancées, des infections du tractus urinaire ainsi que des pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde chez les enfants et adultes, la bronchite chronique, la fibrose kystique (250), le lupus érythémateux systémique, la colite ulcéreuse, la septicémie, l'infection et dans des conditions granulomateuses (telles que la tuberculose et le sarcoïdose) (390).

1.4.4.1 Rôle de la calprotectine dans l'IC et le T2DM

Au niveau des pathologies cardiovasculaires, la calprotectine est corrélée au nombre de neutrophiles (391) et a été retrouvée en concentration plus élevée dans le sang de patients souffrant d'un IM, une angine instable (391, 392) ou une IC chronique (344, 393).

La calprotectine plasmatique était élevée chez les patients souffrants d'IC chronique et cette protéine était corrélée avec les niveaux de CRP, IL-6 et IL-8 (344, 393) ainsi qu'avec les classes élevées d'IC, soit NYHA de classe III et IV (344). Ces études ont démontré que la combinaison de la calprotectine et des cytokines pro-inflammatoires aurait donc le potentiel d'apporter une information sur le pronostic des patients insuffisants cardiaques (393). Ces études n'ont toutefois pas fait la distinction entre les patients HFpEF et HFrEF.

Plusieurs études investiguant le rôle de la calprotectine comme marqueur de pathologies cardiovasculaires ont montré que la calprotectine est activement sécrétée – possiblement par les leucocytes – chez les patients avec un IM aigu et que sa concentration est significativement associée à un pronostic de syndrome coronarien aigu (394, 395) et d'infarctus du myocarde (396). À titre d'exemple, une première étude publiée en 2006 a montré que l'augmentation de la concentration plasmatique de calprotectine pouvait prédire le risque d'un premier évènement cardiovasculaire, soit un IM ou une mort cardiovasculaire (Healy, 2006). Une autre étude a

montré que des patients avec des niveaux élevés de calprotectine et de CRP étaient plus à risque de mort cardiovasculaire ou d'IM (395).

La calprotectine est aussi impliquée dans l'athérosclérose, alors que si les niveaux de calprotectine augmentent, le risque de rupture de plaque athérosclérotique (397) dans les carotides et les artères coronariennes sont plus élevés (10, 394, 398, 399). Par l'utilisation de technique d'immunohistochimie sur des autopsies de myocarde de patients ayant subi un infarctus, une étude a démontré que la calprotectine était exprimée dans les neutrophiles et les macrophages infiltrés dans la région infarctée (400).

L'expression constitutive de S100A8/A9 était attribuée seulement aux neutrophiles et aux monocytes, mais des études ont démontré l'induction de l'expression de S100A8/A9 dans des cellules non myéloïdes de type cardiovasculaire susceptibles d'être présentes dans les lésions athérosclérotiques et/ou autres pathologies cardiovasculaires. En conditions normales, il y a une faible expression de S100A8/A9 dans les CE et les cellules musculaires lisses. Suite à leur activation par le LPS, l'interleukine-1 β , le TNF- α (356, 401), une concentration élevée de glucose *in vitro* et la présence de diabète *in vivo* (357), la calprotectine peut être induite dans les CE et par le LPS dans les cardiomyocytes (402). Au niveau clinique, une étude a montré des niveaux élevés de calprotectine plasmatique chez des patients diabétiques et obèses (345).

1.5 Les angiopoïétines

Les angiopoïétines sont des glycoprotéines et des facteurs de croissance vasculaires de 70 kDa contribuent au processus d'angiogenèse, qui est la formation de vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant (403).

1.5.1 Structure et localisation d'Ang1

Il existe quatre types d'angiopoïétines (Ang1 à 4). Contrairement à Ang3 (souris) et Ang4 (humain), Ang1 et Ang2 sont les mieux décrits dans la littérature. Les angiopoïétines sont des glycoprotéines oligomériques cytosoliques sécrétées (*family of secreted oligomeric glycoproteins*), dont la structure est présentée à la **Figure 12**. Ang1 et Ang2 sont similaires au niveau structural (séquences homologues à 60%) (404) et sont composées de trois principaux domaines. Le premier domaine est un domaine *superclustering* situé au N-terminal, permettant la formation de multimères de haut niveau à partir d'oligomères d'Ang1, suivi d'un domaine

coiled-coil, responsable de l'oligomérisation des monomères d'angiopoïétines et d'un domaine *fibrinogen-related domain* (RGD) lié au domaine précédent par un court domaine de liaison (*linker*). Ce *linker* permet à l'Ang1 sécrétée, mais pas à l'Ang2, de se lier à la matrice extracellulaire (405). Le domaine RGD au C-terminal contient trois autres domaines A, B et P. Le domaine P est celui qui contient la région permettant la liaison au récepteur Tie2 (*Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains*) (406).

Chez l'humain, Ang1 se retrouve dans le cytosol et est principalement produite par les cellules murales péri-endothéliales, les péricytes, les fibroblastes, et est retrouvée dans différents tissus tels que l'utérus, le système nerveux central, le pancréas et les intestins (407). Au niveau des cellules sanguines, Ang1 est exprimée par les plaquettes (408, 409), les monocytes et nous avons démontré dans une étude précédente que les neutrophiles expriment Ang1 mais pas Ang2 (410). L'Ang2, n'est généralement pas exprimée dans les tissus sains, mais on la retrouve dans les corps Weibel-Palade des CE d'où elle est rapidement relâchée en réponse à des stimuli tels que la thrombine (411), l'histamine (411), le facteur de croissance vasculaire endothéliale (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) (412), l'hypoxie (413) et l'Ang-II (414, 415).

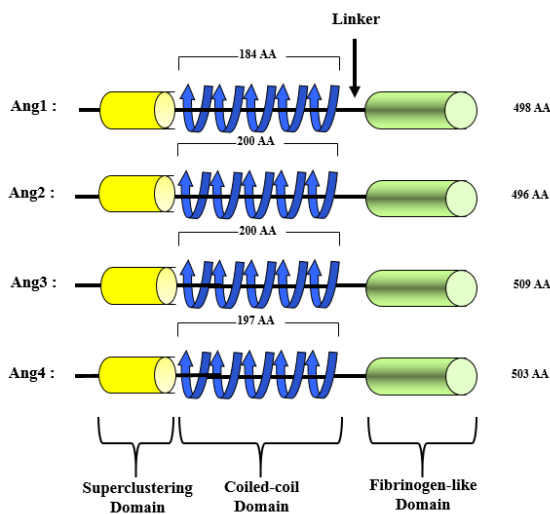


Figure 12. Structure des angiopoïétines. Une courte séquence de signal sécrétoire est suivie d'un domaine superclustering. Ce domaine est suivi par le domaine d'oligomérisation *coiled-coil*, puis d'un court *linker* et du domaine *fibrinogen-related domain* permettant la liaison aux récepteurs. Adaptée de (414, 416).

1.5.2 Angiogenèse physiologique

C'est au cours du développement embryonnaire que s'effectue la création de nouveaux vaisseaux sanguins primitifs (vasculogenèse) à partir de cellules précurseurs. Une fois tous développés, la plupart des vaisseaux sanguins sont par la suite quiescents, à l'exception de ceux

impliqués dans le cycle menstruel ou la croissance d'un embryon et la formation du placenta lors de la grossesse (417, 418).

L'angiogenèse est favorisée par un environnement hypoxique, la présence de facteurs de croissance pro-angiogéniques et de cytokines inflammatoires. En condition physiologique, ces éléments permettent entre autres la réparation des tissus lors d'une blessure (419) ou lors de la croissance musculaire suivant un exercice physique prolongé (420, 421). La balance entre les facteurs pro-angiogéniques (VEGF (*vascular endothelial growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), Ang1, VEGF-R2 (*VEGF receptor*)) et les facteurs anti-angiogéniques (Ang2, VEGF-R1, angiostatine, thrombospondine) est importante pour la régulation de l'angiogenèse. Le VEGF et les angiopoïétines agissent exclusivement sur l'endothélium. Le VEGF augmente la perméabilité vasculaire et induit la mitose des CEs, agissant à plusieurs endroits dans la cascade de l'angiogenèse (422). De son côté, Ang1 favorise la survie des CE, limite la perméabilité vasculaire (407, 423) et joue un rôle dans la maturation vasculaire (424), alors que l'Ang2 induit la déstabilisation des vaisseaux sanguins, l'activation des CE et l'inflammation vasculaire (416).

Il existe trois types d'angiogenèse identifiés : le *sprouting* (bourgeonnement), l'intussusception et la septation. L'angiogenèse par bourgeonnement est la plus connue et la mieux décrite. Elle se fait en quatre principales étapes telles qu'illustrées à la **Figure 13**: la sélection de la cellule de front, la migration, la fusion et la formation de la lumière du vaisseau, ainsi que la maturation et le flux sanguin. Suite à l'augmentation optimale de VEGF, celui-ci interagit avec son récepteur VEGF-R2 sur la cellule de front et induit la transcription de DLL4 (*delta-like ligand 4*) (**Figure 13A**). Cette protéine interagit avec son récepteur Notch 1 sur la cellule de soutien à proximité ce qui conduit à l'expression de VEGF-R1. Cette dernière est dépourvue d'activité transductionnelle et séquestre le VEGF libre prévenant ainsi l'activation de VEGF-R2, en plus de la répression de la transcription du gène codant le VEGF-R2 (425). La cellule de front migre vers les facteurs de guidance tandis que les CEs prolifèrent pour former le début du tube vasculaire en desserrant leurs jonctions et en se détachant de la membrane basale sous l'action des MMPs. Les CEs peuvent traverser la membrane basale et migrer vers les zones de concentration plus élevées en protéines angiogéniques. Au fur et à mesure que les CEs migrent, elles sécrètent Ang2, qui entre en compétition avec Ang1 pour le récepteur Tie2, induisant davantage le détachement des CEs, la perméabilité vasculaire et la prolifération des

CEs pour former le début du tube vasculaire (425, 426) (**Figure 13B**). Ces tubes se joignent afin de former un nouveau vaisseau pouvant être perfusé (**Figure 13C**), alors que les péricytes permettent la stabilisation du nouveau vaisseau sanguin mature (**Figure 13D**) (425).

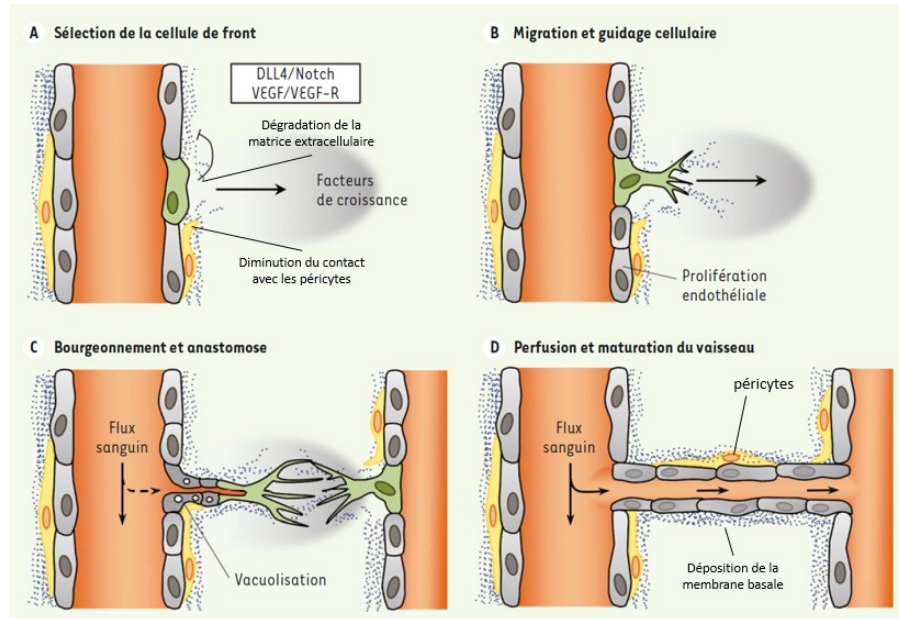


Figure 13. Angiogenèse par bourgeonnement. **A.** Une concentration adéquate en VEGF permet l'expression du DLL4 dans la cellule de front (cellule verte) et l'activation de la voie de signalisation impliquant son récepteur Notch dans les cellules de soutien (cellules grises). La matrice extracellulaire est dégradée localement et les interactions péricytes-CE sont modulées. **B.** En réponse aux facteurs environnementaux, les jonctions endothéliales de la cellule de front sont affaiblies, acquièrent un phénotype invasif et interagissent avec la matrice extracellulaire. **C.** Les cellules de soutien prolifèrent et permettent la croissance et la rencontre de deux bourgeonnements vasculaires. Les processus de vacuolisation commencent. **D.** La fusion des vacuoles endothéliales conduit à la formation de la lumière du vaisseau et permet sa perfusion. Finalement, une nouvelle membrane basale est produite et les péricytes nouvellement recrutés stabilisent les jonctions endothéliales. Adapté de (425).

1.5.3 Angiogenèse pathologique

L'angiogenèse requiert un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques et le déséquilibre entre ces facteurs entraîne un état pathologique. L'hypoxie est un facteur essentiel dans l'angiogenèse physiologique. Cependant, lorsque l'hypoxie est associée avec une surproduction de facteurs de croissance pro-angiogéniques, il y a développement d'une angiogenèse pathologique menant à des maladies telles que la rétinopathie, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et la formation de tumeurs solides dans certains cancers (427). Par exemple, les vaisseaux sanguins tumoraux sont caractérisés par une perméabilité constitutive

importante, sont très dilatés, comportent un réseau vasculaire chaotique et un flux de sang non constant, pouvant même changer de direction (403). De plus, due à la perméabilité importante de ces vaisseaux, la pression interstitielle est haute et peut entraîner des phénomènes d'œdème, de fibrose et d'inflammation, ce qui favorise l'angiogenèse et la dissémination (428). L'angiogenèse pathologique pourrait également être une condition retrouvée dans l'IC. En effet, plusieurs études ont montré un lien entre l'IC et les niveaux de marqueurs tels que le VEGF, la pentraxine-3 et le TGF- β (429).

1.5.4 Synthèse, relâche et récepteurs

Tout comme la calprotectine, Ang1 est exprimée dans le cytosol des neutrophiles et sa relâche peut être induite par des stimuli sélectifs. En effet, nous avons démontré précédemment que l'expression et la relâche d'Ang1 par les neutrophiles pouvait être régulées par des agonistes tels que le PMA (410) et le LPS (430). Cependant, les mécanismes de synthèse et de relâche d'Ang1 par les neutrophiles ne sont pas tout à fait élucidés.

Suite à sa relâche, l'Ang1 a la capacité de se lier au récepteur tyrosine kinase Tie-2 retrouvé sur les CE (407) et les neutrophiles (431) et avoir des effets sur ces cellules. Un autre récepteur possédant une grande homologie structurelle avec Tie-2 est le récepteur Tie-1, qui est encore considéré comme un récepteur orphelin. Tie-1 et Tie-2 sont principalement exprimés sur les CE vasculaires et participent au développement vasculaire embryonnaire. La liaison des angiopoïétines à Tie-2 induit la phosphorylation des tyrosines, ce qui active le récepteur. Tie-1 jouerait un rôle dans l'intégrité vasculaire, tandis que Tie-2 serait important pour l'angiogenèse, particulièrement pour la formation de réseaux vasculaires (432).

Les angiopoïétines, via la signalisation de Tie-2, régulent la survie et l'apoptose des CE, contrôlent la perméabilité vasculaire et régulent la croissance des capillaires qui se produit durant l'angiogenèse normale (ex : développement et remodelage ovarien) (433). Tie-2 joue également un rôle dans le cancer, puisqu'il est surexprimé dans les vaisseaux tumoraux. De plus, Tie-2 est aussi exprimé dans d'autres types de cancer non vascularisés, tels que la leucémie ou les néoplasmes solides (tumeurs gastriques et gliomes) (433).

Ang1 est un agoniste de Tie-2 et elle a des effets anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et anti-perméabilité sur les CEs. En fait, Ang1, en combinaison avec le VEGF, favorise la maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins, la survie des CE et le remodelage des

vaisseaux sanguins (407, 423, 424), tandis que l'Ang2 déstabilise plutôt la structure vasculaire et agit de ce fait comme un antagoniste compétitif de l'effet d'Ang1 (416).

1.5.5 Rôle physiologique d'Ang1

L'Ang1 est impliquée dans l'angiogenèse et est principalement connue pour ses effets anti-inflammatoires. En effet, Ang1 a de puissants effets protecteurs vasculaires, entre autres, via la suppression des fuites plasmatiques, l'inhibition de l'inflammation vasculaire et la prévention de la mort endothéliale (434, 435). L'Ang1 permet la migration des CE et d'autres cellules telles les cellules musculaires lisses (436, 437). Elle induit la prolifération et la réorganisation des CE en tubules (438, 439) et réduit la perméabilité endothéliale en réponse au VEGF et à la thrombine dans les HUVECs (*Human umbilical vein endothelial cells*) (435) (435). Elle joue aussi un rôle dans l'intégrité des jonctions en augmentant l'expression des protéines impliquées telles que PECAM-1 (435), occludine (440) et ZO-2 (TJP2 - *Tight junction protein 2*) (441). La **Figure 14** présente un résumé des voies de signalisation et des effets d'Ang1 au niveau des CE.

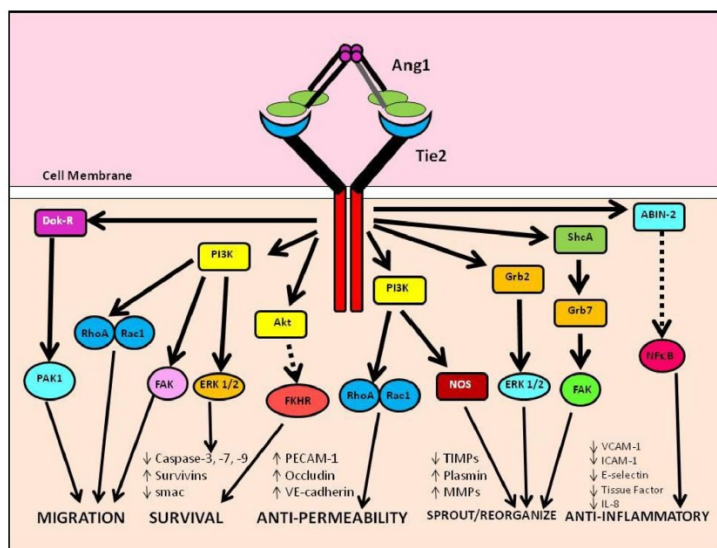


Figure 14. Activités biologiques d'Ang1 sur les CE. Ang1 joue essentiellement un rôle protecteur aux niveaux des CE. En effet, Ang1 est impliquée dans la migration, dans la survie et dans la réorganisation des CE. Elle a également des effets anti-perméabilité et anti-inflammatoire des CE à travers les différentes voies de signalisation. PAK, *p21-activating kinase*; FAK, *focal adhesion kinase*; PI3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*; ERK, *extracellular ligand-regulated kinase*; FKHR, *forkhead transcription factor*; NOS, *nitric oxide synthase*; ABIN-2, *A20 binding inhibitor of NFκB*; NFκB, *nuclear factor kappa B*; ICAM, *intercellular adhesion molecule*; VCAM, *vascular cell adhesion molecule*; smac, *second mitochondrial activator of caspases*; MMP, *matrix metalloproteinase*; TIMP, *tissue inhibitor of metalloproteinases* (416).

Les angiopoïétines exercent également des activités pro-inflammatoires, principalement au niveau des CE, mais également au niveau des neutrophiles. Ang1 et Ang2, via l'activation de Tie2 induisent la synthèse de PAF (*Platelet activating factor* – facteur d'activation plaquettaire) et la translocation de la P-sélectine, ce qui permet l'adhésion des neutrophiles sur les CE (410). Aux niveaux des neutrophiles, Ang1 et Ang2 induisent la synthèse et la relâche de PAF, favorisent la régulation positive (*upregulation*) du complexe $\beta 2$ intégrine (CD11/CD18) et l'adhésion des neutrophiles sur la matrice extracellulaire humaine (*human extracellular matrix* - hECM) (431). De plus, les angiopoïétines favorisent la migration des neutrophiles (442) et induisent la formation et la relâche de NETs par les neutrophiles humains (443) de façon PAD4 et NOX-dépendante. L'Ang1, et non l'Ang2, a également la capacité d'induire la synthèse et/ou la relâche de cytokines inflammatoires telles que MIP-1 β , IL-8, IL-1 β et IL-1RA (444-446).

1.5.6 Pathologies associées aux angiopoïétines

L'hypoxie est un facteur primordial dans l'angiogenèse physiologique ou pathologique. Nous avons mentionné précédemment que l'hypoxie et l'inflammation caractérisent l'IC et T2DM et donc, Ang1 et Ang2 devraient jouer un rôle important dans ces pathologies. En effet, Ang1 et Ang2 sont associées avec diverses pathologies inflammatoires (447, 448) et cardiovasculaires (449-451). Plusieurs études réalisées avec les angiopoïétines dans ces pathologies ont mesuré le ratio Ang2/Ang1 et observé soit une augmentation d'Ang2 et une diminution ou un statut quo d'Ang1. Ces études montrent cette augmentation d'Ang2 et du ratio Ang2/Ang1 dans des pathologies telles que l'état septique ou le choc septique (447, 452), les lésions pulmonaires aiguës (448), le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS- *acute respiratory distress syndrome*) (452) et le trauma (453). Dans le syndrome coronarien aigu (454) et l'IC congestive (455), des études montrent une augmentation d'Ang2, sans diminution d'Ang1.

Quelques études ont montré l'implication d'Ang1 et Ang2 dans des pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (449). D'un côté, des études montrent un déséquilibre dans le ratio Ang2/Ang1 en faveur d'Ang2, indiquant un rôle d'Ang2 dans le développement de la plaque instable (450) et d'un autre côté, d'autres études ont démontré un rôle d'Ang1 dans le développement de l'athérosclérose. En effet, il a été démontré qu'Ang1 stimule la relâche de TNF- α , une cytokine clé qui module le processus inflammatoire de

l'athérosclérose (451). De plus, dans ces études Ang1 induit la migration des monocytes et des neutrophiles (456), deux cellules immunitaires critiques dans la progression de cette maladie, faisant de l'Ang-1 un acteur potentiel dans les mécanismes de recrutement des monocytes, en particulier dans un environnement riche en lipides (451).

Dans l'IC, des niveaux élevés d'Ang-2 ont été observés chez les patients avec une IC avec FEVG réduite (457). En fait, (Eleuteri et al. 2006) ont montré pour la première fois que des niveaux élevés de Ang2 se retrouvent dans le sérum de patients HFREF et qu'Ang2 pouvait être utilisé comme marqueur prédictif de mortalité à 1 an, sans aucune donnée sur Ang1 (457). Il serait donc important d'investiguer le rôle d'Ang1 dans l'IC et particulièrement dans l'IC avec FEVG préservée.

Ang-2, exprimée seulement au site de remodelage vasculaire, est cruciale durant l'angiogenèse qui accompagne une hypertrophie cardiaque (458). Des études montrent un niveau élevé d'Ang-2 dans le plasma chez des patients souffrant d'une hypertrophie cardiaque, en particulier durant une IC aigue qui est corrélé à un mauvais pronostic pour le patient (459-461). Une étude récente impliquant des patients avec un infarctus aigue du myocarde ayant des évènements cardiovasculaires majeurs (arythmie, cardiopathie valvulaire, rupture myocardique, IC, choc cardiogénique, et mort) a montré une diminution du niveau d'Ang1 plasmatique. Cette diminution pourrait être associée à une dysfonction endothéliale et serait un prédicteur du développement d'évènements cardiovasculaires majeurs à 1 an (409). Des études ont montré une augmentation d'Ang2 chez des patients avec un infarctus aigue du myocarde (462, 463) et des patients avec un choc cardiogénique (462) comparée aux sujets sains. De plus, l'étude de Link et al. fait état d'une diminution d'Ang1 plasmatique seulement chez les patients avec un choc cardiogénique comparé aux sujets sains. De façon intéressante, cette étude a montré une plus grande baisse d'Ang1 chez les patients avec un choc cardiogénique ayant décédé. Cette étude a cependant conclu que l'Ang2 serait un prédicteur de mortalité à 28 jours et à 1 an. (462) Également, une étude a rapporté l'Ang2 comme étant un prédicteur indépendant d'un mauvais pronostic chez les patients ayant une ADHF (460).

Le T2DM, tel que mentionné précédemment, est associé avec diverses pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et l'IC résultant d'une dysfonction endothéliale (115). Une première étude publiée en 2005 avait montré que le VEGF et l'Ang2 plasmatique, mais pas l'Ang1, étaient élevés chez les patients T2DM et associés à une

dysfonction endothéliale et l'athérosclérose (464). D'autres études ont également montré une augmentation de l'Ang2 circulant avec un ratio Ang2/Ang1 élevé (464, 465). Il a également été démontré que les niveaux élevés de glucose et d'acides gras supprimaient les effets protecteurs d'Ang1 sur l'endothélium (466).

La plupart des études montrent des augmentations du niveau d'Ang2 dans les pathologies cardiovasculaires (athérosclérose, IC avec FEVG réduite, IC aigue), mais l'Ang1 reste stable ou diminue. Il reste encore beaucoup d'ambiguïtés en ce qui concerne le lien entre l'Ang1 et les pathologies cardiovasculaires telles que l'IC. De plus, étant donné que seulement Ang1 est exprimée par les neutrophiles, il serait davantage intéressant d'investiguer le rôle d'Ang1 exprimée par ces cellules dans l'IC et le T2DM.

La surexpression d'Ang1 aurait des bénéfices au niveau des complications associées au T2DM. En effet, Ang1 pourrait aider à retarder les complications du T2DM en restaurant la fonction microvasculaire et pourrait maintenir la quiescence de certaines cellules souches adultes. Également, Ang1 pourrait accélérer la cicatrisation des plaies, retarder les complications rénales, favoriser la revascularisation au niveau de la rétine et du myocarde et restaurer la fonction pénienne (467). De ce fait, Ang1 serait un potentiel thérapeutique pour la protection vasculaire. Cependant, Ang1 a également été impliqué dans le remodelage des vaisseaux, l'induction de l'angiogenèse pathologique et l'hypertension pulmonaire, ce qui indique que des stratégies pour minimiser tout effet délétère tout en optimisant la protection des vaisseaux sont susceptibles d'être nécessaires (468).

L'Ang1 et la calprotectine sont deux protéines cytosoliques et non-granulaires jouant un rôle dans l'inflammation et les deux sont impliquées dans la pathologie de l'IC et du T2DM. Étudier la synthèse et la relâche de ses protéines permettra potentiellement de mieux comprendre la physiopathologie et les mécanismes impliqués dans l'IC et le diabète. De plus, déterminer si l'Ang1 est présente sur les NETs, en comparaison à la calprotectine (contrôle positif), pourrait apporter une information supplémentaire sur les mécanismes de relâche d'Ang1 et leur rôle potentiel dans l'IC et T2DM.

1.6 Objectifs de recherche

Depuis plusieurs années, notre laboratoire s'intéresse aux neutrophiles et leurs rôles dans diverses pathologies incluant l'insuffisance cardiaque et le diabète. Les neutrophiles sont bien connus pour la formation de NETs qui transportent des protéines antimicrobiennes et inflammatoires telles que la calprotectine, MPO et NE permettant de capturer et de tuer les pathogènes (bactéries, champignons) (182, 237, 238). Des études récentes ont démontré une augmentation de la formation de NETs dans les pathologies auto-immunes (236, 242, 296, 298) et cardiovasculaires (233, 250). De plus, les neutrophiles et les NETs sont impliqués dans l'inflammation et la dysfonction endothéliale qui sont associées à l'IC et le T2DM (233, 239, 309-312). La calprotectine et l'angiopoïétine 1 (Ang1) sont des protéines cytoplasmiques impliquées dans les activités inflammatoires des neutrophiles ayant des mécanismes de transports et de signalisation différentes. De plus, des études ont montré leur implication indépendante dans des pathologies cardiovasculaires (344, 391, 393, 409, 449). Sachant que la composition protéique des NETs varie selon le stimulus et la pathologie et que les protéines transportées par les NETs pourrait avoir un impact potentiel sur leur fonction (251, 252), nous allons étudier si les NETs peuvent transporter différentes protéines dans l'IC et le diabète comparé aux volontaires sains.

Avec ce travail de recherche, nous voulons déterminer la capacité de médiateurs inflammatoires à induire la formation de NETs par les neutrophiles isolés à partir de patients T2DM et de patients HFpEF (stables ou en décompensation aiguë (ADHFpEF)) avec ou sans T2DM. Nous nous intéressons également au rôle de l'Ang1 et de la calprotectine dans l'IC +/- T2DM et leur mécanisme de transport. Nous cherchons donc en second lieu à déterminer la capacité de ces médiateurs à induire la synthèse et la relâche d'Ang1 et de la calprotectine et en troisième lieu la capacité de liaison d'Ang1 aux NETs, en comparaison à la calprotectine, et leur rôle potentiel dans l'IC comparés aux volontaires sains.

CHAPITRE 2: ARTICLE

Your submissions

Track your submissions

Angiotensin 1 release from human neutrophils is independent from neutrophil extracellular traps (NETs)

Corresponding Author: Martin Sirois

BMC Immunology

5c4bae91-f907-4d85-ba5c-fca962e4c18d | v.1.0

Quality check in progress 16 minutes ago

Don't forget, if you have manuscripts with other systems, such as eJournalPress or Editorial Manager, you will only be able to see those manuscripts there. Still have a question? [Contact us](#)

© 2021 Springer Nature.

[About Springer Nature](#)

[Springer Nature](#)

[Help and support](#)

[Cookie Settings](#)

[Give Feedback](#)

Angiopoietin 1 release from human neutrophils is independent from
neutrophil extracellular traps (NETs)

Elcha Charles^{1,2}, Benjamin L. Dumont^{1,2}, Steven Bonneau^{1,2}, Paul-Eduard Neagoe¹,
Louis Villeneuve¹, Agnès Rake^{2,4}, Michel White^{1,3*} and Martin G. Sirois^{1,2*}

Research center, Montreal Heart Institute¹, Departments of pharmacology and physiology² and
medicine³, Faculty of medicine, and Research Center - Centre Hospitalier de l'Université de
Montréal (CHUM)⁴, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada

*Corresponding co-senior authors: Dr. Michel White and Dr. Martin G. Sirois.

Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Qc, Canada, H1T 1C8.

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

E-mail: m_white@icm-mhi.com

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

Running title: Ang1 and Neutrophil Extracellular Traps

2.1 Abstract

Background: Neutrophils induce the synthesis and release of angiopoietin 1 (Ang1), a cytosolic growth factor involved in angiogenesis and capable of inducing several pro-inflammatory activities in neutrophils. Neutrophils also synthesize and release neutrophil extracellular traps (NETs), comprised of decondensed nuclear DNA filaments carrying proteins such as neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), proteinase 3 (PR3) and calprotectin (S100A8/S100A9), which together, contribute to the innate immune response against pathogens (e.g., bacteria). NETs are involved in various pathological conditions through pro-inflammatory, pro-thrombotic and endothelial dysfunction effects and have recently been found in heart failure (HF) and type 2 diabetes (T2DM) patients. The aim of the present study was to investigate the role of NETs on the synthesis and release of Ang1 by the neutrophils in patients with T2DM and HF with preserved ejection fraction (HFpEF) (stable or acute decompensated; ADHFpEF) with or without T2DM.

Results: Our data show that at basal level (PBS) and upon treatment with LPS, levels of NETs are slightly increased in patients suffering from T2DM, HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF w/o T2DM, whereas this increase was significant in ADHFpEF + T2DM patients compared to healthy control (HC) volunteers and ADHFpEF without T2DM. We also observed that treatments with PMA or A23187 increase the synthesis of Ang1 (from 150 to 250%) in HC and this effect is amplified in T2DM and in all cohorts of HF patients. Ang1 is completely released (100%) by neutrophils of all groups and does not bind to NETs as opposed to calprotectin.

