



Université de Montréal

**Rôle inattendu de la protéine des jonctions intercellulaires  
Zonula Occludens-1 (ZO-1) dans la régulation de l'ARN et  
de la prolifération des cellules endothéliales**

par RONY CHIDIAC

Département de pathologie et biologie cellulaire  
Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Doctorat (Ph.D.)  
en programme de Biologie Cellulaire

Décembre 2017

© Rony Chidiac, 2017

## Résumé

Les jonctions intercellulaires entre les cellules endothéliales jouent un rôle primordial dans la régulation de l'intégrité vasculaire. ZO-1 est une protéine essentielle pour la formation et le maintien de ces jonctions. Les voies de signalisation qui régulent la fonction de ZO-1 aux jonctions intercellulaires suite à une stimulation par des facteurs de croissance demeurent méconnues. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'angiopoïétin-1 (Ang-1) sont de puissants agents pro-angiogéniques. L'action concertée de plusieurs voies de signalisation dans les cellules endothéliales activées par le VEGF et l'Ang-1 module la réponse angiogénique. Le VEGF et l'Ang-1, via leur récepteur respectif VEGFR-2 et Tie2, activent plusieurs voies de signalisation afin d'induire la migration, la prolifération et la survie cellulaire. D'ailleurs, ces deux facteurs de croissance jouent un rôle distinct au niveau des jonctions des cellules endothéliales. Notre objectif était d'identifier, en utilisant des approches de protéomiques, de nouveaux mécanismes cellulaires qui participent aux processus biologiques importants dans les cellules endothéliales afin de mieux comprendre le développement vasculaire et l'angiogenèse.

Premièrement, nous avons effectué une analyse comparative par spectrométrie de masse du phosphoprotéome de cellules endothéliales stimulées avec le VEGF ou l'Ang-1. L'analyse bioinformatique du réseau d'interactions des protéines régulées par le traitement au VEGF et à l'Ang-1 a révélé un lien entre la prolifération cellulaire déterminée par l'activation de MAPK et la protéine ZO-1. Nous avons trouvé que la réduction des niveaux cellulaires de ZO-1 est une étape nécessaire lors de l'induction de la prolifération des cellules endothéliales. Ceci a été observé tant dans les cellules endothéliales en culture *in vitro* que lors du développement vasculaire rétinien postnatal chez la souris.

Deuxièmement, notre analyse phosphoprotéomique nous a permis d'identifier que la protéine ZO-1 est phosphorylée sur la Ser617 suite à une stimulation par le VEGF et les sites Ser912 et Ser926 suite à une stimulation par l'Ang-1. Nous avons investigué la fonction de ces résidus de ZO-1 et nous avons trouvé que la Ser617 de ZO-1 joue un rôle essentiel au niveau des jonctions cellulaires et dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales.

Troisièmement, nous avons déterminé par spectrométrie de masse les protéines qui interagissent avec ZO-1 dans des cellules endothéliales traitées ou non avec le VEGF. Nous avons trouvé que la protéine de jonctions ZO-1 interagit avec plusieurs protéines impliquées dans la modulation de l'ARN. Le traitement au VEGF modifie l'interaction de ZO-1 avec certaines protéines de liaison à l'ARN. Cette étude montre un lien intéressant et nouveau entre ZO-1 et les protéines impliquées dans la régulation de l'ARN.

En résumé, nos résultats ont permis l'identification des nouvelles voies de signalisation dans les cellules endothéliales qui mèneront à une meilleure compréhension du développement vasculaire et de l'angiogenèse. Nous avons révélé ZO-1 en tant que nœud d'une voie de signalisation qui lie les jonctions intercellulaires et la prolifération des cellules endothéliales. En plus, nous avons découvert un nouveau lien entre ZO-1 et les protéines de liaison à l'ARN. Ceci apporte une meilleure compréhension du rôle de ZO-1 dans la biologie des cellules endothéliales.

**Mots-clés :** Cellule endothéliale, VEGF, Angiopoïétin-1, ZO-1, protéomique, angiogenèse.

## Abstract

Intercellular junctions between endothelial cells play a critical role in maintaining vascular integrity. ZO-1 is an essential protein that regulates important signaling pathways during angiogenesis. The basic mechanisms activated by growth factors that are involved in the regulation of ZO-1 function at the cell-cell junction are poorly studied. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin-1 (Ang-1) are essential factors to promote angiogenesis through the regulation of a plethora of signaling events in endothelial cells. VEGF and Ang-1, through their receptors VEGFR-2 and Tie-2 respectively, activates many common intracellular signaling pathways in endothelial cells to promote survival, proliferation and migration. However, these growth factors play antagonistic roles in the regulation of cell-cell junctions. Although pathways activated by VEGF and Ang-1 are being established, the unique signaling nodes at endothelial junctions conferring specific responses to each factor remain poorly defined. Our objective was to identify, using proteomics, novel intracellular mechanisms that are involved in important biological processes in endothelial cells in order to better understand the vascular development and angiogenesis.

First, we conducted a large-scale comparative phosphoproteomic analysis of signaling pathways activated by VEGF and Ang-1 in endothelial cells using mass spectrometry. Analysis of VEGF and Ang-1 networks of regulated phosphoproteins revealed a link between the junctional protein ZO-1 and the proliferation of endothelial cells. We found that the reduction of cellular ZO-1 levels is necessary for endothelial cell proliferation. This was shown *in vitro* and during vascular development of the mouse postnatal retina.

Second, our phosphoproteomic study revealed that ZO-1 is phosphorylated on the Serine 617 when cells were treated with VEGF. Thus, we investigated the role of these residues of ZO-1 and we found that the Ser617 of ZO-1 is essential for its function on cell-cell junctions and the proliferation of endothelial cells.

Third, we determined the interactome of ZO-1 in endothelial cells treated or not with VEGF using affinity purification coupled to mass spectrometry. Interestingly, we found that the junctional protein ZO-1 interacts with RNA binding proteins. VEGF treatment influences

the interaction of ZO-1 with multiple RNA binding proteins. Our results show an intriguing link between the junctional protein ZO-1 and the RNA binding proteins involved in the regulation of the RNA machinery.

In summary, we identified crucial signaling pathways in endothelial cells that contribute to a better understanding of vascular development and angiogenesis. We uncovered ZO-1 as a central modulator of endothelial cell proliferation during angiogenesis. Moreover, we revealed a link between ZO-1 and RNA binding proteins. This allowed us to better understand the role of ZO-1 in endothelial cell biology.

**Keywords** : Endothelial cell, VEGF, Angiopoietin-1, ZO-1, proteomics, angiogenesis.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvii
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1. Les vaisseaux sanguins.....	2
1.1.1. L'endothélium vasculaire.....	3
1.1.2. Les types d'endothélium vasculaire.....	4
1.1.3. Les fonctions de l'endothélium vasculaire.....	6
1.2. Vasculogenèse et Angiogenèse.....	10
1.2.1. La vasculogenèse.....	10
1.2.2. L'angiogenèse.....	11
1.3. Les facteurs angiogéniques.....	17
1.3.1. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).....	18
1.3.1.1. La famille du VEGF.....	19
1.3.1.2. Les récepteurs du VEGF.....	22
1.3.1.3. Voies de signalisation activées par VEGFR2.....	27
1.3.2. Les Angiopoïétines.....	30
1.3.2.1. La structure des angiopoïétines.....	30
1.3.2.2. La famille des récepteurs Tie.....	32
1.3.2.3. Voies de signalisation Ang-1/Tie-2.....	34
1.4. Les jonctions des cellules endothéliales.....	38
1.4.1. Les jonctions d'ancrage.....	40
1.4.2. Les jonctions serrées.....	46
1.4.2.1. ZO-1.....	51

1.4.2.2. ZO-2.....	56
1.4.2.3. ZO-3.....	57
1.4.3. Les jonctions communicantes de type GAP .....	58
1.5. Les protéines de liaison à l'ARN.....	59
1.6. Les granules de stress.....	63
1.7. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse .....	66
1.7.1 Études adaptées d'analyse protéomique des cellules endothéliales.....	70
1.8. Objectifs de la thèse.....	73

CHAPITRE 2: Comparative phosphoproteomics analysis of VEGF and Angiopoietin-1 signaling reveals ZO-1 as a critical regulator of endothelial cell proliferation (*Article publié dans Molecular and Cellular Proteomics. 2016 May;15(5):1511-25.*)..... 75

2.1. Summary .....	78
2.2. Introduction.....	79
2.3. Experimental procedures .....	81
2.4. Results.....	91
2.4.1. Phosphoproteome profiling of VEGF or Ang-1 stimulated endothelial cells.....	91
2.4.2. Comparative analysis of VEGF and Ang-1 phosphoproteomes.....	94
2.4.3. Potential link between MAPK-induced proliferation and endothelial junctions ....	95
2.4.4. Down-regulation of p120-catenin, ZO-1, ZO-2 and JUP induces proliferation of endothelial cells .....	97
2.4.5. ZO-1 is central in the modulation of endothelial cell proliferation .....	98
2.5. Discussion .....	101
2.6. Author contributions .....	105
2.7. Acknowledgements.....	105

CHAPITRE 3: ZO-1 phosphorylation at Ser617 influences endothelial cell proliferation and junction assembly..... 126

3.1. Introduction.....	128
3.2. Methods.....	130
3.2. Results.....	133



3.2.1. The effects of ZO-1 on endothelial cell proliferation is dependent on cell-cell junctions.....	133
3.2.2. ZO-1 is essential for endothelial junction assembly.....	133
3.2.3. ZO-1 phosphorylation on Ser617 alters ZO-1-mediated inhibition of endothelial cell proliferation.....	134
3.2.4. Ser617 of ZO-1 is important for endothelial cell permeability.....	135
3.2.5. Ser617 of ZO-1 is necessary for cell junction assembly.....	135
3.3. Discussion.....	137
CHAPITRE 4: Analysis of the ZO-1 interactome in endothelial cells reveals its association with RNA binding proteins and a role in stress granule formation ( <i>En préparation</i> ) .....	146
4.1. Introduction.....	148
4.2. Methods.....	151
4.3. Results.....	157
4.3.1. Identification of ZO-1 interacting proteins by LC-MS/MS.....	157
4.3.2. Functional analysis of the ZO-1 interactome and the effect of VEGF on ZO-1 interacting proteins.....	158
4.3.3. Validation of ZO-1 interacting proteins.....	159
4.4. Discussion.....	163
CHAPITRE 5 : DISCUSSION .....	178
5.1. Le phosphoprotéome des cellules endothéliales traitées par le VEGF ou l'Ang-1 .....	180
5.2. Identification de ZO-1 comme un régulateur important de la prolifération des cellules endothéliales durant l'angiogenèse.....	182
5.3. L'effet de la phosphorylation sur la fonction de ZO-1 .....	183
5.4. Interaction de ZO-1 avec des protéines de liaison à l'ARN .....	187
5.5. ZO-1 joue un rôle essentiel dans la formation des granules de stress .....	188
5.6. Limites des méthodes utilisées.....	190
CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES ET CONCLUSION .....	192
6.1. Perspectives.....	193

6.2. Conclusion .....	197
BIBLIOGRAPHIE .....	199

# Liste des figures

## Chapitre 1

<b>Figure 1.1:</b> Les différents types de vaisseaux sanguins .....	3
<b>Figure 1.2:</b> Les différents types d'endothélium vasculaire .....	4
<b>Figure 1.3:</b> Les fonctions essentielles de l'endothélium vasculaire.....	6
<b>Figure 1.4:</b> Les mécanismes de perméabilité des cellules endothéliales .....	8
<b>Figure 1.5:</b> Les différentes étapes de la vasculogénèse .....	11
<b>Figure 1.6:</b> Représentation schématique de l'angiogénèse par bourgeonnement .....	14
<b>Figure 1.7:</b> Aspect normal et anormal de la vascularisation .....	16
<b>Figure 1.8:</b> Différentes isoformes du VEGF-A suite à l'épissage alternatif .....	21
<b>Figure 1.9:</b> Structure des récepteurs au VEGF et leurs ligands .....	23
<b>Figure 1.10:</b> Les voies de signalisation activées par VEGFR2.....	28
<b>Figure 1.11:</b> La structure de la famille des angiopoïétines et leurs récepteurs .....	33
<b>Figure 12:</b> Les voies de signalisation activées par l'Ang-1 via son récepteur Tie-2 .....	35
<b>Figure 1.13:</b> Schéma illustrant les composants moléculaires des jonctions des cellules endothéliales .....	39
<b>Figure 1.14:</b> Représentation de la structure de la VE-cadhérine et ses interactions intracellulaires.....	41
<b>Figure 1.15:</b> La localisation de ZO-1 et VE-cadhérine dans les cellules endothéliales.....	47
<b>Figure 1.16 :</b> La structure des protéines de la famille des protéines ZO.....	50
<b>Figure 1.17:</b> Les domaines d'interaction et les partenaires de ZO-1 .....	52
<b>Figure 1.18:</b> Localisation de l'ARNm dans les cellules en migration.....	63
<b>Figure 1.19:</b> Les étapes de formation des granules de stress .....	65
<b>Figure 1.20:</b> Schéma global du protocole opératoire de l'analyse phosphoprotéomique utilisé dans le cadre de cette thèse .....	69

## Chapitre 2

<b>Figure 2.1:</b> Analysis of the phosphoproteome in VEGF or Ang-1 treated BAECs.....	106
--	-----

<b>Figure 2.2:</b> Comparative analysis of the phosphoproteomes of VEGF and Ang-1 treated cells .....	108
<b>Figure 2.3:</b> Phosphoprotein interaction network of VEGF and Ang-1 treated cells.....	110
<b>Figure 2.4:</b> Endothelial cell junction proteins regulate cell proliferation .....	112
<b>Figure 2.5:</b> ZO-1 is a major regulator of endothelial cell proliferation .....	114
<b>Figure 2.6:</b> ZO-1 levels correlate with endothelial cell proliferation <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> .....	116
<b>Supplemental Figure S2.1:</b> Correlations between phosphopeptide intensities of biological and technical replicates .....	117
<b>Supplemental Figure S2.2:</b> Overview of the phosphoproteome profiling .....	118
<b>Supplemental Figure S2.3:</b> Correlations between log2 fold-changes of phosphopeptides for the VEGF and Ang-1 treatment conditions .....	119
<b>Supplemental Figure S2.4:</b> Knockdown efficiency of siRNAs and effect of ZO-1, p120-catenin, $\beta$ -catenin and VE-cadherin siRNA on endothelial cell proliferation .....	121
<b>Supplemental Figure S2.5:</b> The localization of p120-catenin, JUP or VE-cadherin was not affected in BAECs transfected with ZO-1 siRNA.....	123
<b>Supplemental Figure S2.6:</b> Representative FACS plot of ZO-1 intensity in BrdU positive or negative cells.....	125

### Chapitre 3

<b>Figure 3.1:</b> The effects of ZO-1 on endothelial cell proliferation is dependent on cell-cell junctions.....	140
<b>Figure 3.2:</b> ZO-1 downregulation delays cell junction assembly in ECs .....	141
<b>Figure 3.3:</b> Ser617 of ZO-1 but not Ser912 is essential to inhibit cell proliferation .....	142
<b>Figure 3.4:</b> Substitution of Serine 617 or 912 to alanine does not affect localization of ZO-1 at the junctions .....	143
<b>Figure 3.5:</b> Ser617 of ZO-1 is necessary for inhibition of endothelial permeability.....	144
<b>Figure 3.6:</b> Ser617 of ZO-1 is necessary for the formation of endothelial junction.....	145

### Chapitre 4

<b>Figure 4.1:</b> Biochemical and computational workflow of ZO-1 interactome.....	166
--	-----

**Figure 4.2:** Gene ontology and network analysis of ZO-1 interacting proteins and VEGF-regulated ZO-1 partners ..... 168

**Figure 4.3:** Validation of ZO-1 protein-protein interactions ..... 170

**Figure 4.4:** Functional analysis of ZO-1 interactome ..... 171

**Figure 4.5:** ZO-1 downregulation increases SGs formation ..... 173

**Figure 4.6:** ZO-1 downregulation increases G3BP1 and YB-1 interaction during SGs formation..... 175

**Figure 4.7:** ZO-1 downregulation increased SGs formation is protective against stress conditions..... 177

## Liste des abréviations

Ab : Anticorps

ACN : Acétonitrile

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIMP1 : Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1

Ang : Angiopoïétine

AMPK : Kinase activée par l'adénosine monophosphate

AP-MS : Purification d'affinité couplées à l'analyse par spectrométrie de masse

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine triphosphate

AuF1 : AU-rich element RNA-binding protein 1

BAEC: Cellule endothéliale de l'aorte bovine

CBD : Domaine de liaison aux caténines

CDK : Kinase cycline-dépendante

CE : Cellule endothéliale

CGN : Cinguline

CPEB : Cytoplasmic polyadenylation element binding protein

Cx : Connexine

Cys : Cystéine

DAG : Diacylglycérol

DBN1 : Drebrine-1

DEP : Density enhanced phosphatase

DLG : Disques larges

DLL4 : Delta-like-4

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

DOCK2 : Deducator of cytokinesis 2

Dok-R : Downstream of tyrosine kinases

DSP : Desmoplakine

DTT : Dithiothreitol  
EC : Endothelial cell  
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique  
EGTA : Acide éthylèneglycoltétraacétique  
EGF : Facteur de croissance épidermique  
F-actin : Actine filamenteuse  
FAK : Kinase des adhésions focales  
FDR : False discovery rate  
FGF : Facteur de croissance fibroblastique  
Flt-1 : fms-like tyrosine kinase  
Flk1 : Fetal liver kinase  
FOXO1 : Facteur de transcription de type Forkhead  
GDP : Guanosine diphosphate  
GFAT1 : Fructose-6-phosphate amidotransferase 1  
GJA1: Gap junction protein-1  
GMP : Guanosine monophosphate  
GO : Gene ontology  
GTP: Guanosine triphosphate  
GuK : Guanylate kinase  
HNRNPA3 : Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3  
HSP : Protéine de choc thermique  
HUVEC : Cellules endothéliales vasculaires de la veine ombilicale humaines  
ICAM1 : Molécules d'adhésion intercellulaire  
Ig : Domaine immunoglobuline  
IL : Interleukine  
IP3 : Inositol (1,4,5)-triphosphate  
IPA : Ingenuity pathway analysis  
JAM : Molécule d'adhésion jonctionnelle  
JMD : Juxtamembrane domain  
JUP : Junction plakoglobin  
KDR : Kinase insert domain containing receptor

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes  
MAGUK : Guanylates kinases associées à la membrane  
MMP : Métalloprotéase matricielle  
mTORC2 : mammalian target of Rapamycin complex 2  
MYL : Myosin protein  
NES : Signaux d'exportation  
NF- $\kappa$ B : Facteur nucléaire- $\kappa$ B  
NLS : Signaux de localisation  
NO : Monoxyde d'azote  
eNOS : NOS endothéliale  
PAK : P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase  
PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes  
PDK1 : Phosphoinositol-dependant kinase 1  
PDZ : PSD95, Dlg1, zo-1  
PGF : Facteur de croissance placentaire  
PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase  
PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate  
PKB/Akt : Protéine kinase B  
PKC : Protéine kinase C  
PLC : Phospholipase C  
Pro : Proline  
PSD-95 : Post synaptic density 95  
RBM : RNA-binding motif protein  
RBP : RNA binding protein  
RPL23A : 60S ribosomal protein L23a  
RT-PCR : Reverse transcriptase polymerase chain reaction  
SAP : Synapse-associated protein  
SDS : sodium dodecyl sulphate  
SF3B2 : Splicing factor 3B subunit 2  
SIRT1 : Sirtuin 1  
Tcf/Lef : T cell factor/leucocyte enhancing factor



TFA : Trifluoroacetic acid  
TGF- $\beta$  : Facteur de croissance transformant beta  
TIAR : T-Cell-Restricted Intracellular Antigen-1 Related protein  
Tie : TK with immunoglobulin-2 and EGF-like domain  
TiO<sub>2</sub> : Dioxyde de titane  
TNF : Facteur de nécrose tumorale  
TSAd : T-cell specific adaptor protein  
Tyr : Tyrosine  
U : Motif unique  
VE : Endothélium vasculaire  
VE-PTP : Protéines tyrosines phosphatase de l'endothélium vasculaire  
VEGF: Facteur de croissance endothéliale  
VEGFR : Récepteur du VEGF  
VPF : Facteur de perméabilité vasculaire  
WT : Wild-type  
ZASP : ZO-2 Associated Speckle Protein  
ZO: Zonula occludens  
ZONAB : ZO-1 associated nucleic acid-binding protein

À ma famille Chidiac

## Remerciements

À l'issue de la rédaction de plusieurs années de recherche et d'étude, je suis convaincu que la thèse n'est pas un travail solitaire.

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr. Jean-Philippe Gratton, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. J'ai eu la grande chance de vous avoir comme superviseur de thèse et de faire partie de votre équipe de recherche. Je serai très reconnaissant pour votre support et assistance durant ces plusieurs années. Votre confiance en moi et votre encouragement m'ont permis de devenir un meilleur chercheur.

Un grand merci à notre collaborateur Dr. Jean-François Côté pour ses conseils pendant tout mon doctorat et pour m'avoir impliqué si généreusement dans les projets de son équipe.

Je tiens à remercier mes collègues et amis du laboratoire, passés et présents, pour tous les moments spéciaux que nous avons passés ensemble. Je ne peux pas demander un meilleur environnement et une meilleure ambiance que l'amitié de mes collègues Chantal Delisle, Malika Oubaha, Ying Zhang, Vanda Lovejoy, Cecile Boscher et Fanny Desjardins qui m'ont aidé à parcourir ce chemin avec beaucoup de joie.

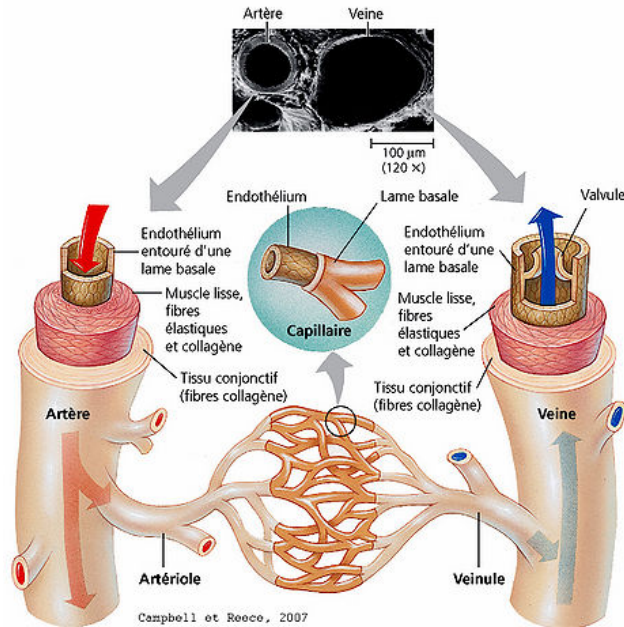
Je n'aurai jamais survécu tout le long de mes études sans l'encouragement et le support de mes chers parents et mon frère Richard. Finalement, je ne peux pas oublier ma meilleure amie et mon épouse, Adèle Coriati, qui m'a supporté et encouragé tout au long de ce chemin et qui est restée à mes côtés à franchir les moments les plus difficiles.

# **CHAPITRE 1 : INTRODUCTION**

## 1.1. Les vaisseaux sanguins

Le système cardiovasculaire composé du cœur, du sang et des vaisseaux sanguins est le premier système qui se développe et fonctionne chez l'embryon. Les vaisseaux sont des conduits qui fonctionnent de manière organisée permettant via le sang de transporter l'oxygène et les nutriments aux organes distants et également d'éliminer les déchets métaboliques (1). Il existe trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires. Ils forment un circuit fermé de sorte que les artères acheminent le sang du cœur aux organes, les capillaires permettent l'échange entre le sang et les tissus, ensuite les veines ramènent le sang au cœur.

Les artères et les veines sont constituées de trois couches concentriques : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1.1) (2). L'intima, autrement nommée la tunique interne, constitue la principale barrière qui est en contact direct avec le sang. Elle est composée d'une monocouche très fine de cellules endothéliales et limitée par la couche interne élastique qui sépare l'intima du média. La média est composée d'une couche épaisse de collagène, de fibres élastiques et des cellules musculaires lisses. Une couche élastique externe sépare la média de l'adventice. L'adventice, aussi nommée la tunique externe, est constituée d'une couche riche en collagène, de fibres élastiques et d'adipocytes. Les capillaires sont constitués uniquement d'une monocouche de cellules endothéliales. Malgré le fait que la fonction, la structure et la taille de ces vaisseaux soient différentes, tous les vaisseaux sanguins sont tapissés d'une monocouche de cellules endothéliales qui forme l'endothélium.



**Figure 1.1:** Les différents types de vaisseaux sanguins.

Les artères et les veines sont constituées de trois couches concentriques : l'intima, la média et l'adventice. Les capillaires sont constitués uniquement d'une monocouche de cellules endothéliales appelée l'endothélium (3).

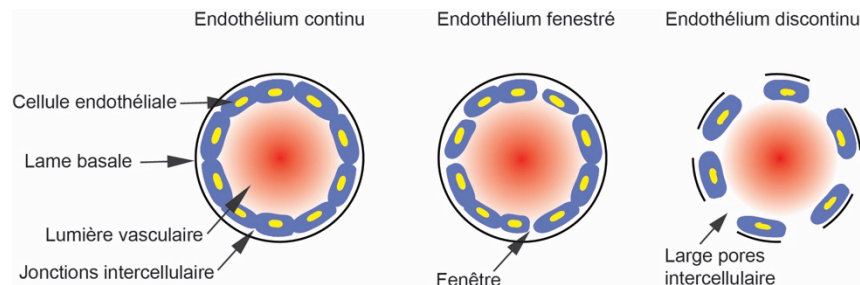
### 1.1.1. L'endothélium vasculaire

L'endothélium est constitué de cellules endothéliales qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules endothéliales sont en contact direct avec le flux sanguin et sont fixées sur une membrane basale riche en glycoprotéines et collagènes qui lui confèrent une résistance mécanique formant une plateforme interne de vaisseaux sanguins. Elles sont enveloppées par des cellules musculaires lisses ou des péricytes. Les cellules endothéliales sont capables de synthétiser toutes les protéines nécessaires et sécréter les enzymes essentielles pour le remodelage et la formation des nouveaux vaisseaux sanguins (4).

Situé à l'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium vasculaire permet le transport de l'oxygène, des nutriments et le passage de l'eau, des solutés et d'autres petites molécules. Dans le corps humain, l'endothélium est constitué d'une monocouche de  $10$  à  $60 \times 10^{12}$  cellules endothéliales et il couvre une surface d'échange importante évaluée entre  $4000$  et  $7000 \text{ m}^2$  (4-6). La structure des cellules endothéliales est hétérogène dépendamment de l'environnement vasculaire et le type d'endothélium. En général, elles sont d'un aspect allongé et juxtaposé formant un tapis en mosaïque et orientées dans la direction du flux sanguin.