Conclusions: Our study suggests that severely ill patients with HFpEF and diabetes synthesize and release a greater abundance of NETs while Ang1 exocytosis is independent of NETs synthesis.

Key Words: angiotensin 1, neutrophil, NETs, heart failure, type 2 diabetes, calprotectin (S100A8/A9), Inflammation

2.2 Introduction

Neutrophil extracellular traps (NETs) are composed of double-stranded DNA decorated with cytosolic and granule-derived pro-inflammatory cytokines and enzymes (1). NETs are produced in response to inflammatory stimuli and carry cytoplasmic, granular and nuclear proteins (e.g. calprotectin; S100A8/A9, myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE), histones and others) (2), contributing to the innate immune response against pathogens (1, 3, 4). Although NETs were initially described as an antimicrobial mechanism of neutrophils and implicated in infectious disorders (1), other studies reported NETs involvement in the pathophysiology of non-infectious conditions such as thrombosis (5, 6), fibrosis (7, 8), inflammation (9) and cardiovascular disorders (10). Even though there are common proteins linked to NETs, the variety and quantity of proteins bound to NETs can vary depending on the stimuli and pro-inflammatory conditions (11, 12).

Heart failure (HF) is a pro-inflammatory condition, in which the magnitude of inflammation is associated with the disease severity, being maximal in acute decompensated heart failure (ADHF) patients. Lately, we and other groups reported an increase of NETs formation (NETosis), either circulating or under *in vitro* neutrophil stimulation in type 2 diabetic (T2DM) patients (13-15) and in patients suffering from HF with or without T2DM (15). HF classification is based on left ventricular ejection fraction (LVEF), which can be reduced (HF_rEF, LVEF ≤ 40%) or preserved (HF_pEF, LVEF ≥ 50%), each with distinct phenotypes (16). HF_rEF is typically associated with primary myocardial lesion (e.g. myocardial infarction) leading to inadequate contractility of the left ventricle (16). In contrast, HF_pEF is a heterogeneous and multiorgan disorder, influenced by multiple comorbidities, including obesity, hypertension and T2DM. These conditions can lead to low-grade systemic inflammation, extensive

endothelial and cardiac microvascular dysfunction, which can ultimately induce myocardial leukocytes migration, ventricular fibrosis, stiffening and dysfunction (17, 18). In these conditions, impaired angiogenesis can occur and is mediated by growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins (Ang). Over the last years, HFpEF prevalence surpassed HFrEF cases, representing now >50% of all HF patients (19, 20) and the attempts to transpose life-saving therapies from HFrEF to HFpEF have failed (21, 22). It is therefore critical to find potential treatments for these patients.

There is also an increased incidence of ADHF, defined by a worsening of stable chronic HF (23). This increases the rate of hospitalization and death in patients >65 years old, who also have a 40% prevalence of T2DM (19). The management of ADHF is different from stable HF (24), hence the importance of studying this pathology separately.

Calprotectin (S100A8/A9), a 36 kDa heterodimeric complex, is a cytosolic glycoprotein with two calcium binding of the S100 protein family and is constitutively expressed in neutrophils, monocytes, and macrophages (25-28). Calprotectin, known for its antimicrobial functions (27, 28), is carried by NETs (3) and used as an inflammatory marker in the diagnostic of non-infectious inflammatory disorders such as arthritis, bowel (29, 30) and cardiovascular diseases (e.g. myocardial infarction, unstable angina and chronic HF) (31). Angiopoietin 1 (Ang1) is a secreted 70-kDa glycoprotein constitutively expressed in the cytosol of vascular smooth muscle cells (32), platelets (33), pericytes, monocytes and neutrophils (34, 35) and a key regulator for angiogenesis, through vascular stabilisation and maturation (36). Ang1 may also play a role in endothelial dysfunction associated with cardiovascular diseases such as HF and T2DM (37, 38). Yet, it is unknown if the release of Ang1 by neutrophils is associated with NETs synthesis and release.

The objective of this study was to determine the capacity of various inflammatory mediators (LPS, PMA and A23187) to induce NETs, Ang1 and calprotectin synthesis and release, and if Ang1 can bind to NETs, using calprotectin as a positive control, from neutrophils of patients with stable or decompensated HF with or without T2DM compared with healthy control (HC) volunteers.

2.3 Results

The clinical characteristics of the study population are presented in Table 1. The study population consisted of 34 healthy control (HC) volunteers, 8 patients with T2DM and without HFpEF, 12 patients with HFpEF and with stable symptoms (7 with T2DM) and 13 patients with ADHFpEF (6 with T2DM). Most HF and ADHF patients had a HF caused by cardiomyopathy. All patients with stable HF and a majority of patients with ADHF + T2DM suffered from hypertension. There was no significant difference in LV ejection fraction between stable or ADHF patients with or without diabetes. All T2DM patients were treated with statins. The majority (>70%) of stable HF or ADHF patients were treated by oral anticoagulants.

NETs release by neutrophils

The rate of NETs synthesis and release for all 6 cohorts (HC, T2DM, stable HFpEF ± T2DM and ADHFpEF ± T2DM patients) is presented in Figure 1. The basal value of NETs (quantified as dsDNA) released by neutrophils from HC treated with PBS (basal control) for 3 hours was 63.6 ± 9.6 ng/ 5×10^6 neutrophils/mL (Figure 1). In HC, we observed a significant 4.2-fold (265 vs 63.6 ng/mL) and 9.4-fold (597 vs 63.6 ng/mL) NETs increase post-stimulation with PMA and A23187 respectively compared to PBS, whereas LPS did not increase NETs release. A similar pattern was observed in PMA- and A23187-stimulated neutrophils from T2DM patients, stable HFpEF ± T2DM and ADHFpEF without T2DM (Figure 1). Basal and LPS-stimulated neutrophils from ADHFpEF + T2DM patients released significantly more NETs (2.4-fold (152 vs 63.6 ng/mL) and 2.9-fold (199 vs 63.6 ng/mL) respectively), while the A23187 stimulation released a significant lower quantity of NETs (47% decrease; 316 vs 597 ng/mL) compared to HC. When comparing ADHFpEF w/o T2DM vs ADHFpEF + T2DM, we observed that NETs

release increased in basal condition (3.2-fold; 152 vs 47.4 ng/mL) and LPS-stimulated neutrophils (2.5-fold; 199 vs 81.1 ng/mL).

Angiopoietin 1 release, intracellular content and NETs binding in neutrophils

We assessed the Ang1 release, intracellular content and binding capacity to released NETs in isolated neutrophils from all 6 cohorts upon stimulation with PBS, LPS, PMA and A23187 for 3 hours. The post-isolation intracellular content of Ang1 (T0) was 112 ± 11 pg/ 5×10^6 neutrophils/mL from HC. There was a decrease (non-significant) in Ang1 concentrations at T0 from neutrophils of all five patients' cohorts (Figure 2). After a 3-hour treatment with PBS, LPS, PMA or A23187, the Ang1 content released by neutrophils from all cohorts was higher than before treatment (T0), but only significant in PBS- (1.56-fold; 175 vs 112 pg/mL), PMA- (1.98-fold; 222 vs 112 pg/mL) and A23187- (1.80-fold; 202 vs 112 pg/mL) stimulated neutrophils from HC. The concentration of Ang1 detected intracellularly or bound to NETs following a 3-hour stimulation with all agonists in all 6 cohorts were below the lower limit of quantitation (LLOQ; <156 pg/mL). Therefore, the total amount of Ang1 detected at 3 hours post-treatment was considered as being almost completely released, indicating a significant increase of Ang1 synthesis (up to 1.98-fold; 202 vs 112 pg/mL) in neutrophils from HC, and this effect was amplified in PMA and A23187 stimulated neutrophils from T2DM patients (up to 2.91-fold; 201 vs 69 pg/mL). In all other cohorts, independently from the agonists used, Ang1 synthesis also increased (up to 3.18-fold; 216 vs 101 pg/mL in HFpEF PMA-stimulated neutrophils) (Figure 2).

Calprotectin release, intracellular content and NETs binding in neutrophils

We assessed the calprotectin (S100A8/S100A9) release, intracellular content and binding capacity to released NETs in isolated neutrophils from all 6 cohorts upon stimulation with PBS,

LPS, PMA, and A23187 for 3 hours. The post-isolation calprotectin intracellular content (T0) in neutrophils from HC was $55.9 \pm 8.7 \mu\text{g}/5 \times 10^6$ neutrophils/mL, while a higher concentration (non-significant) was observed for all patient's cohorts (Figure 3).

In all 6 cohorts and independently from the agonist used, the calprotectin released was significantly lower than the initial quantity found in post-isolation neutrophils (T0). None of the agonists significantly increased the calprotectin release when compared to unstimulated neutrophils (PBS) (Figure 3A).

In all 6 cohorts and independently from the agonist used, the intracellular calprotectin was lower than the initial quantity found in post-isolation neutrophils (T0). PMA-stimulated neutrophils from HC, T2DM and ADHFpEF increased significantly (up to 8.8-fold; 99 vs 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in ADHFpEF) the calprotectin intracellular content compared to PBS. A23187-stimulated neutrophils from HC significantly increased the intracellular calprotectin (2.6-fold; 39.6 vs 15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HFpEF + T2DM had a significantly lower concentration of intracellular calprotectin (55% decrease; 22.8 vs 51.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to T2DM patients, whereas in ADHFpEF patients it increased significantly (2.0-fold; 79.5 vs 39.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to HC. Finally, we observed a significant increase (2.7-fold; 62.3 vs 22.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the calprotectin neutrophil content from ADHFpEF + T2DM compared to HFpEF + T2DM (Figure 3B).

In all 6 cohorts and independently from the agonist used, calprotectin was detected on NETs but was significantly lower than in the intracellular fraction post-isolation (T0). A treatment with PMA increased the calprotectin NETs binding in all cohorts by up to 15-fold in ADHFpEF (2.30 vs 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), while the A23187 stimulation provided a significant increase in HC and T2DM (up to 8-fold; 3.20 vs 0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in T2DM) compared to PBS (Figure 3C).

The total calprotectin (released + intracellular + bound to NETs) following the 3-hour neutrophil incubation with PBS or LPS was lower than post-isolation (T0) in all 6 cohorts, but only significant for PBS in HC (53% decrease; 26.5 vs 55.9 $\mu\text{g/mL}$). When stimulated with PMA for 3 hours, the total calprotectin remained unchanged compared to T0, while being significantly higher in HC (2.4-fold; 64.7 vs 26.5 $\mu\text{g/mL}$) and in ADHFpEF (6.9-fold; 108 vs 15.6 $\mu\text{g/mL}$) when compared to PBS (Figure 3D).

Imaging of Ang 1 and calprotectin localization in human neutrophils

Based on our aforementioned data, we sought to visualize whether Ang1 and calprotectin behave differently in regard to their binding to NETs, using confocal microscopy. Neutrophils isolated from HC were treated with PBS, LPS, PMA, and A23187 for 3 hours, followed by a series of incubations with antibodies detecting either Ang1 (Figure 4) or calprotectin (Figure 5).

First, we observed that in unstimulated neutrophils (PBS), there is no or marginal detection of Sytox orange (green pseudo-color) due to a very low percentage of permeabilized cell membrane and absence of intracellular DNA exposure. Treatment with LPS induced a small synthesis and release of NETs (green pseudo-color), whereas a treatment with PMA and A23187 induced a marked increase of NETs synthesis and release (Figures 4 and 5; Sytox Orange column). For the detection of Ang1 and calprotectin proteins, we observed a similar pattern, namely a marginal intracellular detection of both proteins under PBS and LPS treatments, whereas under PMA and A23187 stimulation, cell permeabilization associated to NETosis allowed the specific binding of Ang1 and calprotectin antibodies intracellularly (Figures 4 and 5; Antibody and merged columns). In addition to the detection of Ang1, calprotectin and NETs within the neutrophils, we observed that Ang1 as opposed to calprotectin does not seem to be bound to extracellular NETs (Figure 6).

2.4 Discussion

In the present study, we report that neutrophils from patients diagnosed with T2DM alone, HFpEF ± T2DM or ADHFpEF w/o T2DM present a slight NETs increase (non-significant), whereas ADHFpEF + T2DM patients have a higher significant NETs release after a 3-hour incubation with PBS (control vehicle) or LPS (a weak NETs inducer), compared to HC. In addition, ADHFpEF + T2DM patients present a lower Ang1 release from their neutrophils, while having a higher capacity to promote calprotectin release under basal (PBS) condition. Finally, in all 6 cohorts and independently from the agonist used, we observed that, while calprotectin was found to bind to the NETs web-like structures, Ang1 did not interact with NETs, suggesting that NETs are selective transporters of proteins. These data suggest that patients with symptomatic HF-pEF exhibit significant neutrophil activation and NETs release. The magnitude of NETs release is significantly increased in patients with ADHF.

NETs release from human neutrophils

It has been demonstrated that neutrophils are not just first responders to acute infections but also active contributors to low-grade chronic inflammation (39), which can be explained, in part, by their capacity to release NETs (40). NETs can be considered as a risk factor of future cardiovascular events because of their role in atherosclerosis, inflammation, and vascular thrombosis (2, 10, 41, 42). There has been little previous data on the release of NETs in the context of heart failure. More recently, we and other groups reported elevated levels of circulating NETs in T2DM patients and an increase in their neutrophil capacity in vitro to release NETs (15, 43, 44). Furthermore, we observed an increase in circulating NETs and corresponding release in HF patients, the latter reaching a maximum in HF + T2DM (15). The results from this study confirm that NETs release is significantly increased in clinical HF and more so in patients

with HF and T2DM. In this study, we used inflammatory mediators, such as LPS, PMA and A23187, targeting different signalling pathways to induce NETosis by human neutrophils (45-49). LPS, a component of gram-negative bacteria, induces NADPH oxidase (NOX)-dependent NETs formation mediated by c-Jun N-terminal kinases (JNK). LPS binds to Toll-like receptor (TLR4) on the surface of neutrophils, activating the production of reactive oxygen species (ROS) and NOX, inducing lytic NETs formation in a concentration- and NOX-dependent manner (47). Other groups have shown that LPS can also induce vital NETs formation via a NOX-independent pathway (48, 49). PMA activates the protein kinase C pathway, which induces NETosis through the ROS generating NADPH oxidase complex that contributes to the disruption of the extracellular membrane. In contrast, A23187, is a faster and robust, NADPH-independent, process dominated by a rise in intracellular calcium concentration (46, 50). This might explain why the elevation of NETs synthesis under PMA is similarly maintained in all groups, whereas we observed a reduction of NETosis in A23187-stimulated neutrophils from AFDHFpEF+T2DM patients. Since the neutrophils from these patients are as responsive as the neutrophils from other groups under PMA stimulation, this might suggest that their stimulation with a calcium ionophore (A23187) is less efficient to promote extracellular Ca^{2+} uptake and/or intracellular Ca^{2+} elevation affecting the downstream NETosis process.

In the present study, we sought to determine the ability of these inflammatory mediators to induce NETs formation by neutrophils from HC, T2DM alone, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients. Our study revealed significantly higher basal (PBS) and LPS-induced NETs release only in patients with ADHFpEF + T2DM, as compared with HC. In addition, released NETs were increased at basal level and significantly following LPS stimulation in ADHFpEF + T2DM patients vs ADHFpEF w/o T2DM, suggesting that T2DM

contributes to increase the inflammatory state in ADHFpEF patients. We did observe an increase (non-significant) in basal or LPS-induced NETs release in T2DM alone or stable HFpEF ± T2DM patients, and this might be an indicator that the management of their low-grade inflammatory condition by the current chronic therapies is not fully capable to revert the inflammatory state associated to NETosis.

The increase in NETs release seen in ADHFpEF + T2DM patients support the concept that these patients are in a state of acute thrombo-inflammation. Such status may lead to a pro-thrombotic state wherein blood vessel obstruction could result in inadequate blood supply to the heart and/or other organs. Therefore, NETs and T2DM can jointly contribute to the progression and severity of HF, leading ultimately to the ADHF condition.

Angiotensin 1 release and NETs binding

In this study, we wanted to determine if the release of Ang1 was comparable to calprotectin, since both proteins are found in the cytosol of neutrophils. We previously demonstrated that in healthy controls, Ang1 is found in the cytosol of neutrophils and can be released upon stimulation with different stimuli (35). Ang1 is an important inflammatory marker for the stabilization and maturation of blood vessels through Tie2 receptor (34, 51). Studies have shown that a decrease of circulating Ang1 levels in patients with acute myocardial infarction and major cardiovascular conditions such as arrhythmia, valvular heart disease, HF and cardiogenic shock, could be potentially associated with the magnitude of endothelial dysfunction (37, 52). In our study, we also observed a lower concentration of intracellular Ang1 in post-isolated (T0) neutrophils in all patients' cohorts. These neutrophils increase their Ang1 synthesis over a 3-hour incubation time period, yet their corresponding Ang1 concentrations never reached the levels observed in HC. Interestingly, the lowest Ang1 concentration post-incubation was

observed in both ADHFpEF + T2DM and stable HFpEF + T2DM suggesting that T2DM comorbidity is negatively impacting the capacity of neutrophils from HF patients to synthesize Ang1. This could contribute to inadequate stabilization of blood vessels, endothelial dysfunction and disease progression.

Since neither calprotectin nor Ang1 are stored in neutrophil granules or vesicles (35, 53, 54), and that calprotectin binds to NETs when released, we wanted to assess if Ang1 exocytosis was also NETs-dependent. Herein, we observed that Ang1 was not detected on the surface of extracellular NETs, either by ELISA or using confocal microscopy, suggesting that its secretion is NETs-independent in all 6 cohorts studied. This could be explained by the fact that Ang1 is not an essential bactericidal protein, like MPO, NE or calprotectin, all found on NETs. Moreover, Ang1 has been shown to bind either to Tie2 receptor and selected integrins, both expressed on cell membrane surface of neutrophils (7, 55, 56). In addition, the low concentration of Ang1 (~100-200 pg/5x10⁶ neutrophils) being released as compared to calprotectin (~5-20 µg/5x10⁶ neutrophils) could explain their membrane proximity, as observed by confocal microscopy, suggesting an autocrine agonistic activity upon its release from the neutrophils.

Calprotectin release and NETs binding

Calprotectin (S100A8/A9) is largely expressed in the cytoplasm of neutrophils and is mainly released in an infectious setting. Moreover, calprotectin can bind to NETs (3) and exerts its main function, namely anti-microbial, in combination with other NETs-bound proteins such as MPO and NE, while NETs are keeping pathogens trapped, thus leading to increased efficiency in pathogens removal.

Calprotectin has also recently been shown to be involved in cardiovascular diseases, following its release by inflammatory mediators (57, 58). Previous studies reported a higher

serum or plasma calprotectin level in patients with chronic HF and was associated with other inflammatory markers such as C-reaction protein (CRP), interleukin IL-6, IL-8 and TNF- α (31, 59, 60). In the present study, we observed an increase of intracellular calprotectin in neutrophils post-isolation (T0) from T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients as compared to HC, whereas in stable HFpEF \pm T2DM the calprotectin initial content remained unchanged. However, there was no additional calprotectin synthesis after 3h of stimulation in all 6 cohorts and independently from the agonists used. The increase of endogenous calprotectin observed in freshly isolated neutrophils from these patients could indicate an increased inflammatory status, thereby contributing to the progression of heart failure.

The levels of released calprotectin were significantly lower than those seen at T0, but interestingly, there was less calprotectin released from the neutrophils of patients with T2DM and HFpEF + T2DM after treatment with PMA contrary to what was observed after stimulation with A23187. Typically, A23187 induces a rapid and robust extracellular DNA release, reaching a plateau within 3 - 4h, whereas NETs formation induced by PMA is slower and reaching maximal extracellular DNA after 4 - 6h (50). Since calprotectin is present in high concentration in the cytosol but not in the granules, treatment with a calcium ionophore might favor its higher release compared to PMA stimuli in the neutrophils from the patients.

After 3h of stimulation and in absence of agonist stimulation (PBS), we observed in all 6 cohorts that the level of calprotectin was reduced by 40 to 85% compared to corresponding T0 values. In addition, even after stimulation with LPS, PMA or A23187 agonists, the levels of calprotectin remained either below or comparable to T0 values. Thus, we hypothesized that this decrease could be associated to calprotectin degradation by the proteasome. However, when using the proteasome inhibitor (MG132; 10 μ M) (61), it did not prevent the reduction of

intracellular calprotectin concentration, neither the total concentration of calprotectin (data not shown). One possibility might be that oxidative post-translational modifications of calprotectin makes it a target for proteasome-independent proteolysis (62).

As previously described (1, 3), we observed that a fraction (up to 5.3%) of the total calprotectin detected at 3h post-incubation was bound to NETs as observed by ELISA and confocal microscopy (Figures 3 and 5). Only NETs produced by PMA and A23187 bound more calprotectin, since those two agonists induced a higher NETs release in all cohorts (Figure 1). Interestingly, in HC and T2DM patients, A23187 induced the release of mostly web-like NETs as seen in Figure 3, and this conformation bound more calprotectin than the PMA-mediated NETs synthesis, localized mostly near the cells. This could be explained by the fact that NETs web-like structures are observed in microbial trapping, thus supporting the calprotectin antimicrobial role (1, 63, 64).

Study limitations

This study consisted of a small sample size of patients with various duration, etiology, and severity of HF. Clinically relevant information such as the duration of diabetes, glycemic control, and the concomitant presence of atherosclerotic heart disease were not readily available. In addition, the various medication might have an impact on the observed results. In vitro neutrophil experiments were limited to stimulation with few agonists and to the measure of Ang1 and calprotectin. Future studies warrant the inclusion of other cytokines and higher number of patients.

2.5 Conclusions

In our study, NETs released by isolated neutrophils upon stimulation with selected agonists were significantly increased in ADHFpEF + T2DM when compared to healthy control volunteers. In addition, the release of Ang1 is independent from NETosis and not affected by diabetes or heart failure conditions. On the other side and as expected, calprotectin does bind to NETs, with the constitutive basal levels of calprotectin tending to increase in neutrophils from T2DM and ADHFpEF ± T2DM patients. Since neutrophils from ADHFpEF + T2DM have a higher capacity to release NETs under basal condition, their capacity to bind calprotectin might further exacerbate NETs-mediated pro-inflammatory activities in these patients.

2.6 Methods

Population

This was a prospective non-randomized non-interventional study including stable HFpEF or ADHFpEF, with or without T2DM, compared with T2DM patients and HC without any heart pathology. Six different cohorts were recruited at the Montreal Heart Institute (MHI): 1) HC (n=34), 2) T2DM (n=8), 3) stable HFpEF (n=5), 4) stable HFpEF+T2DM (n=7), 5) ADHFpEF (n=7) and 6) ADHFpEF+T2D (n=6). Blood collection from all participants was performed at the MHI. The study has been approved by the MHI's Research Ethics Committee and performed with the accordance of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all subjects prior to the study (Montreal, QC, Canada; ethics No. ICM#01-069 and No. ICM #12-1374).

Selection criteria of healthy control volunteers and patients

Healthy controls (HC) recruited in this study were enrolled assuming they had no significant medical conditions and were not treated by any anti-inflammatory medication for at least 14 days before blood collection. T2DM patients with no symptoms or signs of HF were recruited from the *Clinique d'Endocrinologie de Montréal*. HFpEF and ADHFpEF patients with NYHA classification I to IV symptoms were recruited from the MHI heart failure clinic and from the emergency room (ER) or HF care units, respectively. These patients were classified as HFpEF if their LVEF was $\geq 50\%$ (65-67), as documented by contrast ventriculography, magnetic resonance imaging, radionuclide ventriculography or echocardiography assessed within the previous 12 months and if no significant cardiac events occurred since the assessment of LVEF (66). These patients were optimally treated on stable doses of A-II modulating agents, beta-blocker, and mineralo-corticoid antagonist agents unless not tolerated or contra-indicated. In

addition to the previous inclusion criteria outlined above, patients with HF + T2DM required an HbA1c <10% and good glycaemic control by any available hypoglycaemic medications and treated with secondary preventive medication as per current guidelines. The most significant exclusion criteria included the presence of severe chronic pulmonary disease, chronic active inflammatory disease, severe renal failure (creatinine >250 µmol/L), liver damage (transaminases ≥3-fold upper normal values) and ongoing malignancy. Other exclusion criteria included recent myocardial infarction, stroke, or cardiac surgery (<3 months). All participants having ongoing and/or recent infection within 2 weeks prior to the study were excluded from this study.

Study protocol – plasma, serum and neutrophil collection

Venous blood from all participants was collected in 30 mL syringes (containing 5 mL acid citrate dextrose for 25 mL whole blood). Neutrophils were isolated using the Ficoll-Paque gradient method, as previously described (68, 69). Upon isolation, neutrophils were resuspended in phenol-free RPMI-1640 medium (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) supplemented with 1) 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 2) 1% penicillin/streptomycin/ Glutamax (VWR Intl., Montreal, QC, Canada), 3) 1mM CaCl₂ (BDH Chemicals, Toronto, ON, Canada) and 4) 5% FBS (Fetal Bovine serum; VWR) (termed complete RPMI). Contamination by PMBCs was less than 0.1% as determined by morphological analysis and flow cytometry. Cell viability of neutrophils were greater than 98%, as assessed by Trypan blue dye exclusion assay.

NETs production and quantification by fluorometric assays

Isolated neutrophils (5x10⁶/ml) were added to 12-well plates and incubated in complete RPMI at 37°C for 3 hours with either PBS-control buffer, LPS (100 nM; Escherichia coli O111:B4;

Sigma), PMA (25 nM; Calbiochem, La Jolla, CA, USA) or A23187 (5 μ M; Calbiochem). Neutrophils were carefully washed two times with PBS 1X, and nuclease S7 (Sigma) was added for 15 min at 37°C, 5% CO₂ to release NETs bound to the external surface of neutrophils with no or minor loss of NET structure and activity. The reaction was stopped with 10 mM EDTA (Sigma), and the supernatant was centrifuged at 300g for 5 min to remove cell debris. NETs were quantified using Quant-IT PicoGreen dsDNA Assay Kits (catalog no. P7589; Invitrogen, Eugene, OR).

Localisation and release of Ang1 and calprotectin by ELISA

The intracellular Ang1 and calprotectin concentrations in neutrophils (5×10^6 cells/mL) were determined either immediately after isolation (T=0), or upon agonists (PBS, LPS, PMA or A23187) stimulation in 6-well plates for 3 hours at 37°C, 5% CO₂. The supernatants were collected and centrifuged at 300g for 5 min to remove cell debris. Neutrophils were then carefully washed two times with PBS, and DNase I (Sigma) was added for 30 min at 37°C, 5% CO₂. The supernatant was collected in 10 mM EDTA to stop the reaction and centrifuged at 300g for 5 min to remove cell debris. A solution containing complete RPMI + 1% Triton was added to the remaining adhered neutrophils which were then removed using a cell lifter, homogenized by vortex mixing and centrifuged at 18 000g for 10 min. The cell membranes pellet was discarded and the supernatant was used for intracellular content measures. All samples were stored at -80°C for further Ang1 quantification using ELISA DuoSet kits (R&D System). Since the concentration of Ang1 was too low for direct detection by ELISA, all samples were concentrated 5-fold by evaporating all the water (1 mL) from the samples using a SpeedVac and resuspending the dry fraction in 200 μ L of complete RPMI prior to their quantification.

Localisation of calprotectin and Ang1 on NETs by confocal microscopy

Neutrophils ($1 \times 10^6/\text{mL}$) in complete RPMI were incubated in 35 mm petri dishes with 14 mm microwell insert (MatTek; #P35G-1.0-14-C Ashland, MA, USA) for 3 hours at 37°C , 5% CO_2 with different agonists (PBS, PMA, LPS and A23187). After carefully removing the supernatant, 1% BSA (Bovine serum albumin) was added for 30 min at 37°C , 5% CO_2 . Primary antibodies (rabbit anti-human Ang1 (1:100) and mouse anti-human S100A8/A9 (1:20)), IgG isotype control (rabbit or mouse (both 1:200)) were added directly for 30 min at 37°C , 5% CO_2 , followed by a gentle wash with HBSS 1X. Subsequently, secondary antibodies (Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor 488 conjugated rabbit anti-mouse (both $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)) were added and incubated for 30 min at 37°C , 5% CO_2 , followed by two washes with HBSS 1X. A fluorescent nucleic acid stain detecting double-stranded DNA in membrane disrupted cells (NETs) (Sytox Orange; 1:5000, Life Technologies), and WGA (Wheat germ agglutinin; $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, ThermoFisher) to detect cell membrane were added. Images (Z stack) were obtained by confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss).

Statistical Analysis

The data are presented as mean \pm SEM. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.2. Groups were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test for multiple comparisons. The results were considered significant if p values were < 0.05 .

2.7 References

1. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
2. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K. NETopathies? Unraveling the Dark Side of Old Diseases through Neutrophils. *Front Immunol*. 2016;7:678.
3. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacker W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000639.
4. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*. 2010;12(12-13):928-36.
5. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136-44.
6. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819-35.
7. Law SM, Gray RD. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *J Inflamm (Lond)*. 2017;14:29.
8. Yoo DG, Floyd M, Winn M, Moskowitz SM, Rada B. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol Lett*. 2014;160(2):186-94.
9. Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015;14(7):633-40.
10. Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res*. 2017;120(4):736-43.
11. Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun*. 2014;6(6):765-79.
12. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-47.
13. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):497-503.
14. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*. 2015;21(7):815-9.
15. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe PE, Dumas E, Rakel A, White M, et al. CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *Immunohorizons*. 2019;3(8):378-88.
16. Pathophysiology and management of heart failure. *Clinical Pharmacist*. 2018.
17. Sorop O, Heinonen I, van Kranenburg M, van de Wouw J, de Beer VJ, Nguyen ITN, et al. Multiple common comorbidities produce left ventricular diastolic dysfunction associated with coronary microvascular dysfunction, oxidative stress, and myocardial stiffening. *Cardiovasc Res*. 2018;114(7):954-64.

18. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263-71.
19. Cohen-Solal A, Laribi S, Ishihara S, Vergaro G, Baudet M, Logeart D, et al. Prognostic markers of acute decompensated heart failure: the emerging roles of cardiac biomarkers and prognostic scores. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(1):64-74.
20. Bloom MW, Greenberg B, Jaarsma T, Januzzi JL, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17058.
21. Chandra A, Vaduganathan M, Lewis EF, Claggett BL, Rizkala AR, Wang W, et al. Health-Related Quality of Life in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: The PARAGON-HF Trial. *JACC Heart Fail*. 2019;7(10):862-74.
22. Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Angiotensin-Nepriylsin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1609-20.
23. Joseph SM, Cedars AM, Ewald GA, Geltman EM, Mann DL. Acute decompensated heart failure: contemporary medical management. *Tex Heart Inst J*. 2009;36(6):510-20.
24. Raj L, Maidman SD, Adhyaru BB. Inpatient management of acute decompensated heart failure. *Postgrad Med J*. 2020;96(1131):33-42.
25. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
26. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol*. 1996;49(2):M74-9.
27. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003;170(6):3233-42.
28. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):28-37.
29. Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*. 2004;344(1-2):37-51.
30. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
31. Bruhn LV, Lauridsen KG, Schmidt AS, Rickers H, Bach LF, Lofgren B, et al. Elevated calprotectin in patients with atrial fibrillation with and without heart failure. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77(3):210-5.
32. Adamis AP, Berman AJ. Chapter 70 - Inhibition of angiogenesis. In: Levin LA, Albert DM, editors. *Ocular Disease*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2010. p. 544-53.
33. Li J-J, Huang Y-Q, Basch R, Karparkin S. Thrombin Induces the Release of Angiopoietin-1 from Platelets. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;85:204-6.
34. 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):1161-9.
35. Neagoe PE, Brkovic A, Hajjar F, Sirois MG. Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms. *Growth Factors*. 2009;27(6):335-44.
36. Azzi S, Gavard J. [Blood vessels in cancer: can't stop whispering]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(4):408-14.