### 1.1.2. Les types d'endothélium vasculaire

L'endothélium présente une hétérogénéité qui varie en fonction de l'environnement tissulaire. L'hétérogénéité structurale a été découverte suite à des observations microscopiques où la différence entre les jonctions intercellulaires démontre qu'il existe différentes formes d'endothélium vasculaire (7). D'ailleurs, il existe trois types d'endothélium vasculaire selon la taille et la fonction des vaisseaux sanguins: continu, fenestré et discontinu (Figure 1.2) (8).



**Figure 1.2:** Les différents types d'endothélium vasculaire (8).

L'endothélium continu possède un revêtement continu des cellules endothéliales jointives qui est quasi imperméable sauf à l'eau et aux solutés. Les échanges de macromolécules se font par transcytose. Ce type d'endothélium se retrouve dans les artères, les veines et les capillaires qui alimentent des organes tels que le cœur et les poumons. De plus, l'endothélium des capillaires qui constituent la barrière hémato-encéphalique a un phénotype particulier non fenestré avec des jonctions serrées et très peu de vésicules de transport.

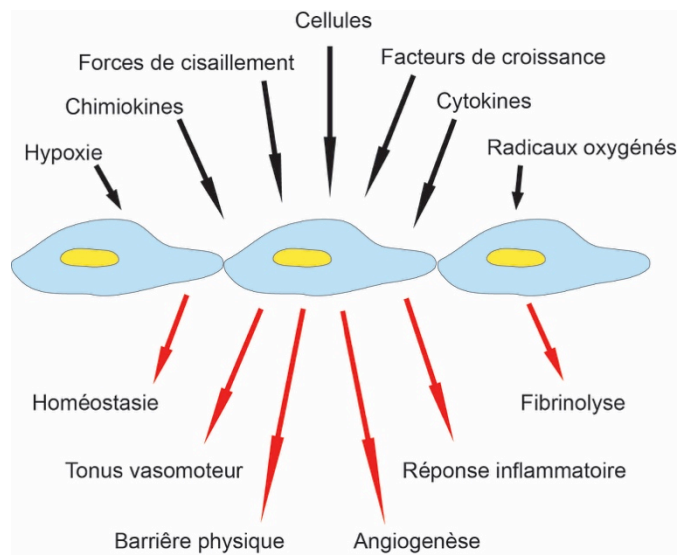
L'endothélium fenestré est associé par une lame basale continue mais possède des pores de 50-60 nm dans la couche endothéliale. Cette dernière permet le passage de l'eau, des solutés et des macromolécules de petites tailles. Ce type d'endothélium est essentiellement retrouvé dans les capillaires des organes où le transport trans-endothélial, l'absorption et la filtration élevée sont nécessaires tels que dans les glandes endocrines, les glomérules rénaux et l'intestin.

L'endothélium discontinu est composé de larges pores de 100-200 nm dans la couche endothéliale et une lame basale discontinue ou absente qui favorise la diffusion facile des macromolécules et des cellules du sang vers les tissus et inversement. On retrouve ce type d'endothélium dans les capillaires des organes où l'échange des macromolécules et des cellules est important comme le foie, la moelle osseuse et la rate (4,7-9).



### 1.1.3. Les fonctions de l'endothélium vasculaire

Les cellules endothéliales sont reconnues par leur grande plasticité et leur capacité de moduler leur structure et leur fonction en réponse à des signaux physiques ou chimiques. La principale fonction de l'endothélium est de constituer une barrière physique entre le sang et les tissus et de permettre les échanges entre les deux compartiments. L'endothélium est aussi un organe multifonctionnel qui contribue significativement à de nombreuses fonctions essentielles du système vasculaire impliquées dans la modulation de l'homéostasie vasculaire, l'inflammation, le tonus vasculaire, l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire (Figure 1.3) (10).



**Figure 1.3:** Les fonctions essentielles de l'endothélium vasculaire.

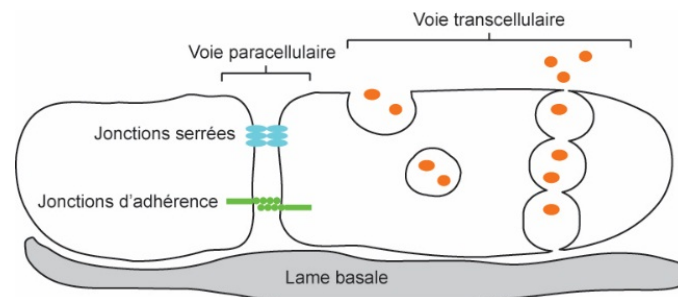
Les cellules endothéliales, en réponse à des signaux physiques ou chimiques qu'elles reçoivent, modulent plusieurs fonctions comme l'homéostasie, l'inflammation, la vasomotricité, l'angiogenèse, la fibrinolyse et la perméabilité vasculaire (10).

L'endothélium permet le maintien du tonus vasculaire et de l'homéostasie vasculaire. Il produit des substances nécessaires qui maintiennent un bon flux sanguin et régulent la pression sanguine. Les forces mécaniques comme les forces de cisaillement et de pression ou les stimulations chimiques comme l'acétylcholine et les hormones provoquent toutes les deux une libération des vasodilatateurs et des vasoconstricteurs. Les vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline préviennent l'agglutination des plaquettes sanguines. Par contre, les vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, l'endothéline, les prostaglandines et le facteur d'activation plaquettaire permettent un ralentissement du flux sanguin. Le tonus vasculaire est maintenu par l'équilibre entre les vasodilatateurs et les vasoconstricteurs et la perturbation de cet équilibre engendre un dysfonctionnement endothélial qui cause une altération de la fonction vasculaire.

Lors d'une lésion vasculaire, la première étape de l'hémostase est d'engendrer une vasoconstriction locale qui entraîne une diminution du flux sanguin au site de dommages. Celle-ci est réalisée par la production des vasoconstrictions qui induisent la contraction locale des cellules musculaires pour ainsi réduire le débit sanguin et favoriser l'accumulation des plaquettes sanguines au site de dommages. L'endothélium, localement détruit, laisse apparaître une matrice riche en collagène qui favorise la fixation des plaquettes formant un amas plaquettaire solide appelé le clou plaquettaire. Une cascade d'activation de facteurs de coagulation est stimulée et des filaments de fibrine emprisonnent les plaquettes pour former le caillot sanguin. Ensuite, l'endothélium induit la fibrinolyse qui permet la dégradation des fibrines du caillot sanguin lorsque le dommage vasculaire est réparé (10).

L'endothélium participe à la réponse immunitaire afin d'éliminer des agents pathogènes. Les cellules endothéliales expriment des protéines d'adhésion qui contrôlent l'extravasation des cellules immunitaires au niveau du site endommagé (11,12). L'endothélium maintient la fluidité du sang en libérant des anticoagulants dans la circulation sanguine afin d'inhiber l'activité des plaquettes, des anti-artérioscléreux et des anti-thrombotiques (13). Il y a, en permanence, un équilibre subtil entre un état anticoagulant et un état pro-coagulant.

L'endothélium est une barrière physique semi-perméable qui contrôle la perméabilité vasculaire aux solutés, la transmigration des leucocytes aux sites de l'inflammation, l'extravasation des cellules sanguines et le remodelage cellulaire durant l'angiogenèse. Donc, la perméabilité des cellules endothéliales est précisément régulée afin de maintenir l'intégrité vasculaire et le bon fonctionnement des organes (14).



**Figure 1.4:** Les mécanismes de perméabilité des cellules endothéliales.

Le passage transcellulaire permet la diffusion des macromolécules à travers des pores transendothéliales. Par contre, les molécules plus grosses traversent la monocouche endothéliale via des cavéoles. D'autre part, le passage paracellulaire est régulé par des jonctions endothéliales (14).

Le passage des substances ou des cellules peut s'effectuer à travers les cellules elles-mêmes (passage transcellulaire) ou via la formation d'un passage entre les cellules endothéliales (passage paracellulaire) (Figure 1.4). Le passage des macromolécules comme l'eau et les fluides peut se réaliser par diffusion ou à travers des pores transendothéliales via des canaux tels que les aquaporines (15). D'autres substances plus grosses traversent la barrière endothéliale par l'intermédiaire des organelles vésiculo-vacuolaires appelées les cavéoles (16,17). Le revêtement des cavéoles est constitué d'une protéine appelée cavéoline. Ces vésicules sont formées par une invagination de la membrane plasmique et assurent le transport des substances à travers les cellules endothéliales. Le passage paracellulaire est influencé par les jonctions endothéliales discutées en détail dans la section IV.

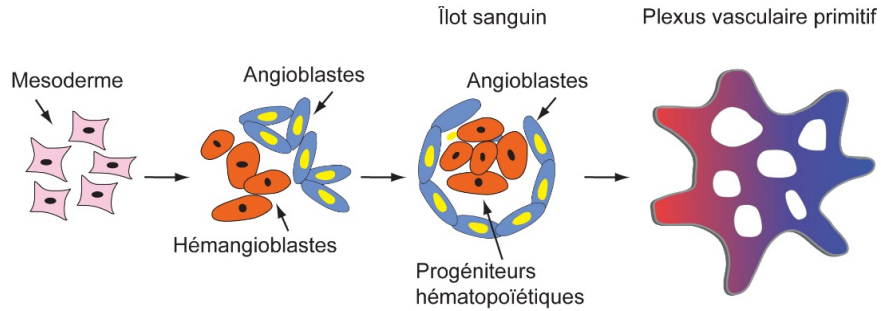
L'endothélium participe aussi dans les processus de formation des vaisseaux sanguins, la vasculogénèse et l'angiogénèse. Ces processus sont responsables de l'expansion du plexus vasculaire primitif et de la formation d'un réseau vasculaire adulte. La vasculogénèse et l'angiogénèse sont discutées en détail dans la prochaine section.

## **1.2. Vasculogenèse et Angiogenèse**

Le système vasculaire est le premier organe qui se développe durant l'embryogenèse. Le réseau vasculaire est formé par deux processus complémentaires : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse intervient essentiellement durant le développement embryonnaire. Cette étape correspond à la migration et la différenciation des cellules progénitrices endothéliales afin de former un réseau vasculaire primitif. L'angiogenèse permet la formation et l'expansion des nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Plus tard, les vaisseaux sanguins sont recouverts par des péricytes (capillaires ou petits vaisseaux) ou des cellules musculaires lisses (gros vaisseaux) qui sont recrutés par les cellules endothéliales pour générer un réseau vasculaire stable et mature (18,19).

### **1.2.1. La vasculogenèse**

La vasculogenèse est un processus qui se déroule chez l'embryon en développement où les angioblastes qui dérivent des cellules mésenchymateuses se différencient « in situ » en cellules endothéliales pour assembler un réseau vasculaire primitif (20). La vasculogenèse débute par la formation d'un îlot sanguin dans le sac vitellin. Les cellules au centre de l'îlot sanguin se différencient en progéniteurs hématopoïétiques, appelés hémangioblastes, qui deviennent soit des globules rouges, des globules blancs ou des mégacaryocytes. D'ailleurs, les cellules en périphérie de l'îlot sanguin, appelé l'angioblaste, se différencient en cellules endothéliales permettant la formation du plexus vasculaire primitif (Figure 1.5).



**Figure 1.5:** Les différentes étapes de la vasculogénèse (21).

Par ailleurs, la vasculogénèse n'est pas restreinte à l'embryogénèse. Des cellules endothéliales progénitrices circulantes dans le sang montrent que la formation des nouveaux vaisseaux sanguins par vasculogénèse se déroule également chez l'adulte. Les cellules endothéliales progénitrices circulantes peuvent se différencier en cellules endothéliales matures et remplacer les cellules endothéliales dans le site de dommage (22-24).

### 1.2.2. L'angiogénèse

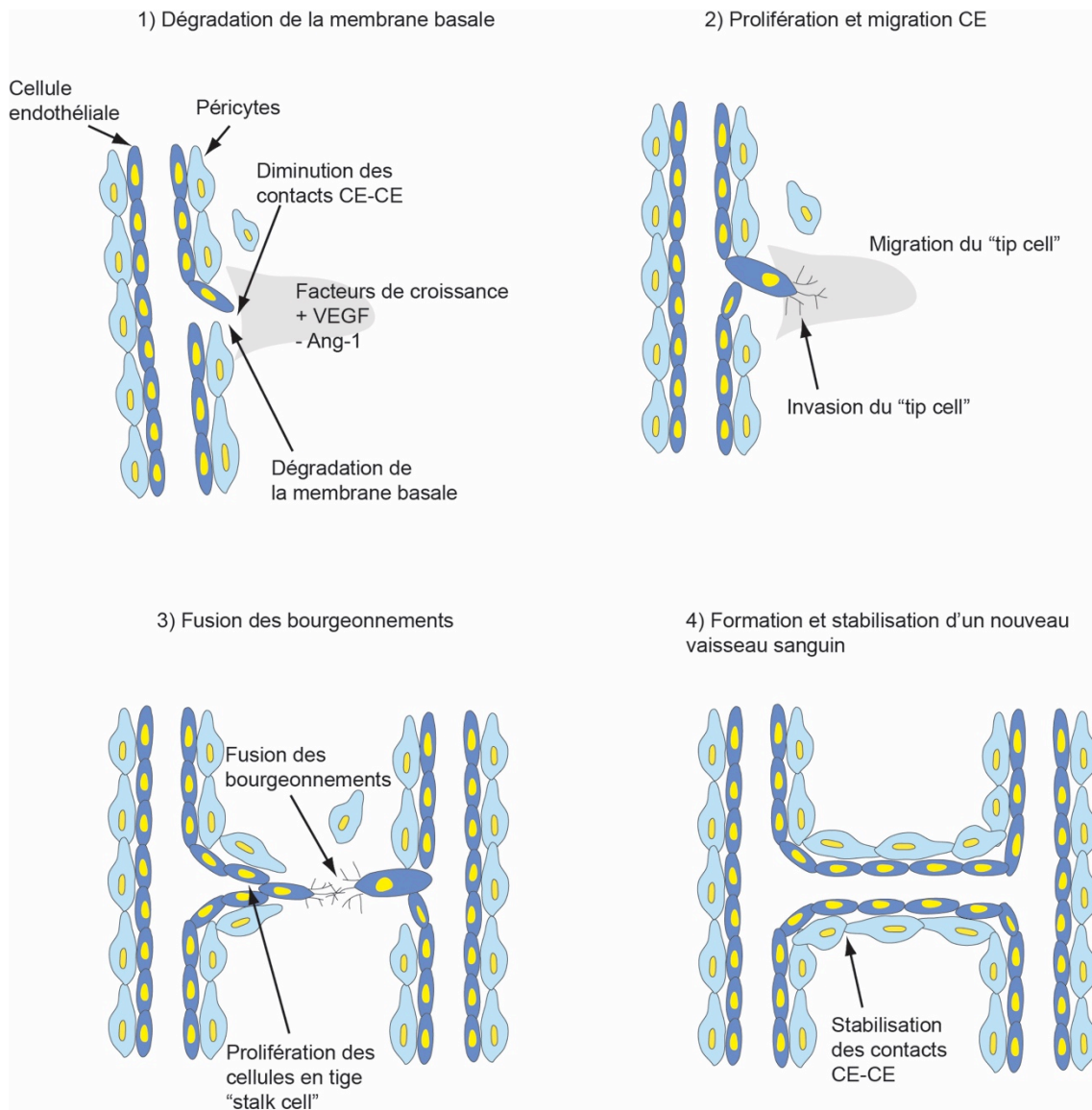
L'angiogénèse est la formation des nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants durant le développement embryonnaire et chez l'adulte. C'est un processus strictement organisé qui permet l'expansion et le remodelage du réseau vasculaire. Il est donc indispensable à de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la reproduction et la régénération des tissus (18,19). D'ailleurs, un déséquilibre de l'angiogénèse participe à de nombreuses pathologies comme le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires et inflammatoires. Par exemple, une insuffisance angiogénique est le facteur

principal qui empêche le rétablissement du tissu après une ischémie. Aussi, cela peut causer l'hypertension, le diabète, une détresse respiratoire et la neurodégénération. Par contre, une angiogenèse excessive ou augmentée peut induire la croissance des tumeurs et une exacerbation de l'inflammation (18,20). Les deux types les plus répandus sont l'angiogenèse par bourgeonnement et par intussusception.

Comme son nom l'indique, l'angiogenèse par bourgeonnement est la formation des vaisseaux sanguins à partir des bourgeonnements des cellules endothéliales qui migrent et prolifèrent suite à des stimuli extracellulaires pro-angiogéniques. C'est le phénomène le plus courant et le plus caractérisé. En condition physiologique, chez l'adulte, la stabilité des vaisseaux sanguins est assurée par les jonctions cellulaires et les péricytes qui empêchent la prolifération des cellules endothéliales en inhibant l'activité des facteurs comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). L'activation de l'angiogenèse suite à un stimulus local comme l'hypoxie est induite par la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF et l'angiopoïétin-2 (Ang-2) qui augmentent la perméabilité vasculaire en déstabilisant les contacts intercellulaires entre les cellules endothéliales (22,23,25). Ceci implique que les cellules endothéliales sortent de leur état de quiescence et ensuite stimulent leur migration en direction du stimulus angiogénique et forment un bourgeonnement (Figure 1.6). La voie de signalisation Delta-Notch joue un rôle clé dans le bourgeonnement. Cette voie promeut la sélection d'une cellule endothéliale meneuse appelée « tip cell » qui se trouve au front de la migration et d'autres cellules qui la suivent appelées cellules en tige ou « stalk cells ». VEGF-A, via le récepteur VEGFR-2, stimule l'expression du ligand de la voie Notch, Delta-like-4 (DLL4), dans les cellules meneuses. En se liant à son récepteur Notch exprimée

par les cellules adjacentes, DLL4 réprime l'expression du VEGFR-2 et bloque son comportement comme une cellule meneuse (26). La cellule endothéliale meneuse étend des longs filopodes afin de suivre le gradient des agents pro-angiogéniques (ex. VEGF) (27-29). Les filopodes expriment le récepteur au VEGF-A en grande quantité permettant de guider le nouveau bourgeon vasculaire dans le sens du gradient de VEGF-A. Les filopodes de la cellule meneuse secrètent des protéases qui vont dégrader localement la matrice extracellulaire et la membrane basale telle que les métalloprotéinases (30). Par contre, les cellules qui suivent la cellule meneuse prolifèrent beaucoup en gardant un contact avec la membrane basale. Les cellules en tige permettent l'élongation du bourgeon endothélial et la fusion avec un autre bourgeon ou vaisseau afin de former la lumière vasculaire et la perfusion d'un nouveau vaisseau. Ensuite, le nouveau vaisseau sanguin est stabilisé par la production de la matrice extracellulaire, le recrutement des péricytes ou des cellules musculaires lisses et la fermeture des jonctions intercellulaires (27).





**Figure 1.6:** Représentation schématique de l'angiogenèse par bourgeonnement.

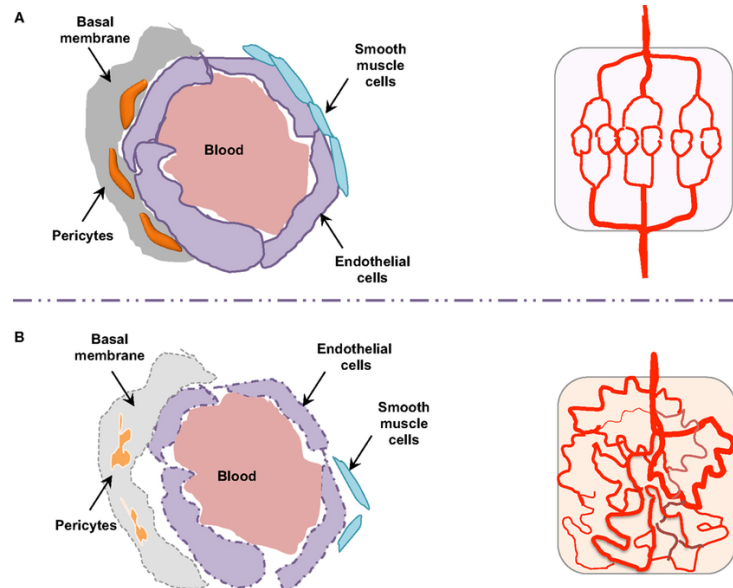
L'angiogenèse se déroule en plusieurs étapes. 1) Augmentation de la perméabilité vasculaire et dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. 2) Prolifération et migration de cellules endothéliales pour former un bourgeonnement. 3) Fusion des bourgeonnements afin de former la lumière vasculaire. 4) Formation et stabilisation d'un nouveau sanguin (19). CE: cellule endothéliale.

D'autre part, l'angiogenèse par intussusception permet l'élargissement et la séparation des vaisseaux sanguins déjà formés afin de former un nouveau vaisseau sanguin. Ce type d'angiogenèse est plus rapide et efficace que l'angiogenèse par bourgeonnement. Il dépend de la réorganisation des cellules endothéliales préexistantes mais par contre, ne dépend pas de la prolifération et de la migration immédiate des cellules endothéliales (31). L'angiogenèse par intussusception se déroule durant le développement et chez les adultes et aussi joue un rôle essentiel durant le développement embryonnaire où les ressources sont limitées et la croissance est rapide (31,32). Lorsque la protrusion des cellules endothéliales des deux côtés d'un vaisseau entre en contact, les jonctions intercellulaires se réorganisent et forment une séparation dans la lumière du vaisseau.

L'angiogenèse tumorale correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins indispensables à l'expansion des tumeurs car ils vont assurer un apport d'oxygène, de nutriments favorables à la croissance des tumeurs, ainsi que l'élimination des déchets cellulaires. Les facteurs identifiés dans les mécanismes de contrôle de l'angiogenèse tumorale sont en partie similaires à ceux de l'angiogenèse physiologique. D'ailleurs, l'angiogenèse tumorale assure la survie des cellules tumorales et constitue une étape essentielle de l'invasion des tumeurs et le développement des métastases. L'étape la plus importante du phénomène d'angiogenèse tumorale est la transition angiogénique traduite par une rupture de l'équilibre entre les régulateurs pro- et anti-angiogéniques. Dans les conditions tumorales, les cascades pro-angiogéniques déclenchées par les cellules tumorales sont irréversibles et dépassent les conditions physiologiques. Cela induit une angiogenèse continue qui provoque la croissance

des tumeurs. Grâce à sa vascularisation, la tumeur peut se mobiliser afin de se loger dans d'autres organes et générer des métastases.

Contrairement à ce qu'on observe dans les conditions physiologiques, l'angiogenèse tumorale est caractérisée par des vaisseaux sanguins non-organisés et perméables. Ces vaisseaux sont immatures et donc le recouvrement des péricytes est diminué et la lame basale est discontinue (Figure 1.7). Ces vaisseaux sanguins très perméables facilitent le passage des cellules tumorales dans le sang et le développement des métastases.



**Figure 1.7:** Aspect normal et anormal de la vascularisation.

Une représentation schématique de l'aspect normal (A) et anormal (B) de la vascularisation. Contrairement à ce que l'on observe dans ces phénomènes physiologiques, l'angiogenèse tumorale est caractérisé par une organisation et des dimensions vasculaires anarchiques ainsi qu'une perméabilité vasculaire accrue (33).

Plusieurs facteurs de croissance activent des cascades d'évènements importantes lors de l'angiogenèse. Pour cela, une étude des voies de signalisation activées par ces facteurs permettrait de mieux comprendre la signalisation durant l'angiogenèse et saisir les désordres et les pathologies vasculaires.

### **1.3. Les facteurs angiogéniques**

L'angiogenèse est étroitement contrôlée par des régulateurs positifs (pro-angiogéniques) et négatifs (anti-angiogéniques). Les facteurs anti-angiogéniques maintiennent l'état de quiescence des cellules endothéliales. Par contre, l'induction de l'angiogenèse (hypoxie, inflammation, altération de la membrane basale, etc) stimule la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques et diminue la sécrétion des facteurs anti-angiogéniques. Donc, la régulation de l'angiogenèse est une balance entre la libération des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Des facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF, l'angiopoïétine-1 (Ang-1), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance transformant beta (TGF- $\beta$ ), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'angiogénine, et d'autres protéines jouent un rôle important dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales durant l'angiogenèse. Ces facteurs pro-angiogéniques sont sécrétés par les cellules endothéliales et les cellules stromales. Les cellules du stroma tumoral constituent un réservoir hétérogène regroupant des fibroblastes activés, des cellules inflammatoires et des cellules immunitaires qui constituent une source supplémentaire de facteurs pro-angiogéniques. Par contre, des facteurs anti-angiogéniques libérés par des cellules endothéliales inhibent la migration et la prolifération afin d'assurer la quiescence de

l'ensemble du système vasculaire. L'angiostatine, l'endostatine, l'angiopoïétine-2, les thrombospondines, les interférons sont parmi les facteurs anti-angiogéniques. Durant mon doctorat, nous avons étudié les voies de signalisation activées par les deux facteurs pro-angiogéniques: le VEGF et l'Ang-1.

### **1.3.1. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)**

Le VEGF est le principal facteur impliqué dans l'angiogenèse physiologique et pathologique. En 1983, Donal Senger et coll. qui travaillaient sur les propriétés physiologiques des vaisseaux sanguins tumoraux, ont mis en évidence une protéine qui induisait une forte perméabilité vasculaire lorsque sécrétée par les tumeurs (34). Cette protéine a été initialement nommée le facteur de perméabilité vasculaire tumorale (VPF: vascular permeability factor) (34,35). En 1989, Napoleone Ferrara et coll. ont identifié et isolé un nouveau facteur de croissance ayant une activité mitotique puissante et spécifique pour les cellules endothéliales qu'ils ont nommé VEGF (36). Plus tard, les deux molécules VEGF et VPF ont été séquencées et cela a indiqué qu'ils s'agissaient d'ailleurs de la même protéine connue aujourd'hui sous le nom de VEGF (37,38). Ces découvertes ont démontré que le VEGF est un facteur de croissance des cellules endothéliales et de la perméabilité vasculaire.