37. Liu KL, Lin SM, Chang CH, Chen YC, Chu PH. Plasma angiopoietin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction - a pilot study. *Int J Cardiol.* 2015;182:155-60.
38. Link A, Poss J, Rbah R, Barth C, Feth L, Selejan S, et al. Circulating angiopoietins and cardiovascular mortality in cardiogenic shock. *Eur Heart J.* 2013;34(22):1651-62.
39. Caielli S, Banchereau J, Pascual V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2012;24(6):671-7.
40. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, Jimenez-Gomez Y, Arias-de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, et al. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun.* 2017;82:31-40.
41. Mozzini C, Garbin U, Fratta Pasini AM, Cominacini L. An exploratory look at NETosis in atherosclerosis. *Intern Emerg Med.* 2017;12(1):13-22.
42. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 2017;23(3):279-87.
43. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine.* 2015;21(7):815-9.
44. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica.* 2014;52(3):497-503.
45. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol.* 1996;59(2):229-40.
46. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;92(4):841-9.
47. Khan MA, Farahvash A, Douada DN, Licht JC, Grasemann H, Swezey N, et al. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Sci Rep.* 2017;7(1):3409.
48. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386-93.
49. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-94.
50. Sofoluwe A, Bacchetta M, Badaoui M, Kwak BR, Chanson M. ATP amplifies NADPH-dependent and -independent neutrophil extracellular trap formation. *Scientific Reports.* 2019;9(1).
51. Jousen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, Qin W, Qaum T, Xu Q, et al. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol.* 2002;160(5):1683-93.
52. Chen S, Guo L, Chen B, Sun L, Cui M. Association of serum angiopoietin-1, angiopoietin-2 and angiopoietin-2 to angiopoietin-1 ratio with heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Exp Ther Med.* 2013;5(3):937-41.
53. John B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol.* 1997;50(3):113-23.

54. Lusitani D, Malawista SE, Montgomery RR. Calprotectin, an Abundant Cytosolic Protein from Human Polymorphonuclear Leukocytes, Inhibits the Growth of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*. 2003;71(8):4711-6.
55. Cascone I, Napione L, Maniero F, Serini G, Bussolino F. Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J Cell Biol*. 2005;170(6):993-1004.
56. Weber CC, Cai H, Ehrbar M, Kubota H, Martiny-Baron G, Weber W, et al. Effects of protein and gene transfer of the angiopoietin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization. *J Biol Chem*. 2005;280(23):22445-53.
57. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Calprotectin and cardiovascular events. A narrative review. *Clin Biochem*. 2014;47(12):996-1001.
58. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*. 2012;4(1):31-40.
59. Jensen LJ, Kistorp C, Bjerre M, Raymond I, Flyvbjerg A. Plasma calprotectin levels reflect disease severity in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(5):999-1004.
60. Ma LP, Haugen E, Ikemoto M, Fujita M, Terasaki F, Fu M. S100A8/A9 complex as a new biomarker in prediction of mortality in elderly patients with severe heart failure. *Int J Cardiol*. 2012;155(1):26-32.
61. Bachmann MP, Riva M, He Z, Källberg E, Ivars F, Leanderson T. Human S100A9 Protein Is Stabilized by Inflammatory Stimuli via the Formation of Proteolytically-Resistant Homodimers. *PLoS ONE*. 2013;8(4).
62. Stephan JR, Yu F, Costello RM, Bleier BS, Nolan EM. Oxidative Post-translational Modifications Accelerate Proteolytic Degradation of Calprotectin. *Journal of the American Chemical Society*. 2018;140(50):17444-55.
63. Chatzikonstantinou M, Konstantopoulos P, Stergiopoulos S, Kontzoglou K, Verikokos C, Perrea D, et al. Calprotectin as a diagnostic tool for inflammatory bowel diseases. *Biomed Rep*. 2016;5(4):403-7.
64. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008;319(5865):962-5.
65. Grodin JL, Philips S, Mullens W, Nijst P, Martens P, Fang JC, et al. Prognostic implications of plasma volume status estimates in heart failure with preserved ejection fraction: insights from TOPCAT. *Eur J Heart Fail*. 2019.
66. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, et al. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2014;370(15):1383-92.
67. Selvaraj S, Claggett B, Shah SJ, Anand I, Rouleau JL, O'Meara E, et al. Prognostic Value of Albuminuria and Influence of Spironolactone in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail*. 2018;11(11):e005288.
68. 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):1523-30.
69. Haddad LE, Sirois MG. Angiopoietin-1 upregulates de novo expression of IL-1beta and IL-1-Ra, and the exclusive release of IL-1-Ra from human neutrophils. *PLoS One*. 2014;9(2):e88980.

2.8 Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study has been approved by the MHI's Research Ethics Committee and performed with the accordance of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all subjects prior to the study (Montreal, QC, Canada; ethics No. ICM#01-069 and No. ICM #12-1374).

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-97943 to MGS), *Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal* (FICM) (to MGS). BV was recipient of a fellowship from FRQS, MW is the recipient of the Carolyn and Richard Renaud Endowed Research Chair in Heart Failure of the Montreal Heart Institute.

Authors' contributions

EC recruited healthy control volunteers, performed the experiments and data analyses and was a major contributor in writing the manuscript. BLD participated to the recruitment of patients and analyzed clinical data. SB participated to patient's recruitment and analyzed clinical data. PEN supervised EC and revised the manuscript. LV is the confocal microscopy platform operator, providing the image capture and helping with the analyses. AR helped with the diabetic patients' recruitment and with the data interpretation regarding those patients. MW is the co-PI

of this study and the co-supervisor of EC and helped with the recruitment of heart failure patients and with the manuscript writing. MGS is the PI of this study and the principal supervisor of EC and helped with the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Not applicable

2.9 Figure and Table Legends

Figure 1. NETs release by neutrophils. Isolated neutrophils ($5 \times 10^6/\text{mL}$) from HC, T2DM, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients were incubated at 37°C for 3 hours with PBS (control vehicle) and agonists, LPS (100 nM), PMA (25 nM), or A23187 (5 μM). NETs were quantified using Quant-IT PicoGreen dsDNA detection kit. Data shown as mean \pm SEM. Significance of data is indicated by $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$ compared with PBS respectively and by $^\dagger p < 0.05$, $^\ddagger p < 0.01$, $^\text{††} p < 0.001$ compared with corresponding treatment of HC. HC (n=28-32), T2D (n=8), stable HFpEF (n=5), stable HFpEF + T2DM (n=6), ADHFpEF (n=6-7), ADHFpEF + T2DM (n=5-6).

Figure 2: Angiopoietin 1 release from neutrophils. Isolated neutrophils ($5 \times 10^6/\text{mL}$) from HC, T2DM, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients were incubated at 37°C for 3 hours with different agonists (PBS control, PMA, LPS and A23187). By ELISA, we quantified Ang1 from unstimulated neutrophils (T0) and stimulated neutrophils. $^\text{\$}P < 0.05$ and $^\text{\$\$}P < 0.01$ vs T0.

Figure 3: Calprotectin synthesis and release from neutrophils. Isolated neutrophils ($5 \times 10^6/\text{ml}$) from HC, T2DM, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients were incubated at 37°C for 3 hours with different agonists (PBS control, PMA, LPS and A23187). By ELISA, we quantified calprotectin from unstimulated neutrophils (T0) and stimulated neutrophils. Total calprotectin corresponds to the addition of calprotectin released, intracellular and bound to NETs. $^\text{\$}P < 0.05$, $^\text{\$\$}P < 0.01$ and $^\text{\$\$\$}P < 0.001$ vs T0, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ vs PBS, $^\dagger P < 0.05$ vs HC-corresponding agonist, $^\text{\text{€}}P < 0.05$ vs T2DM-corresponding agonist and $^\text{\text{¥}}P < 0.01$ vs HFpEF + T2DM.

Figure 4. Ang1 is released independently from NETs. Neutrophils from HC subjects were stimulated with PBS, LPS (100 nM), PMA (25 nM), or A23187 (5 μ M) for 3h to induce NETosis. Following stimulation, neutrophils were incubated with a primary unconjugated Ab (Rabbit α -human Ang1), followed by an incubation with a conjugated secondary Ab (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit; white). For the negative control, neutrophils were incubated only with the secondary Ab (blue boxes). Neutrophils were labeled with wheat germ agglutinin (conjugated with Alexa 647; red) and NETs were labeled with SYTOX Orange (green pseudo-color). Maximum intensity projection from acquired Z-stack were obtained by confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss) using a Plan Apochromat 40x/1.3 oil DIC objective.

Figure 5. Calprotectin (S100A8/A9) binds to NETs. Neutrophils from HC subjects were stimulated with PBS, LPS (100 nM), PMA (25 nM), or A23187 (5 μ M) for 3h to induce NETosis. Following stimulation, neutrophils were incubated with a primary unconjugated Ab (mouse α -S100A8/A9), followed by followed by an incubation with a conjugated secondary Ab (Alexa Fluor 488 anti-mouse; white). For the negative control, neutrophils were incubated only with the secondary Ab (blue boxes). Neutrophils were labeled with wheat germ agglutinin (conjugated with Alexa 647; red) and NETs were labeled with SYTOX Orange (green pseudo-color). Maximum intensity projection from acquired Z-stack were obtained by confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss) using a Plan Apochromat 40x/1.3 oil DIC objective.

Figure 6. Ang1 and calprotectin interaction with NETs induced by PMA and A23187. These images are enlarged areas of the “Merged (3 images)” columns (PMA and A23187) from Figures 2 (Ang1) and 3 (calprotectin). We observe that Ang1 is mainly detected around the cells

surface and does not interact with NETs, whereas calprotectin is detected either in the cells or on the NETs web-like structures.

Table 1. Baseline patients' characteristics. HC, healthy controls; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; ADHF, acute decompensated heart failure; T2DM, type-2 diabetes mellitus; NYHA, New York Health Association; LVEF, left ventricular ejection fraction; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; DPP-4, dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, glucagon-like peptide 1; SGLT2, sodium-glucose co-transporter-2. Continuous variables are shown as mean \pm standard error mean and categorical variables as number (%). Anti-platelets included aspirin, clopidogrel, prasugrel, or ticagrelor or a combination of these. *p < 0.05 vs T2DM

2.10 Figures and tables

Figure 1

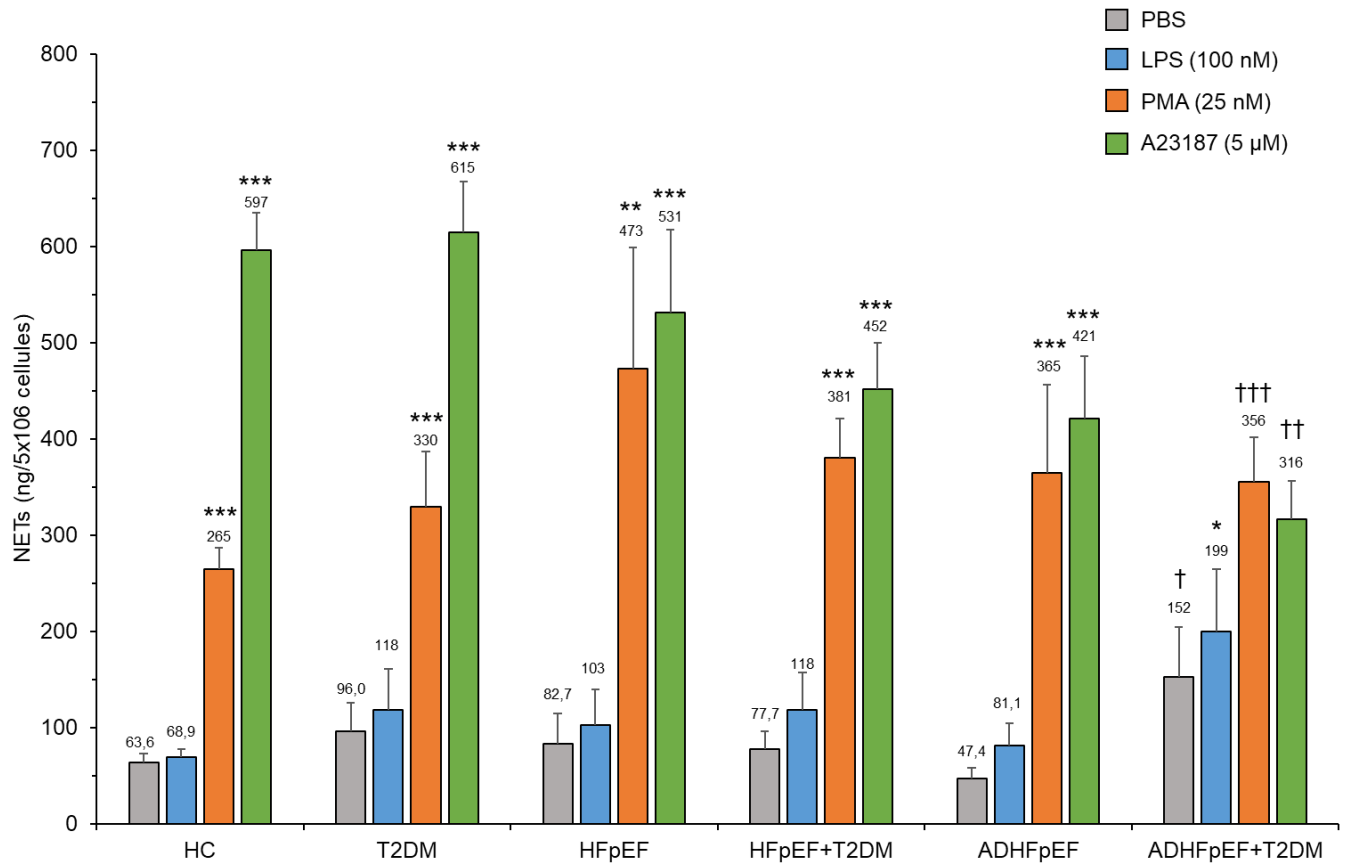


Figure 2

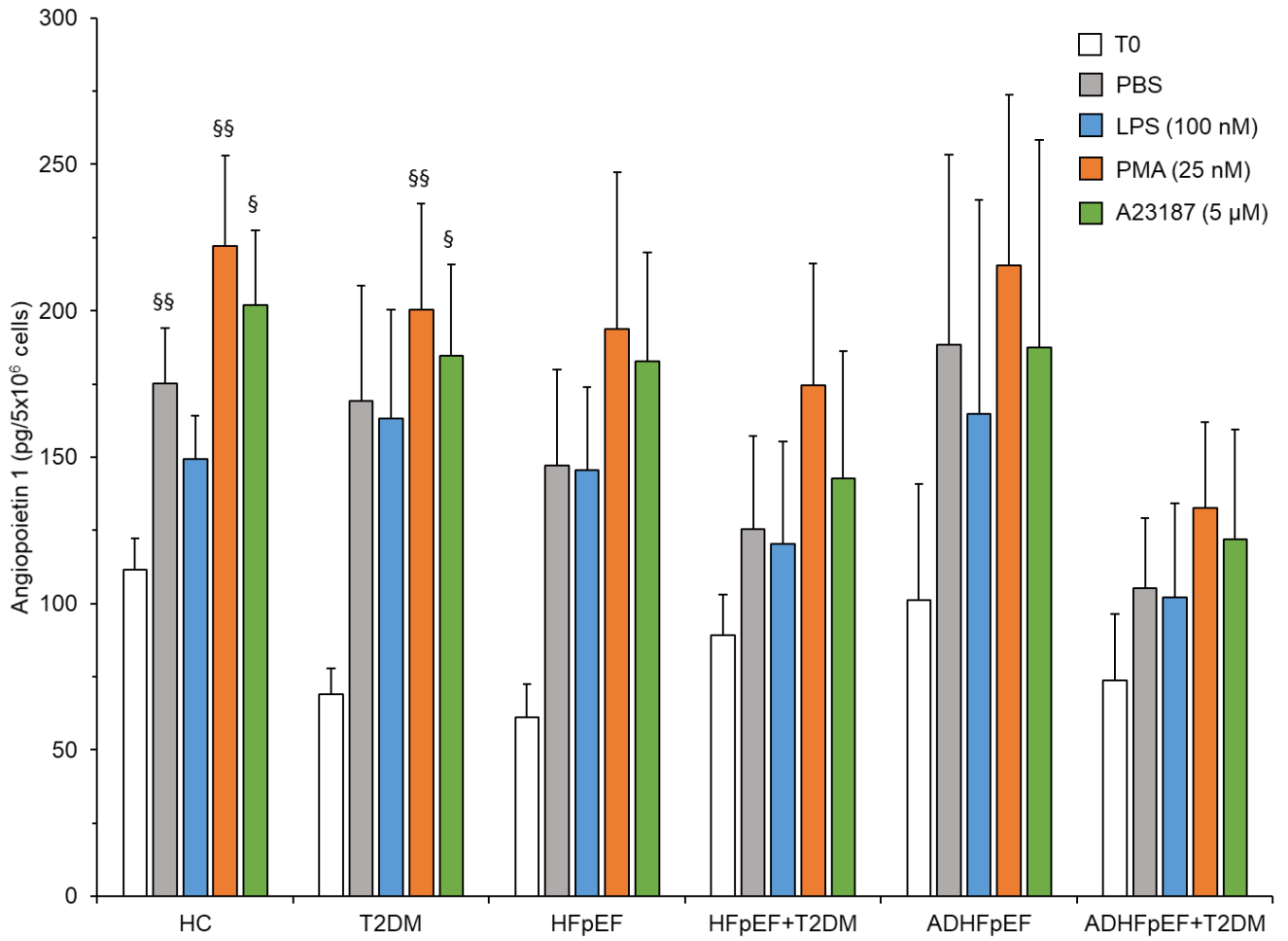
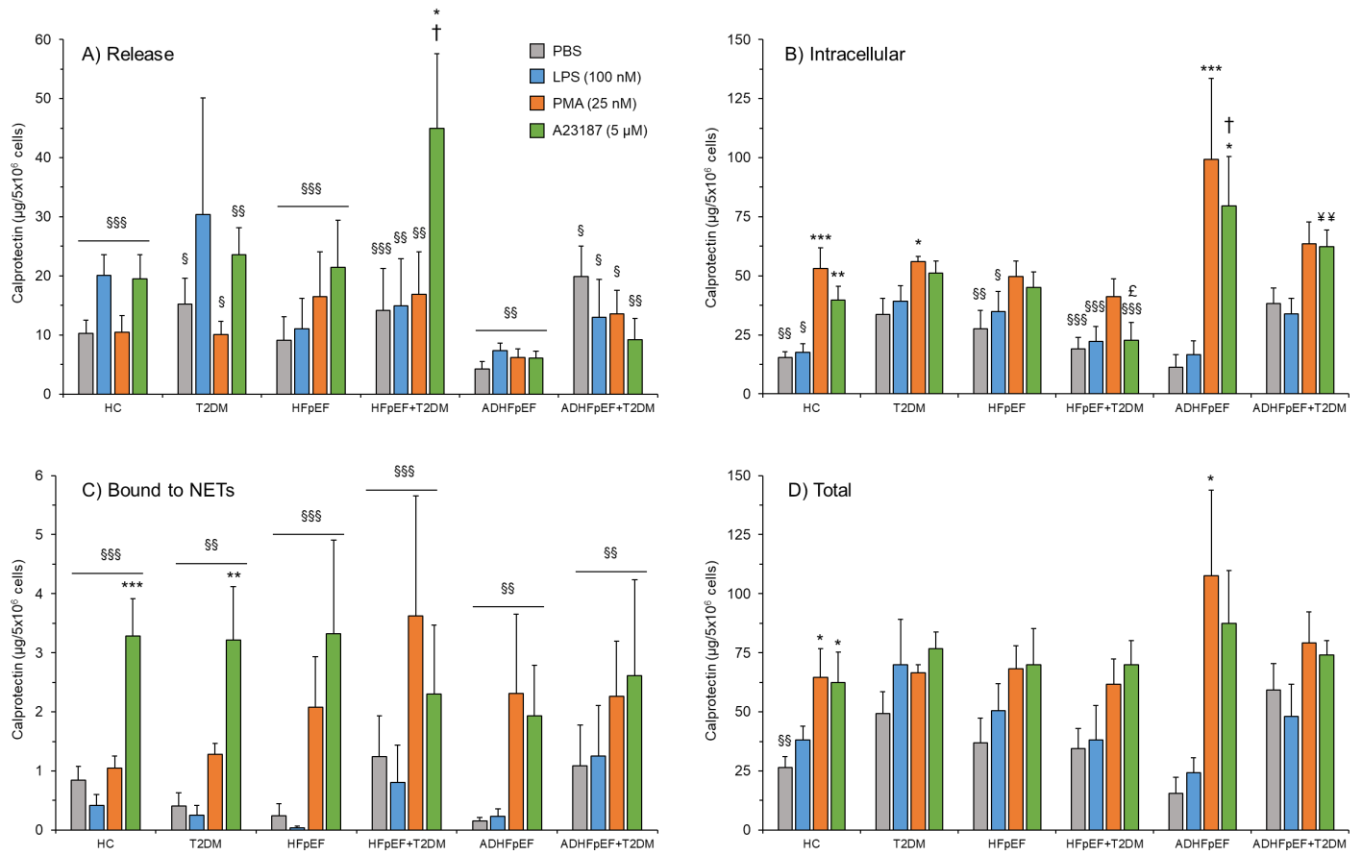


Figure 3



	HC	T2DM	HFpEF	HFpEF+T2DM	ADHFpEF	ADHFpEF+T2DM
T0 (μg/5x10 ⁶ cells)	55.9 ± 8.7	95.5 ± 36.2	62.6 ± 7.6	63.3 ± 4.4	105 ± 40	102 ± 41

Figure 4

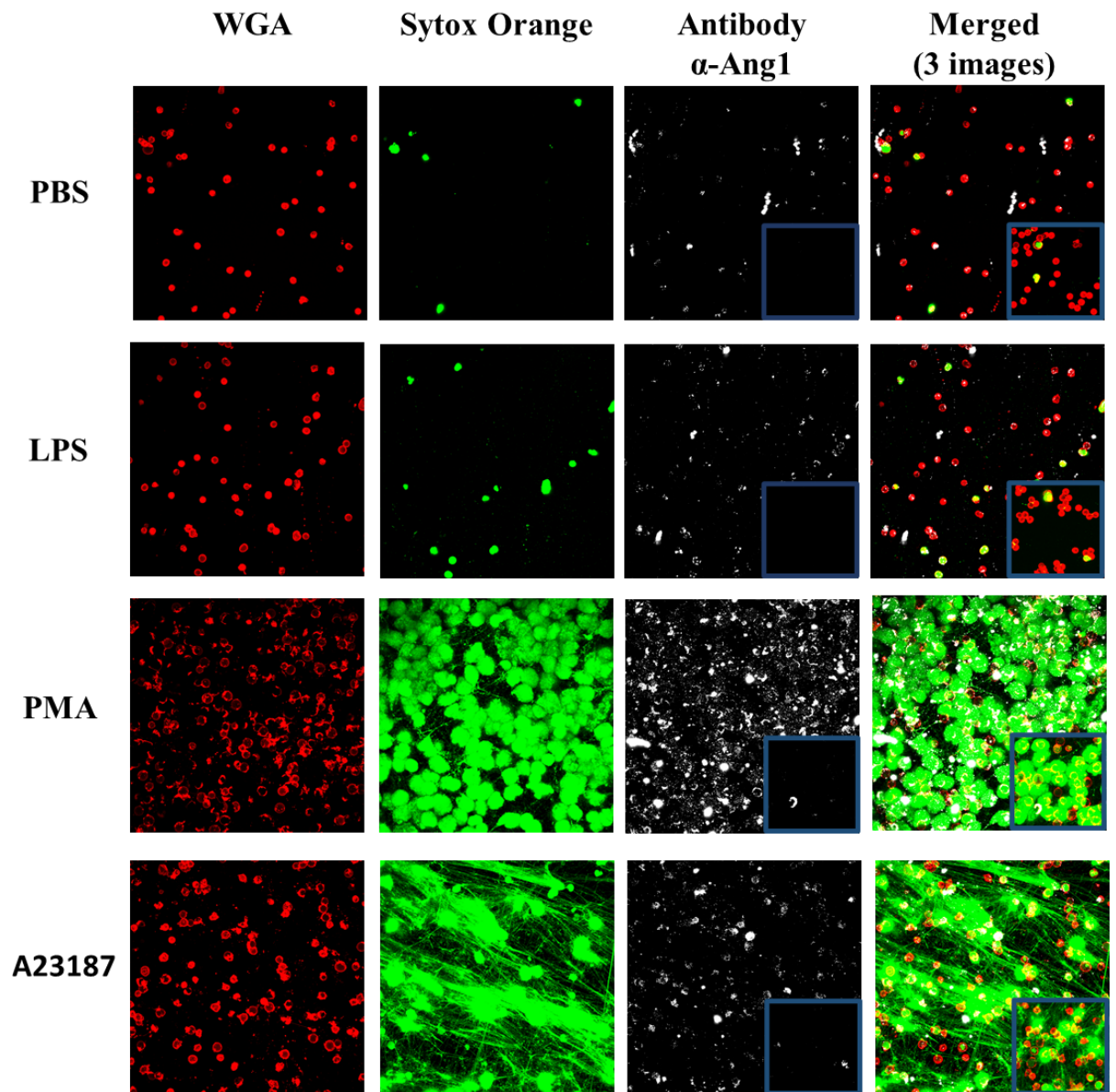


Figure 5

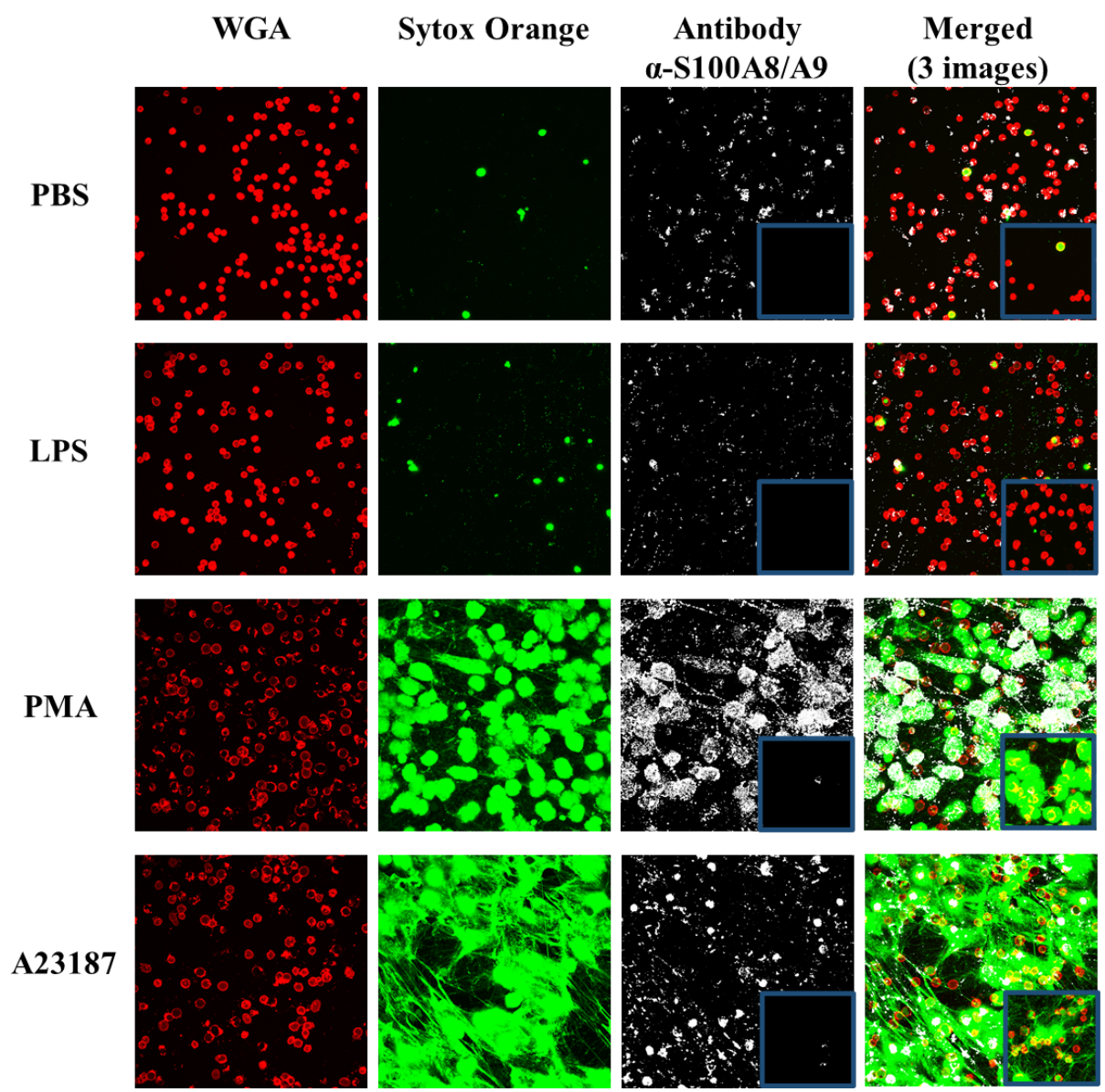


Figure 6

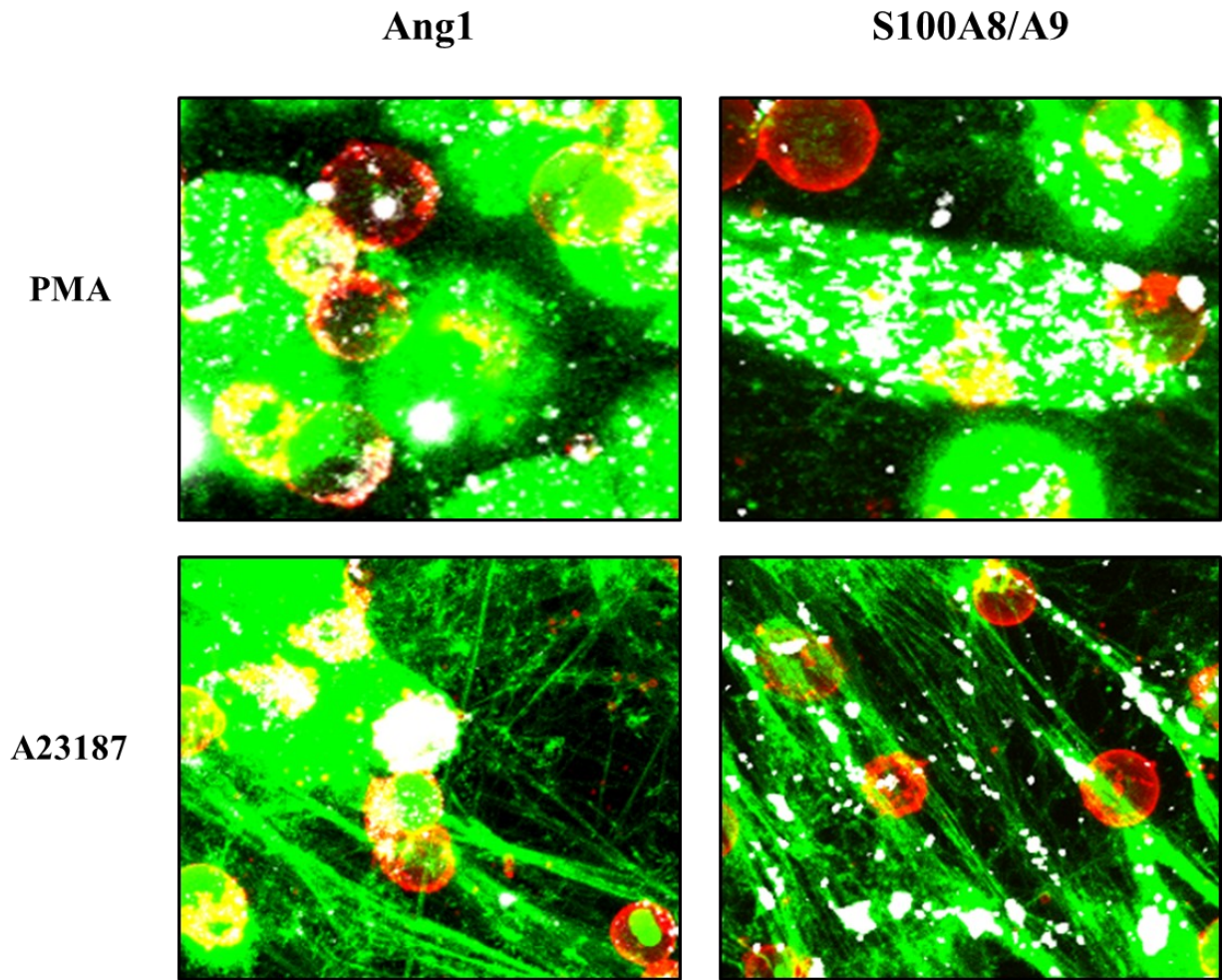


Table 1

	HC (n = 34)	T2DM group (n = 8)	Stable HFpEF (n = 5)	Stable HFpEF +T2DM (n = 7)	ADHFpEF (n = 7)	ADHFpEF +T2DM (n = 6)
Age (y)		68 ± 1.7	75 ± 3.3	71 ± 3.2	82 ± 3.0*	73 ± 43.2
Males n (%)	20 (58.8%)	6 (75%)	2 (40%)	4 (57.4%)	2 (28.6%)	4 (66.7%)
NYHA classification n (%)						
class I	n/a	n/a	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)
class II	n/a	n/a	3 (60%)	5 (71.4%)	2 (28.6%)	1 (16.7%)
class III	n/a	n/a	2 (40%)	1 (14.3%)	2 (28.6%)	2 (33.3%)
class IV	n/a	n/a	0 (0%)	0 (0%)	2 (28.6%)	3 (33.3%)
Etiology n (%)						
Ischemia	n/a	n/a	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	2 (33.3%)
Cardiomyopathy	n/a	n/a	1 (20%)	5 (71.4%)	3 (42.9%)	1 (16.7%)
Valvular	n/a	n/a	0 (0%)	3 (42.9%)	1 (14.3%)	2 (33.3%)
Others	n/a	n/a	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
LVEF (%)						
Hypertension	n/a	6 (75%)	5 (100%)	7 (100%)	4 (57.1%)	6 (100%)
Dislipidemia	n/a	7 (87.5%)	1 (20%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	5 (83.3%)
Stroke	n/a	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Biochemistry						
Creatinine (µmol/l)	n/a	86.7 ± 8.6	147 ± 43	146 ± 17	127 ± 21	166 ± 26
Glucose (mmol/l)	n/a	9.0 ± 0.7	5.7 ± 0.6*	6.9 ± 0.6	6.4 ± 0.6	8.0 ± 0.6
Triglyceride (mmol/l)	n/a	1.35 ± 0.18	1.02 ± 0.10	2.00 ± 0.47		
LDL (mmol/l)	n/a	1.80 ± 0.12	2.23 ± 0.80	1.09 ± 0.23		
Medication n (%)						
ACEi	n/a	3 (37.5%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
ARBs	n/a	5 (62.5%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)
β-blockers	n/a	3 (37.5%)	3 (60%)	5 (71.4%)	5 (71.4%)	5 (83.3%)
Diuretic agent	n/a	2 (25%)	5 (100%)	7 (100%)	5 (71.4%)	6 (100%)
Statin	n/a	8 (100%)	2 (40%)	3 (42.9%)	2 (28.6%)	5 (83.3%)
Anticoagulant	n/a	0 (0.0%)	5 (100%)	4 (57.1%)	6 (85.7%)	3 (50.0%)
Sulfonylureas	n/a	3 (37.5%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	2 (33.3%)
DDP-4 inhibitors	n/a	5 (62.5%)	0 (0.0%)	4 (57.1%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
Agoniste GLP-1	n/a	2 (25%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SGLT-2 inhibitor	n/a	2 (25%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
Metformin	n/a	7 (87.5%)	1 (20%)	4 (57.1%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
Insulin	n/a	1 (12.5%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	0 (0.0%)	2 (33.3%)

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

3.1 Résumé de nos principales observations

Dans le but d'explorer de nouvelles protéines présentes sur les NETs et leur rôle dans le diabète et l'IC, nous nous sommes intéressés à la liaison de l'Ang1 sur les NETs relâchés par les neutrophiles. Nous avons donc tenté de répondre à la question principale suivante : les NETs peuvent-ils transporter l'Ang1 et jouer un rôle protecteur au niveau des vaisseaux sanguins? Dans un premier temps, nous avons analysé la synthèse et la relâche des NETs, d'Ang1 et de la calprotectine de manière indépendante. Puis, dans un deuxième temps, nous avons évalué la capacité de médiateurs inflammatoires spécifiques à induire la liaison de l'Ang1 et de la calprotectine sur les NETs. Ainsi, au cours de mon projet de maîtrise, nous avons été en mesure de démontrer que les neutrophiles de patients sévèrement malades présentant un épisode de décompensation cardiaque aiguë (ADHFpEF+T2DM) relâchent plus de NETs suite à une incubation de 3 heures sans agoniste ou suite à un traitement au LPS que ceux des volontaires sains (VS) et des ADHFpEF sans T2DM. Nous avons aussi documenté que le diabète comme comorbidité joue un rôle important dans la sévérité de l'IC. Nous avons également démontré que la synthèse et la relâche d'Ang1 reste inchangée chez les différents groupes de patients mais nous observons une tendance à la hausse suite aux stimulations avec le PMA et A23187, et que finalement, l'Ang1 ne se retrouve pas sur les NETs, contrairement à la calprotectine.

3.2 La relâche de NETs par les neutrophiles humains

Dans cette étude, nous rapportons l'effet de divers médiateurs inflammatoires sur la formation de NETs par les neutrophiles isolés de patients T2DM, HFpEF±T2DM stables et ADHFpEF±T2DM, comparé aux neutrophiles isolés de volontaires sains (VS). Les médiateurs inflammatoires tels que LPS, PMA et A23187 sont déjà connus pour leur capacité à induire la formation de NETs en utilisant des voies de signalisation différentes. De nombreuses études ont montré que le PMA induit la formation de NETs, qui est dépendante de la production de ROS par le complexe NOX (259) et, dans certains cas, l'hypercitrullination de l'histone 3 (H3) par la PAD4 (266). Contrairement au PMA, le A23187, un ionophore calcique, active la PKC et la PAD4, induisant la formation de NETs de manière NOX-indépendante (267). Ce type de formation de NETs est induit principalement par l'influx de calcium et la production de ROS. Quant au LPS, une composante de la paroi des bactéries gram-négatif, il induit une formation

de NETs NOX-dépendante médiée par les kinases c-Jun N-terminales (JNK). Le LPS se lie au récepteur TLR4 à la surface des neutrophiles et active la NOX et la production de ROS, induisant par conséquent la formation de NETs lytique de manière dose-dépendante (254, 256, 266). D'autres groupes ont montré que le LPS peut également induire la formation de NETs vitale par une voie indépendante de NOX (276, 278).

Tel que démontré auparavant par d'autres études, nous avons également observé que le PMA ou le A23187 augmentent de façon importante la formation de NETs *in vitro* par les neutrophiles sains. Nous observons également une augmentation de la relâche de NETs par les neutrophiles de patients T2DM, HFpEF, HFpEF + T2DM et ADHFpEF, comparée à leur PBS respectif, mais non pour les ADHFpEF + T2DM étant donné que le niveau basal des NETs est déjà très élevé comparé au niveau basal des VS et des autres groupes de patients. En effet, pour ce groupe de patients, on s'aperçoit que les NETs augmentent de façon importante après l'incubation sans agoniste lorsque comparé aux VS et que cette augmentation est maintenue avec les différents agonistes. Des images prises en microscopie confocale permettent de visualiser cette forte augmentation de NETs au niveau basal chez les patients ADHFpEF+T2DM (Figure A1 de l'Annexe). Toutefois, et contrairement à la littérature, aucune augmentation de la formation de NETs n'est observée par la stimulation des neutrophiles au LPS chez les VS. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la formation de NETs par les neutrophiles stimulés au LPS est dose dépendante (265) et que dans notre étude, la dose utilisée (100 nM) semble insuffisante pour permettre l'augmentation de la formation de NETs par les neutrophiles de sujets sains et de patients, comparé au contrôle PBS, à l'exception des patients ADHFpEF+T2DM. En effet, chez ces patients, nous observons que le LPS est plus apte à induire la formation de NETs observant une augmentation significative de 2-3 fois la relâche de NETs comparée aux VS et une augmentation non significative de NETs comparé aux patients ADHFpEF sans T2DM. Les neutrophiles de patients sévèrement malades en concomitance avec le diabète (ADHFpEF+T2DM) relâchent donc des quantités plus élevées de NETs en absence d'agoniste et lorsque les neutrophiles sont stimulés avec le LPS que ceux des VS et des patients ADHFpEF sans T2DM. Cette observation pourrait être expliquée par le fait que les neutrophiles isolés de ces patients soient, de base, plus activés que ceux des VS et des autres groupes de patients.

3.2.1 Rôle du LPS dans l'IC et le T2DM

Il y a de plus en plus d'évidences que le microbiote de l'intestin pourrait jouer un rôle dans le développement de diverses maladies incluant l'IC et le T2DM, des pathologies associées à l'inflammation de bas grade (88, 94, 95). La translocation du microbiote de l'intestin dans la circulation systémique, en particulier les endotoxines bactériennes ou le LPS, a été démontrée comme un élément déclencheur de l'inflammation et l'obésité (469). Le LPS a la capacité d'induire la sécrétion du TNF- α (470), de l'IL-6 (471-473) et de plusieurs autres médiateurs pro-inflammatoires lorsqu'il se lie au complexe CD14 et au récepteur TLR4 à la surface des cellules immunitaires (474) et entraîne une boucle de rétroaction positive qui peut perpétuer l'état inflammatoire chronique (475). Des évidences du rôle joué par le LPS endogène dans l'IC aiguë et chronique ont été montrés dans plusieurs études. La possibilité que le LPS déclenche l'inflammation en augmentant la production de cytokines par les cellules immunitaires dans l'IC a été proposée par Anker et al. (476). Depuis lors, de nombreuses études ont signalé des niveaux élevés de LPS circulant dans l'IC (470, 477-479). En effet, il a été démontré que les concentrations plasmatiques de LPS sont plus élevées chez les insuffisants cardiaques atteints d'œdème périphérique et qu'un traitement diurétique entraîne une réduction des niveaux de LPS (476, 477). De plus, le CD14 soluble, un marqueur de l'interaction endotoxine-cellule et de l'excrétion de la membrane cellulaire, s'est révélé accru chez les patients atteints d'IC chronique (476, 480). Des niveaux élevés de LPS constitueraient un élément prédictif de l'incidence du diabète de type 2 (481). À la lumière de ces informations, il apparaît qu'il y ait une activation immunitaire dans l'IC aiguë et chronique. Étant donné que le LPS endogène est un facteur important responsable de l'inflammation chronique sous-jacente observée dans l'IC, les stratégies d'intervention qui pourraient modifier le microbiote ainsi que diverses stratégies anti-inflammatoires telle que la colchicine et/ou l'immuno-thérapeutique ciblant de façon prédominante le LPS pourraient être bénéfiques pour les patients insuffisants cardiaques (475) et/ou diabétiques.

3.2.2 Rôle des NETs dans la dysfonction endothéliale et la thrombo-inflammation

L'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'endothélium est cruciale dans le maintien de l'homéostasie vasculaire et dans la prévention de pathologie cardiovasculaire. La dysfonction endothéliale est une affection pathologique caractérisée par une perte d'équilibre dans tous les

principaux mécanismes endothéliaux impliquant plusieurs types cellulaires dont les neutrophiles (482). Elle est impliquée dans la physiopathologie de différentes maladies cardiovasculaires et est étroitement lié aux événements cliniques chez les patients atteints d'athérosclérose, d'hypertension (483) et d'IC (484-486).

La diapédèse des neutrophiles est une caractéristique de l'inflammation microvasculaire impliquant une série de changements métaboliques et conformationnels initiés par le roulement et l'adhésion des neutrophiles, suivis de la migration transendothéliale (128). Ce processus dynamique nécessite un contact avec des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , LPS, etc.) et des signaux provenant d'agents pathogènes, de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs), de cellules immunitaires/inflammatoires ou de CE activées (487). Les neutrophiles peuvent altérer la structure et/ou la fonction endothéliale par plusieurs mécanismes dont la production de ROS, la dégranulation ainsi que la synthèse et relâche des NETs (127, 128). Ces derniers peuvent avoir des conséquences néfastes sur les vaisseaux sanguins en activant des métalloprotéinases et ainsi jouer un rôle important dans les dommages endothéliaux (297). En effet, une formation excessive de NETs entraîne la formation d'agrégats (488) qui obstruent les vaisseaux (489) et endommagent les tissus induisant donc une thrombo-inflammation. Les NETs peuvent également induire la libération du facteur von Willebrand à partir des cellules endothéliales qui a pour effet d'augmenter la liaison de l'ADN, l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombose (296, 300), ce qui contribue au blocage des vaisseaux sanguins, rendant ainsi une distribution inadéquate du sang au cœur et aux organes vitaux. Cette distribution erratique peut mener à la nécrose cellulaire, et par conséquent, contribuer à la progression de l'IC.

3.3 La synthèse d'Ang1 et de la calprotectine par les neutrophiles

L'angiopoïétine 1 est une protéine jouant un rôle important pour la stabilisation et la maturation des vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse à travers sa liaison aux récepteurs Tie-2 sur les CE (407, 424, 431). L'Ang1 a de puissants effets vasculaires protecteurs, entre autres, via la suppression des fuites plasmatiques, l'inhibition de l'inflammation vasculaire et la prévention de la mort des CE (434, 435, 468). Des études ont montré qu'une diminution de la concentration d'Ang1 dans le plasma des patients souffrant d'infarctus du myocarde aigu et d'événements cardiovasculaires majeurs tels que l'arythmie, la cardiopathie valvulaire, le choc cardiogénique

et l'IC, pourrait être potentiellement associée à l'altération de la fonction endothéliale (409, 462, 463). Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une diminution de la quantité initiale d'Ang1 intracellulaire chez tous les groupes de patients. Bien que ces patients synthétisent plus d'Ang1 après 3h de stimulation des neutrophiles avec PBS, LPS, PMA et A23187, ce qui pourrait être une tentative de stabilisation et de protection des vaisseaux sanguins, en termes de quantité, il y a moins d'Ang1 synthétisée comparée aux VS. Ceci pourrait donc être impliqué dans une angiogenèse pathologique conduisant à la déstabilisation des vaisseaux sanguins menant à la dysfonction endothéliale puis à la progression de l'IC et du T2DM. De plus, la combinaison des niveaux élevés de NETs qui obstruent les vaisseaux sanguins et une concentration insuffisante d'Ang1 synthétisée pour stabiliser les vaisseaux pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale associée à l'IC et au T2DM. D'autre part, l'Ang1 a des effets pro-inflammatoires sur les neutrophiles. En effet, notre laboratoire a détecté l'expression de Tie2 à la surface des neutrophiles par RT-PCR et par immunocytochimie. L'Ang1 a donc la capacité d'activer les neutrophiles via les voies PI3K, p38 et p42/44 MAPK (490) et d'induire la synthèse de NETs (443). La diminution observée d'Ang1 pourrait atténuer l'état inflammatoire chez les patients insuffisants cardiaques et T2DM.

La calprotectine est largement exprimée dans le cytoplasme des neutrophiles (30-60%) et est libérée dans le milieu extracellulaire lorsque les neutrophiles sont stimulés par des médiateurs inflammatoires (358-360). Sa sécrétion, médiée par les microtubules (359), dépend de la production de ROS et de l'efflux du potassium (K^+) (360). Des études ont signalé un rôle important de la calprotectine dans l'IC en démontrant un taux de calprotectine sérique ou plasmatique plus élevé chez les patients souffrant d'IC chronique associé à d'autres marqueurs inflammatoires tels que la CRP, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α (344, 393). La calprotectine peut se lier à différents récepteurs dont les TLR4 et déclencher une voie de signalisation spécifique se traduisant par une boucle de rétroaction positive autocrine et une amplification de l'induction de facteurs inflammatoires (340, 368, 370). Dans la présente étude, nous avons observé une augmentation de la calprotectine intracellulaire dans les neutrophiles post-isolation (T0) pour tous les groupes de patients comparée aux VS, qui pourrait jouer un rôle dans l'inflammation de bas grade retrouvée dans l'IC et le T2DM et ainsi être impliquée dans la progression de la maladie. Après 3h de stimulation avec PBS, LPS, PMA ou A23187, nous avons observé une diminution de la calprotectine dans les neutrophiles de VS ou de patients. Nous avons émis

l'hypothèse que cette diminution pourrait être associée à la dégradation de la protéine par le protéasome ou des protéases. Toutefois, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome (MG132) ou un cocktail d'inhibiteurs de protéases lors de l'incubation des neutrophiles de VS n'a pas influencé la concentration de la calprotectine à 3h. De plus, afin de comprendre la diminution observée de la calprotectine, nous avons également évalué si la diminution observée était liée à des processus transcriptionnels et/ou traductionnels. Nous avons donc utilisé des inhibiteurs de la transcription (Actinomycine D) et de la traduction (Cycloheximide) et l'utilisation de ces inhibiteurs n'a eu aucun effet significatif sur les niveaux de calprotectine. Une possibilité serait que les modifications oxydatives post-traductionnelles de la calprotectine en fassent une cible pour la protéolyse indépendante du protéasome (491). Des études supplémentaires devront donc être effectuées afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la synthèse et la dégradation de la calprotectine. En outre, la calprotectine est libérée dans la phase aiguë de l'inflammation (353). Cela pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé une augmentation de cette protéine après une stimulation de trois heures des neutrophiles.

3.4 Relâche et liaison de protéines sur les NETs

La calprotectine et l'Ang1 sont des protéines cytosoliques, non granulaires, et seraient relâchées de façon passive par les neutrophiles. Les NETs servent de transporteurs pour certaines protéines bactéricides telles que la MPO, la PR3, la NE et la calprotectine (182, 237) et le stimulus et/ou la pathologie peut influencer la composition des NETs (251, 252). Nous avons donc voulu déterminer si l'Ang1 peut également se lier aux NETs afin d'exercer un rôle protecteur au niveau des vaisseaux sanguins autant chez les volontaires sains que chez les différents groupes de patients. Pour ce faire, nous avons utilisé différents agonistes induisant des NETs ayant des structures différentes. Par microscopie confocale, il est intéressant de constater que les NETs induits par le A23187 sont plus filamenteux comparé à ceux induits par le PMA, dont les NETs induits sont localisés et concentrés principalement près du neutrophile (voir Figure 3 et 4 de l'article). Dans cette étude, nous avons observé une relâche complète de l'Ang1 (100%) dans le milieu extracellulaire, mais pas sa liaison sur les NETs, et ce, indépendamment de l'agoniste utilisé. Les concentrations de l'Ang1 observés étaient en dessous du seuil de détection minimale de l'ELISA, que ce soit pour les VS ou les différents groupes de patients. Sachant que la charge électrostatique négative de l'ADN confère aux NETs des propriétés adhérentes pour les

protéines (249), il se pourrait que Ang1 n'ait pas les propriétés nécessaires pour adhérer aux NETs, comparé à la calprotectine, qui elle est relâchée et liée sur les NETs chez les VS et tous les groupes de patients. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'Ang1 n'est pas une protéine bactéricide, comme la MPO, la NE ou la calprotectine, toutes présentes sur les NETs. L'ensemble de nos résultats suggère que les NETs seraient des transporteurs sélectifs de protéines ayant des caractéristiques antimicrobiennes comme la calprotectine. Quant à l'Ang1, cette protéine est plutôt angiogénique et inflammatoire et est libérée de manière constitutive et indépendante des NETs quel que soit l'agoniste utilisé.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

Les buts de ce travail étaient de vérifier la capacité de différents médiateurs inflammatoires à induire la formation de NETs, la synthèse et la relâche de l'Ang1 et de la calprotectine, la relâche de la calprotectine liée sur les NETs et finalement la liaison de l'Ang1 sur les NETs par les neutrophiles isolés de patients T2DM et HFpEF (stable ou ADHF) \pm T2DM, comparé aux VS et, s'il y a lieu, d'observer des différences entre les différentes cohortes. Nos travaux de recherche démontrent que les neutrophiles de patients ADHFpEF + T2DM sont plus sujets à relâcher des NETs au niveau basal et lorsque stimulés au LPS pendant 3h, en comparant aux VS et aux patients ADHFpEF sans T2DM. La quantité de NETs élevée et la comorbidité du T2DM pourraient donc jouer un rôle important dans la pathologie et la sévérité de l'IC. De plus, la diminution de la concentration initiale de l'Ang1 dans les neutrophiles de tous les groupes de patients, comparée à celle des VS, pourrait être impliquée dans la dysfonction endothéliale et la maladie microvasculaire associés au T2DM et à l'IC. La concentration initiale de la calprotectine dans les neutrophiles de tous les patients est supérieure à celle des VS et cette augmentation pourrait être en partie responsable du statut inflammatoire des patients. L'Ang1 est relâchée dans une proportion de 100% par les neutrophiles de VS et de tous les groupes de patients et est indépendante du stimulus utilisé et de la relâche des NETs.

Cette étude comporte certaines limitations. En effet, l'étude a été faite à partir d'un petit échantillon de patients dont la durée et l'étiologie de l'IC variaient. Ces dernières données pourraient avoir un impact sur l'interprétation des résultats obtenus. De plus, des renseignements cliniquement pertinents tels que la durée du diabète et le contrôle glycémique des patients n'étaient pas facilement disponibles. Dans la présente étude, nous voulions déterminer si l'Ang1 était présente sur les NETs et, dans l'affirmative, dans quelle mesure par rapport à la calprotectine. De plus, nous voulions déterminer si la relâche de l'Ang1 et de la calprotectine et leur liaison aux NETs étaient modulées en fonction de l'étiologie et de la sévérité de l'IC. Les expériences de neutrophiles *in vitro* ont été limitées à la stimulation avec peu d'agonistes et à la mesure d'Ang1 et de calprotectine. Les études futures requièrent l'inclusion d'autres cytokines et d'un plus grand nombre de patients. De plus, un suivi longitudinal pourrait contribuer à élucider si ces anomalies inflammatoires sont associées à un devenir clinique défavorable chez ces patients à haut risque.

4.1 Perspectives futures

La pathophysiologie de l'IC avec FEVG préservée est très complexe et il reste encore beaucoup à découvrir sur les mécanismes impliqués dans cette pathologie dont l'incidence ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population. Étant donné que les NETs sont un sujet récent dans l'IC (233), il reste encore plusieurs interrogations quant aux mécanismes et aux protéines liées sur les NETs impliqués dans cette pathologie. Des stratégies thérapeutiques, de nature anti-inflammatoire ou spécifiques à la réduction des NETs demandent être investiguées. Par exemple, la DNase déjà utilisée dans plusieurs cas pathologiques impliquant les NETs et permettant de diminuer les niveaux basaux élevés de NETs chez les patients insuffisants cardiaques serait l'objet de futurs projets.

Nous avons démontré que l'Ang1 est synthétisée et relâchée par les neutrophiles de VS et de patients indépendamment de l'agoniste utilisé. La détermination des mécanismes intracellulaires menant à la synthèse et la relâche de l'Ang1 par les neutrophiles nous permettrait de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans l'IC et le T2DM, au niveau de la dysfonction endothéliale ainsi que de la thrombo-inflammation. D'un côté, l'Ang1 a des effets protecteurs au niveau de l'endothélium, mais peut également avoir des effets pro-inflammatoires. La surexpression d'Ang1 pourrait être bénéfique au niveau des complications associées au T2DM. En effet, l'Ang1 pourrait aider à retarder les complications du T2DM en restaurant la fonction microvasculaire et maintenir la quiescence de certaines cellules souches adultes (467). Également, l'Ang1 pourrait accélérer la cicatrisation des plaies, retarder les complications rénales et favoriser la revascularisation au niveau de la rétine et du myocarde (467), et aurait donc un potentiel thérapeutique pour la protection vasculaire. Cependant, l'Ang1 a également été impliqué dans le remodelage des vaisseaux, l'induction de l'angiogenèse pathologique et l'hypertension pulmonaire (468), ce qui indique que des stratégies sont nécessaires pour minimiser tout effet délétère tout en optimisant la protection des vaisseaux (468). Déterminer la balance entre les effets positifs et négatifs de l'Ang1 serait la clé pour mieux comprendre son implication dans la pathologie de l'IC et le T2DM. L'Ang1 a été évalué dans des études précliniques et semble prometteur pour une utilisation thérapeutique dans un éventail de pathologies, y compris la septicémie, l'accident vasculaire cérébral, l'artériosclérose de greffe et la rétinopathie diabétique (468). De plus, il serait pertinent d'investiguer des molécules visant

à activer Tie2 telles que des analogues de l'Ang1 (e.g. Hepta-Ang1, C4BP-Ang1 (492), BowAng1 (493), COMP-ANG1 (494)) qui permettrait de prévenir les dommages vasculaires (492).

Les mécanismes de synthèse et de sécrétion de la calprotectine chez les patients insuffisants cardiaques et diabétiques sont encore méconnus. La calprotectine pourrait être responsable d'une partie de l'inflammation de bas grade et stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires, ce qui amplifierait la réponse inflammatoire à travers l'activation des voies de signalisation de NF- κ B et p38 MAPK (495). Le blocage des récepteurs de la calprotectine pourrait offrir une nouvelle approche thérapeutique. Des cibles thérapeutiques inhibant les récepteurs TLR4 empêcheraient la relâche des cytokines proinflammatoires induites par le LPS et la calprotectine, et seraient bénéfiques pour la progression de l'IC. Les statines (fluvastatine, simvastatine et atorvastatine) font partie des médicaments récemment découverts pour leur activité inhibitrice sur la signalisation du TLR4 et les voies subséquentes pour réduire l'inflammation dans les systèmes vasculaires (496). L'eritoran, un antagoniste du récepteur TLR4 utilisé dans le traitement de la septicémie sévère, pourrait atténuer les lésions d'ischémie myocardique et de reperfusion (497) et le développement de l'hypertrophie cardiaque (498).

Finalement, nous étudions un nouveau sous-type de neutrophiles potentiellement impliqué dans l'IC et le T2DM. Ce type de neutrophiles, soit les neutrophiles de faible densité (*low density neutrophils* - LDN) pour les distinguer des neutrophiles bien connus, les neutrophiles de haute densité (*high density neutrophils* - HDN), est un sujet d'actualité dans la communauté scientifique et serait impliqué dans des pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (295, 499), le cancer (500, 501) et les infections systémiques et locales (502, 503) ainsi que des pathologies cardiovasculaires tels que le syndrome coronarien aigu et l'infarctus du myocarde (504). Les LDNs seraient également impliqués dans l'augmentation de NETs circulants dans diverses pathologies (505, 506). Il serait pertinent d'investiguer les protéines des NETs relâchés par les LDNs en les comparant aux HDNs afin de déterminer si le sous-type de neutrophile peut influencer la composition des NETs et déterminer leurs rôles potentiels. Ces études pourraient contribuer à mieux comprendre la pathophysiologie des neutrophiles et de l'inflammation chez les patients souffrant d'IC avec FEVG préservée, une condition en forte augmentation dans la population. Une meilleure compréhension des

mécanismes inflammatoires pourrait faciliter le développement de diverses stratégies anti-inflammatoires chez ces patients à haut risque.

BIBLIOGRAPHIE

1. Tanai E, Frantz S. Pathophysiology of Heart Failure. *Compr Physiol*. 2015;6(1):187-214.
2. Kupper N, Bonhof C, Westerhuis B, Widdershoven J, Denollet J. Determinants of Dyspnea in Chronic Heart Failure. *J Card Fail*. 2016;22(3):201-9.
3. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JG, Coats AJ, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*. 2016;18(8):891-975.
4. Foundation: HS. 2016 report on the health of Canadians: the burden of heart failure. [Available from: <https://www.heartandstroke.ca/heart-disease/conditions/heart-failure#>].
5. Pathophysiology and management of heart failure. *Clinical Pharmacist*. 2018.
6. Kosaraju A, Goyal A, Grigorova Y, Makaryus AN. Left Ventricular Ejection Fraction. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
7. Ezekowitz JA, O'Meara E, McDonald MA, Abrams H, Chan M, Ducharme A, et al. 2017 Comprehensive Update of the Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Heart Failure. *Can J Cardiol*. 2017;33(11):1342-433.
8. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
9. Lam CS, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(1):18-28.
10. McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2012;33(14):1787-847.
11. Paulus WJ. Phenotypic Persistence in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail*. 2019;12(3):e005956.
12. Chandra A, Vaduganathan M, Lewis EF, Claggett BL, Rizkala AR, Wang W, et al. Health-Related Quality of Life in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: The PARAGON-HF Trial. *JACC Heart Fail*. 2019;7(10):862-74.
13. Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Angiotensin-Nepriylsin Inhibition in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1609-20.
14. Joseph SM, Cedars AM, Ewald GA, Geltman EM, Mann DL. Acute decompensated heart failure: contemporary medical management. *Tex Heart Inst J*. 2009;36(6):510-20.
15. Mentz RJ, Kelly JP, von Lueder TG, Voors AA, Lam CS, Cowie MR, et al. Noncardiac comorbidities in heart failure with reduced versus preserved ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(21):2281-93.
16. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of

Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(16):e147-239.

17. Zile MR, Gottdiener JS, Hetzel SJ, McMurray JJ, Komajda M, McKelvie R, et al. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. *Circulation*. 2011;124(23):2491-501.

18. Katz DH, Beussink L, Sauer AJ, Freed BH, Burke MA, Shah SJ. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Cardiol*. 2013;112(8):1158-64.

19. Dunlay SM, Roger VL, Redfield MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14(10):591-602.

20. Snipelisky D, Chaudhry SP, Stewart GC. The Many Faces of Heart Failure. *Card Electrophysiol Clin*. 2019;11(1):11-20.

21. Reddy YN, Borlaug BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Curr Probl Cardiol*. 2016;41(4):145-88.

22. Ather S, Chan W, Bozkurt B, Aguilar D, Ramasubbu K, Zachariah AA, et al. Impact of noncardiac comorbidities on morbidity and mortality in a predominantly male population with heart failure and preserved versus reduced ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(11):998-1005.

23. Dolgin M, Association CCotNYH, Committee NYHAC, Fox AC, Levin RI. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels: Little, Brown; 1994.

24. Guyatt GH, Thompson PJ, Berman LB, Sullivan MJ, Townsend M, Jones NL, et al. How should we measure function in patients with chronic heart and lung disease? *J Chronic Dis*. 1985;38(6):517-24.

25. Guyatt GH, Sullivan MJ, Thompson PJ, Fallen EL, Pugsley SO, Taylor DW, et al. The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Can Med Assoc J*. 1985;132(8):919-23.

26. Zielinska D, Bellwon J, Rynkiewicz A, Elkady MA. Prognostic value of the six-minute walk test in heart failure patients undergoing cardiac surgery: a literature review. *Rehabil Res Pract*. 2013;2013:965494.

27. Du H, Wonggom P, Tongpeth J, Clark RA. Six-Minute Walk Test for Assessing Physical Functional Capacity in Chronic Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2017;14(3):158-66.

28. Cohen-Solal A, Laribi S, Ishihara S, Vergaro G, Baudet M, Logeart D, et al. Prognostic markers of acute decompensated heart failure: the emerging roles of cardiac biomarkers and prognostic scores. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(1):64-74.

29. Nieminen MS, Brutsaert D, Dickstein K, Drexler H, Follath F, Harjola VP, et al. EuroHeart Failure Survey II (EHFS II): a survey on hospitalized acute heart failure patients: description of population. *Eur Heart J*. 2006;27(22):2725-36.

30. Yancy CW, Lopatin M, Stevenson LW, De Marco T, Fonarow GC, Committee ASA, et al. Clinical presentation, management, and in-hospital outcomes of patients admitted with acute decompensated heart failure with preserved systolic function: a report from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) Database. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(1):76-84.