### 1.3.1.1. La famille du VEGF

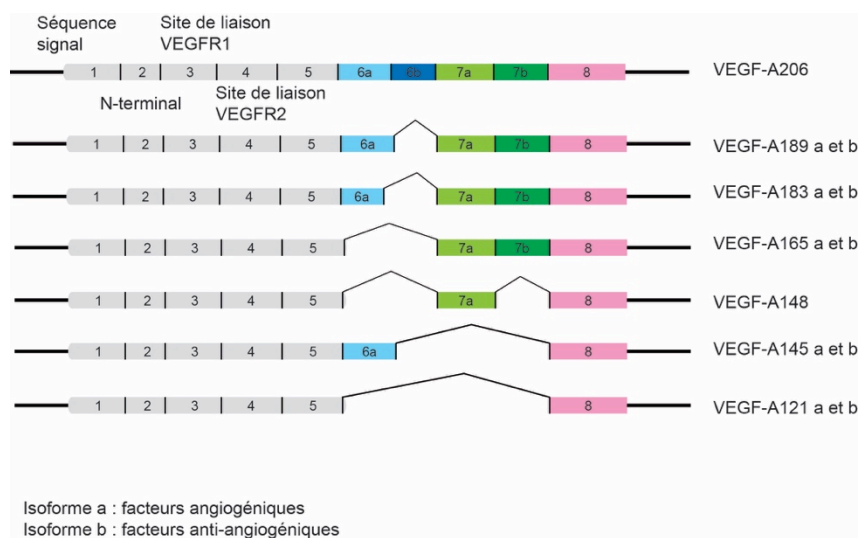
Chez les humains, la famille du VEGF est composée de cinq protéines structurellement similaires : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PGF, placental growth factor). Les VEGFs sont des glycoprotéines secrétées préférentiellement sous formes d'homodimère alors que le VEGF-A et PGF se retrouvent sous forme hétérodimère. La complexité de la famille VEGF augmente suite à différents épissages alternatifs (pour VEGF-A, VEGF-B et PGF) et des clivages protéolytiques (pour VEGF-A, VEGF-C et VEGF-D) (Figure 1.8). Par conséquent, chacun de ces ligands est exprimé sous différentes isoformes (39). L'épissage alternatif et le clivage protéolytique de la famille VEGF permettent de réguler la capacité de ces ligands de lier les récepteurs à VEGF (VEGFRs). D'autres homologues du VEGF ont été découverts chez les non-vertébrés. Le VEGF-E a été découvert dans le génome du virus parapox (34) et le VEGF-F a été découvert dans le venin de certains serpents (40).

L'épissage alternatif du VEGF-A génère plusieurs isoformes VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A148, VEGF-A165, VEGF-A183 et VEGF189 (les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés) (41,42). En plus, un autre épissage alternatif du VEGF-A (VEGF-A121b, VEGF-A145b, VEGF-A165b, VEGF-A183b et VEGF189b) produit des isoformes qui lient mais n'activent pas les VEGFRs et qui sont décrits comme étant des facteurs anti-angiogéniques (43). Par exemple, le VEGF-A165b a été considéré comme un inhibiteur compétitif de VEGF-A165. Le VEGF-A165b lie le récepteur VEGFR2 avec la même affinité que VEGF-A165 mais il est considérablement moins efficace à induire l'activation du VEGFR2 et en conséquence il ne stimule pas les voies de signalisation pro-angiogénique (44).

De plus, le VEGF-A165b ralentit ou inhibe la croissance des tumeurs et il est moins exprimé dans différents types de cancer, y compris les cancers de la prostate et du rein. (44,45)

Le VEGF-A est le plus étudié et lie les deux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Le VEGF-B est un ligand spécifique pour le VEGFR1 (46). Certaines études ont rapporté le rôle angiogénique du VEGF-B mais plusieurs autres études ont démontré que le VEGF-B n'est pas capable de produire les mêmes fonctions que le VEGF-A comme par exemple, lors de la formation des vaisseaux sanguins et la perméabilité vasculaire (47). La fonction du VEGF-B est d'agir comme un facteur de survie plutôt qu'un facteur angiogénique. En plus, les souris dépourvues du VEGF-B sont en bonne santé et fertiles. L'angiogenèse n'est pas affectée dans la plupart des organes de ces souris, contrairement aux souris dépourvues du VEGF-A et VEGF-C qui meurent durant l'embryogenèse (48). Le VEGF-C et le VEGF-D régulent l'angiogenèse durant l'embryogenèse et jouent un rôle plus important au niveau de la lymphangiogenèse et la croissance des tumeurs à partir de la formation des vaisseaux lymphatiques. La délétion du VEGF-C chez les souris est létale et résulte en une malformation des vaisseaux lymphatiques sans affecter le développement vasculaire (49). Par ailleurs, l'inactivation du gène codant pour le VEGF-D n'est pas létale et par la suite les souris sont en bonne santé et développent des vaisseaux lymphatiques. Ceci suggère que le VEGF-D ne joue pas un rôle essentiel dans le développement des vaisseaux lymphatiques et que le VEGF-C pourrait remplacer le VEGF-D (50). Le VEGF-C et le VEGF-D ont une affinité pour les récepteurs VEGFR2 et VEGFR3. Le PGF est un facteur de croissance initialement trouvé dans le placenta. Il n'est pas largement exprimé dans le tissu embryonnaire ou chez les adultes. Par

contre, il est exprimé par des tumeurs où il complète et potentialise l'activité du VEGF-A dans l'angiogénèse pathologique (51,52). Le PGF lie le récepteur VEGFR1.



**Figure 1.8:** Différentes isoformes du VEGF-A suite à l'épissage alternatif.

Le gène humain du VEGF est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3) (53). Il est composé de huit exons qui sont séparés par sept introns. L'exon 3 est un site de liaison au récepteur VEGFR1 et l'exon 4 est un site de liaison au récepteur VEGFR2. L'épissage alternatif du VEGF-A206 génère plusieurs isoformes pro-angiogéniques VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A148, VEGF-A165, VEGF-A183 et VEGF189 (les chiffres indiquent le nombre d'acides aminés) (41,42).

L'isoforme VEGF165, appelé aussi VEGF-A ou VEGF, est l'isoforme le plus prédominant et il est connu comme étant un puissant stimulant de l'angiogénèse (44). Pour cela, notre laboratoire s'intéresse à étudier les effets de VEGF-A sur les cellules endothéliales. Au cours de ma thèse, VEGF se réfère à VEGF-A.



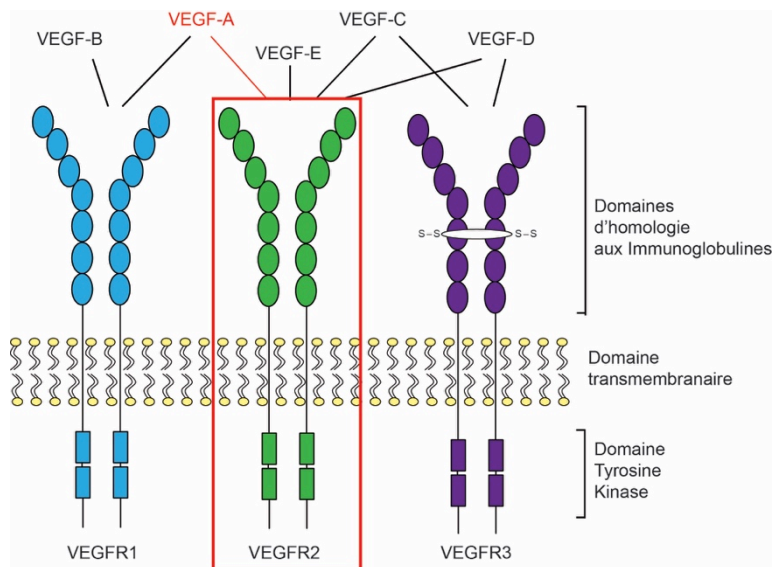
Le VEGF a initialement été caractérisé comme étant un facteur de perméabilité vasculaire ayant une activité mitotique spécifique pour les cellules endothéliales (34). Suite à une activation par le stress oxydatif, le VEGF est produit par plusieurs types cellulaires, notamment les cellules endothéliales, les cellules cancéreuses et les cellules musculaires lisses qui modulera ensuite la fonction des cellules endothéliales via une signalisation auto et paracrine (54,55). Plusieurs études ont montré l'importance du VEGF dans l'angiogenèse. La délétion du gène codant pour le VEGF chez les souris (*VEGFA*<sup>-/-</sup>) conduit à la mort embryonnaire, même à l'état hétérozygote (*VEGFA*<sup>+/-</sup>), causé par une anomalie létale dans la formation des vaisseaux sanguins durant le développement embryonnaire (56,57). L'inactivation du gène à un stade néonatal provoque un retard de croissance létal (58). De plus, la surexpression du VEGF chez les souris est aussi fatale à cause d'une altération sévère du développement cardiaque. Donc, le VEGF joue un rôle essentiel dans l'angiogenèse physiologique. Il est indispensable au développement embryonnaire et à l'angiogenèse chez l'adulte.

### **1.3.1.2. Les récepteurs du VEGF**

Les VEGFs lient et activent trois récepteurs de types tyrosine kinase : VEGFR1 (Flt-1: fms-like tyrosine kinase), VEGFR2 (Flk1: fetal liver kinase) ou KDR (kinase insert domain containing receptor) et VEGFR3 (Flt-4: fms-like tyrosine kinase 4) (Figure 1.9). Les différentes isoformes de VEGF ont une spécificité distincte d'association à chacun des récepteurs ce qui contribue à une diversité des fonctions biologiques (59).

Initialement, les VEGFRs s'expriment sous forme monomère au niveau de la surface cellulaire mais suite à une stimulation par un ligand, les récepteurs subissent une dimérisation

accompagnée par un changement conformationnel du domaine intercellulaire. Le changement conformationnel permet la liaison de l'adénosine triphosphate (ATP) sur des sites de liaison à l'ATP dans le domaine intercellulaire ce qui active les domaines tyrosines kinases et induit une autophosphorylation des tyrosines. Cela induit l'activation des différentes voies de signalisation.



**Figure 1.9:** Structure des récepteurs au VEGF et leurs ligands.

Les VEGFRs sont constitués d'un domaine extracellulaire qui permet la fixation du ligand, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique qui contient les domaines à activité tyrosine kinase. Le domaine extracellulaire est constitué de sept domaines de type immunoglobuline (IgG-like). Pour VEGFR3, le cinquième domaine d'Ig est remplacé par un pont disulfure. Le domaine Ig-2 du domaine extracellulaire du VEGFR2 est nécessaire pour l'interaction ligand-récepteur et le domaine Ig-3 est essentiel pour déterminer l'affinité de l'interaction avec le ligand. Le domaine transmembranaire est important pour l'activation du domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire adjacent à la membrane qui s'appelle le domaine juxtamembranaire régule aussi l'activité des tyrosines kinases (59). Au cours de ma thèse, j'ai utilisé VEGF (VEGF-A) qui agit sur VEGFR2 (en rouge).

### 1.3.1.2.1. Le VEGFR1

Le VEGFR1 est activé en réponse au VEGF-A, VEGF-B et PGF (60). Le VEGFR1 a une affinité plus forte pour le VEGF-A que le VEGFR2. D'autre part, l'activité kinase du VEGFR1 est plus faible que celle du VEGFR2 et les voies de la signalisation activées par VEGFR1 ne sont pas très bien connues (61,62). L'épissage alternatif de VEGFR1 produit une isoforme du récepteur soluble (sVEGFR1) qui peut se lier à et inhiber l'action du VEGF (63). Le VEGFR1 est principalement exprimé dans les cellules endothéliales durant le développement et chez l'adulte (64,65). De plus, plusieurs types cellulaires, autres que les cellules endothéliales, expriment le VEGFR1 comme les monocytes, les macrophages, les cellules musculaires lisses des vaisseaux, les cellules dendritiques et différents types cellulaires tumorales (66-68).

La délétion du VEGFR1 chez la souris (*flt<sup>-/-</sup>*) induit leur mort au stade embryonnaire due à une prolifération excessive des cellules endothéliales et une désorganisation sévère du réseau vasculaire (69). Le VEGFR1 est un inhibiteur de l'angiogenèse durant l'embryogenèse. Par contre, le rôle négatif de VEGFR1 dans l'angiogenèse est indépendant de son domaine tyrosine kinase parce que les souris dépourvues du domaine tyrosine kinase sur la partie intracellulaire du VEGFR1 (*flt TK<sup>-/-</sup>*) ont un développement vasculaire normal (70). L'activité tyrosine kinase du VEGFR1 a été rapportée comme étant faible et inférieure à celle du VEGFR2. Les propriétés structurelles de la boucle d'activation et le manque de sites de phosphorylation nécessaires pour la phosphorylation du VEGFR1 contribuent à la faible activité kinase du VEGFR (71,72). Un épissage alternatif du VEGFR1 génère une forme soluble du récepteur (sVEGFR1). Le sVEGFR1 peut inhiber l'activité du VEGF-A en formant un hétérodimère avec VEGFR2 (63,73).

### 1.3.1.2.2. Le VEGFR2

Le VEGFR2 joue un rôle important dans l'activation des voies de signalisation induites par le VEGF durant le développement embryonnaire et chez les adultes liées à l'angiogenèse physiologique et pathologique. Le VEGFR2 est le principal récepteur impliqué dans l'activité angiogénique du VEGF-A. La fixation du VEGF-A sur ce récepteur active plusieurs voies de signalisation impliquées dans la perméabilité vasculaire, la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le VEGFR2 peut aussi lier le VEGF-C et le VEGF-D. Un épissage alternatif du VEGFR2 génère une forme soluble du récepteur (sVEGFR2) qui est exprimé dans plusieurs tissus. Il lie le VEGF-C et empêche sa fixation au VEGFR3, par conséquent il inhibe la prolifération des cellules endothéliales lymphatiques (74). De plus, le VEGFR2 a aussi une forte affinité pour le PGF et il est le seul récepteur connu pour VEGF-E. Le VEGFR2 est indispensable durant le développement embryonnaire puisque l'embryon des souris dépourvues du VEGFR2 (*flk1*<sup>-/-</sup>) meurt au jour E8.5 due à l'absence des cellules endothéliales matures (75). Ce phénotype est très similaire aux souris *VEGFA*<sup>-/-</sup> (56,57). Le VEGFR2 est exprimé par les cellules endothéliales et leurs précurseurs embryonnaires. En effet, son expression augmente plus durant la vasculogenèse et l'angiogenèse. D'autre part, il est aussi exprimé dans d'autres types cellulaires non-endothéliaux comme les cellules souches hématopoïétiques et les mégacaryocytes (76).

### 1.3.1.2.3. Le VEGFR3

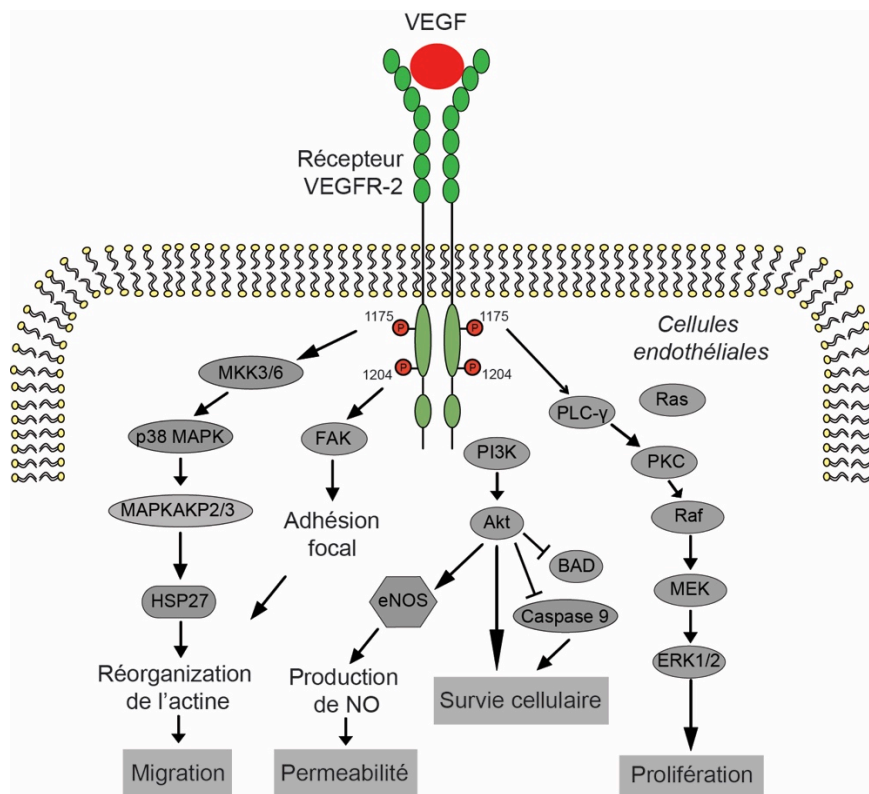
Le VEGFR3 est un récepteur qui possède une sélectivité pour le VEGF-C et le VEGF-D. Le VEGF-C a une affinité de liaison supérieure pour le VEGFR3 que pour le VEGFR2 (76). Durant le développement, le VEGFR3 est exprimé dans le réseau vasculaire et joue un rôle important au niveau de la formation des vaisseaux sanguins (77). Durant l'embryogenèse, le VEGFR3 est exprimé dans les cellules de l'angioblaste qui deviennent ensuite les cellules endothéliales lymphatiques. Pour cela, le VEGFR3 est un marqueur des vaisseaux lymphatiques (78). Il a été démontré que l'activation du VEGFR3 par le VEGF-C et VEGF-D n'est pas nécessaire pour l'angiogenèse. Il joue un rôle important dans la lymphogenèse, mais il est aussi exprimé dans les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse (79). La délétion du gène VEGFR3 induit la mort des souris au stade embryonnaire avant la formation du système lymphatique causée par une malformation et une désorganisation du système vasculaire (80). D'autre part, le développement des vaisseaux sanguins n'est pas affecté chez les souris dépourvues de l'activité tyrosine kinase du VEGFR3 (81). Ceci montre que l'activation du VEGFR3 par le VEGF-C ou le VEGF-D joue un rôle dans la lymphogenèse et non pas dans l'angiogenèse. En revanche, le VEGFR3 peut former un hétérodimère avec le VEGFR2 et contrôler sa signalisation (81).

### 1.3.1.3. Voies de signalisation activées par VEGFR2

La phosphorylation du VEGFR2 est essentielle à l'activation des différentes cascades intercellulaires afin d'induire diverses réponses biologiques comme la prolifération, la migration, la perméabilité et l'inflammation (Figure 1.10). La liaison VEGF/VEGFR2 induit une dimérisation du récepteur et par conséquent la phosphorylation de ses résidus tyrosines. La phosphorylation de ces sites crée une séquence consensus qui permet de recruter des protéines adaptatrices impliquées dans l'activation de différentes voies de signalisation. Les résidus tyrosines majeurs qui sont phosphorylés sont: Tyr951, Tyr996 et Tyr1008 dans le domaine kinase, Tyr1054 et Tyr1059 dans la boucle de l'activation du domaine kinase, et Tyr1175 et Tyr1214 dans le région C-terminal (82,83). Les résidues Tyr966 et Tyr1008 sont importants pour l'activation du phospholipase C (PLC)  $\gamma$  et la libération du calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales (84,85). La phosphorylation des sites Tyr1054 et Tyr1059 est cruciale pour l'activité kinase du récepteur (86). La mutation de ces deux sites de phosphorylation mène à une perte de l'activité kinase du VEGFR2. Le site Tyr1059 interagit avec la tyrosine kinase Src qui à son tour phosphoryle le site Tyr1175 sur VEGFR2. La phosphorylation de Tyr1175 est impliquée dans l'activation du PLC $\gamma$ , la prolifération et dans la vasculogénèse (82,87). D'autre part, la phosphorylation du VEGFR2 sur la tyrosine 801 est essentielle pour la production de NO dans les cellules endothéliales (88). Finalement, la phosphorylation de la Tyr1214 est nécessaire pour l'activation de la kinase activée par les mitogènes p38 ou p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase) et par suite la migration cellulaire (89).

Le VEGFR2 joue un rôle essentiel dans l'activation de la prolifération via l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes MAPKs. La phosphorylation de la Tyr1175

permet le recrutement de PLC $\gamma$  via son domaine SH2. L'activation de PLC $\gamma$  conduit à l'hydrolyse du phospholipide membranaire phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) afin de produire des messagers secondaires, le diacylglycerol (DAG) et l'inositol (1,4,5)-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG active les protéines kinases C (PKC) qui agiront au niveau du Raf-1 et par la suite induire l'activité MAPK afin de stimuler la prolifération cellulaire. D'autre part, l'IP<sub>3</sub> active des récepteurs sur le réticulum endoplasmique pour libérer le calcium intracellulaire (82). Le calcium est important pour la production de prostaglandine-2 et à l'expression des gènes nécessaires pour la prolifération.



**Figure 1.10:** Les voies de signalisation activées par VEGFR2.

Le VEGF via son récepteur VEGFR2 active des signaux anti-apoptotiques pour assurer la survie des cellules endothéliales via l'activation de l'enzyme phosphoinositol 3-kinase (PI3K) (90,91). PI3K promeut l'activation de son médiateur, la protéine kinase B (PKB), connu aussi sous le nom de Akt, à travers la phosphoinositol-dépendant kinase 1 (PDK1) (92,93). Ensuite, la phosphorylation de l'Akt inhibe l'activité des protéines pro-apoptotiques Bad, Bax et caspase-9. De plus, il augmente l'expression des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et IAP (94). Donc, la survie cellulaire est favorisée par la phosphorylation de l'AKT par le VEGF. Une autre voie de signalisation qui permet la survie cellulaire fait intervenir l'activation de la protéine kinase de contacts focaux (FAK). La phosphorylation de la protéine FAK permet l'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire et l'activation des voies de survie cellulaire (95).

Le VEGF augmente la perméabilité des cellules endothéliales. Le VEGF, via VEGFR2, induit la phosphorylation d'Akt sur la Ser473 et ensuite la phosphorylation de la synthase endothéliale de monoxyde d'azote (eNOS) sur la Ser1177 (96). Cette phosphorylation activatrice d'eNOS va stimuler la production de NO (88,93,97). La production de NO induit la nitrosylation de la  $\beta$ -caténine à la cystéine 619 (Cys619) qui mène à la dissociation du complexe des jonctions cellulaires et par la suite à une augmentation de la perméabilité cellulaire (98). De plus, la phosphorylation du VEGFR2 sur le résidu Tyr951 crée un site de liaison à une protéine adaptatrice TSA<sub>d</sub> (T-cell specific adaptor protein) qui lie la tyrosine kinase Src via son domaine SH2 (83). Il a été suggéré que l'activation de la tyrosine kinase Src phosphoryle les résidus tyrosines sur la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine) qui ensuite induit la dissociation des jonctions d'ancrage entre les cellules endothéliales et augmente la perméabilité cellulaire (99-101).



Le VEGF est un facteur pro-migratoire important. La stimulation des cellules endothéliales par VEGF induit l'activation de la voie p38-MAPK et la phosphorylation de la protéine de choc thermique HSP27 (HSP27: Heat shock protein 27). Cela stimule la réorganisation du réseau d'actine et la migration des cellules endothéliales (102,103). La phosphorylation du résidu Tyr1214 du VEGFR2 mène au recrutement et à l'activation de la protéine adaptatrice Nck. Cette activation déclenche la voie de signalisation Cdc42-SAPK2/p38 qui promeut la migration des cellules endothéliales (89).

## **1.3.2. Les Angiopoïétines**

### **1.3.2.1. La structure des angiopoïétines**

Les angiopoïétines sont des protéines solubles secrétées sous forme de dimères ou de multimères. Elles contrôlent étroitement le développement et la stabilité des vaisseaux sanguins (104). La famille des angiopoïétines consiste de quatre différents membres : Ang-1, Ang-2, Ang-3 et Ang-4. Elles agissent comme des ligands pour le récepteur tyrosine kinase Tie-2 (105-107). Les angiopoïétines sont caractérisées par leur effet opposé au niveau du récepteur Tie-2 et par conséquent les voies signalétiques activées. L'Ang-1 et l'Ang-2 sont les membres les plus étudiés et caractérisés. L'Ang-1 a été clonée et identifiée comme un agoniste du Tie-2 qui assure l'intégrité structurale des vaisseaux sanguins. À l'inverse, l'Ang-2 agit comme un inhibiteur de l'activité du système Ang-1/Tie-2. Par contre, certaines études *in vitro* montrent que l'Ang-1 et l'Ang-2 peuvent aussi être des agonistes de Tie-2 mais cela dépend de l'environnement tissulaire et les conditions expérimentales (108-111). L'Ang-3 et l'Ang-4

ont été identifiées comme étant des orthologues inter-espèces, humain et murin, respectivement. De même, elles agissent comme des agonistes et antagonistes de Tie-2 dépendamment du contexte cellulaire.

Les Ang-1 et Ang-2 lient spécifiquement le récepteur de type tyrosine kinase Tie-2 mais la structure du ligand et le degré d'oligomérisation définissent les propriétés fonctionnelles de l'Ang-1 et l'Ang-2. Dans les cellules endothéliales, une organisation en tétramères ou plus est nécessaire afin que l'Ang-1 puisse activer le récepteur Tie-2 (112,113). Contrairement à l'Ang-1, l'Ang-2 ne forme pas des multimères hiérarchisés et par conséquent elle est un agoniste partiel du récepteur Tie-2 dans les cellules endothéliales. En effet, elle est aussi capable d'exercer une fonction antagoniste en présence de l'Ang-1 (113). De plus, les angiopoïétines peuvent lier les intégrines et activer des voies de signalisation indépendamment du récepteur Tie-2 (114).

L'Ang-1 est exprimée dans l'endothélium vasculaire quiescent chez les adultes. Elle est également produite par les cellules murales (les péricytes et les cellules musculaires lisses), et d'autres types cellulaires non endothéliales comme les fibroblastes, les neutrophiles, les monocytes et les cellules tumorales (25,115). L'Ang-1, mais pas l'Ang-2, se fixe sur la matrice extracellulaire via son peptide de liaison (116). Elle est nécessaire pour maintenir des vaisseaux sanguins quiescents et matures. Pour cela, son expression augmente durant l'angiogenèse.

L'Ang-2 est principalement exprimée par les cellules endothéliales et sa production est régulée au niveau transcriptionnel par des facteurs pro-angiogéniques tel que l'hypoxie et le VEGF (117). L'Ang-2 se trouve emmagasinée dans des granules de stockage dans l'endothélium appelé les corps de Weibel-Palade et est rapidement libérée sous l'effet d'un

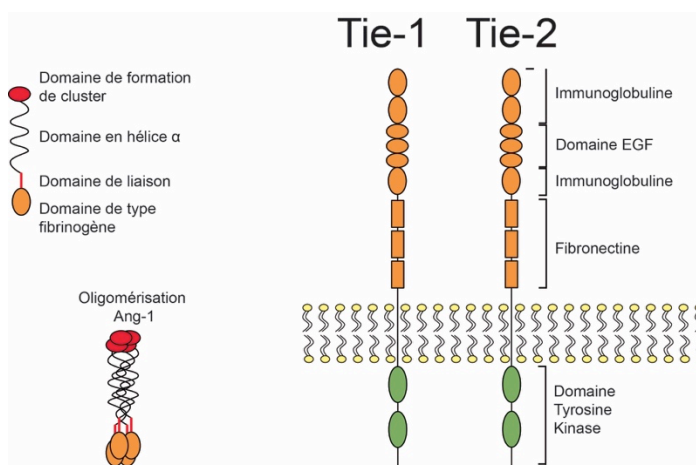
stimulateur d'angiogenèse comme la thrombine, l'hypoxie et le VEGF. De plus, une forte expression de l'Ang-2 est détectée dans les vaisseaux tumoraux et agit en synergie avec le VEGF pour promouvoir la progression tumorale (118).