31. Raj L, Maidman SD, Adhyaru BB. Inpatient management of acute decompensated heart failure. *Postgrad Med J*. 2020;96(1131):33-42.

32. Virginie M, Emmanuel C, Danièle C. Physiopathologie du remodelage ventriculaire. *MT Cardio*. 2006;2(3):273-9.
33. Borlaug BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11(9):507-15.
34. Schaper J, Kostin S, Hein S, Elsasser A, Arnon E, Zimmermann R. Structural remodelling in heart failure. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7(2-3):64-8.
35. van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation*. 2006;113(16):1966-73.
36. Borbely A, van der Velden J, Papp Z, Bronzwaer JG, Edes I, Stienen GJ, et al. Cardiomyocyte stiffness in diastolic heart failure. *Circulation*. 2005;111(6):774-81.
37. Zile MR, Baicu CF, Ikonomidis JS, Stroud RE, Nietert PJ, Bradshaw AD, et al. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin. *Circulation*. 2015;131(14):1247-59.
38. van Heerebeek L, Hamdani N, Falcao-Pires I, Leite-Moreira AF, Begieneman MP, Bronzwaer JG, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. *Circulation*. 2012;126(7):830-9.
39. Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):423-32.
40. Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res*. 2004;64(1):24-31.
41. Gerdes AM, Capasso JM. Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(3):849-56.
42. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82.
43. Paul S. Ventricular remodeling. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 2003;15(4):407-11.
44. Starling EH, Visscher MB. The regulation of the energy output of the heart. *J Physiol*. 1927;62(3):243-61.
45. Ait Mou Y, Bollensdorff C, Cazorla O, Magdi Y, de Tombe PP. Exploring cardiac biophysical properties. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2015;2015:10.
46. Delicce AV, Makaryus AN. Physiology, Frank Starling Law. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
47. LaCombe P, Jose A, Lappin SL. Physiology, Starling Relationships. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
48. Froelicher VF, Myers J. CHAPTER one - Basic Exercise Physiology. In: Froelicher VF, Myers J, editors. *Exercise and the Heart (Fifth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2006. p. 1-10.
49. Grossman W. Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? *Am J Med*. 1980;69(4):576-84.
50. Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev*. 1986;66(3):710-71.
51. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*. 1990;86(6):1913-20.

52. Aikawa Y, Rohde L, Plehn J, Greaves SC, Menapace F, Arnold MO, et al. Regional wall stress predicts ventricular remodeling after anteroseptal myocardial infarction in the Healing and Early Afterload Reducing Trial (HEART): an echocardiography-based structural analysis. *Am Heart J*. 2001;141(2):234-42.
53. Hung CL, Verma A, Uno H, Shin SH, Bourgoun M, Hassanein AH, et al. Longitudinal and circumferential strain rate, left ventricular remodeling, and prognosis after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(22):1812-22.
54. Lupon J, Gavidia-Bovadilla G, Ferrer E, de Antonio M, Perera-Lluna A, Lopez-Ayerbe J, et al. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Infrequently Evolves Toward a Reduced Phenotype in Long-Term Survivors. *Circ Heart Fail*. 2019;12(3):e005652.
55. Orsborne C, Chaggar PS, Shaw SM, Williams SG. The renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure for the non-specialist: the past, the present and the future. *Postgraduate Medical Journal*. 2017;93(1095):29.
56. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(19):1747-62.
57. Floras JS. Sympathetic nervous system activation in human heart failure: clinical implications of an updated model. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(5):375-85.
58. Grassi G, Seravalle G, Quarti-Trevano F, Dell'Oro R, Arenare F, Spaziani D, et al. Sympathetic and baroreflex cardiovascular control in hypertension-related left ventricular dysfunction. *Hypertension*. 2009;53(2):205-9.
59. Kishi T. Heart failure as an autonomic nervous system dysfunction. *Journal of Cardiology*. 2012;59(2):117-22.
60. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):363-82.
61. Sayer G, Bhat G. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Heart Failure. *Cardiology Clinics*. 2014;32(1):21-32.
62. Unger T, Li J. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2004;5 Suppl 1:S7-10.
63. Boone M, Deen PM. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflugers Arch*. 2008;456(6):1005-24.
64. Cuzzo B, Padala SA, Lappin SL. Physiology, Vasopressin. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2020.
65. Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL. The role of endothelins and their receptors in heart failure. *Pharmacological Research*. 2001;43(2):111-26.
66. Iovino M, Iacoviello M, De Pergola G, Licchelli B, Iovino E, Guastamacchia E, et al. Vasopressin in Heart Failure. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 2018;18(5):458-65.
67. Goldsmith SR. The role of vasopressin in congestive heart failure. *Cleve Clin J Med*. 2006;73 Suppl 3:S19-23.
68. Rosner MH, Ronco C. Hyponatremia in heart failure: the role of arginine vasopressin and its antagonism. *Congest Heart Fail*. 2010;16 Suppl 1:S7-14.
69. McMurray JJ, Ray SG, Abdullah I, Dargie HJ, Morton JJ. Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*. 1992;85(4):1374-9.
70. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation*. 1994;89(4):1580-6.

71. Leary PJ, Jenny NS, Bluemke DA, Kawut SM, Kronmal RA, Lima JA, et al. Endothelin-1, cardiac morphology, and heart failure: the MESA angiogenesis study. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39(1):45-52.
72. Diez J. Chronic heart failure as a state of reduced effectiveness of the natriuretic peptide system: implications for therapy. *Eur J Heart Fail*. 2017;19(2):167-76.
73. Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*. 2008;29(19):2388-442.
74. Federation ID. Diabetes facts & figures. 2020.
75. Canada Gd. Le diabète au Canada [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/maladies-et-affections/diabete-canada-faits-saillants-systeme-surveillance-maladies-chroniques.html>].
76. Hosseini Z, Whiting SJ, Vatanparast H. Type 2 diabetes prevalence among Canadian adults — dietary habits and sociodemographic risk factors. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2019;44(10):1099-104.
77. Québec D. Le diabète en chiffres [Available from: <https://www.diabete.qc.ca/fr/diabete-quebec/a-propos/salle-de-presse/le-diabete-en-chiffres/>].
78. Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol*. 2018;14(6):491-509.
79. Al-Goblan AS, Al-Alfi MA, Khan MZ. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2014;7:587-91.
80. Sahoo K, Sahoo B, Choudhury AK, Sofi NY, Kumar R, Bhadoria AS. Childhood obesity: causes and consequences. *J Family Med Prim Care*. 2015;4(2):187-92.
81. Hutton JC, Davidson HW. Cytokine-induced dicing and splicing in the beta-cell and the immune response in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010;59(2):335-6.
82. Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1756-60.
83. Kenny HC, Abel ED. Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. *Circ Res*. 2019;124(1):121-41.
84. (ASPC) AdlspdC. Le diabète au Canada : Perspective de santé publique sur les faits et chiffres [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies-chroniques/rapports-publications/diabete/diabete-canada-perspective-sante-publique-faits-chiffres.html>].
85. Canada Go. Types 2 diabetes [Available from: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/diseases/type-2-diabetes.html>].
86. Lennie TA, Moser DK, Biddle MJ, Welsh D, Bruckner GG, Thomas DT, et al. Nutrition intervention to decrease symptoms in patients with advanced heart failure. *Res Nurs Health*. 2013;36(2):120-45.
87. Echouffo-Tcheugui JB, Xu H, DeVore AD, Schulte PJ, Butler J, Yancy CW, et al. Temporal trends and factors associated with diabetes mellitus among patients hospitalized with heart failure: Findings from Get With The Guidelines-Heart Failure registry. *Am Heart J*. 2016;182:9-20.

88. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart*. 2004;90(4):464-70.
89. Cummings DM, King DE, Mainous AG, Geesey ME. Combining serum biomarkers: the association of C-reactive protein, insulin sensitivity, and homocysteine with cardiovascular disease history in the general US population. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006;13(2):180-5.
90. Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST). *Circulation*. 2001;103(16):2055-9.
91. Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(4):964-71.
92. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(5):1201-6.
93. Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263-71.
94. van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: causes and consequences. *The Netherlands journal of medicine*. 2013;71(4):174-87.
95. Asghar A, Sheikh N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cell Immunol*. 2017;315:18-26.
96. Andersson C, Vasani RS. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(4):230-40.
97. Lara KM, Levitan EB, Gutierrez OM, Shikany JM, Safford MM, Judd SE, et al. Abstract 15448: Dietary Patterns and Incident Heart Failure in Adults With No Known Coronary Disease or Heart Failure: The REGARDS Cohort. *Circulation*. 2017;136(suppl_1):A15448-A.
98. Micha R, Penalvo JL, Cudhea F, Imamura F, Rehm CD, Mozaffarian D. Association Between Dietary Factors and Mortality From Heart Disease, Stroke, and Type 2 Diabetes in the United States. *JAMA*. 2017;317(9):912-24.
99. Barnard ND, Levin SM, Yokoyama Y. A systematic review and meta-analysis of changes in body weight in clinical trials of vegetarian diets. *J Acad Nutr Diet*. 2015;115(6):954-69.
100. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Jr., Drazner MH, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013;128(16):1810-52.
101. Howden EJ, Sarma S, Lawley JS, Opondo M, Cornwell W, Stoller D, et al. Reversing the Cardiac Effects of Sedentary Aging in Middle Age-A Randomized Controlled Trial: Implications For Heart Failure Prevention. *Circulation*. 2018;137(15):1549-60.
102. Kitzman DW, Brubaker P, Morgan T, Haykowsky M, Hundley G, Kraus WE, et al. Effect of Caloric Restriction or Aerobic Exercise Training on Peak Oxygen Consumption and Quality of Life in Obese Older Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016;315(1):36-46.

103. Edelmann F, Gelbrich G, Dungen HD, Frohling S, Wachter R, Stahrenberg R, et al. Exercise training improves exercise capacity and diastolic function in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results of the Ex-DHF (Exercise training in Diastolic Heart Failure) pilot study. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(17):1780-91.
104. Gomes-Neto M, Rodrigues ES, Jr., Silva WM, Jr., Carvalho VO. Effects of Yoga in Patients with Chronic Heart Failure: A Meta-Analysis. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(5):433-9.
105. Aggarwal M, Bozkurt B, Panjrath G, Aggarwal B, Ostfeld RJ, Barnard ND, et al. Lifestyle Modifications for Preventing and Treating Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(19):2391-405.
106. Members ATF, McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*. 2012;33(14):1787-847.
107. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2006;355(3):251-9.
108. National Guideline Centre (Great Britain), National Institute for Health and Care Excellence (Great Britain). Chronic heart failure in adults : diagnosis and management. London: National Institute for Health and Care Excellence,; 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536075/>.
109. Eurich DT, Weir DL, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Johnson JA, Tjosvold L, et al. Comparative safety and effectiveness of metformin in patients with diabetes mellitus and heart failure: systematic review of observational studies involving 34,000 patients. *Circ Heart Fail*. 2013;6(3):395-402.
110. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373(22):2117-28.
111. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *New England Journal of Medicine*. 2020.
112. McMurray JJV, Solomon SD, Inzucchi SE, Køber L, Kosiborod MN, Martinez FA, et al. Dapagliflozin in Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(21):1995-2008.
113. Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C. Inflammation and endothelial dysfunction as therapeutic targets in patients with heart failure. *Int J Cardiol*. 2005;100(3):347-53.
114. Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2008;117(23):3020-30.
115. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*. 2002;105(5):546-9.
116. Androutsos G. Paul Ehrlich (1854-1915): founder of chemotherapy and pioneer of haematology, immunology and oncology. *J BUON*. 2004;9(4):485-91.
117. Fulkerson PC, Rothenberg ME. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(2):117-29.

118. Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, Artis D. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(4):789-801; quiz 788.
119. Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol.* 2018;9:113.
120. Khoy K. Etiopathologie du TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) : anticorps anti-HLA et NADPH oxydase phagocytaire 2016.
121. Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood.* 2002;100(3):854-61.
122. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010;33(5):657-70.
123. Croxford AL, Mair F, Becher B. IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2012;42(9):2263-73.
124. Li Y, Karlin A, Loike JD, Silverstein SC. A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8289-94.
125. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:181-218.
126. Fadeel B, Kagan VE. Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species. *Redox Rep.* 2003;8(3):143-50.
127. Mayadas TN, Cullere X. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol.* 2005;26(7):388-95.
128. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-75.
129. Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem.* 1989;264(14):7768-71.
130. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9238-42.
131. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood.* 2005;106(2):584-92.
132. Sumagin R, Sarelius IH. Intercellular adhesion molecule-1 enrichment near tricellular endothelial junctions is preferentially associated with leukocyte transmigration and signals for reorganization of these junctions to accommodate leukocyte passage. *J Immunol.* 2010;184(9):5242-52.
133. Silva MT. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):93-106.
134. Beste MT, Lomakina EB, Hammer DA, Waugh RE. Immobilized IL-8 Triggers Phagocytosis and Dynamic Changes in Membrane Microtopology in Human Neutrophils. *Annals of Biomedical Engineering.* 2015;43(9):2207-19.
135. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 6):1061-77.
136. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.

137. Sandilands GP, Ahmed Z, Perry N, Davison M, Lupton A, Young B. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*. 2005;114(3):354-68.
138. Fanger NA, Liu C, Guyre PM, Wardwell K, O'Neil J, Guo TL, et al. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid. *Blood*. 1997;89(11):4128-35.
139. Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*. 2010;268(1):25-34.
140. Song P, Zou M-H. Roles of Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Atherosclerosis* 2015. p. 379-92.
141. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev*. 2016;116(5):3029-85.
142. Clark RA. Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *The Journal of Infectious Diseases*. 1999;179(Supplement 2):S309-S17.
143. Wientjes FB, Segal AW, Hartwig JH. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J Leukoc Biol*. 1997;61(3):303-12.
144. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol*. 2012;844:115-24.
145. Mitra S, Abraham E. Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(8):732-41.
146. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2003;5(14):1317-27.
147. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21.
148. Herrero-Turrión MJ, Calafat J, Janssen H, Fukuda M, Mollinedo F. Rab27a regulates exocytosis of tertiary and specific granules in human neutrophils. *J Immunol*. 2008;181(6):3793-803.
149. Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 1993;150(4):1535-43.
150. Faurschou M, Sorensen OE, Johnsen AH, Askaa J, Borregaard N. Defensin-rich granules of human neutrophils: characterization of secretory properties. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1591(1-3):29-35.
151. Joiner KA, Ganz T, Albert J, Rotrosen D. The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophilic, granule constituents into neutrophil phagosomes. *J Cell Biol*. 1989;109(6 Pt 1):2771-82.
152. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111(5):383-9.
153. Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med*. 1998;19(4-5):221-357.
154. Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1427-35.
155. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*. 1986;60(3):1068-74.

156. Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D, Selsted ME. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest.* 1988;81(6):1829-35.
157. Calafat J, Janssen H, Knol EF, Malm J, Egesten A. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is membrane-associated in azurophil granules of human neutrophils, and relocation occurs upon cellular activation. *APMIS.* 2000;108(3):201-8.
158. Sinha S, Watorek W, Karr S, Giles J, Bode W, Travis J. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(8):2228-32.
159. Salvesen G, Farley D, Shuman J, Przybyla A, Reilly C, Travis J. Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T lymphocyte proteinases. *Biochemistry.* 1987;26(8):2289-93.
160. Campanelli D, Melchior M, Fu Y, Nakata M, Shuman H, Nathan C, et al. Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med.* 1990;172(6):1709-15.
161. Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Borregaard N. Lysozyme in human neutrophils and plasma. A parameter of myelopoietic activity. *Leukemia.* 1995;9(1):159-64.
162. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Collagenase is a component of the specific granules of human neutrophil leucocytes. *Biochem J.* 1977;162(1):195-7.
163. Masson PL, Heremans JF, Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med.* 1969;130(3):643-58.
164. Kjeldsen L, Bjerrum OW, Askaa J, Borregaard N. Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. *Biochem J.* 1992;287 (Pt 2):603-10.
165. Pei D. Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res.* 1999;9(4):291-303.
166. Kang T, Yi J, Guo A, Wang X, Overall CM, Jiang W, et al. Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21960-8.
167. Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J Immunol.* 1995;154(8):4157-65.
168. Mollinedo F, Nakajima M, Llorens A, Barbosa E, Callejo S, Gajate C, et al. Major colocalization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem J.* 1997;327 (Pt 3):917-23.
169. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond MS, Springer TA, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest.* 1993;92(3):1467-76.
170. Sengelov H, Kjeldsen L, Kroeze W, Berger M, Borregaard N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. *J Immunol.* 1994;153(2):804-10.
171. Sengelov H, Boulay F, Kjeldsen L, Borregaard N. Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. *Biochem J.* 1994;299 (Pt 2):473-9.
172. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol.* 1995;155(4):2085-95.

173. Mollinedo F, Pulido R, Lacal PM, Sanchez-Madrid F. Mobilization of gelatinase-rich granules as a regulatory mechanism of early functional responses in human neutrophils. *Scand J Immunol.* 1991;34(1):33-43.
174. Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA, McLeish KR. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(10):1503-21.
175. Munafò DB, Johnson JL, Ellis BA, Rutschmann S, Beutler B, Catz SD. Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochem J.* 2007;402(2):229-39.
176. Wimley WC, Selsted ME, White SH. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci.* 1994;3(9):1362-73.
177. Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B. A 25-kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein. *J Biol Chem.* 1987;262(31):14891-4.
178. Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect Immun.* 1998;66(6):2434-40.
179. Tanida N, Ohno N, Adachi Y, Matsuura M, Nakano M, Kiso M, et al. Modification of immunopharmacological activities of synthetic monosaccharide lipid A analogue, GLA60, by lysozyme. *J Biochem.* 1992;112(5):616-23.
180. Oram JD, Reiter B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. *Biochim Biophys Acta.* 1968;170(2):351-65.
181. Eyles JL, Roberts AW, Metcalf D, Wicks IP. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology.* 2006;2(9):500-10.
182. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-5.
183. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):1381-90.
184. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009;30(11):513-21.
185. Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases. *Circ Res.* 2014;114(2):345-53.
186. Boulanger CM, Loyer X, Rautou PE, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(5):259-72.
187. Nawaz M, Camussi G, Valadi H, Nazarenko I, Ekstrom K, Wang X, et al. The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol.* 2014;11(12):688-701.
188. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol.* 2014;5:508.
189. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011;117(14):3720-32.
190. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 1995;16(1):21-6.
191. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal.* 2010;3(105):cm1.

192. Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13590.
193. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(10):1882-6.
194. Ren M, Guo Q, Guo L, Lenz M, Qian F, Koenen RR, et al. Polymerization of MIP-1 chemokine (CCL3 and CCL4) and clearance of MIP-1 by insulin-degrading enzyme. *EMBO J*. 2010;29(23):3952-66.
195. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(8):1403-8.
196. Kant S, Swat W, Zhang S, Zhang ZY, Neel BG, Flavell RA, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev*. 2011;25(19):2069-78.
197. Bi HJ, Wang J, Huang HS, Liu JH. [Influence of IFN on expression of chemokine receptor CXCR1, CXCR2 and their ligand IL-8 in the patients with chronic hepatitis B]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2012;28(4):422-5.
198. Dixit N, Simon SI. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Front Immunol*. 2012;3:188.
199. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265(3):621-36.
200. Andersen CL, Tesfa D, Siersma VD, Sandholdt H, Hasselbalch H, Bjerrum OW, et al. Prevalence and clinical significance of neutropenia discovered in routine complete blood cell counts: a longitudinal study. *J Intern Med*. 2016;279(6):566-75.
201. Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schaffer AA, et al. HAX1 deficiency causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet*. 2007;39(1):86-92.
202. Zeidler C, Germeshausen M, Klein C, Welte K. Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haematol*. 2009;144(4):459-67.
203. Hayee B, Antonopoulos A, Murphy EJ, Rahman FZ, Sewell G, Smith BN, et al. G6PC3 mutations are associated with a major defect of glycosylation: a novel mechanism for neutrophil dysfunction. *Glycobiology*. 2011;21(7):914-24.
204. Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: Results of a long-term survey. *Blood*. 2007;109(1):93-9.
205. Crawford J, Ozer H, Stoller R, Johnson D, Lyman G, Tabbara I, et al. Reduction by granulocyte colony-stimulating factor of fever and neutropenia induced by chemotherapy in patients with small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 1991;325(3):164-70.
206. Altwairgi AK, Hopman WM, Mates M. Real-world impact of granulocyte-colony stimulating factor on febrile neutropenia. *Curr Oncol*. 2013;20(3):e171-9.
207. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):302-14.
208. Chabot-Richards DS, George TI. Leukocytosis. *Int J Lab Hematol*. 2014;36(3):279-88.
209. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000;80(5):617-53.

210. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(9):678-89.
211. Guo Y, Audry M, Ciancanelli M, Alsina L, Azevedo J, Herman M, et al. Herpes simplex virus encephalitis in a patient with complete TLR3 deficiency: TLR3 is otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med*. 2011;208(10):2083-98.
212. Segal AW, Jones OT. Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes. *Nature*. 1978;276(5687):515-7.
213. Casanova JL, Abel L. Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages. *J Exp Med*. 2009;206(9):1839-43.
214. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4.
215. Liaudet L. [Oxidative biology and clinical implications of peroxynitrite]. *Rev Med Suisse*. 2007;3(137):2840-3.
216. Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virag L, et al. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*. 2003;107(6):896-904.
217. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(8):662-80.
218. Fukuyama N, Takebayashi Y, Hida M, Ishida H, Ichimori K, Nakazawa H. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(5):771-4.
219. Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdivia HH, et al. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in human heart failure. *Circulation*. 2005;111(8):988-95.
220. Joseph JE, Harrison P, Mackie IJ, Isenberg DA, Machin SJ. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br J Haematol*. 2001;115(2):451-9.
221. Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A, Lau CS. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2003;48(10):2888-97.
222. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol*. 2013;228(7):1404-12.
223. Swierczak A, Mouchemore KA, Hamilton JA, Anderson RL. Neutrophils: important contributors to tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2015;34(4):735-51.
224. Ionita MG, van den Borne P, Catanzariti LM, Moll FL, de Vries JP, Pasterkamp G, et al. High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(9):1842-8.
225. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*. 2010;122(18):1837-45.
226. Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng CN, Bjorkstrom NK, et al. Distinct infiltration of neutrophils in lesion shoulders in ApoE^{-/-} mice. *Am J Pathol*. 2010;177(1):493-500.
227. van Leeuwen M, Gijbels MJ, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, et al. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(1):84-9.

228. Edfeldt K, Agerberth B, Rottenberg ME, Gudmundsson GH, Wang XB, Mandal K, et al. Involvement of the antimicrobial peptide LL-37 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1551-7.
229. Lee TD, Gonzalez ML, Kumar P, Chary-Reddy S, Grammas P, Pereira HA. CAP37, a novel inflammatory mediator: its expression in endothelial cells and localization to atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 2002;160(3):841-8.
230. Soehnlein O. Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis. *Circ Res.* 2012;110(6):875-88.
231. Nagareddy PR, Murphy AJ, Stirzaker RA, Hu Y, Yu S, Miller RG, et al. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab.* 2013;17(5):695-708.
232. Barrett TJ, Distel E, Murphy AJ, Hu J, Garshick MS, Ogando Y, et al. Apolipoprotein AI Promotes Atherosclerosis Regression in Diabetic Mice by Suppressing Myelopoiesis and Plaque Inflammation. *Circulation.* 2019;140(14):1170-84.
233. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe PE, Dumas E, Rakel A, White M, et al. CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *Immunohorizons.* 2019;3(8):378-88.
234. Dhananjayan R, Koundinya KS, Malati T, Kutala VK. Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Indian J Clin Biochem.* 2016;31(4):372-9.
235. Grundy SM. Third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-421.
236. Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K. NETopathies? Unraveling the Dark Side of Old Diseases through Neutrophils. *Front Immunol.* 2016;7:678.
237. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000639.
238. McCormick A, Heesemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* 2010;12(12-13):928-36.
239. Meegan JE, Yang X, Coleman DC, Jannaway M, Yuan SY. Neutrophil-mediated vascular barrier injury: Role of neutrophil extracellular traps. *Microcirculation.* 2017;24(3).
240. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol.* 1996;59(2):229-40.
241. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668-76.
242. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost.* 2012;10(1):136-44.
243. Papayannopoulos V, Staab D, Zychlinsky A. Neutrophil elastase enhances sputum solubilization in cystic fibrosis patients receiving DNase therapy. *PLoS One.* 2011;6(12):e28526.
244. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest.* 2013.

245. Luger K, Richmond TJ. DNA binding within the nucleosome core. *Curr Opin Struct Biol.* 1998;8(1):33-40.
246. Simpson RT. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry.* 1978;17(25):5524-31.
247. Widom J. Chromatin structure: linking structure to function with histone H1. *Curr Biol.* 1998;8(22):R788-91.
248. Widom J. Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998;27:285-327.
249. Sorensen OE, Borregaard N. Neutrophil extracellular traps - the dark side of neutrophils. *J Clin Invest.* 2016;126(5):1612-20.
250. Law SM, Gray RD. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *J Inflamm (Lond).* 2017;14:29.
251. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134-47.
252. Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun.* 2014;6(6):765-79.
253. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-41.
254. Khan MA, Palaniyar N. Transcriptional firing helps to drive NETosis. *Sci Rep.* 2017;7:41749.
255. Yoo DG, Winn M, Pang L, Moskowitz SM, Malech HL, Leto TL, et al. Release of cystic fibrosis airway inflammatory markers from *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated human neutrophils involves NADPH oxidase-dependent extracellular DNA trap formation. *J Immunol.* 2014;192(10):4728-38.
256. Doua DN, Yip L, Khan MA, Grasmann H, Palaniyar N. Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis. *Blood.* 2014;123(4):597-600.
257. Keshari RS, Verma A, Barthwal MK, Dikshit M. Reactive oxygen species-induced activation of ERK and p38 MAPK mediates PMA-induced NETs release from human neutrophils. *J Cell Biochem.* 2013;114(3):532-40.
258. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-9.
259. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677-91.
260. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules.* 2019;9(8).
261. Doua DN, Khan MA, Grasmann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(9):2817-22.
262. Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med.* 2010;207(9):1853-62.

263. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Front Immunol.* 2018;9:2036.
264. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 2009;184(2):205-13.
265. Khan MA, Farahvash A, Douada DN, Licht JC, Grasemann H, Swezey N, et al. JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis. *Sci Rep.* 2017;7(1):3409.
266. Kenny EF, Herzig A, Kruger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, et al. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017;6.
267. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;92(4):841-9.
268. Wong SL, Wagner DD. Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. *FASEB J.* 2018:fj201800691R.
269. Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA. Activation of PAD4 in NET formation. *Front Immunol.* 2012;3:360.
270. Neeli I, Radic M. Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release. *Front Immunol.* 2013;4:38.
271. Guiducci E, Lemberg C, Kung N, Schraner E, Theocharides APA, LeibundGut-Landmann S. *Candida albicans*-Induced NETosis Is Independent of Peptidylarginine Deiminase 4. *Front Immunol.* 2018;9:1573.
272. Malawista SE, De Boisfleury Chevance A. The cytokineplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol.* 1982;95(3):960-73.
273. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.
274. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 2012;18(9):1386-93.
275. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-94.
276. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2010;185(12):7413-25.
277. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013;190(8):4136-48.
278. Bjornsdottir H, Dahlstrand Rudin A, Klose FP, Elmwall J, Welin A, Stylianou M, et al. Phenol-Soluble Modulin alpha Peptide Toxins from Aggressive *Staphylococcus aureus* Induce Rapid Formation of Neutrophil Extracellular Traps through a Reactive Oxygen Species-Independent Pathway. *Front Immunol.* 2017;8:257.
279. Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol.* 2013;191(5):2647-56.

280. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Moroy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat Genet.* 2000;25(2):177-81.
281. Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(21):9813-8.
282. Thomas GM, Carbo C, Curtis BR, Martinod K, Mazo IB, Schatzberg D, et al. Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood.* 2012;119(26):6335-43.
283. Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, et al. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol.* 2006;16(4):396-400.
284. Berends ET, Horswill AR, Haste NM, Monestier M, Nizet V, von Kockritz-Blickwede M. Nuclease expression by Staphylococcus aureus facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J Innate Immun.* 2010;2(6):576-86.
285. Saffarzadeh M, Preissner KT. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol.* 2013;20(1):3-9.
286. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med.* 2008;14(9):949-53.
287. von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood.* 2008;111(6):3070-80.
288. Chow OA, von Kockritz-Blickwede M, Bright AT, Hensler ME, Zinkernagel AS, Cogen AL, et al. Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps. *Cell Host Microbe.* 2010;8(5):445-54.
289. Ueki S, Melo RC, Ghiran I, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. *Blood.* 2013;121(11):2074-83.
290. Ueki S, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Hirokawa M, Matsuwaki Y, et al. Eosinophil extracellular trap cell death-derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(1):258-67.
291. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, Walls AF, Obata-Ninomiya K, Karasuyama H, et al. NADPH oxidase-independent formation of extracellular DNA traps by basophils. *J Immunol.* 2014;192(11):5314-23.
292. Mollerherm H, von Kockritz-Blickwede M, Branitzki-Heinemann K. Antimicrobial Activity of Mast Cells: Role and Relevance of Extracellular DNA Traps. *Front Immunol.* 2016;7:265.
293. Naqvi N, Ahuja K, Selvapandiyan A, Dey R, Nakhasi H, Puri N. Role of Mast Cells in clearance of Leishmania through extracellular trap formation. *Sci Rep.* 2017;7(1):13240.
294. Granger V, Faille D, Marani V, Noel B, Gallais Y, Szely N, et al. Human blood monocytes are able to form extracellular traps. *J Leukoc Biol.* 2017;102(3):775-81.
295. Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2011;187(1):538-52.
296. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-83.

297. Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(7):1417-24.
298. Wang W, Peng W, Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(2):415-21.
299. Yoo DG, Floyd M, Winn M, Moskowitz SM, Rada B. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol Lett*. 2014;160(2):186-94.
300. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819-35.
301. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, Dwivedi DJ, Mai SH, Weitz JI, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(9):1977-84.
302. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Jr., et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880-5.
303. Doring Y, Drechsler M, Soehnlein O, Weber C. Neutrophils in atherosclerosis: from mice to man. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):288-95.
304. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science*. 2015;349(6245):316-20.
305. Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res*. 2017;120(4):736-43.
306. Hofbauer TM, Mangold A, Scherz T, Seidl V, Panzenbock A, Ondracek AS, et al. Neutrophil extracellular traps and fibrocytes in ST-segment elevation myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2019;114(5):33.
307. de Denuis S, Tardif JC, White M, Bourassa MG, Racine N, Levesque S, et al. Temporal variations in hematocrit values in patients with left ventricular dysfunction: Relationship with cause-specific mortality and morbidity and optimal monitoring--further insights from SOLVD. *Can J Cardiol*. 2008;24(1):45-8.
308. Tracchi I, Ghigliotti G, Mura M, Garibaldi S, Spallarossa P, Barisione C, et al. Increased neutrophil lifespan in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2009;11(4):378-85.
309. Wang L, Zhou X, Yin Y, Mai Y, Wang D, Zhang X. Hyperglycemia Induces Neutrophil Extracellular Traps Formation Through an NADPH Oxidase-Dependent Pathway in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 2018;9:3076.
310. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*. 2015;21(7):815-9.
311. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):497-503.
312. Fadini GP, Menegazzo L, Scattolini V, Gintoli M, Albiero M, Avogaro A. A perspective on NETosis in diabetes and cardiometabolic disorders. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2016;26(1):1-8.