Les autres membres de la famille des angiopoïétines, Ang-3 et Ang-4, sont très peu étudiés. Elles partagent seulement 65% d'homologie de séquence d'acides aminés et semblent exercer des effets pro- ou anti-angiogéniques en fonction des conditions expérimentales. L'Ang-3 est exprimée dans de multiples tissus murins et l'Ang-4 est spécifiquement exprimée dans les poumons humains. L'Ang-4 a des effets semblables à l'Ang-1. L'Ang-4 phosphoryle Tie-2 dans les cellules endothéliales humaines et induit la migration cellulaire. D'autre part, la stimulation avec une forme recombinante de l'Ang-3 active le récepteur Tie2. Donc, l'Ang-3 est un agoniste de Tie-2 dans l'endothélium murin (107,119). Par contre, les actions de l'Ang-3 sont contextes dépendants. L'Ang-3 ne peut pas phosphoryler Tie-2 et elle inhibe sa phosphorylation induite par l'Ang-1 dans les cellules endothéliales humaines. De même, il a été démontré que la surexpression de l'Ang-3 inhibe l'angiogenèse tumorale et les métastases pulmonaires dans le modèle de carcinome pulmonaire et de carcinome mammaire (107,119).

### **1.3.2.2. La famille des récepteurs Tie**

Après la découverte du VEGF dans les années 1980, la recherche des protéines tyrosines kinases a permis d'identifier les récepteurs tyrosines kinases Tie-1 (TIE) et Tie-2 (TEK), un second type de récepteur à activité tyrosine kinase exprimées par les cellules endothéliales (Figure 1.11). Ces deux récepteurs présentent une structure générale similaire.

Le récepteur Tie-2 peut lier tous les angiopoïétines mais l'absence du ligand pour Tie-1 rend la caractérisation des fonctions Tie-1 plus difficile. Il est intéressant de noter que des études montrent une nouvelle fonction de Tie-1 indépendamment du ligand. Ce dernier peut former un hétéromère avec Tie-2 et modifier son activité (111,120-124). Toutes les cellules endothéliales expriment fortement les récepteurs Tie-2.



**Figure 1.11:** La structure de la famille des angiopoïétines et leurs récepteurs

Structurellement, les angiopoïétines sont constitués d'un domaine N-terminale contenant deux résidus cystéines suivi d'un domaine en hélice alpha, un peptide de liaison et un domaine de type fibrinogène impliqué dans la liaison au récepteur dans la partie C-terminale (100). Les cystéines dans le N-terminale permettent le regroupement des angiopoïétines homodimères en multimères de tailles variables. Les multiples hélices alpha organisent l'oligomérisation des monomères. Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 sont des monomères qui consistent d'une partie N-terminal contenant deux motifs d'immunoglobuline, suivi par trois domaines d'homologie à la facteur de croissance épidermique (EGF), un troisième domaine de type immunoglobuline, trois domaines fibronectine de type III, un domaine transmembranaire et finalement un domaine catalytique tyrosine kinase dans la partie C-terminale responsable de transmettre le signal intracellulaire (125,126).

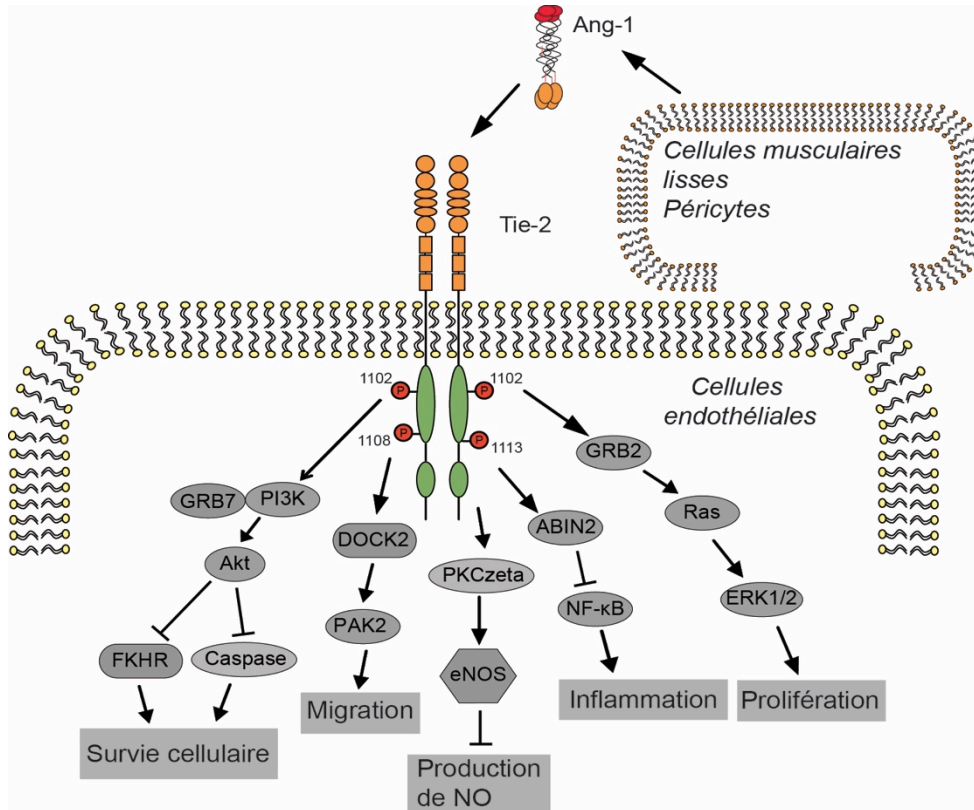
Les modèles de souris génétiquement modifiées ont permis de démontrer le rôle clé de l'Ang-1 et Tie2 dans le remodelage des vaisseaux sanguins, le recrutement des cellules murales et la maturation des vaisseaux sanguins durant le développement embryonnaire ainsi que l'hémostase chez les adultes. Les souris déficientes pour le gène *TIE1* ont une angiogenèse qui n'est pas perturbée mais les vaisseaux perdent leur intégrité ce qui peut induire une hémorragie, un oedème tissulaire grave et éventuellement le mort des embryons entre la naissance et le jour 13.5 (127,128). Les souris déficientes pour le gène *TIE2* présentent un phénotype similaire à celui observé chez les souris dépourvues d'*Ang-1*. Elles meurent entre les jours embryonnaires 9.5 et 12.5 due à une malformation du réseau vasculaire qui demeure peu organisé et immature. De plus, ces vaisseaux ont un déficit en couverture cellulaire murale (les péricytes et cellules musculaires lisses) (128-130). L'hématopoïèse et le développement de l'endothélium cardiaque sont également affectés chez ces souris (129).

### **1.3.2.3. Voies de signalisation Ang-1/Tie-2**

L'Ang-1 est un facteur de croissance qui active Tie-2 afin de promouvoir plusieurs fonctions biologiques importantes pour la croissance et le remodelage vasculaire. Dans les cellules endothéliales, les multimères d'Ang-1 se lient à Tie-2 qui forme à son tour des dimères ou des multimères, ce qui engendre l'autophosphorylation du récepteur et l'activation des voies de signalisations impliquées dans des fonctions biologiques diverses comme la migration cellulaire, la réorganisation du cytosquelette et la survie cellulaire (131).

L'Ang-1, via l'activation du récepteur Tie-2, inhibe l'apoptose des cellules endothéliales. L'effet anti-apoptotique de l'Ang-1 implique la phosphorylation de PI3K qui

ultérieurement active la protéine kinase Akt (132,133). Ensuite, Akt active les voies impliquées dans la survie cellulaire comme la voie eNOS et inhibe les voies pro-apoptotiques comme BAD et caspase-9. L'activation d'Akt induit la phosphorylation et l'inhibition du facteur de transcription de type Forkhead (FOXO1: Forkhead box protein O1). FOXO1 stimule l'apoptose des cellules endothéliales et influence l'expression de plusieurs gènes, incluant Ang-2, qui déstabilisent l'endothélium. Cela montre aussi que l'Ang-1 inhibe la production de l'Ang-2 via la voie Akt (134,135).



**Figure 12:** Les voies de signalisation activées par l'Ang-1 via son récepteur Tie-2.

Également, l'activation du récepteur Tie-2 par l'Ang-1 stimule la migration des cellules endothéliales suite à la liaison de plusieurs effecteurs. Des protéines adaptatrices tel que eNOS, PI3K, Dok-related docking protein (DOCK2), NCK2 et p21-activated kinase 2 (PAK2) contribuent à la stimulation de la migration des cellules endothéliales (136-138). Notre laboratoire a identifié la PKC $\zeta$  comme un nouveau partenaire moléculaire en aval de l'Ang-1/Tie-2. En effet, l'Ang-1 induit une migration collective et directionnelle via la formation du complexe PKC $\zeta$  et  $\beta$ -caténine aux jonctions d'ancrage. Ce complexe maintient la cohésion nécessaire pour une migration collective (139).

Le système Ang-1/Tie-2 joue un rôle important dans l'inflammation en recrutant les leucocytes aux sites de l'inflammation. L'activation du Tie-2 agit comme un signal anti-inflammatoire en inhibant la voie de signalisation du facteur nucléaire- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). La voie NF- $\kappa$ B est essentielle pour induire l'expression des gènes inflammatoires et des molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM1) (140,141).

Afin de maintenir un phénotype quiescent pour l'endothélium vasculaire, les cellules endothéliales établissent des jonctions intercellulaires serrées. L'activation du récepteur Tie-2 par l'Ang-1 inhibe directement la perméabilité des cellules endothéliales. Il a été démontré que la protéine à activité tyrosine kinase Src augmente la perméabilité des cellules endothéliales induite par le VEGF en induisant la phosphorylation du VE-cadhérine et son internalisation. Par contre, la protéine mDia (mammalian diaphenous) activée par la stimulation du récepteur Tie-2 permet la séquestration du Src. Par conséquent, l'activation du voie Ang-1/Tie-2 inhibe la perméabilité induite par le VEGF (142). Notre laboratoire a démontré un mécanisme par lequel l'Ang-1 assure la stabilité et l'imperméabilité endothéliale. Nous avons conclu que l'Ang-1, via son récepteur Tie-2, contrecarre les effets de perméabilité cellulaire induit par le

VEGF en inhibant la production de NO par les cellules endothéliales. L'activation de Tie-2 par l'Ang-1 stimule la phosphorylation de eNOS sur la Thr497 via la protéine kinase PKC $\zeta$ . Cette phosphorylation bloque la production de NO, qui est un promoteur de la perméabilité cellulaire (143).

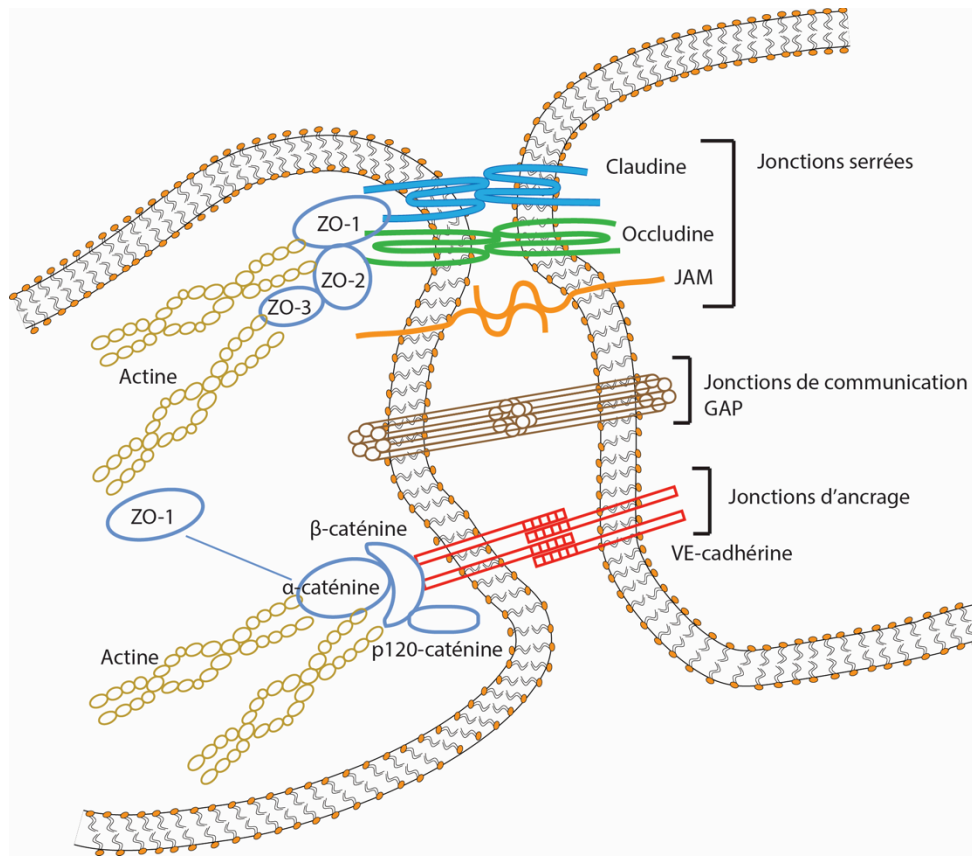
Les études au cours des dernières années détaillées ci-dessus démontrent que les deux facteurs de croissance, VEGF et Ang-1, activent des voies de signalisation similaires afin d'induire la prolifération, la migration et la survie cellulaire. Par contre, l'Ang-1 contrecarre les effets de VEGF au niveau des jonctions cellulaires.



## 1.4. Les jonctions des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont connectées entre elles par des jonctions intercellulaires nécessaires pour maintenir l'intégrité vasculaire. Ces jonctions sont formées de différentes protéines transmembranaires à activité adhésive localisées le long de la zone de contact. Il est important de noter que les jonctions sont très dynamiques afin de permettre la migration des leucocytes à travers la barrière endothéliale lors de la réponse inflammatoire et le remodelage cellulaire durant l'angiogenèse (144-147). Mis à part de leur rôle dans la perméabilité vasculaire, les jonctions intercellulaires peuvent aussi détecter et transmettre des signaux intercellulaires qui permettent l'activation des différentes voies de signalisation. Les jonctions intercellulaires sont impliquées dans diverses fonctions cellulaires tels que la croissance par l'inhibition de contact, l'établissement de la polarité, la migration et la mort cellulaire (145,148). Pour cela, tout changement dans l'organisation des jonctions peut avoir une énorme conséquence sur l'architecture des vaisseaux sanguins.

Il existe trois types de jonctions : les jonctions d'adhérence, les jonctions serrées et les jonctions de communication de type GAP (Figure 1.12).



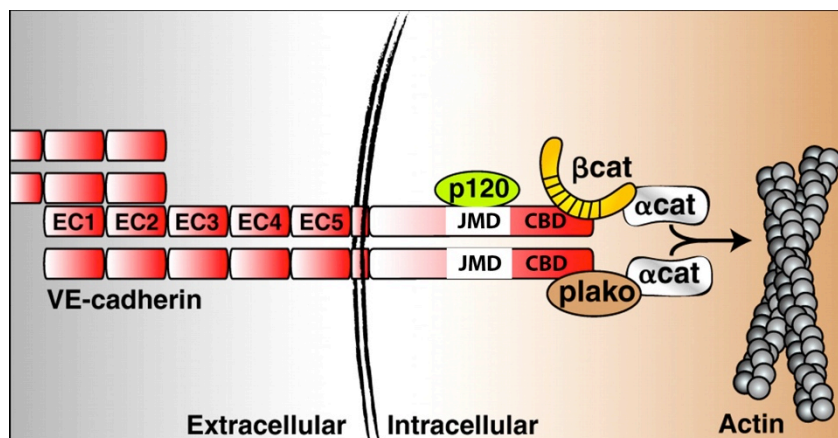
**Figure 1.13:** Schéma illustrant les composants moléculaires des jonctions des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont reliées par trois types de jonctions : les jonctions d'adhérence, les jonctions serrées et les jonctions de communication de type GAP. Pour les jonctions adhérentes, ses composants sont les protéines transmembranaires VE-cadhérine et cytoplasmiques  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ -caténine et la p120-caténine. Ces protéines cytoplasmiques relient les jonctions d'ancrage au cytosquelette via les filaments d'actine. Les jonctions serrées sont formées des protéines transmembranaires occludine, claudine et JAM. Les occludines et les claudines interagissent avec les protéines intercellulaires de la famille zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3). ZO-1 se lie aux cytosquelettes d'actine et fait le pont entre les protéines de jonctions d'ancrage et de jonctions serrées. Les jonctions de communications de type GAP sont des canaux qui forment des communications directes entre les cellules endothéliales.

### **1.4.1. Les jonctions d'ancrage**

Les cellules endothéliales contiennent des jonctions d'ancrage qui permettent l'adhésion entre les cellules adjacentes (adherens junctions). Elles sont caractérisées par la formation des jonctions intercellulaires principalement à travers la protéine transmembranaire VE-cadhérine et par l'association avec ses partenaires de la famille à répétitions armadillo, la p120-caténine, la plakoglobine, la  $\beta$ -caténine et l' $\alpha$ -caténine dans la partie cytoplasmique qui relie les jonctions d'ancrage au cytosquelette via les filaments d'actine. Outre leurs rôles dans le contrôle de l'intégrité et la perméabilité cellulaire, les jonctions d'ancrage participent à plusieurs fonctions biologiques impliquées dans l'adhésion, la survie, la croissance, la polarité et la migration cellulaire.

Structurellement, les jonctions d'ancrage des cellules endothéliales sont formées par des protéines transmembranaires de la famille des VE-cadhérines. Il a été rapporté que les cellules endothéliales ainsi que certaines cellules cancéreuses peuvent aussi imiter les cellules endothéliales en exprimant la VE-cadhérine (149,150). La capacité adhésive de la VE-cadhérine dépend de son domaine extracellulaire qui possède 5 domaines de liaison au calcium (EC1 à EC5) (Figure 1.13). Ces domaines permettent l'interaction avec les VE-cadhérines et participent à des adhésions homotypiques dépendant du calcium.



**Figure 1.14:** Représentation de la structure de la VE-cadhérine et ses interactions intracellulaires.

Les VE-cadhérines comprennent un domaine extracellulaire composé de cinq modules répétés (nommés EC1 à EC5) permettent l'interaction avec d'autres VE-cadhérines. Elles possèdent un domaine transmembranaire et leur partie cytoplasmique présente deux domaines d'interaction conservés. Le domaine près de la membrane (JMD, JuxtaMembrane Domain) assure une interaction avec la p120-caténine. Le domaine de liaison aux caténines (CBD, Catenin- Binding Domain) interagit avec la  $\beta$ -caténine et  $\gamma$ -caténine et par suite avec l' $\alpha$ -caténine (149,150).

La fonction de VE-cadhérine ainsi que son interaction avec ses partenaires est fortement régulée par des facteurs de croissances. Le changement du complexe cadhérine-caténine ainsi que la phosphorylation de VE-cadhérine ont une conséquence majeure sur l'intégrité structurale et du contact cellule-cellule. La stimulation par le Facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) conduit à la phosphorylation des résidus Y658 et Y731 de la VE-cadhérine qui empêche son interaction avec ses partenaires p120-caténine et la  $\beta$ -caténine (151). La mutation d'un des deux résidus tyrosines conduit à une augmentation de la

perméabilité cellulaire ainsi qu'un changement phénotypique mésenchymal des cellules endothéliales. D'autre part, la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF conduit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le résidu Y685 par la kinase Src (152). Cette phosphorylation augmente la perméabilité des cellules endothéliales stimulées par VEGF. De plus, une stimulation au VEGF induit l'activation de la kinase sérine/thréonine PAK2 (PAK2: p21-activated kinase 2) qui phosphoryle la VE-cadhérine sur le résidu S665 afin de réguler l'endocytose de la VE-cadhérine (153). L'endocytose de la VE-cadhérine détruit les jonctions endothéliales et par la suite augmente la perméabilité cellulaire. Plusieurs études ont observé que les vaisseaux présentent des malformations si la VE-cadhérine demeure phosphorylée. Pour cela, la phosphorylation de la VE-cadhérine peut être influencée par des phosphatases comme par exemple la tyrosine phosphatase de l'endothélium vasculaire VE-PTP (VE-PTP : vascular endothelial-phosphatase tyrosine protein) et la phosphatase DEP-1 (Density Enhanced Phosphatase 1) (154,155).

Le domaine cytoplasmique possède une propriété de liaison avec ces partenaires cytoplasmiques  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ -caténine, la plakoglobine et p120-caténine et les filaments d'actine (156,157). Les caténines jouent le rôle d'un pont entre la VE-cadhérine et les filaments d'actine (148).

La  $\beta$ -caténine interagit avec le domaine cytoplasmique du VE-cadhérine et ensuite, le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine recrute l' $\alpha$ -caténine qui à son tour interagit directement avec la F-actine et d'autres protéines associées à l'actine comme la vinculine. Ceci stabilise les jonctions à l'actine et influencent plusieurs fonctions biologiques comme la prolifération, la perméabilité cellulaire, la polarité et la migration (158). La phosphorylation de plusieurs

résidus de la  $\beta$ -caténine régule l'intégrité des complexes des jonctions d'ancrage dans les cellules endothéliales et par conséquent affecte la perméabilité cellulaire. La phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur le résidu Y654 par la kinase Src dissocie l'interaction entre la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine (159). De plus, la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine sur le résidu Y142 induit la dissociation de la  $\beta$ -caténine de son partenaire l' $\alpha$ -caténine (160). La  $\beta$ -caténine s'associe dans le noyau avec le complexe Tcf/Lef (T cell factor/leucocyte enhancing factor) et agit comme un régulateur transcriptionnel de gènes cibles impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire.

La  $\gamma$ -caténine, ou plakoglobine, est un homologue de la  $\beta$ -caténine. De même, elle interagit avec le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine et lie l' $\alpha$ -caténine. Elle lie aussi le facteur Tcf/LEF dans le noyau sur un site différent que celui de la  $\beta$ -caténine et pourrait être un activateur ainsi qu'un inhibiteur de la transcription (161). La plakoglobine est un intermédiaire entre la VE-cadhérine et les desmoplakines qui établissent un lien avec les filaments d'actine comme la vimentine (162).

Initialement, la p120-caténine a été décrite comme un substrat de la tyrosine kinase Src. Plus tard, des études ont démontrés que p120-caténine interagit avec les cadhérines (159,163). Le domaine de régulation de p120-caténine est riche en sites de phosphorylation qui contrôlent étroitement sa fonction (163). La p120-caténine interagit avec la VE-cadhérine via son domaine proche de la membrane (JMD : juxtamembrane domain) et modifie l'expression de la VE-cadhérine, sa localisation et sa stabilité à la membrane plasmique (164-167). En absence de la p120-caténine, la VE-cadhérine est internalisée par des vésicules à clathrine et dégradée par le lysosome ce qui augmente la perméabilité cellulaire (165,166,168). En outre, la p120-caténine peut empêcher la dégradation de la VE-cadhérine

par une ubiquitine ligase, Hakai, en bloquant la phosphorylation des sites tyrosines nécessaire pour la liaison de l'enzyme Hakai (159,169). Par ailleurs, la p120-caténine est aussi impliquée dans la modulation de la transcription via son interaction avec le facteur de transcription Kaiso dans le noyau. La protéine Kaiso bloque la transcription des gènes activés par l'interaction  $\beta$ -caténine/Tcf-LEF. Contrairement au  $\beta$ -caténine, la p120-caténine est un inhibiteur de la transcription dont son rôle est d'inhiber l'activité répressive du facteur de transcription Kaiso (170). Aussi, la p120-caténine affecte l'activité des GTPases (GTP: Guanosine triphosphate) RhoA, Rac1 et Cdc42 impliquées dans l'organisation du cytosquelette (166).

L' $\alpha$ -caténine constitue un lien entre les protéines du complexe des jonctions d'ancrage et l'actine. Elle possède un domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine et des sites de liaison à l'actine. L' $\alpha$ -caténine lie le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/plakoglobine à l'actine via une interaction directe avec l'actine filamenteuse (F-actin) (171,172). L'actine est une composante principale du cytosquelette des cellules endothéliales. L' $\alpha$ -caténine joue un rôle essentiel dans la réorganisation du cytosquelette et dans la maturation des jonctions intercellulaires (173).

Plusieurs études ont montré l'importance des composants des jonctions d'ancrages dans l'angiogenèse. L'inactivation du gène *CDH5* qui code pour la protéine VE-cadhérine dans les cellules souches embryonnaires ne permet pas leur organisation en réseau vasculaire (174). Les embryons déficients en VE-cadhérines meurent à un stade précoce du développement embryonnaire (E9.5) à cause d'une malformation du réseau vasculaire (175). Aussi, la  $\beta$ -caténine et la p120-caténine sont impliquées dans le développement du système vasculaire. Les embryons dépourvus du gène *CTNNB1* qui code pour la protéine  $\beta$ -caténine meurent à un stade embryonnaire précoce (E6.5-E7.5) à cause d'un défaut de la gastrulation

durant le développement embryonnaire (176). L'inactivation conditionnelle du gène *CTNBI* dans les cellules endothéliales est aussi létale, entraînant la mort des embryons de souris à un stade précoce (E11.5-E13.5) à cause d'une malformation du système vasculaire (177). Les cellules endothéliales dépourvues de  $\beta$ -caténine forment des jonctions plus perméables que des cellules normales *in vitro* et *in vivo* (177). De même, les souris dépourvues du gène *CTNNDI* qui code pour la protéine p120-caténine meurent durant la gestation (164,166). La délétion spécifique du gène *CTNNDI* dans les cellules endothéliales engendre une réduction de l'expression du VE-cadhérine et un réseau vasculaire mal organisé. Par conséquent, les embryons des souris meurent au stade embryonnaire E11.5 (178). Ces études montrent que les protéines de jonctions sont essentielles pour le développement vasculaire.

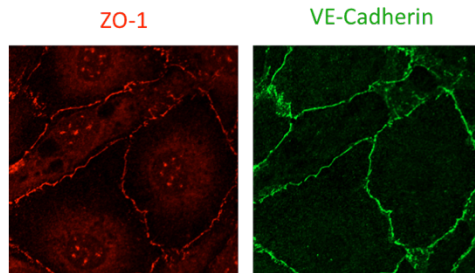
Les cellules endothéliales quiescentes ressemblent à des cellules confluentes en culture. Dans ces conditions, les cellules inhibent leur croissance par les contacts intercellulaires, se protègent contre l'apoptose et contrôlent la perméabilité (148,179). Ce phénomène peut être expliqué en partie par le rôle de la VE-cadhérine à séquestrer la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme. Ceci empêche la  $\beta$ -caténine de jouer son rôle comme un facteur de transcription et augmenter l'expression du gène *CCND1* (qui code pour la protéine Cycline D1) important pour l'entrée dans le cycle cellulaire (148). Par contre, cette interaction n'explique pas comment les cellules non-confluentes prolifèrent malgré l'association de la VE-cadhérine et la  $\beta$ -caténine. D'autres mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire ont été étudiés. Par exemple, la VE-cadhérine interagit avec des phosphatases dont la SHP1, SHP2 et DEP-1 qui jouent un rôle dans l'inhibition de contact et la prolifération cellulaire (148,155).



## 1.4.2. Les jonctions serrées

Dans les cellules endothéliales, les jonctions serrées se trouvent aux niveaux des contacts intercellulaires. Par contre, dans les cellules épithéliales, les jonctions serrées délimitent la membrane apicale du domaine basolatérale. Donc, la distribution des protéines de jonctions serrées dans les cellules épithéliales est distincte à celle de la majorité des cellules endothéliales où les jonctions serrées sont moins structurées et s'intercalent avec les jonctions d'ancrage (147,148). Certains constituants des jonctions, historiquement associés à un type spécifique des jonctions comme la protéine de la famille Zonula Occludens-1 (ZO-1), sont capable d'interagir à la fois avec les jonctions serrées et les jonctions d'ancrage (Figure 1.14). Il existe une grande variabilité dans la composition des jonctions serrées selon l'architecture des vaisseaux sanguins. Leur organisation est moins conservée lorsque le diamètre des vaisseaux sanguins est petit. En outre, les artères qui sont exposées à des niveaux de flux sanguin élevés ont des jonctions serrées bien développées entre les cellules endothéliales. Les jonctions serrées sont moins complexes dans les cellules endothéliales des capillaires. Par contre, la barrière hémato-encéphalique est formée de cellules endothéliales qui sont particulièrement riches en jonctions serrées (146,147).

Les jonctions serrées sont constituées des protéines transmembranaires et intercellulaires dont les claudines, les occludines, les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM) et de protéines de la famille ZO. D'autres protéines cytoplasmiques sont aussi liées aux jonctions serrées comme Par-3, Par-6, Crumbs, Cingulin, etc. Les protéines transmembranaires de jonctions serrées peuvent former des interactions homophiliques entre deux cellules adjacentes. D'autre part, les protéines cytoplasmiques lient les protéines transmembranaires aux filaments d'actine afin de transmettre des signaux intercellulaires.



**Figure 1.15:** La localisation de ZO-1 et VE-cadhérine dans les cellules endothéliales

Un marquage effectué dans notre laboratoire des cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAECs) avec des anticorps spécifiques contre ZO-1 (rouge) et VE-cadhérine (vert). Les deux protéines de jonctions, ZO-1 et VE-cadhérine se localisent au niveau des contacts intercellulaires qui contournent les cellules endothéliales.

L'occludine est une protéine transmembranaire localisée aux jonctions serrées. Celle-ci est composée de 4 domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires qui lui permettent de former des liens homotypiques et contribuer à l'assemblage des jonctions serrées. Les extrémités N-terminale et C-terminale sont localisées dans le cytoplasme. L'occludine est exprimée majoritairement dans les cellules endothéliales du système nerveux central (180). Une diminution de l'expression des occludines a été observée dans plusieurs maladies associées à une altération des jonctions endothéliales de la barrière hémato-encéphalique comme l'accident vasculaire cérébrale et le diabète (180,181).

Les claudines sont les constituants majeurs des jonctions serrées transmembranaires. La famille des claudines comprend plus de 20 membres qui sont répartis dans plusieurs types cellulaires de manière distincte. La protéine claudine-5 est exprimée significativement dans les cellules endothéliales (182). Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique

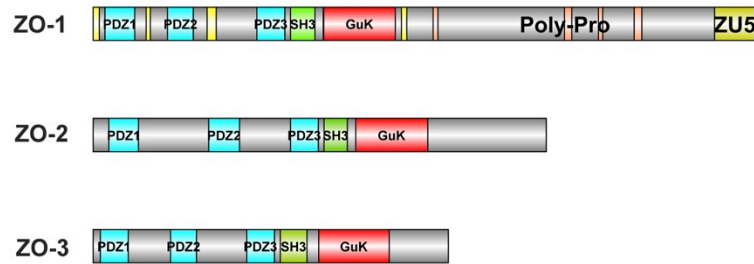
sont plus perméables pour les molécules de petites tailles chez les souris déficientes pour le gène *CLDN5* qui code pour la claudine-5 (183). Les claudines-1, 3, 11 et 12 sont aussi exprimées dans les cellules endothéliales mais plus d'évidences sont nécessaires pour confirmer cette observation (182-185).

Les protéines JAM appartiennent à la superfamille des immunoglobulines qui sont formées d'un domaine intracellulaire court, un domaine transmembranaire et deux longs domaines extracellulaires. Trois protéines de la famille JAM ont été décrites : JAM-1, 2 et 3 (147). JAM-1 est exprimée dans les cellules endothéliales et les cellules épithéliales alors que JAM-2 est exprimée majoritairement par certaines sous-populations des cellules endothéliales comme les veinules endothéliales hautes. Par contre, JAM-3 est exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales (186). Les JAMs possèdent un domaine PDZ (Post-synaptic protein, disc large, ZO-1) au niveau de leur domaine intracellulaire qui permet de recruter et interagir avec des protéines signalétiques comme la protéine kinase-C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ), partitioning-defective protein-6 (Par6), Cdc42 et ZO-1 (187,188).

La famille Zonula occludens est constituée de trois protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Les protéines ZO sont des protéines d'échafaudage qui permettent le recrutement de différentes protéines à la surface cytoplasmique des jonctions intercellulaires. Originellement, les protéines ZO ont été décrites comme étant des protéines qui lient spécifiquement les jonctions serrées (189,190). Par contre, plusieurs études récentes ont montrés que ces protéines s'associent aussi aux jonctions d'ancrage et aux jonctions GAP dans les cellules endothéliales où les jonctions serrées ne sont pas clairement définies (191-193).

Les protéines ZO appartiennent à la famille des guanylates kinases associées à la membrane (MAGUK, Membrane-Associated Guanylate Kinase). Les protéines MAGUK sont spécialisées dans la création et le maintien des complexes moléculaires cytoplasmiques ou membranaires (194). Elles possèdent un à trois domaines PDZ, un domaine SH3 (Src homology-3) et un domaine de type guanylate kinase, le domaine GuK. La présence de nombreux domaines d'interactions protéiques permet aux protéines MAGUK d'interagir avec plusieurs partenaires. Les principaux membres de la famille des protéines MAGUK comprennent la famille des protéines ZO, la protéine post-synaptique PSD-95 (post synaptic density 95 protein) et la famille de la protéine Dlg (discs-large [Drosophila] protein) chez les drosophiles ou la protéine associée au synapse SAP-97 (synapse-associated protein 97) chez les humains (195).

ZO-1, ZO-2 et ZO-3 présentent une homologie de séquence élevée. Les trois protéines ont les domaines nécessaires pour l'organisation structurale des jonctions intercellulaires et d'autres domaines qui permettront la transduction de signaux cellulaires.



**Figure 1.16** : La structure des protéines de la famille des protéines ZO.

Les protéines ZO sont composées de trois domaines PDZ (en bleu), un domaine SH3 (en vert) et un domaine homologue à la guanylate kinase (GuK) (en rouge). L'extrémité C-terminale de ZO-1 est plus longue et possède une région beaucoup plus riche en proline que ZO-2 et ZO-3. La région riche en proline (Poly-Pro) permet l'interaction des protéines ZO avec la cytosquelette. ZO-1 est la seule protéine qui contient un domaine ZU5, qui participe dans la migration cellulaire (196).

Structurellement, les protéines ZO se composent de trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine homologue à la guanylate kinase (GuK) (Figure 1.15) (196). Les domaines PDZ sont caractérisés par la formation des liaisons ou des dimères avec des protéines membranaires et intracellulaires. Ils sont des modules d'interaction multimoléculaires à de différentes localisations cellulaires notamment à la membrane plasmique et la surface cytoplasmique (197). Les protéines contenant des domaines PDZ sont limitées par des domaines cellulaires spécifiques comme les jonctions intercellulaires dans les cellules épithéliales et endothéliales et les jonctions neuro-musculaires (197). Elles sont impliquées dans la signalisation intracellulaire, l'adhésion cellulaire, le transport des ions et la formation des jonctions cellulaires (194,196). Le domaine SH3 est un domaine très commun chez les protéines intracellulaires ou associées à la membrane. Le domaine GuK a une séquence

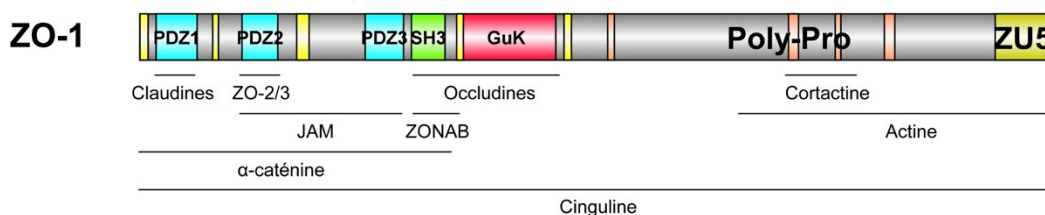
similaire à la kinase guanylate kinase qui permet la conversion du GMP (Guanosine monophosphate) en GDP (Guanosine diphosphate) en utilisant l'ATP comme un donneur de phosphate. Certaines protéines de la famille MAGUK ont des sites de liaison GMP et ATP intacts. Par contre, les protéines ZO ne possèdent pas certains résidus nécessaires à la liaison au GMP. Des études suggèrent que le domaine GuK des protéines MAGUK a perdu son activité enzymatique durant l'évolution (198). En conséquence, le domaine GuK est devenu non-catalytique afin qu'il soit impliqué dans les interactions protéiques. Une région riche en proline est localisée soit dans la partie C-terminale de ZO-1 et ZO-2 ou entre le deuxième et le troisième domaine PDZ de ZO-3. Des domaines variables nommés motifs Unique 1 (U1) jusqu'à U6 sont localisés entre les domaines essentiels des protéines ZO. En plus, les protéines ZO contiennent des signaux de localisation (NLS) et d'exportation (NES) nucléaires, ce qui leur permettent de jouer le rôle d'une navette entre le cytoplasme et le noyau. Il a déjà été démontré que certains de ces motifs jouent un rôle important dans la localisation et l'interaction des protéines ZO à différents composants des jonctions serrées.

#### **1.4.2.1. ZO-1**

ZO-1 est le premier membre de la famille ZO à avoir été identifié en 1986 (190). ZO-1 est une protéine cytoplasmique d'environ 225 kDa principalement enrichie au niveau des jonctions cellulaires des cellules endothéliales et des cellules épithéliales (190,193). ZO-1 possède une région d'épissage alternatif qui génère deux isoformes; ZO-1  $\alpha^+$  et ZO-1  $\alpha^-$ . L'isoforme ZO-1  $\alpha^-$  est composée de 80 acides aminés de moins que la forme ZO-1  $\alpha^+$  (199-201). Les deux isoformes sont exprimées dans les cellules épithéliales. Les cellules

endothéliales expriment les deux isoformes  $\alpha^+$  et  $\alpha^-$  mais ce dernier semble être prédominant dans les cellules où les jonctions sont plus dynamiques (202).

ZO-1 interagit avec la région C-terminale des claudines via le domaine PDZ-1 (203) et les protéines JAM via le domaine PDZ-2/3 (188). De même, ZO-1 associe les occludines à travers les domaines SH3 et GuK (204). ZO-1 forme des hétérodimères avec ZO-2 et ZO-3 à travers le domaine PDZ-2 (205-207). En plus, ZO-1 se lie au cytosquelette d'actine par son extrémité C-terminale riche en proline assurant un pont entre les protéines de jonctions et le cytosquelette (190,204,208). Les motifs U5 (unique-5) et U6 sont essentiels à la localisation de ZO-1 au niveau des jonctions serrées *in vivo* et à son interaction avec les occludines *in vitro*. Les domaines SH3 et GuK de ZO-1 déterminent la position des motifs U5 et U6 et contrôlent l'interaction de ZO-1 avec les occludines et d'autres protéines (209). Le domaine ZU5 sur ZO-1 participe à la formation du complexe ZO-1/MRCK $\beta$  au front migratoire des cellules et contrôle la migration cellulaire (210). En plus d'être associé à des protéines transmembranaires, ZO-1 lie des protéines de jonctions périphériques comme les protéines qui lient l'actine et la myosine, notamment la cortactine, l'afadine, la cinguline et shroom (211-213). Particulièrement, ZO-1 lie l' $\alpha$ -caténine, une composante principale des jonctions d'ancrage (Figure 1.16).



**Figure 1.17:** Les domaines d'interaction et les partenaires de ZO-1.

À part d'être une protéine qui affecte les jonctions cellulaires, ZO-1 peut aussi réguler l'expression des gènes impliqués dans la croissance cellulaire, la prolifération et la différenciation. Dans les cellules épithéliales, ZO-1 se localise en partie dans le noyau des cellules non-confluentes et durant le remodelage des jonctions cellulaires (214). Le niveau d'expression de ZO-1 augmente avec la densité cellulaire et par la suite ZO-1 devient stable sur les jonctions dans des cellules confluentes (215). ZO-1 inhibe la prolifération des cellules épithéliales en interagissant avec le facteur de transcription ZONAB (ZO-1 associated nucleic acid-binding protein) via son domaine SH3. L'interaction de ZO-1/ZONAB régule l'expression du proto-oncogène *Erb-2* d'une manière dépendante à la densité cellulaire (215,216). Des études démontrent aussi que ZO-1 sert à séquestrer ZONAB dans le cytoplasme, inhiber son accumulation dans le noyau et ensuite réduire la prolifération cellulaire et la densité des cellules épithéliales (215,216). Dans le noyau, ZONAB interagit avec la kinase cycline-dépendante 4 (CDK4: cyclin-dependent kinase 4) responsable de la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (216). La translocation nucléaire de ZONAB induit une accumulation nucléaire de CDK4 et éventuellement une augmentation de la prolifération cellulaire. ZONAB n'affecte pas l'activité enzymatique de CDK4 directement mais plutôt l'accumulation nucléaire de CDK4. Donc, la surexpression de ZO-1 dans les cellules épithéliales inhibe ZONAB par la séquestration cytoplasmique et en conséquence diminue l'accumulation nucléaire de CDK4 réduisant ainsi la prolifération cellulaire (216). ZO-1 participe à la différenciation des cellules épithéliales. Par exemple, lorsqu'une forme tronquée de ZO-1, qui ne contient pas un domaine PDZ, est exprimée dans des cellules épithéliales MDCK, ceci induit la dédifférenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses (217).



En sommes, ZO-1 est important pour la prolifération et la différenciation cellulaire, en plus de son rôle essentiel dans l'organisation des jonctions cellulaires. Les fonctions de ZO-1 sont bien établies dans les cellules épithéliales. En revanche, les voies de signalisation qui influencent la fonction de ZO-1 et son implication dans des processus biologiques comme la prolifération et la perméabilité dans les cellules endothéliales demeurent méconnues.

Les deux facteurs de croissance VEGF et Ang-1 jouent un rôle majeur dans le développement du système vasculaire et l'angiogenèse. L'effet de ces facteurs de croissance sur la fonction de ZO-1 dans les cellules endothéliales est très peu étudié. Il a été démontré que VEGF stimule la phosphorylation de ZO-1 sur des sites tyrosines et cela induit une perte de ZO-1 des jonctions dans les cellules endothéliales. Cette diminution en ZO-1 augmente la perméabilité vasculaire (218). Par contre, l'Ang-1 est capable de serrer les jonctions des cellules endothéliales du cerveau en induisant une distribution linéaire de ZO-1 et claudine-1 aux niveau des jonctions intercellulaires (219). D'une manière intéressante, la combinaison de l'Ang-1 et le VEGF augmente la densité vasculaire dans le cerveau des souris. Donc, l'Ang-1 contrecarre l'effet du VEGF sur la permeabilite de la barrière hémato-encéphalique dans le cerveau des souris adultes. L'Ang-1 protège l'expression et la distribution de ZO-1 sur les jonctions intercellulaires et ceci maintien l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (220). Une autre étude a démontré que le VEGF diminue les niveaux d'expressions de ZO-1 en réponse aux produits provenant de la dégradation du glucose (221).

La délétion du gène codant pour ZO-1 est létale. Les souris meurent au stade embryonnaire (E10.5-E11.5) suite à des défauts dans le développement vasculaire et embryonnaire du sac vitellin suggérant un rôle essentiel pour ZO-1 dans l'angiogenèse (222).

L'implication de ZO-1 dans la progression tumorale est très peu connue. Dans plusieurs types de cancers, l'expression de ZO-1 est soit diminuée ou sa localisation est changée. Pour cela, ZO-1 est en général considérée comme un suppresseur des tumeurs (223-225). Il est intéressant de noter que, selon le type de tumeur, les niveaux d'expressions de ZO-1 peuvent varier. Par exemple, les niveaux d'expression de ZO-1 diminuent dans les cellules cancéreuses qui induisent une métastase dans le foie (226,227) ainsi que dans les cancers mammaires (223), colorectaux (227) et les carcinomes gastrointestinaux (228).

Des études ont observé que l'expression de ZO-1 dépourvus de la partie N-terminale qui contient les domaines PDZ mène à une accumulation cytoplasmique de ZO-1 dans des cellules épithéliales suivie par une altération importante des caractères épithéliales (perte de la E-Cadhérine) accompagnée par une induction des gènes mésenchymateuses (229). D'ailleurs, la délocalisation de ZO-1 a été examinée pour démontrer l'implication de la translocation de ZO-1 dans la dissociation des jonctions et l'invasion. Cela a montré que la translocation de ZO-1 est impliquée dans l'induction de l'invasion via l'activation du facteur de croissance EGFR dans les cellules cancéreuses du pancréas (230) et via l'expression des métalloprotéases matricielles-14 (MMP-14) dans les cellules mammaires tumorales (231). Par contre, une augmentation de l'expression de ZO-1 a été observée chez les patients qui souffrent d'un adénocarcinome du pancréas comparé aux patients sains (232). De même, les niveaux d'expression de ZO-1 augmentent dans les mélanomes où ils sont colocalisés avec la N-cadhérine (233). Ces études montrent que ZO-1 joue un rôle pro- ou anti-oncogénique selon le contexte cellulaire.

### 1.4.2.2. ZO-2

ZO-2 est une protéine cytoplasmique de 160 kDa et identifiée comme un partenaire de ZO-1. Structurellement, la séquence de ZO-2 présente une grande homologie avec celle de ZO-1. Sa fonction est redondante avec ZO-1, donc elle peut remplacer ZO-1 dans la formation des jonctions (234). Comme ZO-1, ZO-2 se lie aux claudines et aux occludines et aux  $\alpha$ -caténines. Le domaine PDZ-1 du ZO-2 interagit avec les claudines pour permettre le recrutement de ZO-2 aux jonctions. Le domaine PDZ-2 est responsable de la dimérisation de ZO-2 et de son interaction avec les Cx43. ZO-2 interagit avec p120-catenine, une composante des jonctions d'ancrage (235). La diminution de l'expression de ZO-2 par l'interférence à l'ARN perturbe la fonction des jonctions en affectant la distribution des occludines (236). Les souris dépourvues du gène *ZO-2* sont létales au niveau embryonnaire à cause d'une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose (237).

La localisation cellulaire de ZO-2 dépend des contacts intercellulaires. Dans les cellules non-confluentes, ZO-2 s'accumule dans le noyau. À l'opposé, ZO-2 est retrouvée au niveau des jonctions dans les cellules confluentes (238). Des domaines de localisation et d'exportation nucléaires sont identifiés dans la séquence de ZO-2 (238,239). Dans le noyau, le domaine PDZ-2 de ZO-2 s'associe avec des facteurs de transcription afin de réguler l'expression des gènes responsables de la prolifération et la différenciation. Une interaction directe a été documentée entre ZO-2 et les facteurs de transcription Jun, Fos, C-EBP et SAF-B (239,240). Une surexpression de ZO-2 dans les cellules épithéliales diminue la prolifération en régulant négativement la transcription de la protéine cyclin D1 (241,242). Récemment, il a été découvert que ZO-2 interagit avec la protéine ZASP (ZO-2 Associated Speckle Protein) (243). La surexpression de ZASP bloque l'effet de ZO-2 sur la transcription de cyclin D1 et par la

suite diminue la prolifération. Dans le noyau, ZO-2 peut s'associer via le domaine PDZ-2 à la protéine YAP2 afin de réguler sa localisation et empêcher la prolifération induite par YAP2 (243,244). Donc, une accumulation nucléaire de ZO-2 augmente la prolifération des cellules épithéliales et des cellules endothéliales.

### **1.4.2.3. ZO-3**

ZO-3 est une protéine de 130 kDa qui partage une homologie structurelle avec ZO-1 et qui interagit avec ZO-1 et ZO-2. Contrairement à ZO-1 et ZO-2, qui sont exprimées dans des cellules épithéliales et non-épithéliales, ZO-3 est exprimé spécifiquement dans les cellules épithéliales (245). Structurellement, ZO-3 contient trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GuK. La surexpression de la partie N-terminale de ZO-3 qui possède les trois domaines PDZ retarde la formation des jonctions serrées et des jonctions d'ancrage (246), diminue le nombre des fibres de stress et des focaux d'adhésion et augmente la migration cellulaire (247). La partie C-terminale de ZO-3 peut interagir directement avec p120-catenine.

Les souris dépourvues du gène ZO-3 sont viables et fertiles, suggérant que ZO-3 n'est pas indispensable pour le développement des souris. La structure et la fonction des jonctions serrées ne sont pas affectées dans les cellules cancéreuses dépourvues de ZO-3 mais les niveaux d'expression de ZO-2 augmentent (248). La fonction de ZO-3 est sous-estimée parce que sa fonction peut être remplacée par ZO-1 ou ZO-2.

### 1.4.3. Les jonctions communicantes de type GAP

Comme leur nom l'indique, les jonctions GAP sont des canaux intracellulaires qui forment des communications directes entre deux cellules adjacentes pour permettre la diffusion passive des métabolites, des ions et des petites molécules comme le calcium et l'inositol triphosphate (249). La protéine essentielle qui forme ces jonctions est la connexine (Cx). Six connexines s'assemblent pour former un semi-canal nommé connexon. L'association entre deux connexons de deux cellules adjacentes crée un canal intracellulaire fonctionnel (249,250). Dans le système vasculaire, il existe quatre connexines Cx43, Cx40, Cx37 et Cx45. Les Cx45 sont exprimées uniquement par les cellules musculaires lisses. Les Cx37, Cx40 et Cx43 sont exprimées par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. La Cx40 se localise majoritairement dans les cellules endothéliales, par contre la Cx43 est principalement exprimée dans les cellules musculaires lisses (250). Les souris dépourvues du gène codant pour la Cx45 meurent durant le développement embryonnaire à cause d'un défaut dans l'organisation des vaisseaux sanguins (251). Ce même phénotype est perçu chez les souris dépourvues simultanément des gènes *Cx37* et *Cx40* (252). De plus, les souris dépourvues du gène codant pour la Cx43 présentent une modification au niveau de l'expression des gènes nécessaires pour la vasculogénèse et l'angiogénèse (253). Donc, ces études génétiques montrent un rôle essentiel pour les jonctions communicantes dans la régulation de l'hémostase, la régénération et le développement cellulaire. Les jonctions communicantes interagissent avec les jonctions serrées et les jonctions d'ancrage. Cette interaction déclenche des voies de signalisation qui régulent la perméabilité cellulaire.

Les jonctions intercellulaires endothéliales sont très dynamiques et suite à multiples facteurs externes, les jonctions subissent un remodelage rapide. Afin de permettre aux cellules de s'adapter rapidement aux changements de leur environnement, un contrôle post-transcriptionnel étroit de l'expression des gènes est nécessaire. Dans la prochaine section, je discute le rôle des protéines de liaison à l'ARN dans la modification post-transcriptionnelle de l'ARN en concentrant sur ceux qui régulent les protéines de jonctions.

## **1.5. Les protéines de liaison à l'ARN**

L'acide ribonucléique messager (ARNm) est un intermédiaire entre l'acide désoxyribonucléique (ADN) et les protéines qui sont produites d'un gène encodé par la séquence d'ADN. L'ARNm subit plusieurs étapes de modification, appelées régulation post-transcriptionnelle, importante pour l'expression d'une protéine. L'ARNm devient mature suite à la transcription, l'épissage, l'édition, la polyadénylation à l'extrémité 3' et l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5'. Enfin, l'ARNm mature est localisé au cytoplasme où il est traduit en protéine (254).

Les protéines de liaison à l'ARN (RBPs: RNA binding proteins) jouent un rôle crucial dans le contrôle post-transcriptionnel de l'ARN qui affecte des processus cellulaires importants dans le contrôle étroit de l'expression des gènes. Les protéines de liaison à l'ARN peuvent jouer un rôle sur la stabilité, la fonction, le transport, la traduction et la localisation cellulaire de l'ARNm. Ces protéines sont localisées autant dans le cytoplasme que dans le noyau. En général, la localisation de l'ARNm est contrôlée soit par des éléments régulateurs

en *Cis* retrouvés dans la séquence de l'ARN ou les éléments régulateurs en *trans* tels que les RBPs qui reconnaissent les éléments en *Cis* (255). Le mécanisme de transport des ARNm comprend plusieurs étapes. D'abord, une formation d'un complexe ribonucléoprotéique dans le noyau est nécessaire pour la maturation des transcrits. Ensuite, les ribonucléoprotéines sont remodelées et oligomérisées entre elles dans le cytoplasme. Par la suite, pour certains transcrits, les ribonucléoprotéines sont assemblées dans des granules d'ARN. Finalement, les granules ou les transcrits sont transportés vers la région appropriée (255). En général, les protéines de liaison à l'ARN se lient à des séquences présentes sur l'ARN cible afin de mener à l'assemblage de ribonucléoprotéines et dicter le devenir de l'ARNm. L'association entre les protéines de liaison à l'ARN et les éléments *Cis* est essentielle pour la localisation de l'ARNm jusqu'à sa destination finale. De même, les protéines de liaison à l'ARN forment des interactions protéine-protéine qui sont des facteurs critiques pour déterminer la formation des ribonucléoprotéines (256).