313. Fadini GP, Menegazzo L, Rigato M, Scattolini V, Poncina N, Bruttocao A, et al. NETosis Delays Diabetic Wound Healing in Mice and Humans. *Diabetes*. 2016;65(4):1061-71.
314. Choi Y, Pham LD, Lee DH, Ban GY, Lee JH, Kim SH, et al. Neutrophil Extracellular DNA Traps Induce Autoantigen Production by Airway Epithelial Cells. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5675029.
315. Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, Cassidy AJ, Suarez-Cuartin G, Sibila O, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(1):117-27.
316. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. 2020.
317. Organization WH. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>].
318. Canada Gd. Maladie à coronavirus (COVID-19) [Available from: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/maladie-coronavirus-covid-19.html>].
319. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020.
320. Shi H, Zuo Y, Yalavarthi S, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19. *medRxiv*. 2020.
321. Liang W, Feng Z, Rao S, Xiao C, Xue X, Lin Z, et al. Diarrhoea may be underestimated: a missing link in 2019 novel coronavirus. *Gut*. 2020;69(6):1141-3.
322. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020;158(6):1831-3 e3.
323. Jin X, Lian JS, Hu JH, Gao J, Zheng L, Zhang YM, et al. Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. *Gut*. 2020;69(6):1002-9.
324. Lin L, Jiang X, Zhang Z, Huang S, Zhang Z, Fang Z, et al. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. *Gut*. 2020;69(6):997-1001.
325. Organization WH. DRAFT landscape of COVID-19 candidate vaccines. *World*. 2020.
326. Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, Barker MD, Bax BD, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol*. 2015;11(3):189-91.
327. Cedervall J, Dragomir A, Saupe F, Zhang Y, Arnlov J, Larsson E, et al. Pharmacological targeting of peptidylarginine deiminase 4 prevents cancer-associated kidney injury in mice. *Oncoimmunology*. 2017;6(8):e1320009.
328. Junowicz E, Spencer JH. Studies on bovine pancreatic deoxyribonuclease A. II. The effect of different bivalent metals on the specificity of degradation of DNA. *Biochim Biophys Acta*. 1973;312(1):85-102.
329. Parsiegla G, Noguere C, Santell L, Lazarus RA, Bourne Y. The structure of human DNase I bound to magnesium and phosphate ions points to a catalytic mechanism common to members of the DNase I-like superfamily. *Biochemistry*. 2012;51(51):10250-8.
330. Lelliott PM, Momota M, Shibahara T, Lee MSJ, Smith NI, Ishii KJ, et al. Heparin induces neutrophil elastase-dependent vital and lytic NET formation. *Int Immunol*. 2020;32(5):359-68.

331. Hueber W, Patel DD, Dryja T, Wright AM, Koroleva I, Bruin G, et al. Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis. *Sci Transl Med*. 2010;2(52):52ra72.
332. Mitroulis I, Kambas K, Chrysanthopoulou A, Skendros P, Apostolidou E, Kourtzelis I, et al. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1beta and autophagy-related signaling in gout. *PLoS One*. 2011;6(12):e29318.
333. Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, Bonderup OK, Glerup H, Bogsted M, et al. Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(9):2052-67.
334. Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*. 2013;25(6):469-84.
335. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2019;381(26):2497-505.
336. Bouabdallaoui N, Tardif J-C, Waters DD, Pinto FJ, Maggioni AP, Diaz R, et al. Time-to-treatment initiation of colchicine and cardiovascular outcomes after myocardial infarction in the Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *European Heart Journal*. 2020.
337. Vaidya K, Tucker B, Kurup R, Khandkar C, Pandzic E, Barraclough J, et al. 2020.
338. Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol*. 1996;49(2):M74-9.
339. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003;170(6):3233-42.
340. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):28-37.
341. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Calprotectin and cardiovascular events. A narrative review. *Clin Biochem*. 2014;47(12):996-1001.
342. Cury DB, Mizsputen SJ, Versolato C, Mijji LO, Pereira E, Delboni MA, et al. Serum calprotectin levels correlate with biochemical and histological markers of disease activity in TNBS colitis. *Cell Immunol*. 2013;282(1):66-70.
343. Pathirana WG, Chubb SP, Gillett MJ, Vasikaran SD. Faecal Calprotectin. *Clin Biochem Rev*. 2018;39(3):77-90.
344. Jensen LJ, Kistorp C, Bjerre M, Raymond I, Flyvbjerg A. Plasma calprotectin levels reflect disease severity in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(5):999-1004.
345. Pedersen L, Nybo M, Poulsen MK, Henriksen JE, Dahl J, Rasmussen LM. Plasma calprotectin and its association with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:196.
346. Bjarnason I. The Use of Fecal Calprotectin in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2017;13(1):53-6.
347. Chatzikonstantinou M, Konstantopoulos P, Stergiopoulos S, Kontzoglou K, Verikokos C, Perrea D, et al. Calprotectin as a diagnostic tool for inflammatory bowel diseases. *Biomed Rep*. 2016;5(4):403-7.
348. Voganatsi A, Panyutich A, Miyasaki KT, Murthy RK. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *J Leukoc Biol*. 2001;70(1):130-4.

349. Shabani F, Farasat A, Mahdavi M, Gheibi N. Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflamm Res*. 2018;67(10):801-12.
350. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, et al. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104(13):4260-8.
351. Kerkhoff C, Nacken W, Benedyk M, Dagher MC, Sopalla C, Doussiere J. The arachidonic acid-binding protein S100A8/A9 promotes NADPH oxidase activation by interaction with p67phox and Rac-2. *FASEB J*. 2005;19(3):467-9.
352. Clark MA, Plank LD, Connolly AB, Streat SJ, Hill AA, Gupta R, et al. Effect of a chimeric antibody to tumor necrosis factor-alpha on cytokine and physiologic responses in patients with severe sepsis--a randomized, clinical trial. *Crit Care Med*. 1998;26(10):1650-9.
353. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
354. Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*. 2004;344(1-2):37-51.
355. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):223-9.
356. Yen T, Harrison CA, Devery JM, Leong S, Iismaa SE, Yoshimura T, et al. Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. *Blood*. 1997;90(12):4812-21.
357. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes*. 2010;59(1):249-55.
358. Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2006;72(11):1622-31.
359. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*. 2012;4(1):31-40.
360. Tardif MR, Chapeton-Montes JA, Posvanzic A, Page N, Gilbert C, Tessier PA. Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. *J Immunol Res*. 2015;2015:296149.
361. Naess-Andresen CF, Egelanddal B, Fagerhol MK. Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of calprotectin (L1 protein). *Clin Mol Pathol*. 1995;48(5):M278-84.
362. Kaushik DK, Hahn JN, Yong VW. EMMPRIN, an upstream regulator of MMPs, in CNS biology. *Matrix Biol*. 2015;44-46:138-46.
363. Hojilla CV, Wood GA, Khokha R. Inflammation and breast cancer: metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):205.
364. Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression. *Pathol Int*. 2006;56(7):359-67.
365. Kanekura T, Chen X. CD147/basigin promotes progression of malignant melanoma and other cancers. *J Dermatol Sci*. 2010;57(3):149-54.
366. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nat Med*. 2010;16(6):713-7.

367. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med*. 2013;45:e66.
368. Nishikawa Y, Kajiura Y, Lew JH, Kido JI, Nagata T, Naruishi K. Calprotectin Induces IL-6 and MCP-1 Production via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Human Gingival Fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2017;232(7):1862-71.
369. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007;13(9):1042-9.
370. Ehrchen JM, Sunderkotter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol*. 2009;86(3):557-66.
371. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
372. Kang JH, Hwang SM, Chung IY. S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor-kappaB pathways. *Immunology*. 2015;144(1):79-90.
373. Ma L, Sun P, Zhang JC, Zhang Q, Yao SL. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int J Mol Med*. 2017;40(1):31-8.
374. Yatime L, Betzer C, Jensen RK, Mortensen S, Jensen PH, Andersen GR. The Structure of the RAGE:S100A6 Complex Reveals a Unique Mode of Homodimerization for S100 Proteins. *Structure*. 2016;24(12):2043-52.
375. Leclerc E, Heizmann CW. The importance of Ca²⁺/Zn²⁺ signaling S100 proteins and RAGE in translational medicine. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011;3:1232-62.
376. Brun JG, Ulvestad E, Fagerhol MK, Jonsson R. Effects of human calprotectin (L1) on in vitro immunoglobulin synthesis. *Scand J Immunol*. 1994;40(6):675-80.
377. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(6):753-60.
378. Sohnle PG, Collins-Lech C, Wiessner JH. The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. *J Infect Dis*. 1991;164(1):137-42.
379. Murthy AR, Lehrer RI, Harwig SS, Miyasaki KT. In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J Immunol*. 1993;151(11):6291-301.
380. Miyasaki KT, Bodeau AL, Murthy AR, Lehrer RI. In vitro antimicrobial activity of the human neutrophil cytosolic S-100 protein complex, calprotectin, against *Capnocytophaga sputigena*. *J Dent Res*. 1993;72(2):517-23.
381. Brophy MB, Hayden JA, Nolan EM. Calcium ion gradients modulate the zinc affinity and antibacterial activity of human calprotectin. *J Am Chem Soc*. 2012;134(43):18089-100.
382. Anderson AS, Scully IL, Timofeyeva Y, Murphy E, McNeil LK, Mininni T, et al. Staphylococcus aureus manganese transport protein C is a highly conserved cell surface protein that elicits protective immunity against *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis*. 2012;205(11):1688-96.
383. Ouyang Z, He M, Oman T, Yang XF, Norgard MV. A manganese transporter, BB0219 (BmtA), is required for virulence by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3449-54.

384. Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, Coburn B, et al. The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun*. 2004;72(9):5522-5.
385. Bearden SW, Perry RD. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol*. 1999;32(2):403-14.
386. Zaia AA, Sappington KJ, Nisapakultorn K, Chazin WJ, Dietrich EA, Ross KF, et al. Subversion of antimicrobial calprotectin (S100A8/S100A9 complex) in the cytoplasm of TR146 epithelial cells after invasion by *Listeria monocytogenes*. *Mucosal Immunol*. 2009;2(1):43-53.
387. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008;319(5865):962-5.
388. Achouiti A, Vogl T, Urban CF, Rohm M, Hommes TJ, van Zoelen MA, et al. Myeloid-related protein-14 contributes to protective immunity in gram-negative pneumonia derived sepsis. *PLoS Pathog*. 2012;8(10):e1002987.
389. Sampson B, Fagerhol MK, Sunderkotter C, Golden BE, Richmond P, Klein N, et al. Hyperzincaemia and hypercalprotectinaemia: a new disorder of zinc metabolism. *Lancet*. 2002;360(9347):1742-5.
390. Kido J, Kido R, Suryono, Kataoka M, Fagerhol MK, Nagata T. Induction of calprotectin release by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human neutrophils. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(3):182-7.
391. Cotoi OS, Duner P, Ko N, Hedblad B, Nilsson J, Bjorkbacka H, et al. Plasma S100A8/A9 correlates with blood neutrophil counts, traditional risk factors, and cardiovascular disease in middle-aged healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(1):202-10.
392. Bruhn LV, Lauridsen KG, Schmidt AS, Rickers H, Bach LF, Lofgren B, et al. Elevated calprotectin in patients with atrial fibrillation with and without heart failure. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77(3):210-5.
393. Ma LP, Haugen E, Ikemoto M, Fujita M, Terasaki F, Fu M. S100A8/A9 complex as a new biomarker in prediction of mortality in elderly patients with severe heart failure. *Int J Cardiol*. 2012;155(1):26-32.
394. Altwegg LA, Neidhart M, Hersberger M, Muller S, Eberli FR, Corti R, et al. Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2007;28(8):941-8.
395. Morrow DA, Wang Y, Croce K, Sakuma M, Sabatine MS, Gao H, et al. Myeloid-related protein 8/14 and the risk of cardiovascular death or myocardial infarction after an acute coronary syndrome in the Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy: Thrombolysis in Myocardial Infarction (PROVE IT-TIMI 22) trial. *Am Heart J*. 2008;155(1):49-55.
396. Schaub N, Reichlin T, Meune C, Twerenbold R, Haaf P, Hochholzer W, et al. Markers of plaque instability in the early diagnosis and risk stratification of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2012;58(1):246-56.
397. Ionita MG, Vink A, Dijke IE, Laman JD, Peeters W, van der Kraak PH, et al. High levels of myeloid-related protein 14 in human atherosclerotic plaques correlate with the characteristics of rupture-prone lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(8):1220-7.

398. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, Gaus K, Zreiqat H, Cai H, et al. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem.* 2005;280(50):41521-9.
399. Miyamoto S, Ueda M, Ikemoto M, Naruko T, Itoh A, Tamaki S, et al. Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque of unstable angina. *Heart.* 2008;94(8):1002-7.
400. Katashima T, Naruko T, Terasaki F, Fujita M, Otsuka K, Murakami S, et al. Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. *Circ J.* 2010;74(4):741-8.
401. Averill MM, Barnhart S, Becker L, Li X, Heinecke JW, Leboeuf RC, et al. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation.* 2011;123(11):1216-26.
402. Boyd JH, Kan B, Roberts H, Wang Y, Walley KR. S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res.* 2008;102(10):1239-46.
403. Azzi S, Gavard J. [Blood vessels in cancer: can't stop whispering]. *Med Sci (Paris).* 2014;30(4):408-14.
404. 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.
405. Xu Y, Yu Q. Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region. *J Biol Chem.* 2001;276(37):34990-8.
406. Barton WA, Tzvetkova-Robev D, Miranda EP, Kolev MV, Rajashankar KR, Himanen JP, et al. Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(6):524-32.
407. 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):1161-9.
408. Li JJ, Huang YQ, Basch R, Karpatkin S. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost.* 2001;85(2):204-6.
409. Liu KL, Lin SM, Chang CH, Chen YC, Chu PH. Plasma angiopoietin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction - a pilot study. *Int J Cardiol.* 2015;182:155-60.
410. Neaogoe PE, Brkovic A, Hajjar F, Sirois MG. Expression and release of angiopoietin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms. *Growth Factors.* 2009;27(6):335-44.
411. 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):4150-6.
412. 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):3403-12.

413. 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):15732-9.
414. Koh GY, Kim I, Kwak HJ, Yun MJ, Leem JC. Biomedical significance of endothelial cell specific growth factor, angiopoietin. *Exp Mol Med*. 2002;34(1):1-11.
415. Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Honda Y. Angiotensin II induces expression of the Tie2 receptor ligand, angiopoietin-2, in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes*. 2001;50(4):867-75.
416. Moss A. The angiopoietin:Tie 2 interaction: a potential target for future therapies in human vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(6):579-92.
417. Rizov M, Andreeva P, Dimova I. Molecular regulation and role of angiogenesis in reproduction. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017;56(2):127-32.
418. Torry DS, Torry RJ. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol*. 1997;37(1):21-9.
419. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1445-52.
420. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev*. 1991;71(2):541-85.
421. Olfert IM, Baum O, Hellsten Y, Egginton S. Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(3):H326-36.
422. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(6):C1358-66.
423. Jousseaume AM, Poulaki V, Tsujikawa A, Qin W, Qaum T, Xu Q, et al. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol*. 2002;160(5):1683-93.
424. Dimberg A, Sund M. Cancer Angiogenesis and Vasculogenesis. *Pathobiology of Human Disease* 2014. p. 403-11.
425. Treps L, Gavard J. [Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad]. *Med Sci (Paris)*. 2015;31(11):989-95.
426. Pezzella F, Winkler F. Tumors and Blood Vessel Interactions: A Changing Hallmark of Cancer. *Reference Module in Biomedical Sciences* 2017.
427. Chung AS, Ferrara N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:563-84.
428. Azzi S, Hebda JK, Gavard J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Front Oncol*. 2013;3:211.
429. Shepel RN, Drapkina, O. M. . Angiogenesis in Patients with Chronic Heart Failure: Focus on Endothelial Vascular Growth Factor, Pentraxin-3 and Transforming Growth Factor Beta. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2020;16(3):10.
430. Mofarrahi M, Nouh T, Qureshi S, Guillot L, Mayaki D, Hussain SN. Regulation of angiopoietin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(5):L955-63.
431. 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):1523-30.
432. Chen J, Smith LEH. Ocular Angiogenesis. *Ocular Therapeutics* 2008. p. 473-93.

433. Martin V, Liu D, Fueyo J, Gomez-Manzano C. Tie2: a journey from normal angiogenesis to cancer and beyond. *Histol Histopathol.* 2008;23(6):773-80.
434. 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):477-9.
435. 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):603-7.
436. Iurlaro M, Scatena M, Zhu WH, Fogel E, Wieting SL, Nicosia RF. Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 17):3635-43.
437. Jones N, Chen SH, Sturk C, Master Z, Tran J, Kerbel RS, et al. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol.* 2003;23(8):2658-68.
438. 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):952-9.
439. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W. Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol.* 1998;8(9):529-32.
440. Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K, Nakashima E, Terasaki T. A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem.* 2004;89(2):503-13.
441. Lee SW, Kim WJ, Jun HO, Choi YK, Kim KW. Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2. *Int J Mol Med.* 2009;23(2):279-84.
442. Burnett A, Gomez I, De Leon DD, Ariaans M, Progijs P, Kammerer RA, et al. Angiopoietin-1 enhances neutrophil chemotaxis in vitro and migration in vivo through interaction with CD18 and release of CCL4. *Sci Rep.* 2017;7(1):2332.
443. Lavoie SS, Dumas E, Vulesevic B, Neagoe PE, White M, Sirois MG. Synthesis of Human Neutrophil Extracellular Traps Contributes to Angiopoietin-Mediated In Vitro Proinflammatory and Proangiogenic Activities. *J Immunol.* 2018;200(11):3801-13.
444. Haddad LE, Sirois MG. Angiopoietin-1 upregulates de novo expression of IL-1beta and I11-Ra, and the exclusive release of I11-Ra from human neutrophils. *PLoS One.* 2014;9(2):e88980.
445. Dumas E, Neagoe PE, McDonald PP, White M, Sirois MG. New Insights into the Pro-Inflammatory Activities of Ang1 on Neutrophils: Induction of MIP-1beta Synthesis and Release. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163140.
446. Neagoe PE, Dumas E, Hajjar F, Sirois MG. Angiopoietin-1 but not angiopoietin-2 induces IL-8 synthesis and release by human neutrophils. *J Cell Physiol.* 2012;227(8):3099-110.
447. Ricciuto DR, dos Santos CC, Hawkes M, Toltl LJ, Conroy AL, Rajwans N, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 as clinically informative prognostic biomarkers of morbidity and mortality in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2011;39(4):702-10.
448. Ong T, McClintock DE, Kallet RH, Ware LB, Matthay MA, Liu KD. Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Crit Care Med.* 2010;38(9):1845-51.

449. Ahmed A, Fujisawa T. Multiple roles of angiopoietins in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*. 2011;22(5):380-5.
450. Post S, Peeters W, Busser E, Lamers D, Sluijter JP, Goumans MJ, et al. Balance between angiopoietin-1 and angiopoietin-2 is in favor of angiopoietin-2 in atherosclerotic plaques with high microvessel density. *J Vasc Res*. 2008;45(3):244-50.
451. Fujisawa T, Wang K, Niu XL, Egginton S, Ahmad S, Hewett P, et al. Angiopoietin-1 promotes atherosclerosis by increasing the proportion of circulating Gr1⁺ monocytes. *Cardiovasc Res*. 2017;113(1):81-9.
452. Calfee CS, Gallagher D, Abbott J, Thompson BT, Matthay MA, Network NA. Plasma angiopoietin-2 in clinical acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Crit Care Med*. 2012;40(6):1731-7.
453. Ganter MT, Cohen MJ, Brohi K, Chesebro BB, Staudenmayer KL, Rahn P, et al. Angiopoietin-2, marker and mediator of endothelial activation with prognostic significance early after trauma? *Ann Surg*. 2008;247(2):320-6.
454. Chong AY, Caine GJ, Freestone B, Blann AD, Lip GY. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(3):423-8.
455. Lee KW, Lip GY, Blann AD. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004;110(16):2355-60.
456. Ahmed A, Fujisawa T. Multiple roles of angiopoietins in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2011;22(5):380-5.
457. Eleuteri E, Di Stefano A, Giordano A, Corra U, Tarro Genta F, Gnemmi I, et al. Prognostic value of angiopoietin-2 in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2016;212:364-8.
458. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res*. 2014;114(3):565-71.
459. Lukasz A, Beutel G, Kumpers P, Denecke A, Westhoff-Bleck M, Schieffer B, et al. Angiopoietin-2 in adults with congenital heart disease and heart failure. *PLoS One*. 2013;8(6):e66861.
460. Poss J, Ukena C, Kindermann I, Ehrlich P, Fuernau G, Ewen S, et al. Angiopoietin-2 and outcome in patients with acute decompensated heart failure. *Clin Res Cardiol*. 2015;104(5):380-7.
461. Jiang F, Mohr F, Ullrich ND, Hecker M, Wagner AH. Endothelial cell modulation of cardiomyocyte gene expression. *Exp Cell Res*. 2019:111565.
462. Link A, Poss J, Rbah R, Barth C, Feth L, Selejan S, et al. Circulating angiopoietins and cardiovascular mortality in cardiogenic shock. *Eur Heart J*. 2013;34(22):1651-62.
463. Chen S, Guo L, Chen B, Sun L, Cui M. Association of serum angiopoietin-1, angiopoietin-2 and angiopoietin-2 to angiopoietin-1 ratio with heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Exp Ther Med*. 2013;5(3):937-41.
464. Lim HS, Lip GY, Blann AD. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2005;180(1):113-8.

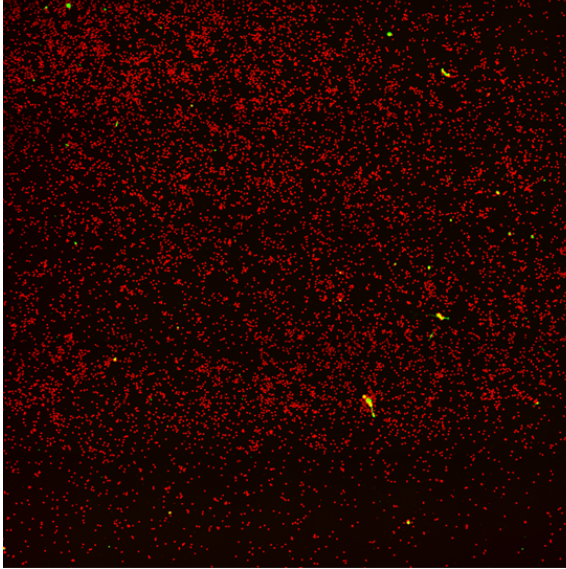
465. Rasul S, Reiter MH, Ilhan A, Lampichler K, Wagner L, Kautzky-Willer A. Circulating angiopoietin-2 and soluble Tie-2 in type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2011;10:55.
466. Singh H, Brindle NP, Zammit VA. High glucose and elevated fatty acids suppress signaling by the endothelium protective ligand angiopoietin-1. *Microvasc Res.* 2010;79(2):121-7.
467. Koh GY. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration. *Trends Mol Med.* 2013;19(1):31-9.
468. Brindle NPJ, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and Functions of Angiopoietin-1 in Vascular Protection. *Circulation Research.* 2006;98(8):1014-23.
469. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007;56(7):1761-72.
470. Genth-Zotz S, von Haehling S, Bolger AP, Kalra PR, Wensel R, Coats AJ, et al. Pathophysiologic quantities of endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha release in whole blood from patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2002;90(11):1226-30.
471. Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA. Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine.* 1990;2(3):205-10.
472. Cicco NA, Lindemann A, Content J, Vandenbussche P, Lubbert M, Gauss J, et al. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood.* 1990;75(10):2049-52.
473. Le Contel C, Vinit MA, Parant FJ, Parant MA. Differential priming for endotoxin-induced circulating cytokine production by tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 beta. *Cytokine.* 1990;2(5):375-80.
474. Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature.* 1998;395(6699):284-8.
475. Charalambous BM, Stephens RC, Feavers IM, Montgomery HE. Role of bacterial endotoxin in chronic heart failure: the gut of the matter. *Shock.* 2007;28(1):15-23.
476. Anker SD, Egerer KR, Volk HD, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJ. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 1997;79(10):1426-30.
477. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet.* 1999;353(9167):1838-42.
478. Sharma R, Bolger AP, Li W, Davlouros PA, Volk HD, Poole-Wilson PA, et al. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital heart disease. *Am J Cardiol.* 2003;92(2):188-93.
479. Peschel T, Schonauer M, Thiele H, Anker SD, Schuler G, Niebauer J. Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2003;5(5):609-14.
480. Al-Kindi SG, Buzkova P, Shitole SG, Reiner AP, Garg PK, Gottdiener JS, et al. Soluble CD14 and Risk of Heart Failure and Its Subtypes in Older Adults. *J Card Fail.* 2020;26(5):410-9.

481. Huang X, Yan D, Xu M, Li F, Ren M, Zhang J, et al. Interactive association of lipopolysaccharide and free fatty acid with the prevalence of type 2 diabetes: A community-based cross-sectional study. *Journal of diabetes investigation*. 2019;10(6):1438-46.
482. Sarma JV, Ward PA. Neutrophils in Endothelial Damage. In: Mackay IR, Rose NR, Diamond B, Davidson A, editors. *Encyclopedia of Medical Immunology: Autoimmune Diseases*. New York, NY: Springer New York; 2014. p. 777-84.
483. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 2005;111(3):363-8.
484. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983-92.
485. Alem MM. Endothelial Dysfunction in Chronic Heart Failure: Assessment, Findings, Significance, and Potential Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
486. Zuchi C, Tritto I, Carluccio E, Mattei C, Cattadori G, Ambrosio G. Role of endothelial dysfunction in heart failure. *Heart Failure Reviews*. 2020;25(1):21-30.
487. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-24.
488. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhofer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014;20(5):511-7.
489. Jimenez-Alcazar M, Rangaswamy C, Panda R, Bitterling J, Simsek YJ, Long AT, et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*. 2017;358(6367):1202-6.
490. Maliba R, Lapointe S, Neagoe PE, Brkovic A, Sirois MG. Angiotensin-1 and -2 are both capable of mediating endothelial PAF synthesis: intracellular signalling pathways. *Cell Signal*. 2006;18(11):1947-57.
491. Stephan JR, Yu F, Costello RM, Bleier BS, Nolan EM. Oxidative Post-translational Modifications Accelerate Proteolytic Degradation of Calprotectin. *J Am Chem Soc*. 2018;140(50):17444-55.
492. Liu P, Ryczko M, Xie X, Baardsnes J, Lord-Dufour S, Duroche Y, et al. New soluble angiotensin analog of Hepta-ANG1 prevents pathological vascular leakage. *Biotechnol Bioeng*. 2021;118(1):423-32.
493. Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Huang T, Kovac L, et al. Angiotensins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol*. 2003;10(1):38-44.
494. Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Steinmetz MO, Ryu YS, Lee SH, et al. COMP-Ang1: a designed angiotensin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(15):5547-52.
495. Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, et al. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(3):R69.
496. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Front Physiol*. 2017;8:508.

497. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I270-4.
498. Ehrentraut H, Weber C, Ehrentraut S, Schwederski M, Boehm O, Knuefermann P, et al. The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(6):602-10.
499. Singh N, Traisak P, Martin KA, Kaplan MJ, Cohen PL, Denny MF. Genomic alterations in abnormal neutrophils isolated from adult patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(4):R165.
500. Marini O, Spina C, Mimiola E, Cassaro A, Malerba G, Todeschini G, et al. Identification of granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSCs) in the peripheral blood of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. *Oncotarget*. 2016;7(19):27676-88.
501. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep*. 2015;10(4):562-73.
502. Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G, et al. Low-Density Granulocytes Are Elevated in Mycobacterial Infection and Associated with the Severity of Tuberculosis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153567.
503. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*. 2013;41(3):820-32.
504. Marechal P, Tridetti J, Nguyen ML, Wera O, Jiang Z, Gustin M, et al. Neutrophil Phenotypes in Coronary Artery Disease. *J Clin Med*. 2020;9(5).
505. Kanamaru R, Ohzawa H, Miyato H, Yamaguchi H, Hosoya Y, Lefor AK, et al. Neutrophil Extracellular Traps Generated by Low Density Neutrophils Obtained from Peritoneal Lavage Fluid Mediate Tumor Cell Growth and Attachment. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2018(138).
506. Torres-Ruiz J, Carrillo-Vázquez DA, Tapia-Rodríguez M, Garcia-Galicia JA, Alcocer-Varela J, Gómez-Martín D. The role of low density granulocytes and NETosis in the pathogenesis of adult-onset Still's Disease. *Clinical and experimental rheumatology*. 2019;37 Suppl 121(6):74-82.

ANNEXE

Volontaire sain



Patient ADHFpEF+T2DM

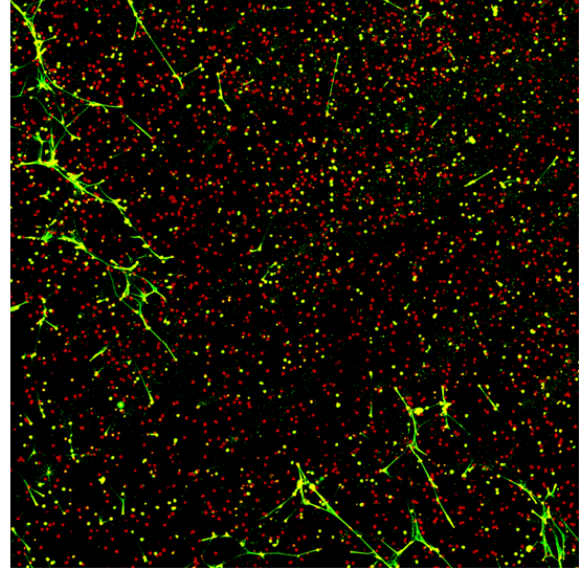


Figure A1. Relâche des NETs au niveau basal par les neutrophiles d'un volontaire sain (VS) et d'un patient ADHFpEF+T2DM. Les neutrophiles isolés d'un volontaire sain et d'un patient ADHFpEF+T2DM ont été incubés sans agoniste pendant 1 heure afin d'induire la formation de NETs. Une coloration avec WGA (en rouge) permet de visualiser les neutrophiles et une coloration de l'ADN double brin avec Sytox Green permet de visualiser les NETs. L'acquisition des images a été obtenue par microscopie confocale (LSM 710, Carl Zeiss). Magnification à 200X. On observe que sans agoniste, les neutrophiles de patients ADHFpEF+T2DM relâchent plus de NETs que ceux des volontaires sains.

Article publié: Angiotensin 1 release from human neutrophils is independent from neutrophil extracellular traps (NETs)

RESEARCH

Open Access



Angiopoietin 1 release from human neutrophils is independent from neutrophil extracellular traps (NETs)

Elcha Charles^{1,2}, Benjamin L. Dumont^{1,2}, Steven Bonneau^{1,2}, Paul-Eduard Neagoe¹, Louis Villeneuve¹, Agnès Râkel^{3,4}, Michel White^{1,3*} and Martin G. Sirois^{1,2*}

Abstract

Background: Neutrophils induce the synthesis and release of angiopoietin 1 (Ang1), a cytosolic growth factor involved in angiogenesis and capable of inducing several pro-inflammatory activities in neutrophils. Neutrophils also synthesize and release neutrophil extracellular traps (NETs), comprised from decondensed nuclear DNA filaments carrying proteins such as neutrophil elastase (NE), myeloperoxidase (MPO), proteinase 3 (PR3) and calprotectin (S100A8/S100A9), which together, contribute to the innate immune response against pathogens (e.g., bacteria). NETs are involved in various pathological conditions through pro-inflammatory, pro-thrombotic and endothelial dysfunction effects and have recently been found in heart failure (HF) and type 2 diabetes (T2DM) patients. The aim of the present study was to investigate the role of NETs on the synthesis and release of Ang1 by the neutrophils in patients with T2DM and HF with preserved ejection fraction (HFpEF) (stable or acute decompensated; ADHFpEF) with or without T2DM.

Results: Our data show that at basal level (PBS) and upon treatment with LPS, levels of NETs are slightly increased in patients suffering from T2DM, HFpEF ± T2DM and ADHF without (w/o) T2DM, whereas this increase was significant in ADHFpEF + T2DM patients compared to healthy control (HC) volunteers and ADHFpEF w/o T2DM. We also observed that treatments with PMA or A23187 increase the synthesis of Ang1 (from 150 to 250%) in HC and this effect is amplified in T2DM and in all cohorts of HF patients. Ang1 is completely released (100%) by neutrophils of all groups and does not bind to NETs as opposed to calprotectin.