Grâce à l'épissage alternatif, un gène peut générer plusieurs ARNm et par conséquent coder pour de multiples isoformes protéiques (257). Les protéines de liaison à l'ARN participent à l'épissage alternatif en se liant sur les éléments *cis* régulateurs d'un ARNm. La liaison des protéines de liaison à l'ARN à ces séquences régulatrices localisées dans les introns ou les exons permet d'activer ou d'empêcher l'épissage d'un ARNm. La demi-vie des ARNm varie beaucoup dans le cytoplasme. Les protéines de liaison à l'ARN ont des propriétés stabilisatrices ou déstabilisatrices qui permettent à inhiber ou à favoriser la dégradation des ARNm cibles. Certaines protéines de liaison à l'ARN permettent le recrutement des protéines de la machinerie de dégradation qui entraîne la déstabilisation et la dégradation des ARN et

d'autres stabilisent l'ARN en empêchant la fixation d'une protéine déstabilisante. Par exemple, la protéine HuR inhibe la liaison de la protéine AUF1 (AUF1: AU-rich element RNA-binding protein 1), un déstabilisateur de l'ARN, ce qui favorise la traduction de la cycline D1. D'autre part, la diminution de l'expression de HuR permet la liaison entre la protéine AUF1 et la cycline D1 et par conséquent une dégradation de la cycline D1 (258). Dans les cellules endothéliales, la protéine HuR lie et stabilise l'ARN de sirtuin 1 (SIRT1). Ceci mène à l'augmentation de l'expression de la protéine SIRT1 et l'inhibition de la réponse des cellules endothéliales au TNF- $\alpha$  et au glucose (259).

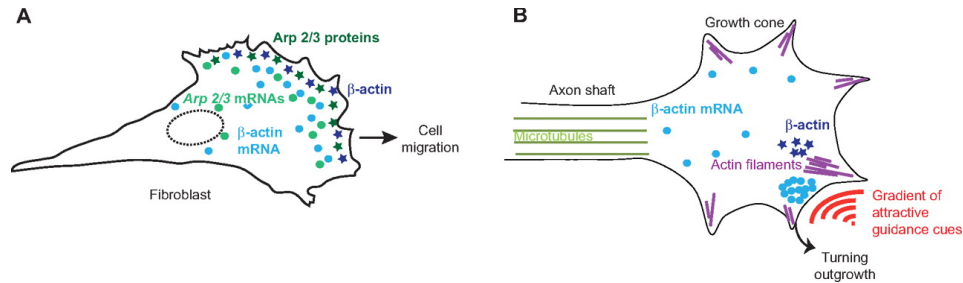
Les protéines de liaison à l'ARN peuvent aussi contrôler positivement ou négativement l'efficacité de la traduction par une interaction directe. Ceci en favorisant ou inhibant la liaison des facteurs d'initiation de la traduction et les ribosomes sur l'ARN (260). Par exemple, la protéine de liaison à l'ARN TIAR (T-Cell-Restricted Intracellular Antigen-1 Related protein) agit comme un suppresseur de la traduction. Dans les cellules épithéliales, la protéine TIAR lie l'ARNm qui code pour la protéine ZO-1 et inhibe la traduction de ZO-1 (261). La protéine HuR influence la traduction des occludines et la fonction de la barrière des cellules épithéliales (262). Aussi, les protéines de liaison à l'ARN HuR et AuF1 ont une affinité de liaison à l'ARNm de ZO-1 mais le rôle de cette interaction demeure méconnu (261).

Dans la plupart des cas, les ARN localisés sont codants et leur localisation permet la synthèse locale des protéines. Plusieurs études ont observé que des machineries spécialisées permettent la localisation de l'ARNm avant la traduction des protéines (263-265). La localisation de l'ARN dans un endroit spécifique est utilisée par différents types de cellules afin de traduire localement des protéines spécifiques. L'avantage de la localisation locale est



de permettre la traduction d'une protéine plus efficacement. Une répartition ordonnée des molécules d'ARNm permet une traduction plus efficace et rapide au lieu de synthèse protéique par rapport à un endroit aléatoire dans la cellule qui compte sur le transport de l'ARN au site de l'action surtout dans des grosses cellules comme par exemple les cellules neuronales et embryonnaires. Cela permet aux cellules d'économiser l'énergie requise pour le transport de chaque protéine vers sa destination. D'autre part, ce processus empêche la localisation aberrante d'une protéine qui peut avoir un effet néfaste et toxique pour la cellule (255,263). De plus, il a été suggéré que la localisation de l'ARNm assure l'efficacité des interactions protéiques et la formation des complexes à un site spécifique (266).

À la lumière de ces avantages, il a été démontré que le mécanisme de la localisation de l'ARN est impliqué dans plusieurs processus biologiques importants comme la polarité cellulaire, la migration et la spécification de l'axe embryonnaire chez divers organismes (267). Chez la levure, l'ARNm *Ash1* est localisé au niveau du bourgeon de la cellule fille qui contrôle le destin de la cellule mère et de la cellule fille (268). Chez la drosophile, la localisation de l'ARN permet d'établir l'axe embryonnaire (269). La localisation de l'ARNm de la  $\beta$ -actine au niveau de lamellipodes dans les fibroblastes permet la traduction locale des transcrits d'actine, ce qui rend la migration plus efficace (270). Ce même mécanisme se produit au niveau des axones dans les neurones (Figure 1.17) (271). La traduction locale de la  $\beta$ -actine est nécessaire pour la formation des jonctions des cellules épithéliales (272).



**Figure 1.18:** Localisation de l'ARNm dans les cellules en migration.

A) Les ARNm de la  $\beta$ -actine ou des sous-unités du complexe Arp2/3 se localisent dans les lamellipodes des fibroblastes en migration. Une synthèse locale des protéines correspondantes contribue à une migration directionnelle. B) L'ARNm de la  $\beta$ -actine est transporté vers la région de l'axone en croissance attirée par un gradient qui induit la migration cellulaire. Une traduction locale du  $\beta$ -actine s'accumule dans cette région et induit une migration directionnelle dans le sens du gradient.

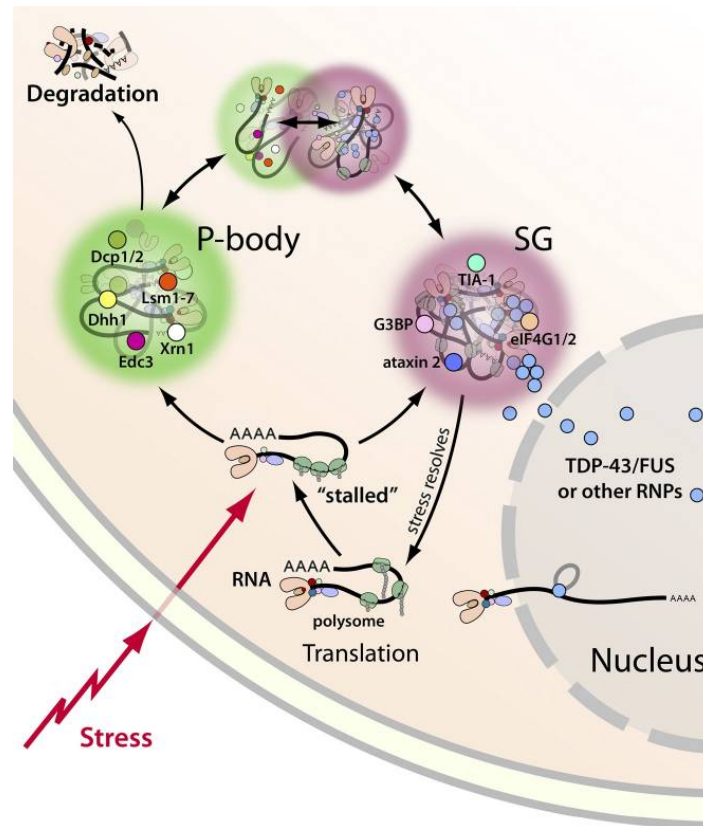
La protéine de liaison à l'ARN Quaking est requise pour l'expression locale de  $\beta$ -caténine et VE-cadhérine afin de maintenir la fonction de la barrière endothéliale (273).

La localisation de l'ARNm *ZO-1* aux jonctions apicales des cellules épithéliales est assurée par la protéine CPEB qui reconnaît les éléments cytoplasmiques de polyadénylation (CPEB: cytoplasmic polyadenylation element binding protein). Cette localisation semble être nécessaire pour la formation des jonctions serrées dans les cellules épithéliales (274).

## 1.6. Les granules de stress

Les cellules sont exposées à des différents types de stress : thermique, osmotique, chimique, exposition à une infection virale, aux agents chimio-thérapeutiques, etc. La réponse cellulaire au stress est observée par la formation des inclusions cytoplasmiques appelées des

granules de stress qui est une étape importante pour la résistance au stress et la survie cellulaire. Les granules de stress ne sont pas délimités par une membrane et renferment des ARNms, des petites sous-unités ribosomales, des facteurs d'initiation de traduction comme les facteurs eIF3, eIF4G, eIF4E et des protéines de liaison à l'ARN comme les protéines TIA-1 et G3BP1 (275-277). Les granules de stress constituent un lieu de stockage transitoire des ARNms où les transcrits subissent un triage soit vers leur dégradation ou soit vers leur traduction en fonction des conditions (373). En général, les granules de stress sont formées afin d'inhiber la traduction et protéger les ARNms de la dégradation engendrée par le stress cellulaire (278). La déplétion des protéines de liaison à l'ARN comme TIA-1 et G3BP1 affecte significativement la formation des granules de stress (373,374,388). La première étape se constitue par la phosphorylation de la protéine eIF2a sur la sérine 51 qui permet l'inhibition de la traduction et la formation des granules de stress (279). Lors de leur formation, les granules de stress vont recruter de nombreuses protéines qui ont pour fonction de séquestrer les ARNms non traduites. Ensuite, les inclusions observées sous formes de granules de stress vont se fusionner en de plus grosses inclusions corrélées à une augmentation de la survie cellulaire (280). Ces structures cytoplasmiques vont se disparaître une fois que le stress s'est résorbé et ceci permet la reprise de la traduction. Les ARNms non traduites peuvent aussi être dirigés vers des « processing bodies » qui sont des inclusions cytoplasmiques pour le stockage et la dégradation des ARNms (281). Les granules de stress et les processing bodies partagent certains composants protéiques et interagissent beaucoup malgré que chacun est formé d'une manière indépendante et différente de l'autre (282).



**Figure 1.19:** Les étapes de formation des granules de stress.

L'exposition au stress cellulaire peut déclencher une réponse cellulaire qui bloque l'initiation de la traduction entraînant la formation de granules de stress. Les granules de stress sont des complexes cytoplasmiques dynamiques qui contiennent des protéines de liaison à l'ARN, des ARNm et des facteurs d'initiation de la traduction. Lorsque l'exposition au stress se termine, les granules de stress se désassemblent et la traduction de l'ARNm reprend. Les ARNm non traduits peuvent également être dirigés vers des granules cytoplasmiques distincts des granules de stress appelés « processing bodies », qui sont des sites de dégradation de la traduction et de la dégradation de l'ARNm. Les deux sont régulés de manière différentielle, mais ils interagissent souvent. Les protéines de liaison à l'ARN dirigent l'ARN dans un des deux compartiments. Par exemple, TDP-43, FUS résident principalement dans le noyau, mais l'exposition au stress peut déclencher leur recrutement vers les granules de stress dans le cytoplasme.

Les protéines de liaison à l'ARN jouent un rôle essentiel à diriger l'ARN dans des granules de stress pour aider à les protéger contre le stress cellulaire. Récemment, deux études ont montrées l'existence d'un réseau ribonucléoprotéique déjà assemblé en absence du stress qui va être rapidement remodelées dans des conditions de stress afin de lier l'ARN et induire la formation des granules de stress (283,284).

## **1.7. L'analyse protéomique par spectrométrie de masse**

La protéomique est l'étude systématique de l'ensemble des protéines nommé « protéome ». En général, la protéomique permet établir l'identité, la quantité, la structure et la fonction biochimique et cellulaire de l'ensemble des protéines constituant un organisme, un tissu, une cellule ou un compartiment cellulaire et de comprendre comment ces propriétés varient dans le temps, l'espace envers un état physiologique (285). Les principaux domaines d'études de la protéomique incluent non seulement l'identification des protéines mais aussi l'élucidation de leur fonction, la localisation, les interactions protéine-protéine ainsi que l'étude des modifications post-traductionnelles. La protéomique est un processus d'analyse très complexe pour plusieurs raisons. Le protéome varie beaucoup en fonction des cellules ou des tissus, du temps et des conditions environnementales. En plus, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la glycosylation, l'acétylation, etc., qui affectent complètement la fonction des protéines (286-288). Finalement, le protéome est très dynamique, en d'autres mots un même gène peut donner plusieurs protéines selon l'état physiologique ou la réponse aux signaux biologiques. La spectrométrie

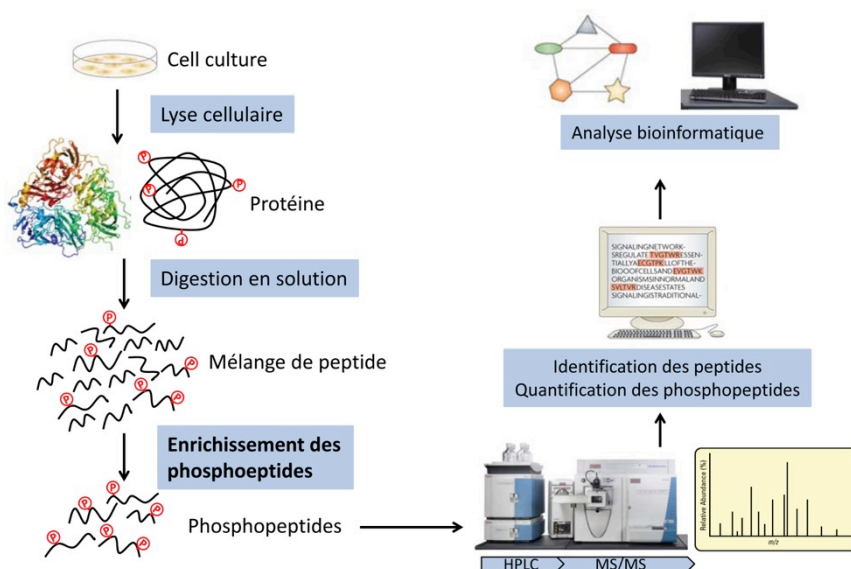
de masse est devenue un outil précieux pour l'identification et la quantification des protéines ainsi que leurs modifications comme la phosphorylation et leurs partenaires à partir d'un échantillon biologique complexe. Par contre, la faible abondance de plusieurs phosphoprotéines ainsi que la nature dynamique et sensible de la phosphorylation augmentent la complexité de la stratégie nécessaire pour étudier la phosphoprotéome par spectrométrie de masse.

Suite à un stimulus, les protéines n'agissent jamais seules mais ils exercent leur fonction dans des réseaux d'interactions protéiques dynamiques et complexes. Ces interactions régulent les processus biologiques de la cellule. Pour cela, l'identification des interactions protéine-protéine permet de mieux comprendre les fonctions des protéines et leur rôle dans les différents processus biologiques. Ainsi, l'identification de l'ensemble des interactions protéine-protéine à grande échelle est appelée interactome. Les techniques de spectrométrie de masse ont été utilisées pour réaliser des cribles à grandes échelles. La purification par affinité à l'analyse par spectrométrie de masse (AP-MS) est une des techniques la plus utilisée pour suivre les changements des interactions protéine-protéine. La purification par affinité suivie d'une analyse par spectrométrie de masse est une méthode qui permet de purifier biochimiquement un complexe protéique des extraits cellulaires. Les anticorps couplés à un support solide sont souvent utilisés pour capter et enrichir spécifiquement à grande échelle une protéine d'intérêt endogène ainsi que des protéines fusionnées à des étiquettes. Le défi de cette technique est la présence de faux positifs causés par les interactions non spécifiques soit avec l'anticorps ou le support solide ainsi que d'autres contaminants qui peuvent être présents dans le lysat. Ceci est diminué avec la réalisation de plusieurs répliques biologiques et l'efficacité de la méthode statistique.

La complexité des réseaux d'interactions dans la cellule rend l'interprétation des processus cellulaires très difficile. Les données d'interactions entre protéines sont disponibles dans des bases de données accessibles au publiques comme la base de données STRING. Ces bases de données donnent des informations automatisées sur les interactions entre les protéines. Les informations sur les interactions protéines-protéines dérivent de sources différentes comme la littérature, les évidences expérimentales et la prospection automatique. Les réseaux d'interaction sont visualisés avec plusieurs outils qui permettent la représentation de réseaux ainsi les analyses nécessaires des réseaux d'interaction protéine-protéine comme les méthodes de classification. Un des outils le plus utilisés est le logiciel Cytoscape. La base de donnée Gene Ontology (GO) possède des termes pour définir une annotation fonctionnelle des gènes conservés entre les différentes espèces (289). Ces outils bioinformatiques facilitent l'interprétation des données à large échelle obtenues et sont utiles pour comprendre et investiguer les voies de signalisation dans un échantillon complexe.

Suite à son important rôle dans la régulation des différents processus cellulaires, il est essentiel de caractériser et d'étudier l'ensemble de phosphoprotéines appelé la phosphoprotéomique. La phosphoprotéomique consiste à caractériser et quantifier globalement les évènements de phosphorylation d'un protéome suite à une stimulation cellulaire. Compte tenu des progrès réalisés dans les méthodes analytiques durant les dernières années et l'intérêt croissant à investiguer en détail et à une grande échelle plusieurs voies de signalisation intracellulaire, la phosphoprotéomique est devenue un domaine d'envergure pour plusieurs équipes. Les études phosphoprotéomiques permettent de quantifier les changements dynamiques de phosphorylation et d'élucider des mécanismes cellulaires impliqués dans diverses voies de signalisation.

En général, les approches protéomiques permettent de mieux comprendre les voies de signalisations impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires dans des échantillons biologiques complexes.



**Figure 1.20:** Schéma global du protocole opératoire de l'analyse phosphoprotéomique utilisé dans le cadre de cette thèse.

La préparation de l'échantillon regroupe la culture cellulaire, l'extraction protéique, la digestion enzymatique et l'enrichissement des peptides en phosphopeptides. La première étape requiert l'isolation des protéines à partir d'un lysat de cellules endothéliales (BAECs). L'étape qui suit la lyse cellulaire est la digestion enzymatique en solution des protéines isolées des cellules. La trypsine est l'enzyme utilisée dans le cadre de ma thèse. La digestion enzymatique génère des phosphopeptides qui sont très peu abondant en présence des peptides non-phosphorylés. Pour cela, il est indispensable d'effectuer une étape d'enrichissement des phosphopeptides. L'enrichissement avec des billes de dioxyde de titane  $TiO_2$  est la méthode utilisée pour mon projet de doctorat. Ensuite, les phosphopeptides purifiés sont séparés par chromatographie liquide et analysés par spectrométrie de masse. Les données enregistrées sont traitées afin d'obtenir les identifications protéiques suite à l'interrogation des bases de données et ensuite la quantification est réalisée. Des logiciels bioinformatiques sont utilisés afin d'interpréter les résultats.



### **1.7.1 Études adaptées d'analyse protéomique des cellules endothéliales**

Des approches de protéomique à grande échelle réalisées dans les cellules endothéliales ont permis de mieux comprendre les mécanismes et les voies de signalisation qui régulent l'angiogenèse. L'amélioration de la technologie de spectrométrie de masse a eu un impact sur les études de protéomique effectuées pour investiguer globalement le comportement des cellules endothéliales suite à de multiples stimuli.

Une première étude protéomique des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVECs) en culture publiée en 2003 a permis l'identification de 53 protéines d'un lysat total séparé sur un gel 2D et analysé par spectrométrie de masse (290). Quelques années plus tard, le même groupe a identifié un nombre plus élevé de protéines. Ils ont trouvé 162 protéines dont 8 protéines qui sont différentiellement modifiées suite à l'induction de l'apoptose par les étoposides (291). La majorité des études dans la littérature comparent le changement protéomique total des cellules endothéliales dans de différentes conditions comme le traitement au thrombine, VEGF, TNF- $\beta$ , interleukine- $\beta$  (IL $\beta$ ), etc. (292-294). Une étude extensive a permis de caractériser la réponse à des cytokines inflammatoires TNF- $\beta$  et IL $\beta$  et d'identifier 5000 protéines dont des centaines sont régulées (295). Plusieurs groupes ont étudié les protéines qui sont différentiellement exprimées ou phosphorylées suite à une stimulation au VEGF dans les HUVECs. Pawlowska et coll. ont trouvé que la modulation des protéines impliquées dans la régulation de la cytosquelette comme la vimentine, la tubuline, l'actine et la myosine expliquent le changement morphologiques des cellules endothéliales durant la migration (296). De plus, Jorge et coll. ont analysé à grande échelle des cellules endothéliales humaines traitées ou non par le VEGF et ils ont identifié 3800 protéines, incluant l'implication

de plusieurs protéines dans la voie de signalisation de VEGF qui étaient auparavant inconnue (297).

Les investigations à grande échelle de la phosphorylation ont permis d'identifier et de caractériser des protéines et des mécanismes inconnus important dans l'angiogenèse. Plusieurs groupes ont étudié les voies de signalisation activées par différents facteurs de croissance en fonction du temps et de sa localisation dans les cellules endothéliales (292,293). Une étude a identifié 1288 sites de phosphorylation par spectrométrie de masse suite à une stimulation à l'angiotensine dans les cellules endothéliales. Cette étude a démontré que l'inhibition de la prolifération et la croissance des tumeurs par l'angiotensine est partiellement due à l'activation et la localisation nucléaire du facteur de transcription FOXO1 (298). De même, il a été identifié 2224 sites de phosphorylations suite à une stimulation des cellules endothéliales par la thrombine en fonction du temps. Cette étude caractérise d'une manière compréhensive les voies de signalisation activées par la thrombine dans les cellules endothéliales (293).

Récemment, Zhuang et coll. ont utilisé une approche protéomique pour analyser les effets d'une stimulation au VEGF sur le changement du phosphoprotéome de HUVEC traitées ou non avec le VEGF. Ils ont observé que la voie de signalisation PI3K-mTORC2 (mTORC2: mammalian target of Rapamycin complex 2) est essentielle pour la survie des cellules endothéliales par l'inhibition de l'activité du facteur de transcription FOXO1 (292). D'autre part, Zibrova et al. ont montré que la phosphorylation de GFAT1 (fructose-6-phosphate amidotransférase 1) par la kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK: AMP-activated protein kinase), promeut l'angiogenèse activée par le VEGF. Ils ont trouvé que la diminution de l'expression de GFAT1 stimule l'angiogenèse et que cibler AMPK pourra

améliorer l'hyperglycémie induite par un dysfonctionnement vasculaire associé à un défaut métabolique (299).

En outre de la stimulation avec un seul facteur, des stimulations par un milieu conditionné, ont été utilisées pour traiter les cellules endothéliales. Par exemple, dans le contexte du cancer, les protéines exprimées différemment dans les cellules endothéliales en réponse à un milieu conditionné des cellules saines ou tumorales ont été utilisées pour mieux comprendre les voies de signalisation spécifique de l'angiogenèse tumorale et identifiées une nouvelle cible thérapeutique (300).

La technologie de spectrométrie de masse est devenue la technique la plus utilisée pour investiguer le système du complexe biologique cellulaire. Durant l'angiogenèse, une pléthore de mécanismes cellulaires et moléculaires très dynamiques et organisés est activée afin de former un nouveau vaisseau sanguin.

## 1.8. Objectifs de la thèse

L'objectif général de ma thèse est d'identifier, en utilisant des approches de protéomique, des mécanismes cellulaires qui participent à des processus biologiques importants dans les cellules endothéliales afin de mieux comprendre le développement vasculaire et l'angiogenèse. Les objectifs spécifiques de chaque partie de ma thèse sont :

1) L'Ang-1 contrecarre les effets du VEGF au niveau des jonctions cellulaires. Pour cela, notre hypothèse est que des constituants des voies de signalisation intercellulaires sont différenciellement phosphorylés par le VEGF et l'Ang-1 dans les cellules endothéliales durant l'angiogenèse. Nos objectifs étaient de :

- Caractériser par phosphoprotéomique les voies de signalisation activées dans les cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF ou à l'Ang-1.
- Comparer les mécanismes cellulaires activés par le VEGF ou l'Ang-1.
- Identifier de nouvelles voies de signalisation qui contribuent à des réponses biologiques spécifiques au VEGF et à l'Ang-1 dans les cellules endothéliales.

2) Dans la première partie de la thèse, nous avons identifiée de nouveaux sites de phosphorylation de ZO-1, pour cette section nos objectifs étaient de :

- Déterminer le rôle de ces nouveaux sites de phosphorylation sur ZO-1 et leur influence sur son activité.

- Déterminer la fonction biologique de la phosphorylation de ces sites sur l'activité de ZO-1 au niveau des jonctions cellulaires et de son influence sur la prolifération des cellules endothéliales.

**3)** Les fonctions cellulaires de ZO-1 sont déterminées par son association à diverses protéines. Pour cela, nous avons émis l'hypothèse que l'identification du réseau d'interaction protéique de ZO-1 nous permettra de mieux comprendre la fonction de ZO-1 dans les cellules endothéliales. Nos objectifs spécifiques étaient de :

- D'identifier par protéomique des protéines qui forment un complexe avec ZO-1 dans les cellules endothéliales.

- Examiner l'influence du traitement VEGF sur l'interactome de ZO-1.

- Déterminer le rôle fonctionnel de nouveaux partenaires de ZO-1.

## **CHAPITRE 2**

### **Comparative phosphoproteomics analysis of VEGF and Angiopoietin-1 signaling reveals ZO-1 as a critical regulator of endothelial cell proliferation**

*(Article publié dans*

*Molecular and Cellular Proteomics. 2016 May;15(5):1511-25.)*

## **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

Les expériences effectuées dans cette étude ont été partagées comme suit :

J'ai réalisé toutes les expériences à l'exception de:

- Les expériences de protéomique ont été faites et analysées par Dr. Denis Faubert et Sylvain Tessier à l'institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).
- Les expériences du RT-PCR ont été réalisées par Ying Zhang.
- Chantal Delisle a maintenu la colonie de souris et a aidé à extraire des rétines de souris.

L'analyse et l'interprétation des résultats et l'écriture du manuscrit ont été faites par moi-même et mon directeur de recherche Dr. Jean-Philippe Gratton.

# **Comparative phosphoproteomics analysis of VEGF and Angiopoietin-1 signaling reveals ZO-1 as a critical regulator of endothelial cell proliferation.**

Rony Chidiac<sup>1,2</sup>, Ying Zhang<sup>1,2</sup>, Sylvain Tessier<sup>3</sup>, Denis Faubert<sup>3</sup>, Chantal Delisle<sup>1</sup>, Jean-Philippe Gratton<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>3</sup>Proteomics discovery platform, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada.

\* Author for correspondence:

Jean-Philippe Gratton  
Department of Pharmacology  
Faculty of Medicine  
Université de Montréal  
P O. Box 6128 Station Centre-Ville  
Montreal, Quebec, H3C 3J7  
CANADA  
Tel: (514) 343-2343  
E-mail: jean-philippe.gratton@umontreal.ca

Running Title: Comparison of VEGF and Angiopoietin-1 signaling



## 2.1. Summary

VEGF and angiopoietin-1 (Ang-1) are essential factors to promote angiogenesis through regulation of a plethora of signaling events in endothelial cells (ECs). Although pathways activated by VEGF and Ang-1 are being established, the unique signaling nodes conferring specific responses to each factor remain poorly defined. Thus, we conducted a large-scale comparative phosphoproteomic analysis of signaling pathways activated by VEGF and Ang-1 in ECs using mass spectrometry. Analysis of VEGF and Ang-1 networks of regulated phosphoproteins revealed that the junctional proteins ZO-1, ZO-2, JUP and p120-catenin are part of a cluster of proteins phosphorylated following VEGF stimulation that are linked to MAPK1 activation. Down-regulation of these junctional proteins led to MAPK1 activation and accordingly, increased proliferation of ECs stimulated specifically by VEGF, but not by Ang-1. We identified ZO-1 as the central regulator of this effect and showed that modulation of cellular ZO-1 levels is necessary for EC proliferation during vascular development of the mouse postnatal retina. In conclusion, we uncovered ZO-1 as part of a signaling node activated by VEGF, but not Ang-1, that specifically modulates EC proliferation during angiogenesis.

## 2.2. Introduction

The concerted action of VEGF and angiopoietin-1 on endothelial cells (ECs) regulates the process of new blood vessel formation, called angiogenesis (301). During vascular development, VEGF and Ang-1 have complementary roles to form mature blood vessels. VEGF plays a key role in vessel sprouting and initiation of new vessels, whereas Ang-1 is required for subsequent vessel maturation (57,130,302). Pathological angiogenesis leads to aberrant blood vessel formation in diseases such as cancer progression and metastasis or in vascular retinopathies (23,303). Targeting intracellular signaling events elicited by VEGF and Ang-1 in ECs therefore holds promise for the treatment of angiogenic diseases (22).

Through activation of their cognate tyrosine kinase receptors, VEGFR2 and Tie2, VEGF and Ang-1 trigger phosphorylation of multiple intracellular effectors to induce proliferation, survival and migration of ECs (304,305). When examined individually, it is appreciated that both receptors activate common signaling pathways in ECs such as ERK/MAPK (306,307), PI3K/Akt (308-310) and p38 MAPK (102,307) to induce angiogenesis. However, VEGF and Ang-1 must signal differently to cell-cell junctions to respectively augment or decrease endothelial permeability to macromolecules (142,143,311,312). This shows that, in order to induce angiogenesis, VEGF and Ang-1 must activate overlapping and diverging signaling pathways in ECs. There are numerous studies on the implication of individual intracellular signaling pathways that are activated by VEGF and Ang-1 to control angiogenesis. However, a global comparison and analysis of signaling pathways activated in ECs by these growth factor is needed to uncover novel interrelations between specific intracellular signaling events that control the angiogenic response.

The endothelial junctions have long been associated with barrier functions, however they also receive and transmit signals that regulate cell communication, differentiation and proliferation (146,222,313,314). Proteins that form endothelial intercellular junctions integrate signaling events that are important for angiogenesis. For instance, genetic deletion of VE-cadherin,  $\beta$ -catenin or ZO-1 in mice leads to embryonic lethality due to vascular defects (174,175,177). In addition, it is well established that signals transmitted from intercellular junctions to the nucleus control contact-mediated inhibition of cell proliferation. In ECs, the adherens junction proteins  $\beta$ -catenin and p120-catenin are known to elicit signaling pathways that induce proliferation when junctions are disrupted (146,315). Both proteins can translocate to the nucleus and act as modulator of gene expression through interaction with the TCF/LEF transcription factors for  $\beta$ -catenin or by relieving the repressor activity of the transcription factor Kaiso for p120-catenin (316,317). The tight junction protein ZO-1 was recently shown in ECs to function as a major cytoskeletal organizer that orchestrates adherens junctions to control barrier function, cell migration and angiogenesis (318). However, the role of ZO-1 in the regulation of EC proliferation is undefined.

Herein, the phosphoproteomes of ECs treated with VEGF or Ang-1 were systematically compared to profile the activation of intracellular signaling pathways. Network analysis of the phosphoproteins regulated by VEGF and Ang-1 uncovered a cluster of cell-cell junction proteins unique to VEGF treatment, which is linked to activation of MAPK1 and promotion of EC proliferation. We demonstrate that ZO-1 is the central regulator of this cluster of cell junction proteins to promote MAPK1 activation. Furthermore, we observed that reduction of the cellular levels of ZO-1 correlates with cell proliferation during retinal vascular development in mice. Collectively, our comparative phosphoproteomic analyses

identified a regulatory signaling node, differentially engaged by VEGF over Ang-1, that controls EC proliferation.

## **2.3. Experimental procedures**

### ***Cell culture and reagents***

Bovine aortic endothelial cells (BAECs), obtained from VEC Technologies (Rensselaer, NY), were cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. BAECs were treated with the recombinant human VEGF-A and recombinant human Ang-1 obtained from R&D System. The primary antibodies used were: Anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (monoclonal antibody [mAb]), p42/44 MAPK (polyclonal antibody [pAb]), phospho-Ser1179-eNOS (pAb), eNOS (mAb), beta-actin (mAb), phospho-Ser252 p120-catenin (pAb) and BrdU (mAb) from Cell Signaling Technology. Anti-p120-catenin (mAb), anti-VE-cadherin (pAb) and anti-ZO-1 (pAb) were from Santa Cruz. Anti-JUP (mAb) and anti-β-catenin (mAb) were from BD Transduction Laboratories. Anti-phospho-Ser268 p120-catenin was from Novus Biologicals. Anti-phospho-histone 3 (mAb) was from Abcam and Rhodamine conjugated Lectin I was from Vector.

### ***Trypsin digestion***

For phosphoproteomics experiments, cells were washed three times with ice-cold PBS and scraped into lysis buffer containing 8 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM ethylenediaminetetraacetic (EDTA), 1 mM ethyleneglycoltetraacetic (EGTA), 10 mM sodium

fluoride (NaF), 1 mM sodium orthovanadate ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 1 mM sodium pyrophosphate ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) and 50 mM NaCl. The lysates were sonicated and cleared by centrifugation at 3,000 g for 10 minutes. Protein concentration was carried out using BCA protein assays.  $\beta$ -casein phosphoprotein (50ng; Sigma) was spiked all samples as an internal standard to normalize for phosphopeptide recovery between conditions. For in-solution digestion, a total 2 mg of protein was reduced at 37°C using dithiothreitol (DTT) for one hour and alkylated by iodoacetamide for 60 minutes at room temperature in the dark. Then, the mixture was digested using trypsin (ratio enzyme/total protein of 1:50) followed by incubation at 37°C overnight. The tryptic digestion was quenched by adding 1% TFA (trifluoroacetic acid).

#### ***Desalting and phosphopeptides enrichment with TiO<sub>2</sub>***

The resultant peptides were desalted using Oasis HLB extraction plate 30  $\mu\text{m}$  (Waters UK). Briefly, the wells were equilibrated with 500  $\mu\text{L}$  of 100% methanol and washed with 500  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{O}$ . Afterward, wells were loaded with the peptide mixture, washed with 500  $\mu\text{L}$  of 5% methanol and eluted with 400  $\mu\text{L}$  of 100% methanol. The recovered peptides were lyophilized and subjected to phosphopeptides enrichment as follow (319-321). Peptides were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of 80% Acetonitrile (ACN) / 3% TFA / 300 mg DHB (dihydroxybenzoic acid).  $\text{TiO}_2$  beads (GL sciences) were resuspended in the same buffer and 20  $\mu\text{L}$  of this slurry was added to each (1:2 peptide to beads ratio). Samples were incubated for 30 minutes on a rotator at room temperature and centrifuged at 5000 g for 1 minute. Phosphopeptides-bound  $\text{TiO}_2$  beads was washed 3 times with 30% ACN, 3% TFA on a StageTip C8 material (ThermoFisher Scientific) and then 3 times with 80% ACN, 0.3% TFA. Phosphopeptides were eluted twice

using a C8 StageTip with 75  $\mu$ L 40% ACN, 15%  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Eluted phosphopeptides samples were vacuum-dried prior to LC-MS/MS analyses.

### ***Liquid chromatography-tandem mass spectrometry***

Phosphopeptides enriched samples were re-solubilized under agitation for 15 minutes in 21  $\mu$ L of 1% ACN / 1% formic acid. The LC column was a PicoFrit fused silica capillary column (17 cm x 75  $\mu$ m i.d; New Objective, Woburn, MA), self-packed with C-18 reverse-phase material (Jupiter 5  $\mu$ m particles, 300 Å pore size; Phenomenex, Torrance, CA) using a high-pressure packing cell. This column was installed on the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) and coupled to the LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a Proxeon nanoelectrospray Flex ion source. The buffers used for chromatography were 0.2% formic acid (buffer A) and 100% ACN / 0.2% formic acid (buffer B). Peptides were loaded on-column at a flow rate of 600 nL/minute and eluted with a 2 slopes gradient at a flow rate of 250 nL/minute. Solvent B first increased from 1 to 40% in 110 minutes and then from 40 to 80% B in 50 minutes.

LC-MS/MS data was acquired using a data-dependent top8 method combined with a  $\text{MS}^3$  scanning upon detection of a neutral loss of phosphoric acid (48.99, 32.66 or 24.5 Th) in  $\text{MS}^2$  scans. The mass resolution for full MS scan was set to 60,000 (at m/z 400) and lock masses were used to improve mass accuracy. Mass over charge ratio range was from 375 to 1800 for MS scanning with a target value of 1,000,000 charges and from  $\sim 1/3$  of parent m/z ratio to 1800 for  $\text{MS}^n$  scanning in the linear ion trap analyzer with a target value of 10,000 charges. The data dependent scan events used a maximum ion fill time of 100 milliseconds and target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 30 seconds after 2 repeat

counts. Nanospray and S-lens voltages were set to 1.5 kV and 50 V, respectively. The normalized collision energy used was of 27 with an activation  $q$  of 0.25 and activation time of 10 milliseconds. Capillary temperature was 250°C.

### ***Experimental Design and Statistical Rationale***

Raw mass spectrometry data were processed using the MaxQuant software (version 1.3.0.5) (322). Database searching was performed using the Andromeda search engine (version 1.3.0.5) integrated into MaxQuant against the bovine NCBI and UniProt database (89,075 entries downloaded on May 2012 and 27,028 entries downloaded on June 2012, respectively) and against the human UniProt database (86,749 entries downloaded on June 2012) (323). Enzyme specificity was set to trypsin and up to two missed cleavages was allowed. Cysteine carbamidomethylation (C) was set as fixed modification and oxidation (M) and phosphorylation (STY) were set as variable modification. The minimum required peptide length was 6 amino acids. Mass tolerances for precursor ions and fragment ions were set to 20 ppm and 0.5 Da, respectively. The “matching between runs” algorithm in MaxQuant was enabled with a time window of 3 min to transfer identifications between adjacent replicates. The false discovery rate (FDR) was estimated by searching against the databases with the reversed sequences. For protein and peptide identification, the maximum FDR was set to 1%. For each peptide, the modification sites and the localization probabilities were assigned and calculated by MaxQuant. Phosphorylation events with a localization probability above 0.75 were considered localized on the respective S/T/Y residue. Three biological replicates of non-treated, VEGF or Ang-1 treated cells were performed. In addition, one technical replicate for non-treated and Ang-1 and two technical replicates for VEGF treated cells were performed to

validate reproducibility of the MS analysis. Correlations between the technical replicates are shown in Supplemental Fig. S1A. Moreover, a phosphopeptide had to be identified in at least two biological replicates per conditions in order to be considered for further statistical analyses. The technical replicates for each condition were averaged and used for phosphopeptide quantification. First, in order to determine phosphopeptides that were statistically significant following VEGF or Ang-1 treatment, we performed an analysis of variance where the intensities of each treatment were compared to non-treated. Phosphopeptides with a p-value below 0.05 were retained. Secondly, to identify the regulated phosphopeptides, the ratio of the intensities from VEGF or Ang-1 treatments to non-treated was calculated for each experiment to determine the fold-changes. The fold-changes of all phosphopeptides from the three biological replicates were log<sub>2</sub> transformed and then averaged. Finally, the average log<sub>2</sub> fold-change of each phosphopeptide was normalized using a  $\beta$ -casein phosphopeptide (FQpSEEQQQTEDELQDK) that was added to all samples as an internal standard to correct for phosphopeptide recovery between the different LC-MS/MS runs (correction factor VEGF: 0.11; Ang-1: -0.15; See Table S1). A cut-off of > 1.4 fold-increase (log<sub>2</sub> fold-change > 0.5) and < 0.7 fold-decrease (log<sub>2</sub> fold-change < -0.5) was applied to define regulated phosphopeptides. The MS proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) (324) via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD002456. MaxQuant viewer version 1.3.0.5 was used to view the annotated spectra.



### ***Bioinformatic analysis***

Gene ontology annotations for biological processes were obtained from the Gene Ontology integrated in STRING database (version 9.1) (325). Data was visualized using Perseus 1.3.0.4. Ingenuity pathway analysis (IPA) was used to identify pathways that were significantly enriched. Only terms or pathways that were significantly enriched with a *P*-value of less than 0.05 were used in the analysis. To generate protein interactions network, STRING interactions database was used. The published or informatic-predicted interactions were first determined using standard STRING-defined confidence (medium confidence 0.4). The obtained STRING network data were imported into the Cytoscape software (version 3.0.1) (<http://www.cytoscape.org>) (326). For clustering analysis, MCODE plugin in Cytoscape was used to identify functional protein clusters within the networks. Cluster enrichment was manually annotated based on the GO biological process enrichment.

### ***Plasmids and transfections***

p120-catenin, ZO-1, ZO-2, JUP, VE-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin small interfering RNA (siRNA) as well as nonsilencing control siRNA were obtained from IDT technology. si-CT AUGAACGUGAAUUGCUCUCAAUU, si-VE-cadherin ACAAAGAACUGGACAGAGAUU, si-p120-catenin-(1) CAAGAAAGGCAAAGGGAAAUU, si-p120-catenin-(2) GGACAGAAAGAUUCGGAUAAUU, si- $\beta$ -catenin AAGUAGCUGAUAAUUGAUGGACUU, si- $\alpha$ -catenin GGGCAAUGCUGGACGUAAAUU, si-ZO-1-(1) GCAGAGAGGAAGAGAGAAUUU, si-ZO-1-(2) CAGCAAAGGUGUACAGGAAUU, si-ZO-2 GGUUAAAUACCGUGAGACAUU, si-JUP GCAACAACAGCAAGAACAAUU. Human ZO-1 tagged myc was obtained from Addgene. Murine p120-catenin was a generous

gift from Dr. Albert Reynolds (Vanderbilt University Medical Center). p120-catenin was inserted in a pCMV-myc tag. BAECs were transfected with plasmids or siRNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

### ***Immunoblotting***

For immunoblotting, cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% deoxycholic acid, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM sodium  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  and 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Lysate were incubated for 30 minutes at 4°C, centrifuged at 14000 *g* for 10 minutes, boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham), and western blotted. Antibody detection was performed by a LI-COR Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using Alexa-680 and Alex-800-labeled secondary antibodies (Invitrogen) or by a chemiluminescence-based detection system (ECL; GE healthcare). The quantifications of band intensities presented are means of at least three independent experiments.

### ***RNA extraction and quantitative (q)RT-PCR***

Total RNA was extracted with an RNeasy Mini kit (Qiagen), and reversed-transcribed into complementary DNA by using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed with the SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) and conducted in triplicate for each sample with RNA preparations from at least 2 independent experiments. Gene expression levels were analyzed on an Eco™ Real-Time PCR System (Illumina) and normalized based on  $\beta$ -actin mRNA expression.

Bovine cyclin D1 forward primer is TTACTGACAACCTCCATCCG and its reverse primer is CATCTTGGAGAGGAAGTGCTC. Bovine  $\beta$ -actin forward primer is GACAGGATGCAGAAAGAGATCA and its reverse primer is AATCCACACGGAGTACTTGC.

### ***Immunofluorescence***

BAECs were transfected and then cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips. Cells were washed with cold PBS and fixed for 20 minutes in Methanol:Acetone (1:1) at -20°C. Fixed cells were rinsed with PBS and blocked with 1% BSA for 1 hour at room temperature. After blocking, cells were incubated with primary antibodies overnight in 0.1% BSA in PBS. Bound primary antibodies were visualized after 1 hour of incubation using Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-goat, Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-mouse, Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse. Coverslips were mounted using Fluoromount (Sigma-Aldrich) and observed using an Olympus FV-300 confocal laser-scanning microscope. Samples were viewed with a  $\times 60/1.5$  zoom oil objective. Images were assembled via ImageJ and Photoshop CS4 (Adobe Systems).

### ***BrdU immunostaining***

For basal proliferation, BAECs were transfected and then cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips for 24 hours in 10% FBS. For VEGF or Ang-1 treatment, cells were cultured and treated in 1% FBS overnight. Cells were incubated with 0.03 mg/ml BrdU at 37°C for 30 minutes and then fixed with 70% ethanol for 5 minutes. Cells were rinsed with PBS and denatured with 1.5 M HCl for 30 minutes at room temperature. After incubation with 1% BSA

to block non-specific staining for 60 minutes, they were incubated with BrdU antibody overnight at 4°C. After three washes with PBS, cells were incubated with Alexa-Fluor 568-labeled goat anti-mouse for one hour. DAPI was used to stain the nuclei.

### ***Flow cytometry***

BAECs were treated with 0.03 mg/ml BrdU at 37°C for 30 minutes. Cells were then fixed with 70% ethanol for one hour at 4°C. After fixation, cells were denatured and permeabilized with 1.5M HCl and 0.03% Triton X-100 for 30 minutes, washed with PBS and incubated with BrdU (dilution 1:50) and ZO-1 (dilution 1:50) antibodies for 2 hours at room temperature. After one wash with PBS, cells were incubated with Alexa-Fluor 647-labeled goat anti-mouse and Alexa-Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit for 45 minutes. Stained cells were processed by flow cytometry FACSCanto II (BD biosciences), and the results were analyzed using FlowJo ([www.flowjo.com](http://www.flowjo.com)).

### ***Retina immunostaining***

Dissection and whole mount staining of post-natal retinas at the stage P5 were performed as described previously (327). Retinas were fixed for 2 hours on ice in 4% paraformaldehyde. Dissected retinas were blocked overnight in 1% BSA, 0.3% Triton X-100 in PBS. For lectin I staining, retinas were equilibrated with Pblec buffer containing 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 in PBS (pH 6.8) and then stained with Rhodamine conjugated Lectin-I (dilution 1:100) overnight at 4°C. For ZO-1 and phospho-histone 3 (pH3) staining, retinas were incubated with rabbit ZO-1 (Life Technologies, dilution 1:100) and mouse pH3 (Abcam, dilution 1:100) in blocking buffer overnight at 4°C. After primary incubation, retinas were

labeled with Alexa-Fluor 488-labeled goat anti-rabbit, Alexa-Fluor 647-labeled goat anti-mouse for 2 hours at room temperature. Stained retinas were flat-mounted using Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences). Z-stack confocal imaging was performed on Zeiss LSM700 confocal laser-scanning microscope using a 63X objective and a 2.5X digital zoom. All quantifications were performed on z-stack confocal images. Images were analyzed using Fiji software.

### ***Statistical analyses***

Data are represented as the means  $\pm$  SEM. Two-tailed independent Student's tests were used when comparing two groups. Comparisons between multiple groups were made using one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferoni's multiple comparisons test among groups. *P*-value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## 2.4. Results

### 2.4.1. Phosphoproteome profiling of VEGF or Ang-1 stimulated endothelial cells

To analyze in a comprehensive manner the phosphorylation events regulated by VEGF and Ang-1, we performed a phosphoproteomic profiling of bovine aortic endothelial cells (BAECs) stimulated with VEGF or Ang-1. Because VEGF and Ang-1 activate numerous signaling pathways implicated in cell survival, proliferation and migration through the phosphorylation of MAPK, Akt and eNOS, we first established that 10 minutes of stimulation was the optimal time point of these signaling intermediates in BAECs (Figure 2.1A).

To profile the phosphoproteomes of BAECs treated with VEGF or Ang-1, we used a label-free approach based on the comparison of phosphopeptide intensities between control and treated cells together with statistical analysis of replicates. First, whole BAEC lysates were enriched for phosphopeptides with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) followed by LC-MS/MS analysis using an LTQ Orbitrap mass spectrometer. In total, three biological replicates of non-treated, VEGF or Ang-1 treated cells and one technical replicate of Ang-1 and two technical replicates of VEGF treated cells were performed. All replicates were combined for statistical analysis. We identified a total of 2426 unique phosphopeptides corresponding to 1001 individual proteins (false discovery rate (FDR)  $\leq$  1%) (Supplemental Table S2.1). Phosphopeptides enrichment by TiO<sub>2</sub> was 64.3% (3772 total peptides). To evaluate the reproducibility of our label-free approach, linear correlations of raw data for any two replicates were performed. Correlation coefficients of biological and technical replicates were between 0.64 and 0.96 (Supplemental Fig. S2.1A,B). Analysis of the overall distribution of identified phosphorylation sites revealed

that most phosphopeptides were singly phosphorylated (67.1%), while the others had either double (24.8%) or multiple (8.1%) phosphorylation sites. In addition, 87.9% of the phosphorylated sites identified were on serine, 10.2% on threonine and 1.8% on tyrosine (Supplemental Fig. S2.2A,B). As expected, we identified less tyrosine phosphorylated than serine or threonine phosphorylated peptides due to the low affinity of  $\text{TiO}_2$  for phosphotyrosine residues and the lower numbers of tyrosine phosphorylation events in cells (328,329).

To identify phosphopeptides that were up- or down-regulated in response to VEGF or Ang-1 stimulation of BAECs, the average intensities of the replicates was calculated and the treated/non-treated ratio for each phosphopeptide was determined. The distribution of the log<sub>2</sub> ratio for all phosphopeptides following normalization for the  $\beta$ -casein phosphopeptide standard (see Methods) shows a median distribution of 0.40 and 0.65 for VEGF and Ang-1 phosphopeptides, respectively (Supplemental Fig. S2.2C). Distribution of the significantly modulated phosphopeptides ( $P$ -value < 0.05) shows that more than 95% were above a log<sub>2</sub> fold-change of  $\pm 0.5$  (Supplemental Fig. S2.2D). Thus, a cut-off of > 1.4 fold-increase (log<sub>2</sub> fold-change > 0.5) and < 0.7 fold-decrease (log<sub>2</sub> fold-change < 0.5) was applied. All significant phosphopeptides were identified in at least two biological replicates. The correlation coefficients between the log<sub>2</sub> fold-changes of the VEGF and Ang-1 treatment conditions were determined for all quantified phosphopeptides (Supplemental Fig. S2.3A,B) and for significantly regulated phosphopeptides (Supplemental Fig. S2.3C,D). As anticipated, the correlation coefficients were markedly improved when applied only to phosphopeptides that were significantly regulated by VEGF or Ang-1 treatments. The correlation coefficients of significantly regulated phosphopeptides for the biological replicates of the VEGF treatment

were 0.61, 0.62 and 0.66 and were 0.66, 0.71 and 0.75 for the Ang-1 condition (Supplemental Fig. S2.3C,D). Thus, a total of 427 phosphopeptides were significantly modulated upon VEGF and Ang-1 stimulation (Figure 2.1B, Supplemental Figure S2.2D). In VEGF-treated cells, 255 phosphopeptides were found up-regulated and 9 were down-regulated whereas in Ang-1-treated cells, 248 phosphopeptides were up-regulated and 11 were down-regulated (Figure 2.1B). In sum, our analyses identified 168 phosphopeptides, corresponding to 147 phosphoproteins, regulated solely by VEGF; 163 phosphopeptides, corresponding to 140 phosphoproteins, regulated solely by Ang-1, and 96 phosphopeptides, corresponding to 80 phosphoproteins, regulated by both VEGF and Ang-1 (Figure 2.1C).

To validate our mass spectrometry analyses, we confirmed that peptides corresponding to the well-established phosphorylation sites Thr145 and Tyr147 of bovine MAPK1 (Thr185 and Tyr187 in human MAPK1) shown in immunoblots of Figure 1A were present in VEGF and Ang-1 samples. Indeed, we found a peptide with both residues phosphorylated that was increased by an average of 4.9 and 7.5 folds in VEGF and Ang-1 samples, respectively (Supplemental Table S2.1 and Fig. 2.2C). In addition, to confirm the accuracy of peptide identification by MaxQuant, we manually searched the MS/MS spectra corresponding to peptides of phosphorylated Ser252 and Ser268 of the cell junction protein p120-catenin (CTNND1) (Figure 2.1D,E). In order to quantify the phosphopeptide abundance in VEGF or Ang-1 treatment, we used the intensities of the different replicates calculated by MaxQuant to determine the average log<sub>2</sub> fold-change of each treatment. As shown in Figure 1F and 1G, the phosphorylated peptides pSer252 and pSer268 of p120-catenin were identified in at least three out of four replicates and were increased in BAECs treated with VEGF and Ang-1. These significant increases in phosphopeptide intensities compared to control cells were confirmed



by western blots using commercially available phosphorylation site-specific antibodies against pSer252 and pSer268 of p120-catenin. Consistent with the quantification by MS, the phosphorylation levels of Ser252 and Ser268 of p120-catenin were increased in BAECs treated with VEGF and Ang-1 at 10 minutes of stimulation (Figure 2.1H).