Conclusions: Our study suggests that severely ill patients with HFpEF and diabetes synthesize and release a greater abundance of NETs while Ang1 exocytosis is independent of NETs synthesis.

Keywords: Angiopoietin 1, Neutrophil, NETs, Heart failure, Type 2 diabetes, Calprotectin (S100A8/A9), Inflammation

Background

Neutrophil extracellular traps (NETs) are composed of double-stranded DNA decorated with cytosolic and granule-derived pro-inflammatory cytokines and enzymes [1]. NETs are in response to inflammatory stimuli and

carry cytoplasmic, granular and nuclear proteins (e.g. calprotectin; S100A8/A9, myeloperoxidase (MPO), neutrophil elastase (NE), histones and others) [2], contributing to the innate immune response against pathogens [1, 3, 4]. Although NETs were initially described as an antimicrobial mechanism of neutrophils and implicated in infectious disorders [1], other studies reported NETs involvement in the pathophysiology of non-infectious conditions such as thrombosis [5, 6], fibrosis [7, 8], inflammation [9] and cardiovascular disorders [10]. Even

*Correspondence: m_white@icm-mhi.com; Martin.sirois@icm-mhi.org
¹ Research Center, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, 5000 Belanger Street, Montreal, QC H1T 1C8, Canada
Full list of author information is available at the end of the article



though there are common proteins linked to NETs, the variety and quantity of proteins bound to NETs can vary depending on the stimuli and pro-inflammatory conditions [11, 12].

Heart failure (HF) is a pro-inflammatory condition, in which the magnitude of inflammation is associated with the disease severity, being maximal in acute decompensated heart failure (ADHF) patients. Lately, we and other groups reported an increase of NETs formation (NETosis), either circulating or under in vitro neutrophil stimulation in type 2 diabetic (T2DM) patients [13–15] and in patients suffering from HF with or without (w/o) T2DM [15]. HF classification is based on left ventricular ejection fraction (LVEF), which can be reduced (HFrEF, LVEF \leq 40%) or preserved (HFpEF, LVEF \geq 50%), each with distinct phenotypes [16]. HFrEF is typically associated to primary myocardial lesion (e.g. myocardial infarction) leading to inadequate contractility of the left ventricle [16]. In contrast, HFpEF is a heterogeneous and multiorgan disorder, influenced by multiple comorbidities, including obesity, hypertension and T2DM. These conditions can lead to low-grade systemic inflammation, extensive endothelial and cardiac microvascular dysfunction, which can ultimately induce myocardial leukocytes migration, ventricular fibrosis, stiffening and dysfunction [17, 18]. In these conditions, impaired angiogenesis can occur and is mediated by growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietins (Ang). Over the last years, HFpEF prevalence outreached HFrEF cases, representing now > 50% of all HF patients [19, 20] and the attempts to transpose life-saving therapies from HFrEF to HFpEF have failed [21, 22]. It is therefore critical to find potential treatments for these patients.

There is also an increased incidence of ADHF, defined by a worsening of stable chronic HF [23]. This increases the rate of hospitalization and death in patients > 65 years old, who also have a 40% prevalence of T2DM [19]. The management of ADHF is different from stable HF [24], hence the importance of studying this pathology separately.

Calprotectin (S100A8/A9), a 36 kDa heterodimeric complex, is a cytosolic glycoprotein with two calcium binding of the S100 protein family and is constitutively expressed in neutrophils, monocytes, and macrophages [25–28]. Calprotectin, known for its antimicrobial functions [27, 28], is carried by NETs [3] and used as an inflammatory marker in the diagnostic of non-infectious inflammatory disorders such as arthritis, bowel [29, 30] and cardiovascular diseases (e.g. myocardial infarction, unstable angina and chronic HF) [31]. Angiopoietin 1 (Ang1) is a secreted 70-kDa glycoprotein constitutively expressed by vascular smooth muscle cells [32], platelets

[33], pericytes, monocytes and neutrophils [34, 35] and a key regulator for angiogenesis, through vascular stabilisation and maturation [36]. Ang1 may also play a role in endothelial dysfunction associated with cardiovascular diseases such as HF and T2DM [37, 38]. Yet, it is unknown if the release of Ang1 by the neutrophils is associated to NETs synthesis and release.

The objective of this study was to determine the capacity of various inflammatory mediators (LPS, PMA and A23187) to induce NETs, Ang1 and calprotectin synthesis and release, and if Ang1 can bind to NETs, using calprotectin as a positive control, from neutrophils of patients with stable or decompensated HF with or w/o T2DM compared with healthy control (HC) volunteers.

Results

The clinical characteristics of the study population are presented in Table 1. The study population consisted of 34 healthy control (HC) volunteers, 8 patients with T2DM and without HF-pEF, 12 patients with HFpEF and with stable symptoms (7 with T2DM) and 13 patients with ADHFpEF (6 with T2DM). Most HF and ADHF patients had a HF caused by cardiomyopathy. All patients with stable HF and a majority of patients with ADHF + T2DM suffered from hypertension. There was no significant difference in LV ejection fraction between stable or ADHF patients with or without diabetes. All T2DM patients were treated with statins. The majority (> 70%) of stable HF or ADHF patients were treated by oral anticoagulants.

NETs release by neutrophils

The rate of NETs synthesis and release for all 6 cohorts (HC, T2DM, stable HFpEF \pm T2DM and ADHF-pEF \pm T2DM patients) is presented in Fig. 1. The basal value of NETs (quantified as dsDNA) released by neutrophils from HC treated with PBS (basal control) for 3 h was 63.6 ± 9.6 ng/ 5×10^6 neutrophils/mL (Fig. 1). In HC, we observed a significant 4.2-fold (265 vs 63.6 ng/mL) and 9.4-fold (597 vs 63.6 ng/mL) NETs increase post-stimulation with PMA and A23187 respectively compared to PBS, whereas LPS did not increase NETs release. A similar pattern was observed in PMA- and A23187-stimulated neutrophils from T2DM patients, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF without T2DM (Fig. 1). Basal and LPS-stimulated neutrophils from ADHFpEF + T2DM patients released significantly more NETs (2.4-fold (152 vs 63.6 ng/mL) and 2.9-fold (199 vs 63.6 ng/mL) respectively), while the A23187 stimulation released a significant lower quantity of NETs (47% decrease; 316 vs 597 ng/mL) compared to HC. When comparing ADHF w/o T2DM versus ADHF + T2DM, we

Table 1 Baseline patients characteristics

	HC (n = 34)	T2DM group (n = 8)	Stable HFpEF (n = 5)	Stable HFpEF + T2DM (n = 7)	ADHFpEF (n = 7)	ADHFpEF + T2DM (n = 6)
Age (years)		68 ± 1.7	75 ± 3.3	71 ± 3.2	82 ± 3.0*	73 ± 3.5
Males n (%)	20 (58.8%)	6 (75%)	2 (40%)	4 (57.1%)	2 (28.6%)	4 (66.7%)
<i>NYHA classification n (%)</i>						
Class I	n/a	n/a	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)
Class II	n/a	n/a	3 (60%)	5 (71.4%)	2 (28.6%)	1 (16.7%)
Class III	n/a	n/a	2 (40%)	1 (14.3%)	2 (28.6%)	2 (33.3%)
Class IV	n/a	n/a	0 (0%)	0 (0%)	2 (28.6%)	2 (33.3%)
<i>Etiology n (%)</i>						
Ischemia	n/a	n/a	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	2 (33.3%)
Cardiomyopathy	n/a	n/a	1 (20%)	5 (71.4%)	3 (42.9%)	1 (16.7%)
Valvular	n/a	n/a	0 (0%)	3 (42.9%)	1 (14.3%)	2 (33.3%)
Others	n/a	n/a	4 (80%)	0 (0%)	4 (57.1%)	0 (0%)
LVEF (%)	n/a	n/a	54 ± 2.1	58 ± 1.5	57 ± 2.6	55 ± 1.3
Hypertension	n/a	6 (75%)	5 (100%)	7 (100%)	4 (57.1%)	6 (100%)
Dyslipidemia	n/a	7 (87.5%)	1 (20%)	4 (57.1%)	3 (42.9%)	5 (83.3%)
Stroke	n/a	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
<i>Biochemistry</i>						
Creatinine (µmol/l)	n/a	86.7 ± 8.6	147 ± 43	146 ± 17	127 ± 21	166 ± 26
Glucose (mmol/l)	n/a	9.0 ± 0.7	5.7 ± 0.6*	6.9 ± 0.6	6.4 ± 0.6	8.0 ± 0.6
Triglyceride (mmol/l)	n/a	1.35 ± 0.19	1.02 ± 0.12	2.06 ± 0.56		1.43 ± 0.13
LDL (mmol/l)	n/a	1.80 ± 0.12	2.23 ± 0.80	1.09 ± 0.23		1.64 ± 0.50
<i>Medication n (%)</i>						
ACEi	n/a	3 (37.5%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
ARBs	n/a	5 (62.5%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)
β-blockers	n/a	3 (37.5%)	3 (60%)	5 (71.4%)	5 (71.4%)	5 (83.3%)
Diuretic agents	n/a	2 (25%)	5 (100%)	7 (100%)	5 (71.4%)	6 (100%)
Statins	n/a	8 (100%)	2 (40%)	3 (42.9%)	2 (28.6%)	5 (83.3%)
Anticoagulants	n/a	0 (0.0%)	5 (100%)	4 (57.1%)	6 (85.7%)	3 (50.0%)
Sulfonylureas	n/a	3 (37.5%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)	2 (33.3%)
DDP-4 inhibitors	n/a	5 (62.5%)	0 (0.0%)	4 (57.1%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
GLP-1 agonists	n/a	2 (25%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
SGLT-2 inhibitors	n/a	2 (25%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
Metformin	n/a	7 (87.5%)	1 (20%)	4 (57.1%)	0 (0.0%)	1 (16.7%)
Insulin	n/a	1 (12.5%)	0 (0.0%)	2 (28.6%)	0 (0.0%)	2 (33.3%)

HC, healthy controls; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; ADHF, acute decompensated heart failure; T2DM, type-2 diabetes mellitus; NYHA, New York Health Association; LVEF, left ventricular ejection fraction; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; DPP-4, dipeptidyl peptidase 4; GLP-1, glucagon-like peptide 1; SGLT2, sodium-glucose co-transporter-2. Continuous variables are shown as mean ± standard error mean and categorical variables as number (%). Anti-platelets included aspirin, clopidogrel, prasugrel, or ticagrelor or a combination of these. * $p < 0.05$ versus T2DM

observed that NETs release increased in basal condition (3.2-fold; 152 vs 47.4 ng/mL) and LPS-stimulated neutrophils (2.5-fold; 199 vs 81.1 ng/mL).

Angiopietin 1 release, intracellular content and NETs binding in neutrophils

We assessed the Ang1 release, intracellular content and binding capacity to released NETs in isolated neutrophils from all 6 cohorts upon stimulation with PBS, LPS, PMA

and A23187 for 3 h. The post-isolation intracellular content of Ang1 (T0) was 112 ± 11 pg/ 5×10^6 neutrophils/mL from HC. There was a non-significant decrease in Ang1 concentrations at T0 from neutrophils of all five patients' cohorts (Fig. 2). After a 3-h treatment with PBS, LPS, PMA or A23187, the Ang1 content released by neutrophils from all cohorts was higher than before treatment (T0), but only significant in PBS- (1.56-fold; 175 vs 112 pg/mL), PMA- (1.98-fold; 222 vs 112 pg/mL) and

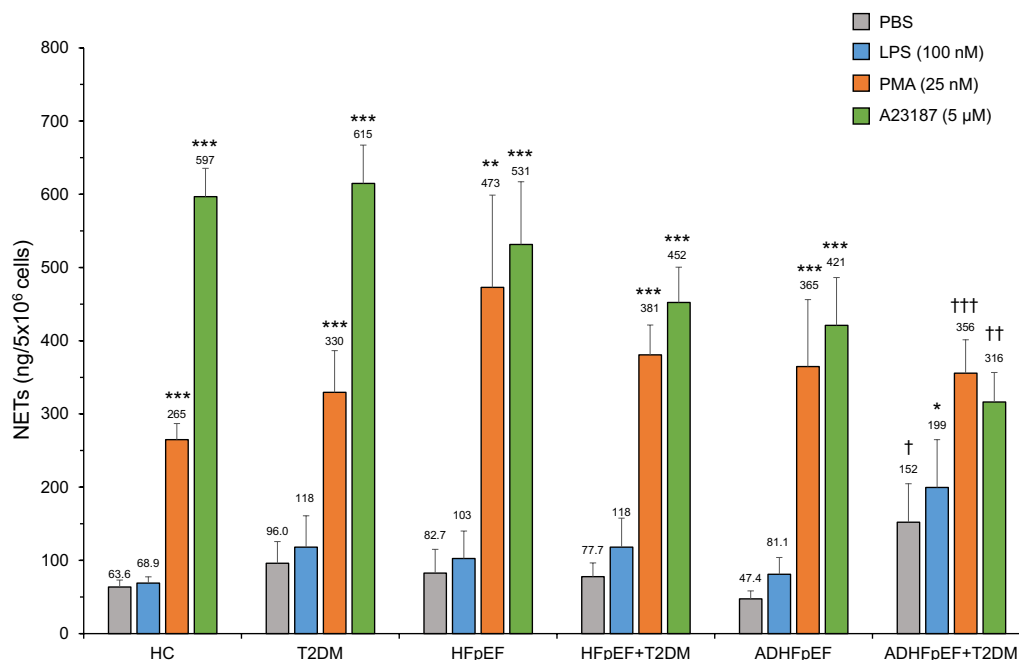


Fig. 1 NETs release by neutrophils. Isolated neutrophils (5×10^6 /mL) from HC, T2DM, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients were incubated at 37 °C for 3 h with PBS (control vehicle) and agonists, LPS (100 nM), PMA (25 nM), or A23187 (5 μ M). NETs were quantified using Quant-IT PicoGreen dsDNA detection kit. Data shown as mean \pm SEM. Significance of data is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ compared with PBS respectively and by $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$, $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ compared with corresponding treatment of HC. HC (n = 28–32), T2D (n = 8), stable HFpEF (n = 5), stable HFpEF + T2DM (n = 6), ADHF (n = 6–7), ADHF + T2DM (n = 5–6)

A23187-(1.80-fold; 202 vs 112 pg/mL) stimulated neutrophils from HC. The concentration of Ang1 detected intracellularly or bound to NETs following a 3-h stimulation with all agonists in all 6 cohorts were below the lower limit of quantitation (LLOQ; < 156 pg/mL), and extrapolated from the ELISA standard curve. Therefore, the total amount of Ang1 detected at 3 h post-treatment was considered as being almost completely released, indicating a significant increase of Ang1 synthesis (up to 1.98-fold; 202 vs 112 pg/mL) in neutrophils from HC, and this effect was amplified in PMA and A23187 stimulated neutrophils from T2DM patients (up to 2.91-fold; 201 vs 69 pg/mL). In all other cohorts, independently from the agonists used, Ang1 synthesis of also increased (up to 3.18-fold; 216 vs 101 pg/mL in HFpEF PMA-stimulated neutrophils) (Fig. 2).

Calprotectin release, intracellular content and NETs binding in neutrophils

We assessed the calprotectin (S100A8/S100A9) release, intracellular content and binding capacity to released NETs in isolated neutrophils from all 6 cohorts upon stimulation with PBS, LPS, PMA, and A23187 for 3 h. The post-isolation calprotectin intracellular content (T0)

in neutrophils from HC was $55.9 \pm 8.7 \mu\text{g}/5 \times 10^6$ neutrophils/mL, while a higher concentration (non-significant) was observed for all patient's cohorts (Fig. 3).

In all 6 cohorts and independently from the agonist used, the calprotectin released was significantly lower than the initial quantity found in post-isolation neutrophils (T0). None of the agonists significantly increased the calprotectin release when compared to unstimulated neutrophils (PBS) (Fig. 3A).

In all 6 cohorts and independently from the agonist used, the intracellular calprotectin was lower than the initial quantity found in post-isolation neutrophils (T0). PMA-stimulated neutrophils from HC, T2DM and ADHFpEF increased significantly (up to 8.8-fold; 99 vs 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in ADHFpEF) the calprotectin intracellular content compared to PBS. A23187-stimulated neutrophils from HC significantly increased the intracellular calprotectin (2.6-fold; 39.6 vs 15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HFpEF + T2DM had a significantly lower concentration of intracellular calprotectin (55% decrease; 22.8 vs 51.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to T2DM patients, whereas in ADHFpEF patients it increased significantly (2.0-fold; 79.5 vs 39.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) compared to HC. Finally, we observed a significant increase (2.7-fold; 62.3 vs 22.8 $\mu\text{g}/$

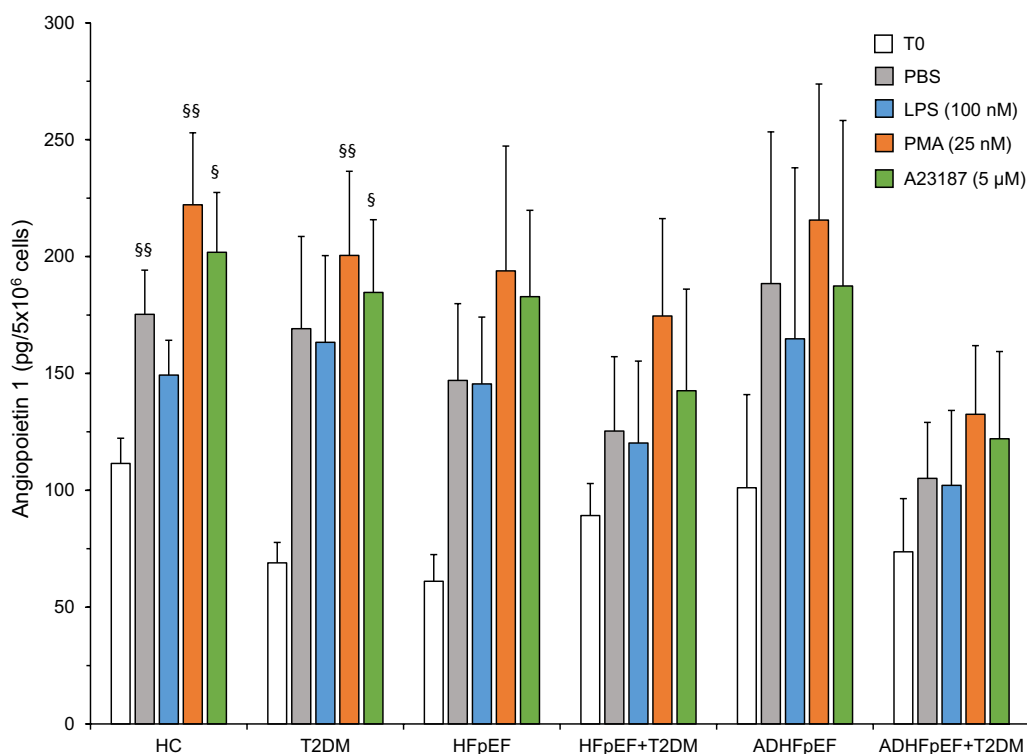


Fig. 2 Angiopoietin 1 release from neutrophils. Isolated neutrophils (5×10^6 /mL) from HC, T2DM, stable HFpEF \pm T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients were incubated at 37 °C for 3 h with different agonists (PBS control, PMA, LPS and A23187). By ELISA, we quantified Ang1 from unstimulated neutrophils (T0) and stimulated neutrophils. § $p < 0.05$ and §§ $p < 0.01$ versus T0

mL) in the calprotectin neutrophil content from ADHFpEF + T2DM compared to HFpEF + T2DM (Fig. 3B).

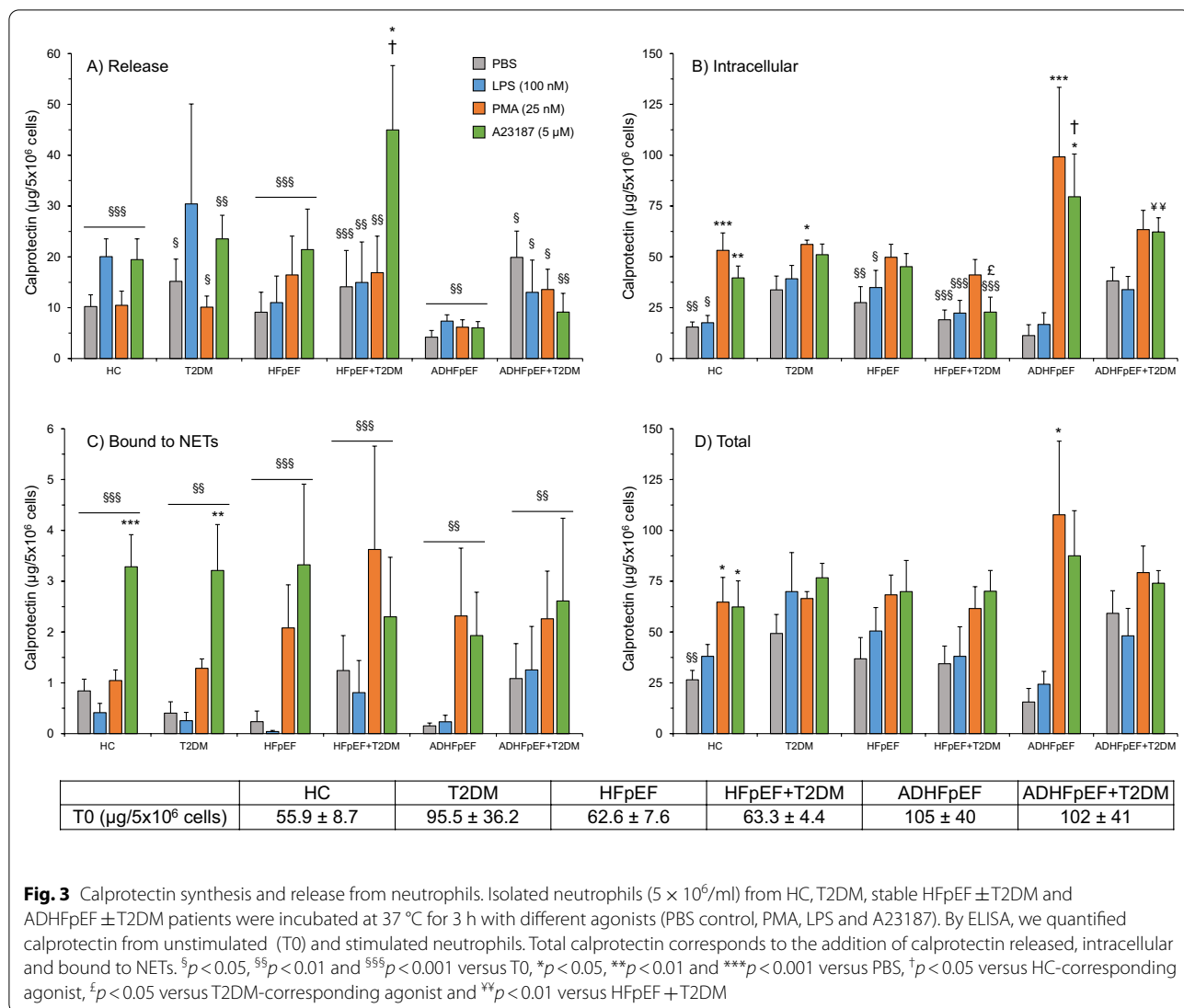
In all 6 cohorts and independently from the agonist used, calprotectin was detected on NETs but was significantly lower than in the intracellular fraction post-isolation (T0). A treatment with PMA increased the calprotectin NETs binding in all cohorts by up to 15-fold in ADHFpEF (2.30 vs 0.15 μ g/mL), while the A23187 stimulation provided a significant increase in HC and T2DM (up to 8-fold; 3.20 vs 0.40 μ g/mL in T2DM) compared to PBS (Fig. 3C).

The total calprotectin (released + intracellular + bound to NETs) following the 3-h neutrophil incubation with PBS or LPS was lower than post-isolation (T0) in all 6 cohorts, but only significant for PBS in HC (53% decrease; 26.5 vs 55.9 μ g/mL). When stimulated with PMA for 3 h, the total calprotectin remained unchanged compared to T0, while being significantly higher in HC (2.4-fold; 64.7 vs 26.5 μ g/mL) and in ADHFpEF (6.9-fold; 108 vs 15.6 μ g/mL) when compared to PBS (Fig. 3C).

Imaging of Ang 1 and calprotectin localization in human neutrophils

Based on our aforementioned data, we sought to visualize whether Ang1 and calprotectin behave differently in regard to their binding to NETs, using confocal microscopy. Neutrophils isolated from HC were treated with PBS, LPS, PMA, and A23187 for 3 h, followed by a series of incubations with antibodies detecting either Ang1 (Fig. 4) or calprotectin (Fig. 5).

First, we observed that in unstimulated neutrophils (PBS), there is no or marginal detection of SYTOX Orange (green pseudo-color) due to a very low percentage of permeabilized cell membrane and absence of intracellular DNA exposure. Treatment with LPS induced a small synthesis and release of NETs (green pseudo-color), whereas a treatment with PMA and A23187 induced a marked increase of NETs synthesis and release (Figs. 4 and 5; SYTOX Orange column). For the detection of Ang1 and calprotectin proteins, we observed a similar pattern, namely a marginal intracellular detection of both proteins under PBS and LPS treatments, whereas under PMA and A23187 stimulation, cell permeabilization associated to NETosis allowed the specific binding of Ang1 and calprotectin



antibodies intracellularly (Figs. 4 and 5; Antibody and merged columns). In addition to the detection of Ang1, calprotectin and NETs within the neutrophils, we observed that Ang1 as opposed to calprotectin does not seem to be bound to extracellular NETs (Fig. 6).

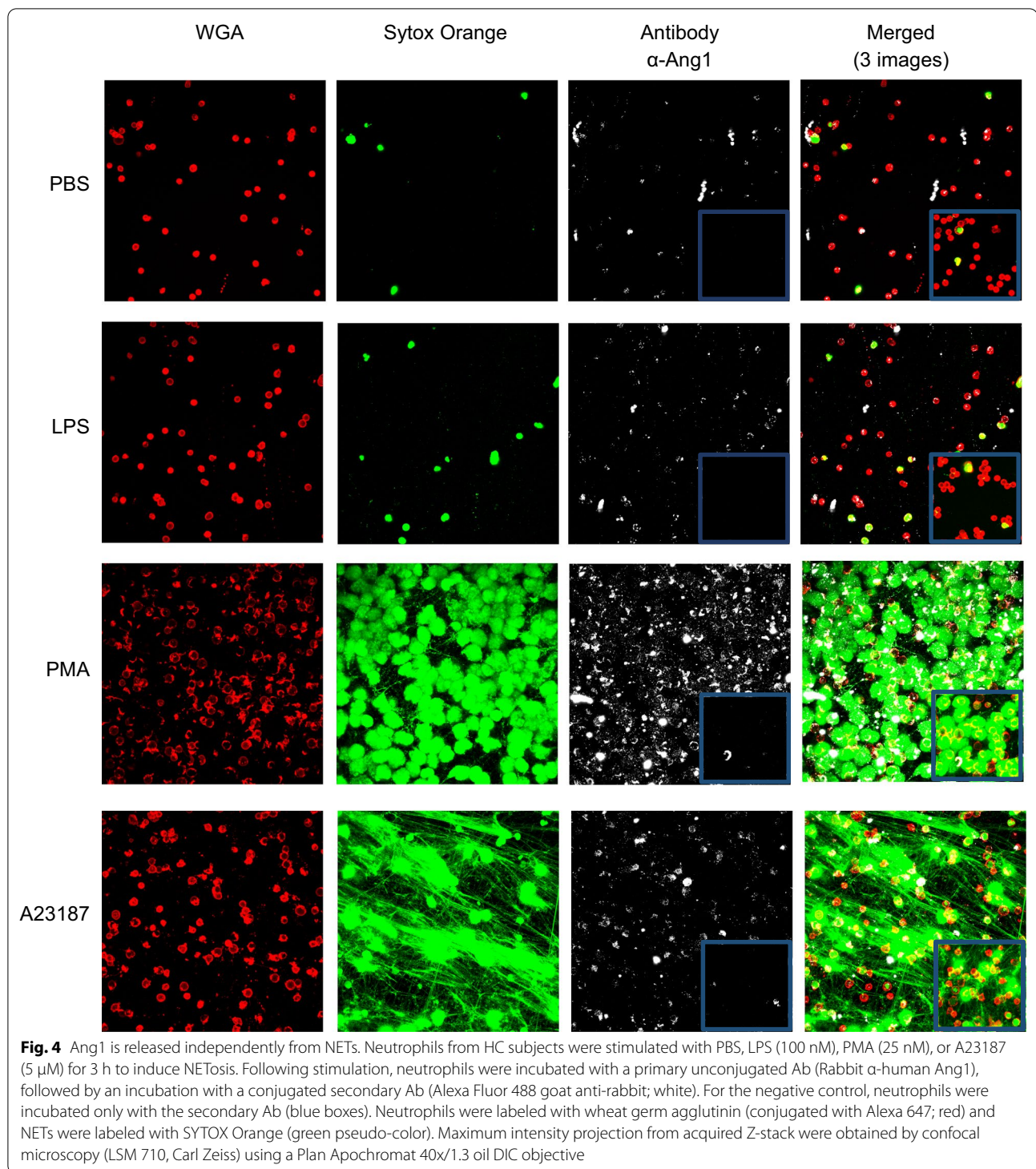
Discussion

In the present study, we report that neutrophils from patients diagnosed with T2DM alone, HFpEF \pm T2DM or ADHFpEF w/o T2DM present a slight non-significant NETs increase, whereas ADHFpEF + T2DM patients have a higher significant NETs release after a 3-h incubation with PBS (control vehicle) or LPS (a weak NETs inducer), compared to HC. In addition, ADHFpEF + T2DM patients present a lower Ang1 release from their neutrophils, while having a higher capacity to promote calprotectin release under basal

(PBS) condition. Finally, in all 6 cohorts and independently from the agonist used, we observed that, while calprotectin was found to bind to the NETs web-like structures, Ang1 did not interact with NETs, suggesting that NETs are selective transporters of proteins. These data suggest that patients with symptomatic HFpEF exhibit significant neutrophil activation and NETs release. The magnitude of NETs release is significantly increased in patients with ADHF.

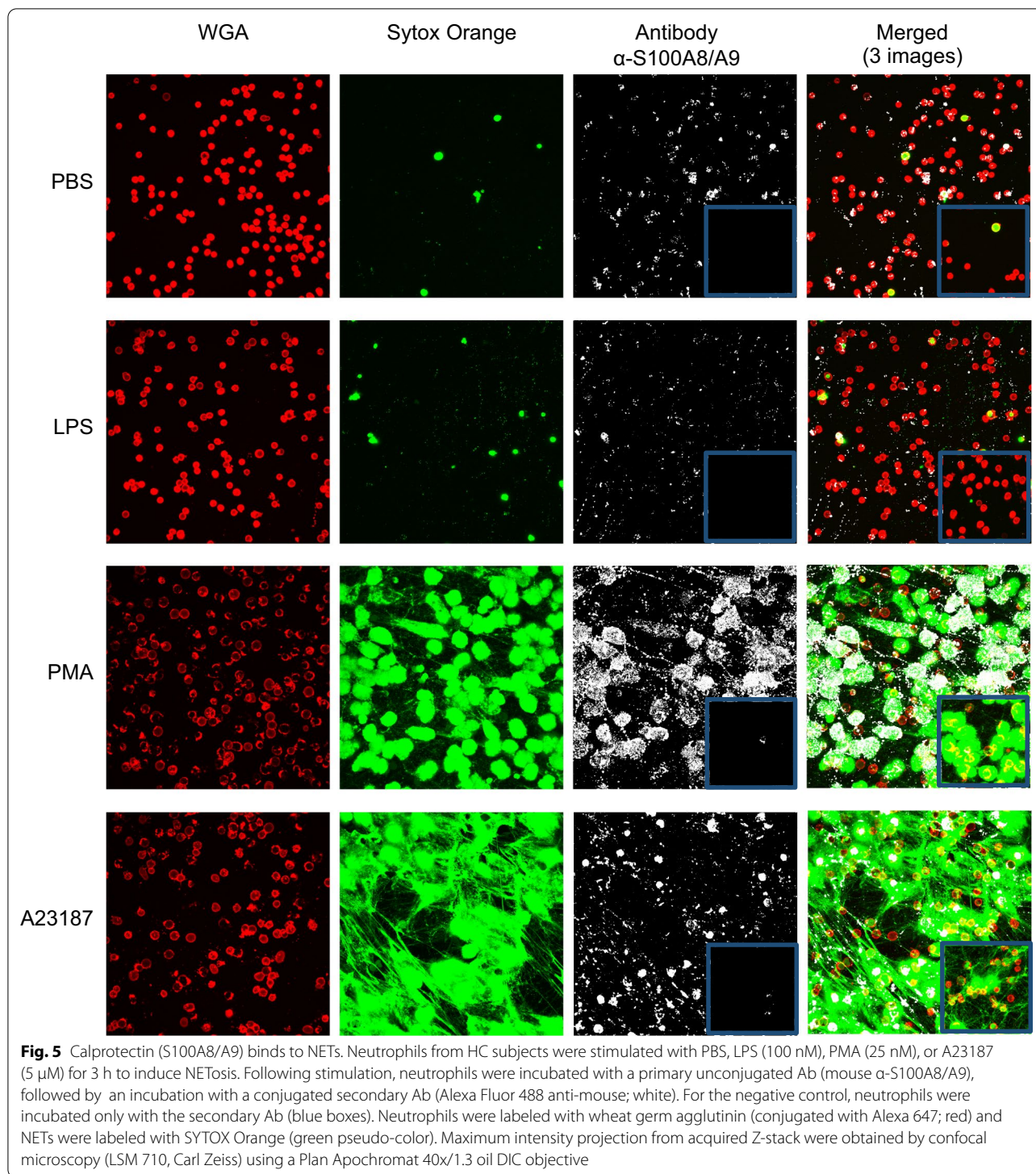
NETs release from human neutrophils

It has been demonstrated that neutrophils are not just first responders to acute infections but also active contributors to low-grade chronic inflammation [39], which can be explained, in part, by their capacity to release NETs [40]. NETs can be considered as a risk factor of future cardiovascular events because of their role in



atherosclerosis, inflammation, and vascular thrombosis [2, 10, 41, 42]. There has been little precious data on the release of NETs in the context of heart failure. More recently, we and other groups reported elevated levels of circulating NETs in T2DM patients and an increase in

their neutrophil capacity in vitro to release NETs [14, 15, 43]. Furthermore, we observed an increase in circulating NETs and corresponding release in HF patients, the latter reaching a maximum in HF + T2DM [15]. The results from this study confirm that NETs release is significantly



increased in clinical HF and more so in patients with HF and T2DM. In this study, we used inflammatory mediators, such as LPS, PMA and A23187, targeting different signalling pathways to induce NETosis by human neutrophils [44–48]. LPS, a component of gram-negative

bacteria, induces NADPH oxidase (NOX)-dependent NETs formation mediated by c-Jun N-terminal kinases (JNK). LPS binds to Toll-like receptor (TLR4) on the surface of neutrophils, activating the production of reactive oxygen species (ROS) and NOX, inducing lytic NETs

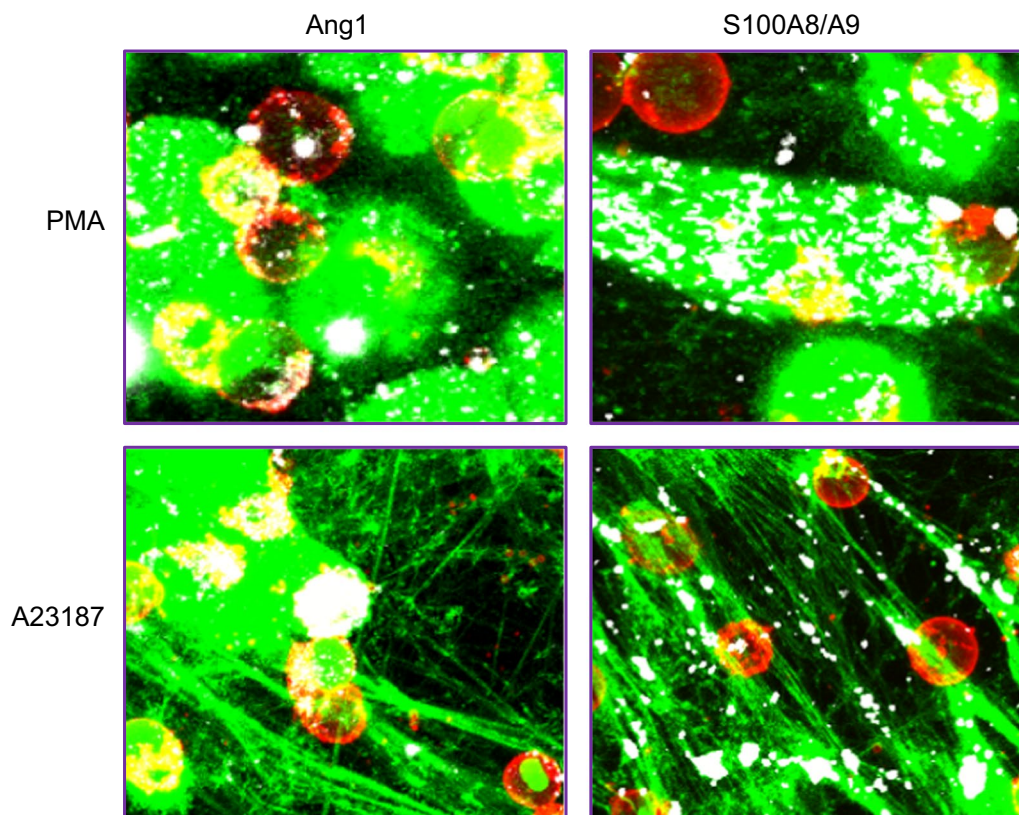


Fig. 6 Ang1 and calprotectin interaction with NETs induced by PMA and A23187. These images are enlarged areas of the “Merged (3 images)” columns (PMA and A23187) from Figs. 2 (Ang1) and 3 (calprotectin). We observe that Ang1 is mainly detected around the cells and does not interact with NETs, whereas calprotectin is detected either in the cells or on the NETs web-like structures

formation in a concentration- and NOX-dependent manner [46]. Other groups have shown that LPS can also induce vital NETs formation via a NOX-independent pathway [47, 48]. PMA activates the protein kinase C pathway, which induces NETosis through the ROS generating NADPH oxidase complex that contributes to the disruption of the extracellular membrane. In contrast, A23187, is a faster and robust, NADPH-independent, process dominated by a rise in intracellular calcium concentration [45, 49]. This might explain why the elevation of NETs synthesis under PMA is similarly maintained in all groups, whereas we observed a reduction of NETosis in A23187-stimulated neutrophils from ADFHFpEF + T2DM patients. Since the neutrophils from these patients are as responsive as the neutrophils from other groups under PMA stimulation, this might suggest that their stimulation with a calcium ionophore (A23187) is less efficient to promote extracellular Ca^{2+} uptake and/or intracellular Ca^{2+} elevation affecting the downstream NETosis process.

In the present study, we sought to determine the ability of these inflammatory mediators to induce NETs formation by neutrophils from HC, T2DM alone, stable HFpEF ± T2DM and ADHFpEF ± T2DM patients. Our study revealed significantly higher basal (PBS) and LPS-induced NETs release only in patients with ADHFpEF + T2DM, as compared with HC. In addition, released NETs were increased at basal level and significantly following LPS stimulation in ADHFpEF + T2DM patients versus ADHFpEF w/o T2DM, suggesting that T2DM contributes to increase the inflammatory state in ADHFpEF patients. We did observe an increase, although non-significant, in basal or LPS-induced NETs release in T2DM alone or stable HFpEF ± T2DM patients, and this might be an indicator that the management of their low-grade inflammatory condition by the current chronic therapies is not fully capable to revert the inflammatory state associated to NETosis.

The increase in NETs release seen in ADHFpEF + T2DM patients support the concept that these patients are in a state of acute thrombo-inflammation. Such status may lead to a pro-thrombotic state wherein

blood vessel obstruction could result in inadequate blood supply to the heart and/or other organs. Therefore, NETs and T2DM can jointly contribute to the progression and severity of HF, leading ultimately to the ADHF condition.

Angiopoietin 1 release and NETs binding

In this study, we wanted to determine if the release of Ang1 was comparable to calprotectin, since both proteins are found in the cytosol of neutrophils. We previously demonstrated that in healthy controls, Ang1 is found in the cytosol of neutrophils and can be released upon stimulation with different stimuli [35]. Ang1 is an important inflammatory marker for the stabilization and maturation of blood vessels through Tie2 receptor [34, 50]. Studies have shown that a decrease of circulating Ang1 levels in patients with acute myocardial infarction and major cardiovascular conditions such as arrhythmia, valvular heart disease, HF and cardiogenic shock, could be potentially associated with the magnitude of endothelial dysfunction [37, 51]. In our study, we also observed a lower concentration of intracellular Ang1 in post-isolated (T0) neutrophils in all patients' cohorts. These neutrophils increase their Ang1 synthesis over a 3-h incubation time period, yet, their corresponding Ang1 concentrations never reached the levels observed in HC. Interestingly, the lowest Ang1 concentration post-incubation was observed in both ADHFpEF + T2DM and stable HFpEF + T2DM suggesting that T2DM co-morbidity is negatively impacting the capacity of neutrophils from HF patients to synthesize Ang1. This could contribute to inadequate stabilization of blood vessels, endothelial dysfunction and disease progression.

Since neither calprotectin nor Ang1 are stored in neutrophil granules or vesicles [35, 52, 53], and that calprotectin binds to NETs when released, we wanted to assess if Ang1 exocytosis was also NETs-dependent. Herein, we observed that Ang1 was not detected on the surface of extracellular NETs, either by ELISA or using confocal microscopy, suggesting that its secretion is NETs-independent in all 6 cohorts studied. This could be explained by the fact that Ang1 is not an essential bactericidal protein, like MPO, NE or calprotectin, all found on NETs. Moreover, Ang1 has been shown to bind either to Tie2 receptor and selected integrins, both expressed on cell membrane surface of neutrophils [7, 54, 55]. In addition, the low concentration of Ang1 ($\sim 100\text{--}200 \text{ pg}/5 \times 10^6$ neutrophils) being released as compared to calprotectin ($\sim 5\text{--}20 \text{ }\mu\text{g}/5 \times 10^6$ neutrophils) could explain their membrane proximity, as observed by confocal microscopy, suggesting an autocrine agonistic activity upon its release from the neutrophils.

Calprotectin release and NETs binding

Calprotectin (S100A8/A9) is largely expressed in the cytoplasm of neutrophils and is mainly released in an infectious setting. Moreover, calprotectin can bind to NETs [3] and exerts its main function, namely anti-microbial, in combination with other NETs-bound proteins such as MPO and NE, while NETs are keeping pathogens trapped, thus leading to increased efficiency in pathogens removal.

Calprotectin has also recently been shown to be involved in cardiovascular diseases, following its release by inflammatory mediators [56, 57]. Previous studies reported a higher serum or plasma calprotectin level in patients with chronic HF and was associated with other inflammatory markers such as C-reaction protein (CRP), interleukin IL-6, IL-8 and TNF- α [31, 58, 59]. In the present study, we observed an increase of intracellular calprotectin in neutrophils post-isolation (T0) from T2DM and ADHFpEF \pm T2DM patients as compared to HC, whereas in stable HFpEF \pm T2DM the calprotectin initial content remained unchanged. However, there was no additional calprotectin synthesis after 3 h of stimulation in all 6 cohorts and independently from the agonists used. The increase of endogenous calprotectin observed in freshly isolated neutrophils from these patients could indicate an increased inflammatory status, thereby contributing to the progression of heart failure.

The levels of released calprotectin were significantly lower than those seen at T0, but interestingly, there was less calprotectin released from the neutrophils of patients with T2DM and HFpEF + T2DM after treatment with PMA contrary to what was observed after stimulation with A23187. Typically, A23187 induces a rapid and robust extracellular DNA release, reaching a plateau within 3–4 h, whereas NETs formation induced by PMA is slower and reaching maximal extracellular DNA after 4–6 h [49]. Since calprotectin is present in high concentration in the cytosol but not in the granules, treatment with a calcium ionophore might favor its higher release compared to PMA stimuli in the neutrophils from the patients.

After 3 h of stimulation and in absence of agonist stimulation (PBS), we observed in all 6 cohorts that the level of calprotectin was reduced by 40 to 85% compared to corresponding T0 values. In addition, even after stimulation with LPS, PMA or A23187 agonists, the levels of calprotectin remained either below or comparable to T0 values. Thus, we hypothesized that this decrease could be associated to calprotectin degradation by the proteasome. However, when using the proteasome inhibitor (MG132; 10 μM) [60], it did not prevent the reduction of intracellular calprotectin concentration, neither the total concentration of calprotectin (data not shown).

One possibility might be that oxidative post-translational modifications of calprotectin makes it a target for protease-independent proteolysis [61].

As previously described [1, 3], we observed that a fraction (up to 5.3%) of the total calprotectin detected at 3 h post-incubation was bound to NETs as observed by ELISA and confocal microscopy (Figs. 3 and 5). Only NETs produced by PMA and A23187 bound more calprotectin, since those two agonists induced a higher NETs release in all cohorts (Fig. 1). Interestingly, in HC and T2DM patients, A23187 induced the release of mostly web-like NETs as seen in Fig. 3, and this conformation bound more calprotectin than the PMA-mediated NETs synthesis, localized mostly near the cells. This could be explained by the fact that NETs web-like structures are observed in microbial trapping, thus supporting the calprotectin antimicrobial role [1, 62, 63].

Study limitations

This study consisted of a small sample size of patients with various duration, etiology and severity of HF. Clinically relevant information such as the duration of diabetes, glycemic control, and the concomitant presence of atherosclerotic heart disease were not readily available. In vitro neutrophil experiments were limited to stimulation with few agonists and to the measure of Ang1 and calprotectin. Future studies warrant the inclusion of other cytokines and higher number of patients.

Conclusions

In our study, NETs released by isolated neutrophils upon stimulation with selected agonists were significantly increased in ADHFpEF + T2DM when compared to healthy control volunteers. In addition, the release of Ang1 is independent from NETosis and not affected by diabetes or heart failure conditions. On the other side and as expected, calprotectin does bind to NETs, with the constitutive basal levels of calprotectin tending to increase in neutrophils from T2DM and ADHFpEF ± T2DM patients. Since neutrophils from ADHF + T2DM have a higher capacity to release NETs under basal condition, their capacity to bind calprotectin might further exacerbate NETs-mediated pro-inflammatory activities in these patients.

Methods

Population

This was a prospective non-randomized non-interventional study including stable HFpEF or ADHFpEF, with or without T2DM, compared with T2DM patients and HC without any heart pathology. Six different cohorts were recruited at the Montreal Heart Institute (MHI): (1) HC (n = 34), (2) T2DM (n = 8), (3) stable HFpEF (n = 5),

(4) stable HFpEF + T2DM (n = 7), (5) ADHFpEF (n = 7) and (6) ADHFpEF + T2D (n = 6). Blood collection from all participants was performed at the MHI. The study has been approved by the MHI's Research Ethics Committee and performed with the accordance of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all subjects prior to the study (Montreal, QC, Canada; ethics No. ICM#01-069 and No. ICM #12-1374).

Selection criteria of healthy control volunteers and patients

Healthy controls (HC) recruited in this study were enrolled assuming they had no significant medical conditions and were not treated by any anti-inflammatory medication for at least 14 days before blood collection. T2DM patients with no symptoms or signs of HF were recruited from the *Clinique d'Endocrinologie de Montréal*. HFpEF and ADHFpEF patients with NYHA classification I to IV symptoms were recruited from the MHI heart failure clinic and from the emergency room (ER) or HF care units respectively. These patients were classified as HFpEF if their LVEF was $\geq 50\%$ [64–66], as documented by contrast ventriculography, magnetic resonance imaging, radionuclide ventriculography or echocardiography assessed within the previous 12 months and if no significant cardiac events occurred since the assessment of LVEF [65]. These patients were optimally treated on stable doses of A-II modulating agents, beta-blocker, and mineralo-corticoid antagonist agents unless not tolerated or contra-indicated. In addition to the previous inclusion criteria outlined above, patients with HF + T2DM required an HbA1c < 10% and good glycemic control by any available hypoglycaemic medications and treated with secondary preventive medication as per current guidelines. The most significant exclusion criteria included the presence of severe chronic pulmonary disease, chronic active inflammatory disease, severe renal failure (creatinine > 250 $\mu\text{mol/L}$), liver damage (transaminases \geq threefold upper normal values) and ongoing malignancy. Other exclusion criteria included recent myocardial infarction, stroke, or cardiac surgery (< 3 months). All participants having ongoing and/or recent infection within 2 weeks prior to the study were excluded from this study.

Study protocol—plasma, serum and neutrophil collection

Venous blood from all participants was collected in 30 mL syringes (containing 5 mL acid citrate dextrose for 25 mL whole blood). Neutrophils were isolated using the Ficoll-Paque gradient method, as previously described [67, 68]. Upon isolation, neutrophils were resuspended in phenol-free RPMI-1640 medium (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) supplemented with (1) 25 mM HEPES

(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), (2) 1% penicillin/streptomycin/ Glutamax (VWR Intl., Montreal, QC, Canada), (3) 1 mM CaCl₂ (BDH Chemicals, Toronto, ON, Canada) and (4) 5% FBS (Fetal Bovine serum; VWR) (termed complete RPMI). Contamination by PMBCs was less than 0.1% as determined by morphological analysis and flow cytometry. Cell viability of neutrophils were greater than 98%, as assessed by Trypan blue dye exclusion assay.

NETs production and quantification by fluorometric assays

Isolated neutrophils (5×10^6 /ml) were added to 12-well plates and incubated in complete RPMI at 37 °C for 3 h with either PBS-control buffer, LPS (100 nM; Escherichia coli O111:B4; Sigma), PMA (25 nM; Calbiochem, La Jolla, CA, USA) or A23187 (5 μM; Calbiochem). Neutrophils were carefully washed two times with PBS 1X, and nuclease S7 (Sigma) was added for 15 min at 37 °C, 5% CO₂ to release NETs bound to the external surface of neutrophils with no or minor loss of NET structure and activity. The reaction was stopped with 10 mM EDTA (Sigma), and the supernatant was centrifuged at 300 g for 5 min to remove cell debris. NETs were quantified using Quant-IT PicoGreen dsDNA Assay Kits (catalog no. P7589; Invitrogen, Eugene, OR).

Localisation and release of Ang1 and calprotectin by ELISA

The intracellular Ang1 and calprotectin concentrations in neutrophils (5×10^6 cells/mL) were determined either immediately after isolation (T=0), or upon agonists (PBS, LPS, PMA or A23187) stimulation in 6-well plates for 3 h at 37 °C, 5% CO₂. The supernatants were collected and centrifuged at 300 g for 5 min to remove cell debris. Neutrophils were then carefully washed two times with PBS, and DNase I (Sigma) was added for 30 min at 37 °C, 5% CO₂. The supernatant was collected in 10 mM EDTA to stop the reaction and centrifuged at 300 g for 5 min to remove cell debris. A solution containing complete RPMI+1% Triton was added to the remaining adhered neutrophils which were then removed using a cell lifter, homogenized by vortex mixing and centrifuged at 18,000g for 10 min. The cell membranes pellet was discarded and the supernatant was used for intracellular content measures. All samples were stored at -80 °C for further Ang1 quantification using ELISA DuoSet kits (R&D System). Since the concentration of Ang1 was too low for direct detection by ELISA, all samples were concentrated fivefold by evaporating all the water (1 mL) from the samples using a SpeedVac and resuspending the dry fraction in 200 μL of complete RPMI prior to their quantification.

Localisation of calprotectin and Ang1 on NETs by confocal microscopy

Neutrophils (1×10^6 /mL) in complete RPMI were incubated in 35 mm petri dishes with 14 mm microwell insert (MatTek; #P35G-1.0-14-C Ashland, MA, USA) for 3 h at 37 °C, 5% CO₂ with different agonists (PBS, PMA, LPS and A23187). After carefully removing the supernatant, 1% BSA (Bovine serum albumin) was added for 30 min at 37 °C, 5% CO₂. Primary antibodies (rabbit anti-human Ang1 (1:100) and mouse anti-human S100A8/A9 (1:20)), IgG isotype control (rabbit or mouse (both 1:200)) were added directly for 30 min at 37 °C, 5% CO₂, followed by a gentle wash with HBSS 1X. Subsequently, secondary antibodies (Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor 488 conjugated rabbit anti-mouse (both 0.5 μg/mL)) were added and incubated for 30 min at 37 °C, 5% CO₂, followed by two washes with HBSS 1X. A fluorescent nucleic acid stain detecting double-stranded DNA in membrane disrupted cells (NETs) (Sytox Orange; 1:5000, Life Technologies), and WGA (Wheat germ agglutinin; 1 μg/mL, ThermoFisher) to detect cell membrane were added. Images (Z stack) were obtained by confocal microscopy (LSM 710, Carl Zeiss).

Statistical analysis

The data are presented as mean ± SEM. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9.1.2. Groups were compared by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post-test for multiple comparisons. The results were considered significant if *p* values were < 0.05.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12865-021-00442-8>.

Additional file 1. Individual patient characteristics and raw data for NETs release, Ang1 and calprotectin synthesis and release from human neutrophils.

Acknowledgements

We are thankful to the volunteers for kindly providing blood samples.

Authors' contributions

EC recruited healthy control volunteers, performed the experiments and data analyses and was a major contributor in writing the manuscript. BLD participated to the recruitment of patients and analyzed clinical data. SB participated to patient's recruitment and analyzed clinical data. PEN supervised EC and revised the manuscript. LV is the confocal microscopy platform operator, providing the image capture and helping with the analyses. AR helped with the diabetic patients' recruitment and with the data interpretation regarding those patients. MW is the co-PI of this study and the co-supervisor of EC and helped with the recruitment of heart failure patients and with the manuscript writing. MGS is the PI of this study and the principal supervisor of EC and helped with the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-97943 to MGS), *Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal* (FICM) (to MGS). BV was recipient of a fellowship from FRQS, MW is the recipient of the Carolyn and Richard Renaud Endowed Research Chair in Heart Failure of the Montreal Heart Institute.

Availability of data and materials

Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study has been approved by the MHI's Research Ethics Committee and performed with the accordance of the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all subjects prior to the study (Montreal, QC, Canada; ethics No. ICM#01-069 and No. ICM #12-1374).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Research Center, Montreal Heart Institute, Université de Montréal, 5000 Belanger Street, Montreal, QC H1T 1C8, Canada. ²Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. ³Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada. ⁴Faculty of Medicine, and Research Center—Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

Received: 14 January 2021 Accepted: 20 July 2021

Published online: 03 August 2021

References

- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–5.
- Mitsios A, Arampatzioglou A, Arelaki S, Mitroulis I, Ritis K. NETopathies? Unraveling the dark side of old diseases through neutrophils. *Front Immunol*. 2016;7:678.
- Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000639.
- McCormick A, Heeseemann L, Wagener J, Marcos V, Hartl D, Loeffler J, et al. NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*. 2010;12(12–13):928–36.
- Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136–44.
- von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819–35.
- Law SM, Gray RD. Neutrophil extracellular traps and the dysfunctional innate immune response of cystic fibrosis lung disease: a review. *J Inflamm (Lond)*. 2017;14:29.
- Yoo DG, Floyd M, Winn M, Moskowitz SM, Rada B. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. *Immunol Lett*. 2014;160(2):186–94.
- Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015;14(7):633–40.
- Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil extracellular traps in atherosclerosis and atherothrombosis. *Circ Res*. 2017;120(4):736–43.
- Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, Maurer R, Mitchell R, Olesen H, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor. *J Innate Immun*. 2014;6(6):765–79.
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134–47.
- Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):497–503.
- Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*. 2015;21(7):815–9.
- Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe PE, Dumas E, Rakef A, White M, et al. CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *Immunohorizons*. 2019;3(8):378–88.
- Pathophysiology and management of heart failure. *Pharm J*. 2018. <https://doi.org/10.1211/pj.2018.20205742>.
- Sorop O, Heinonen I, van Kranenburg M, van de Wouw J, de Beer VJ, Nguyen ITN, et al. Multiple common comorbidities produce left ventricular diastolic dysfunction associated with coronary microvascular dysfunction, oxidative stress, and myocardial stiffening. *Cardiovasc Res*. 2018;114(7):954–64.
- Paulus WJ, Tschope C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(4):263–71.
- Cohen-Solal A, Laribi S, Ishihara S, Vergaro G, Baudet M, Logeart D, et al. Prognostic markers of acute decompensated heart failure: the emerging roles of cardiac biomarkers and prognostic scores. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015;108(1):64–74.
- Bloom MW, Greenberg B, Jaarsma T, Januzzi JL, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Heart failure with reduced ejection fraction. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17058.
- Chandra A, Vaduganathan M, Lewis EF, Claggett BL, Rizkala AR, Wang W, et al. Health-related quality of life in heart failure with preserved ejection fraction: the PARAGON-HF trial. *JACC Heart Fail*. 2019;7(10):862–74.
- Solomon SD, McMurray JJV, Anand IS, Ge J, Lam CSP, Maggioni AP, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition in heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1609–20.
- Joseph SM, Cedars AM, Ewald GA, Geltman EM, Mann DL. Acute decompensated heart failure: contemporary medical management. *Tex Heart Inst J*. 2009;36(6):510–20.
- Raj L, Maidman SD, Adhyaru BB. Inpatient management of acute decompensated heart failure. *Postgrad Med J*. 2020;96(1131):33–42.
- Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in inflammation. *Front Immunol*. 2018;9:1298.
- Fagerhol MK. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol*. 1996;49(2):M74–9.
- Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*. 2003;170(6):3233–42.
- Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):28–37.
- Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*. 2004;344(1–2):37–51.
- Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28–292.
- Bruhn LV, Lauridsen KG, Schmidt AS, Rickers H, Bach LF, Lofgren B, et al. Elevated calprotectin in patients with atrial fibrillation with and without heart failure. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77(3):210–5.
- Adams AP, Berman AJ. Chapter 70—Inhibition of angiogenesis. In: Levin LA, Albert DM, editors. *Ocular disease*. Edinburgh: W.B. Saunders; 2010. p. 544–53.
- Li J-J, Huang Y-Q, Basch R, Karparkin S. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost*. 2001;85:204–6.

34. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiotensin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996;87(7):1161–9.
35. Neagoe PE, Brkovic A, Hajjar F, Sirois MG. Expression and release of angiotensin-1 from human neutrophils: intracellular mechanisms. *Growth Factors*. 2009;27(6):335–44.
36. Azzi S, Gavard J. Blood vessels in cancer: can't stop whispering. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(4):408–14.
37. Liu KL, Lin SM, Chang CH, Chen YC, Chu PH. Plasma angiotensin-1 level, left ventricular ejection fraction, and multivessel disease predict development of 1-year major adverse cardiovascular events in patients with acute ST elevation myocardial infarction—a pilot study. *Int J Cardiol*. 2015;182:155–60.
38. Link A, Poss J, Rbahr R, Barth C, Feth L, Selejan S, et al. Circulating angiotensins and cardiovascular mortality in cardiogenic shock. *Eur Heart J*. 2013;34(22):1651–62.
39. Caielli S, Banchereau V, Pascual V. Neutrophils come of age in chronic inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(6):671–7.
40. Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, Aguirre MA, Jimenez-Gomez Y, Arias-de la Rosa I, Abalos-Aguilera MC, et al. Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. *J Autoimmun*. 2017;82:31–40.
41. Mozzini C, Garbin U, Fratta Pasini AM, Cominacini L. An exploratory look at NETosis in atherosclerosis. *Intern Emerg Med*. 2017;12(1):13–22.
42. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017;23(3):279–87.
43. Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, Mazzucato M, Persano M, Bonora B, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014;52(3):497–503.
44. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*. 1996;59(2):229–40.
45. Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol*. 2012;92(4):841–9.
46. Khan MA, Farahvash A, Doua DN, Licht JC, Grasemann H, Sweezey N, et al. JNK activation turns on LPS- and gram-negative bacteria-induced NADPH oxidase-dependent suicidal NETosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):3409.
47. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386–93.
48. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013;122(16):2784–94.
49. Sofoluwe A, Bacchetta M, Badaoui M, Kwak BR, Chanson M. ATP amplifies NADPH-dependent and -independent neutrophil extracellular trap formation. *Sci Rep*. 2019;9(1):2522.
50. Jousen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, Qin W, Qaum T, Xu Q, et al. Suppression of diabetic retinopathy with angiotensin-1. *Am J Pathol*. 2002;160(5):1683–93.
51. Chen S, Guo L, Chen B, Sun L, Cui M. Association of serum angiotensin-1, angiotensin-2 and angiotensin-2 to angiotensin-1 ratio with heart failure in patients with acute myocardial infarction. *Exp Ther Med*. 2013;5(3):937–41.
52. Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol*. 1997;50(3):113–23.
53. Lusitani D, Malawista SE, Montgomery RR. Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymorphonuclear leukocytes, inhibits the growth of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*. 2003;71(8):4711–6.
54. Cascone I, Napione L, Maniero F, Serini G, Bussolino F. Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J Cell Biol*. 2005;170(6):993–1004.
55. Weber CC, Cai H, Ehrbar M, Kubota H, Martiny-Baron G, Weber W, et al. Effects of protein and gene transfer of the angiotensin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization. *J Biol Chem*. 2005;280(23):22445–53.
56. Montagnana M, Danese E, Lippi G. Calprotectin and cardiovascular events. A narrative review. *Clin Biochem*. 2014;47(12):996–1001.
57. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun*. 2012;4(1):31–40.
58. Jensen LJ, Kistorp C, Bjerre M, Raymond I, Flyvbjerg A. Plasma calprotectin levels reflect disease severity in patients with chronic heart failure. *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(5):999–1004.
59. Ma LP, Haugen E, Ikemoto M, Fujita M, Terasaki F, Fu M. S100A8/A9 complex as a new biomarker in prediction of mortality in elderly patients with severe heart failure. *Int J Cardiol*. 2012;155(1):26–32.
60. Bachmann MP, Riva M, He Z, Källberg E, Ivars F, Leanderson T. Human S100A9 protein is stabilized by inflammatory stimuli via the formation of proteolytically-resistant homodimers. *PLoS ONE*. 2013;8(4):256.
61. Stephan JR, Yu F, Costello RM, Bleier BS, Nolan EM. Oxidative post-translational modifications accelerate proteolytic degradation of calprotectin. *J Am Chem Soc*. 2018;140(50):17444–55.
62. Chatzikonstantinou M, Konstantopoulos P, Stergiopoulos S, Kontzoglou K, Verikokos C, Perrea D, et al. Calprotectin as a diagnostic tool for inflammatory bowel diseases. *Biomed Rep*. 2016;5(4):403–7.
63. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*. 2008;319(5865):962–5.
64. Grodin JL, Philips S, Mullens W, Nijst P, Martens P, Fang JC, et al. Prognostic implications of plasma volume status estimates in heart failure with preserved ejection fraction: insights from TOPCAT. *Eur. J. Heart Fail*. 2019;21:634–42.
65. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, et al. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2014;370(15):1383–92.
66. Selvaraj S, Claggett B, Shah SJ, Anand I, Rouleau JL, O'Meara E, et al. Prognostic value of albuminuria and influence of spironolactone in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2018;11(11):e005288.
67. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. Angiotensins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood*. 2005;105(4):1523–30.
68. Haddad LE, Sirois MG. Angiotensin-1 upregulates de novo expression of IL-1beta and IL-1Ra, and the exclusive release of IL-1Ra from human neutrophils. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e88980.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