#### **2.4.2. Comparative analysis of VEGF and Ang-1 phosphoproteomes**

To determine the biological processes and signaling pathways that emerged as being enriched in VEGF or Ang-1-regulated phosphoproteomes, we performed Gene Ontology analyses of phosphoproteins identified against the entire human database and biological processes annotations with a *P*-value less than 0.05 were retained (hypergeometric test) (Supplemental Table S2.2). Hierarchical clustering of biological processes resulted into three groups (Figure 2.2A). The first cluster (green), comprised of biological processes enriched only in VEGF-treated cells, includes processes such as signal transduction (GO:0007165), translation (GO:0006412) and cell morphogenesis (GO:0000902). The second cluster (blue) encloses mainly biological processes weakly enriched in VEGF and Ang-1 treatments such as cellular component assembly (GO:0022607) and cell proliferation (GO:0008283). Finally, the third and fourth cluster (purple and orange) corresponds to high enrichments in both VEGF and Ang-1 conditions and includes biological processes associated with cell cycle (GO:0007049), transport (GO:0006810), mRNA processing (GO:0006397), cell differentiation (GO:0030154), membrane organization (GO:0061024), and notably cell junction organization (GO:0034330) and cytoskeleton organization (GO:0007010) (Figure 2.2A). To characterize the signaling pathways modulated by VEGF and Ang-1, a pathway enrichment analysis was conducted using Ingenuity Pathway Analysis (IPA). The top

significantly enriched pathways modulated by VEGF and Ang-1 were determined (Figure 2.2B, Supplemental Table S2.2). Signaling pathways such as ERK/MAPK, mTOR and PDGF signaling were mostly enriched in the VEGF condition. However, Cdc42 signaling, Rac signaling, actin cytoskeleton and cell-cell junction signaling pathways were among the most enriched in both VEGF and Ang-1 conditions. This is consistent with the known modulatory roles of VEGF and Ang-1 on EC junctions. Moreover, several phosphorylation sites on proteins involved in the regulation of cell-cell junctions that are regulated by VEGF or Ang-1 were identified (Figure 2.2C). For example, pSer252 and pSer268 on p120-catenin (CTNND1), and pThr145 and pSer147 on MAPK1 were phosphorylated under VEGF and Ang-1 conditions. In contrast, pSer453 on catenin-alpha 1 (CTNNA1) and pSer346 on Vinculin (VCL) were phosphorylated only by Ang-1. pSer305/307/309 on tight junction protein 2 (ZO-2) and pSer665 on junction plakoglobin were phosphorylated only with VEGF treatment. Finally, pSer586 on tight junction protein 1 (ZO-1) was phosphorylated only with VEGF while pSer881 and pSer895 were only found in Ang-1 samples. The function of many of these phosphorylation sites remains unknown ([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)) (330).

### **2.4.3. Potential link between MAPK-induced proliferation and endothelial junctions**

Based on our phosphoproteomic data, we generated a protein interaction network of phosphoproteins that are significantly regulated by VEGF or Ang-1 using the STRING database and assembled by Cytoscape. A network of 110 interacting nodes and 189 connecting edges for VEGF-regulated proteins was determined (Figure 2.3A). The Ang-1 interaction network showed 120 nodes and 201 edges (Figure 2.3B). The proteins were grouped based on

their biological functions using GO annotations and the Uniprot database. These interaction network highlighted subsets of proteins associated with cell junction organization, cell motility, cell proliferation, cytoskeleton organization, cell cycle, translation, transcription, RNA splicing and transport. Based on these networks, we performed a protein interaction clustering using MCODE in order to regroup highly interconnected proteins based on known protein-protein interactions (325,331). The parameters used in MCODE to identify a cluster based on connectivity are shown in Supplemental Table S3. We identified three sub-networks in VEGF-treated cells (Figure 2.3C) and six sub-networks in Ang-1-treated cells (Figure 2.3D). The STRING database provides a protein-protein interaction network in which each edge represents a known link between two proteins based on the literature. Therefore, proteins of similar functions tend to be regrouped within a cluster. For example, the blue cluster (Figure 2.3C) contains a group of proteins all involved in translational initiation and the yellow cluster encloses proteins all involved in RNA splicing (Figure 2.3D). In contrast, the green clusters link together phosphoproteins of various functions such as RNA splicing, regulation of signal transduction, activation of MAPK and cell-cell junction organization (Figure 2.3C,D).

Ang-1 and VEGF act in opposite manner on EC junctions and since our phosphoproteomic analysis yielded a high enrichment of proteins involved in the regulation of junctions, we focused on clusters in which junctional phosphoproteins were identified. In VEGF-treated cells, ZO-1, ZO-2, JUP and p120-catenin were found in the same cluster (green cluster) as MAPK1 (Figure 2.3C). In Ang-1-treated cells, p120-catenin and  $\alpha$ -catenin formed a cluster with vinculin, zyxin and filamin A. Moreover, ZO-1 clustered separately with cytoskeleton organization proteins such as proteins paxillin, vimentin and drebrin 1.

Remarkably in the Ang-1 interaction network, none of the junctional phosphoproteins identified clustered with MAPK1 (Figure 2.3D). Notably, the peptides identified for MAPK1 were phosphorylated on Thr145 and Tyr147, well-known indicators of MAPK activation and cell proliferation (Figure 2.1A). This suggests that in order to induce MAPK1 activation, VEGF signaling may be more reliant on junctional proteins than Ang-1-induced activation of MAPK1. Thus, these findings revealed a potential link between MAPK-induced proliferation and p120-catenin, JUP, ZO-1 and ZO-2 junctional proteins specifically in VEGF-stimulated ECs (Figure 2.3C).

#### **2.4.4. Down-regulation of p120-catenin, ZO-1, ZO-2 and JUP induces proliferation of endothelial cells**

Since the formation cell-cell contacts between ECs is involved in the inhibition of proliferative signals, we investigated further the potential link that we uncovered between proteins involved in the regulation of endothelial junctions and MAPK-induced proliferation. To explore this in more details, we used siRNAs to down-regulate p120-catenin, ZO-1, ZO-2 and JUP in BAECs and monitored cell proliferation by measuring BrdU labeling (Figure 2.4A). Interestingly, we found that down-regulation of p120-catenin, ZO-1, ZO-2 and JUP significantly increased BrdU incorporation by ~20, 17, 13 and 12%, respectively (Figure 2.4A). These results were confirmed by the use of a second siRNA against p120-catenin and ZO-1 that showed similar results (Supplemental Figure S2.4A). The knockdown efficiency of all siRNAs was confirmed by western blotting (Supplemental Fig. S2.4A,B). Similarly, we observed increased Cyclin D1 mRNA levels in ZO-1 down-regulated cells confirming cell cycle progression and proliferation (Supplemental Fig. S2.4C). To determine if this increase in

cell proliferation was specific to junction phosphoproteins identified in our cluster analyses, we down-regulated other components of adherens junctions. Down-regulation of VE-cadherin,  $\beta$ -catenin or  $\alpha$ -catenin did not increase proliferation of ECs (Figure 2.4A). In the network analysis, MAPK1 clustered with junction phosphoproteins only for the VEGF-stimulated condition although Ang-1-stimulation can also promote MAPK activation and EC proliferation (Figure 2.3C,D). The effect of down-regulation of p120-catenin and ZO-1 on VEGF and Ang-1-stimulated proliferation of BAECs was compared. Down-regulation of p120-catenin and of ZO-1 increased basal cell proliferation that was increased further in VEGF-stimulated cells. In contrast, Ang-1 stimulation did not stimulate further proliferation in cells where p120-catenin or ZO-1 is down-regulated (Figure 2.4B). However, down-regulation of VE-cadherin or  $\beta$ -catenin did not affect proliferation induced by VEGF or Ang-1 treatment (Supplemental Fig. S2.4D). To confirm the link between MAPK1 activation and cell junction proteins, we monitored MAPK phosphorylation (P-p42/44 MAPK) in p120-catenin or ZO-1 down-regulated BAECs. In agreement with the proliferation results, VEGF-stimulated phosphorylation of MAPK was increased significantly in p120-catenin and ZO-1 down-regulated cells (Figure 2.4C,D). Our results indicate that cellular levels of p120-catenin, ZO-1, ZO-2 and JUP influence MAPK-mediated proliferation of ECs.

#### **2.4.5. ZO-1 is central in the modulation of endothelial cell proliferation**

While investigating the relationship between junctional proteins within the VEGF network cluster, we observed that transfection of BAECs with siRNAs against p120-catenin or JUP also reduced ZO-1 protein levels (Figure 2.5A,B). However, siRNA against ZO-1 did not decrease the protein levels of p120-catenin, JUP or VE-cadherin (Figure 2.5C). Moreover, the

localization of p120-catenin, JUP or VE-cadherin at the cell membrane was not affected in BAECs transfected with ZO-1 siRNA (Supplemental Fig. S2.5A,B,C). Thus, these results indicate that to induce EC proliferation, down-regulation of a cell junction protein must consequently provoke a reduction of the cellular levels of ZO-1. Furthermore, expression of myc-tagged human ZO-1 reduced proliferation of BAECs transfected with siRNA against bovine ZO-1. Similarly, proliferation induced by transfection of p120-catenin siRNA is reduced when myc-tagged p120-catenin is expressed (Figure 2.5D). However, expression of myc-tagged ZO-1 in p120-catenin down-regulated cells did block proliferation induced by p120-catenin siRNA. In contrast, expression of myc-tagged p120-catenin did not significantly affect proliferation induced by ZO-1 siRNA (Figure 2.5D). Interestingly, down-regulation of the adherens junction proteins VE-cadherin and  $\beta$ -catenin, which are not part of the ZO-1/MAPK1 cluster, did not induce cell proliferation and did not affect ZO-1 levels or its localization at cell-cell junctions (Figure 2.5E,F,G). Thus, we identified ZO-1 as the central regulator of this cluster of junctional proteins and that modulation of the cellular levels of ZO-1 could control proliferation of ECs.

To further investigate the relationship between ZO-1 levels, MAPK and EC proliferation, we hypothesized that the cellular ZO-1 levels are inversely correlated with cell proliferation in a cell density-dependent manner. To verify this, BAECs were seeded at low cell density and ZO-1 levels were determined until cells proliferated to confluence (7 days). We found that ZO-1 levels increased with cell density and reduced phosphorylation of MAPK was observed in parallel (Figure 2.6A). This correlation between ZO-1 levels and cell proliferation has been observed in other cell systems and indicated a possible role for ZO-1 in contact-mediated inhibition of EC proliferation (216). Next, we examined ZO-1 levels in

proliferating ECs. Thus, we performed FACS analysis of confluent BAECs stained for BrdU and ZO-1. Cells were treated with BrdU for 30 minutes at 37 °C, then fixed and labeled for BrdU and ZO-1. BrdU positive cells showed an overall 19% decrease in ZO-1 intensity compared to BrdU negative cells (Figure 2.6B, Supplemental Fig. S2.6). Furthermore, we visualized the decrease of ZO-1 levels in proliferating cells by immunofluorescence microscopy. Indeed, proliferating BrdU positive BAECs displayed a 20% decrease in ZO-1 staining compared to non-proliferating cells (Figure 2.6C). However, the levels of VE-cadherin were identical in proliferating and non-proliferating cells (Figure 2.6D). In the mouse retina, the development of the vascular plexus forms during the first week after birth and the growth vessels reaches the retinal edges at approximately postnatal day (P) 8 (332). In order to determine ZO-1 levels in proliferating ECs *in vivo*, we examined mouse retina at P5 where growth of the vascular plexus is not fully completed. To identify proliferating ECs in the retina, phospho-histone 3 (pH3) staining was performed and ZO-1 levels were quantified in ECs (lectin I positive/red). At day P5, a significant proportion of ECs were proliferating (Figure 2.6E). In agreement with our results in cultured ECs, ZO-1 levels, when normalized to the staining of the EC marker lectin I, was decreased by 23% in proliferating cells (pH3 positive cells) compared to non-proliferating cells (Figure 2.6E) in the developing vasculature of the mouse postnatal retina.

## 2.5. Discussion

VEGF and Ang-1, through their respective receptors, activate overlapping signaling cascade such that the molecular mechanisms explaining their unique biological activities remain largely undefined. Herein, we demonstrate that by comparing and analyzing the phosphoproteomes of ECs subjected to stimulation by angiogenic factors, we can uncover molecular networks of phosphoproteins that are determinants of basic cellular functions such as proliferation. We identified a link between MAPK1-induced proliferation and the junctional proteins ZO-1, ZO-2, JUP (junction plakoglobin) and p120-catenin. We found that ZO-1 is the central modulator of the actions of these proteins on MAPK activation and cell proliferation. Importantly, our results define a role for ZO-1 in the regulation of EC proliferation during development of the vasculature in the mouse retina.

The use of a label-free proteomics approach based on the comparison of phosphopeptide intensities, the use of multiple replicates and straightforward statistical analysis provided us with accurate identifications and reliable quantifications to determine the phosphoproteomes of VEGF or Ang-1 stimulated ECs (333,334). Moreover, the identification of phosphorylation sites allowed us to profile the proteins modulated by VEGF and Ang-1 treatment in order to define molecular networks that could regulate ECs during and important for angiogenesis. This method also allowed us to confirm several previously reported phosphorylation sites regulated by VEGF or Ang-1. Notably, we identified regulated phosphopeptides in VEGF and Ang-1 conditions corresponding to the well-established phosphorylation sites on Thr185 and Tyr187 on human MAPK1 (ERK2/p44 MAPK) that are linked to its activation and cell proliferation (306). In addition, phosphorylation of Ser82/78



(human/bovine) on HSPB1 (heat shock protein beta 1 or HSP27) was previously shown to be phosphorylated by Protein Kinase D and to participate in VEGF-stimulated EC migration (335). Other phosphorylation sites identified highlight important signaling pathways that are responsible for the effects of VEGF and/or Ang-1 in ECs. For example, we identified a group of phosphoproteins, EIF4B (Ser406) (336), EIF4EBP1 (Ser65) (337,338), EIF4G1 (Ser1077/1104; human/bovine) (339) and RPS6 (Ser235, Ser236) (340) that are all linked to the regulation of mRNA translation. Furthermore, phosphorylation sites on proteins known to be involved in cell migration and cytoskeletal reorganization such as Dock1 (Ser1857/1860; human/bovine) (341,342), Dock6 (Ser1343) (343), ARHGEF7 (Ser694/673, Ser518/497; human/bovine) (344,345) and eNOS (Ser633/635; human/bovine) (346) were also identified in our analyses. Analysis of pathway enrichment and GO terms indicate that cell junctions, cytoskeleton reorganization processes are highly modulated by VEGF and Ang-1 (Figure 2.2). Interestingly, the phosphoproteins of VEGF-stimulated ECs showed high enrichment of mTOR, MAPK and 14-3-3 signaling pathways. These are all consistent with the known effect of VEGF in angiogenesis (292,306).

In VEGF-treated cells, our bioinformatics analyses revealed a link between MAPK1 activation and the cell junction proteins ZO-1, ZO-2, JUP and p120-catenin. Signaling at cell junctions is well known to modulate cell density and proliferation. However, we show that the induction of EC proliferation by down-regulation of these proteins is accomplished independently of adherens junction integrity. Indeed, we show that down-regulation of VE-cadherin or  $\beta$ -catenin does not provoke an increase in EC proliferation in contrast to down-regulation of ZO-1, ZO-2, JUP and p120-catenin. Interestingly, the concomitant reduction in the cellular levels of ZO-1 is necessary for increased cell proliferation (Figure 2.4,2.5). Few

studies have directly linked these proteins to the regulation of cell proliferation. Deletion of ZO-1 or ZO-2 in mice is embryonic lethal due to reduced yolk sac angiogenesis or to an arrest in early gastrulation and decrease in cell proliferation (222,237). Furthermore, ZO-1 was found to participate in cell cycle regulation and cell density in epithelial cells via the Y-box transcription factor ZO-1-associated nucleic acid binding protein (ZONAB) (216). ZONAB was found to associate with cell division kinase (CDK) 4 and regulate its nuclear accumulation. On the other hand, the translocation of p120-catenin to the nucleus was reported to promote proliferation of ECs through the transcription factor Kaiso (317). Finally, expression of plakoglobin under the control of the keratin K14 promoter in mice reduced proliferation of epithelial cells of the epidermis and hair follicles, in agreement with our observations in ECs (347).

The comparison of interaction networks showed that MAPK1 clustered with junctional proteins only in VEGF-treated cells. This differential clustering led us to investigate further the implication of these proteins in the regulation of VEGF-stimulated proliferation (Figure 2.3). It is established that the cellular levels of junctional proteins increase with cell density to control contact mediated inhibition of cell proliferation (146,216,317). Here, we reveal that ZO-1 is a central regulator of this process. Notably, we show that down-regulation of ZO-1 specifically enhances VEGF-mediated MAPK activation and cell proliferation, which is not observed under Ang-1 stimulation (Figure 2.4). Thus, it is tempting to propose that since VEGF is known to disrupt EC junctions, in contrast to Ang-1, this contributes to facilitation and activation of the proliferative signals in ECs, which require a decrease in the cellular levels of ZO-1(318)(308)(308)(308)(309)(309)(308). Our results suggest that ECs must reduce ZO-1 levels in order to enter the proliferative program. Importantly, we found that

proliferating cells display decreased ZO-1 levels compared to non-proliferating cells. Moreover, we demonstrate that ZO-1 levels are decreased in ECs during retinal vascular development in mice. Further studies will need to determine how ZO-1 directly affects cell proliferation.

Interestingly, we identified Ser617/Ser586 (human/bovine) of ZO-1 to be phosphorylated in response to VEGF and found Ser912/Ser881 and Ser926/Ser895 (human/bovine) to be phosphorylated under Ang-1 conditions. This suggests that these phosphorylation events regulate differentially the function of ZO-1. Since phosphorylation of Ser617 is positively regulated by VEGF and that depletion of ZO-1 has a similar effect as VEGF treatment, the possibility that phosphorylation of this residue is somehow inactivating ZO-1 is currently being investigated. Alternatively, it has been previously reported that VEGF and Ang-1 modulate differently the expression of ZO-1 or ZO-2. For example, in brain microvascular endothelial cells Ang-1 was found to counteract VEGF-induced permeability by increasing expression of ZO-2 (348). Moreover, in human peritoneal mesothelial cells, VEGF was reported to decrease the expression levels of ZO-1 in response to glucose degradation products (221).

In conclusion, by comparing the phosphoproteomes and signaling networks of ECs stimulated with well-defined growth factors, VEGF and Ang-1, we revealed a major role for ZO-1 in the control of cell proliferation during angiogenesis. This indicates that global phosphoproteomics analyses may serve to delineate interrelations between signaling pathways that act as regulators of basic cell function that are important in physiological and pathological setting.

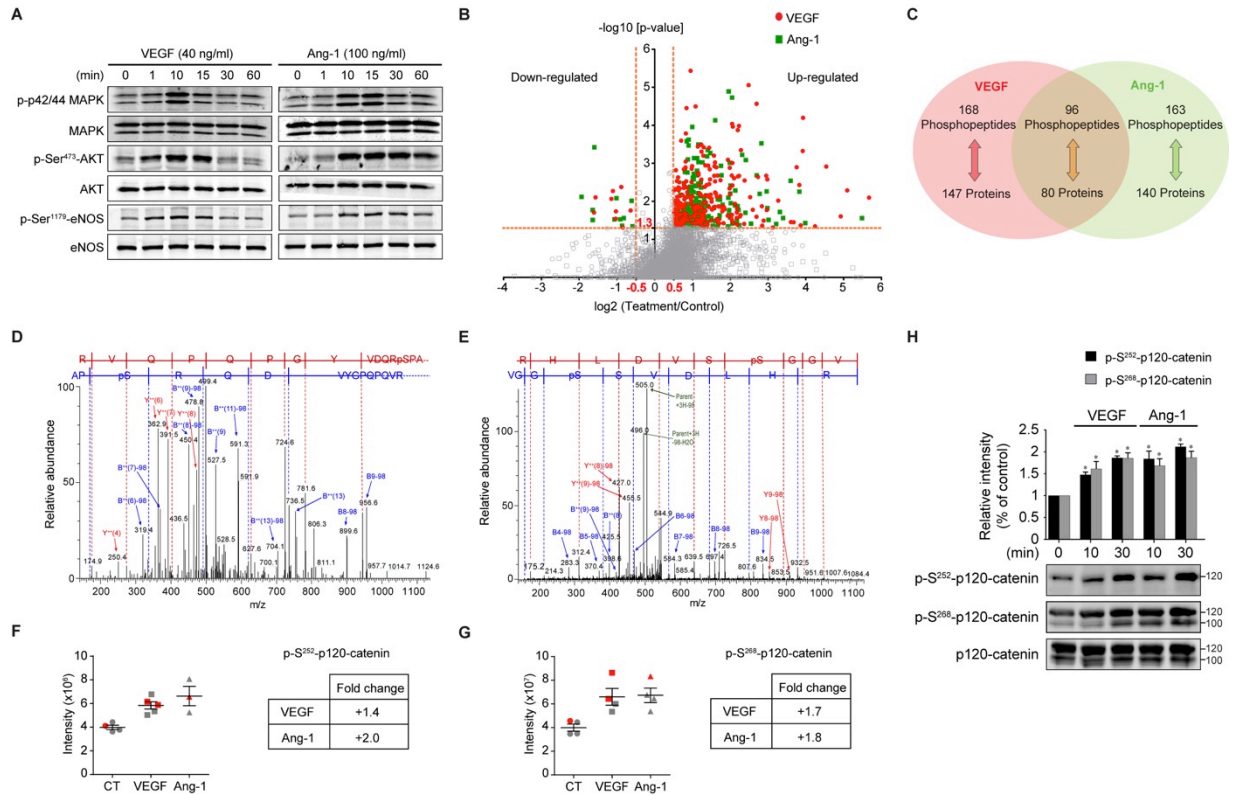
## **2.6. Author contributions**

R.C. designed and performed the experiments, analyzed the data, prepared the figures, and wrote the manuscript; Y.Z., S.T. and C.D. performed the experiments and analyzed the data, D.F. participated in designing the experiments and analyzed the data; J.-P.G. designed and supervised the experiments, analyzed the data, prepared the figures, and wrote the manuscript.

**Conflict of interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

## **2.7. Acknowledgements**

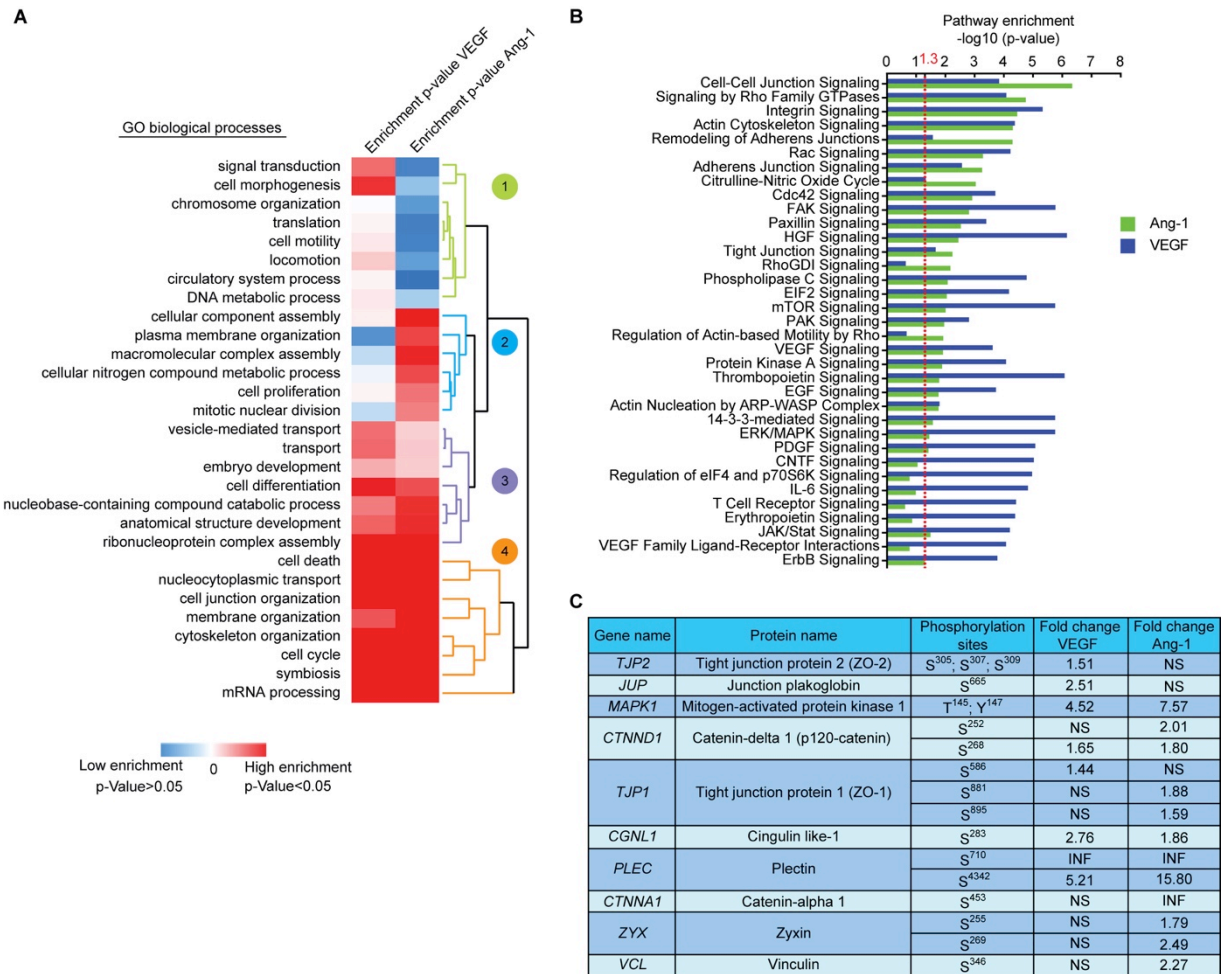
This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research to J.-P.G. (MOP-86464 and MOP-111031). J.-P.G. holds a Université de Montréal research Chair and was in receipt of a Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) Senior career award. The authors wish to thank Dr. Audrey Claing (Université de Montréal, Montreal, Canada) and Dr. Jean-François Côté (IRCM, Montreal, Canada) for critical reading of the manuscript.



**Figure 2.1: Analysis of the phosphoproteome in VEGF or Ang-1 treated BAECs.**

(A) Activation of Akt, MAPK and eNOS, using the indicated phosphospecific antibodies, was monitored in BAECs treated with VEGF (40ng/ml) or Ang-1 (100ng/ml) for the indicated times. Equal protein loading was confirmed by reprobing the membranes with antibodies against total Akt, MAPK and eNOS. These experiments were repeated at least three times with similar results. (B) Volcano plot showing the distribution of phosphopeptides abundance of VEGF or Ang-1 over control (fold-change, x-axis) as a function of statistical significance ( $-\log_{10}$  of p-value, y-axis). Red circles correspond to 248 significantly up-regulated peptides and 8 significantly down-regulated peptides upon VEGF stimulation. Green squares correspond to 263 significantly up-regulated peptides upon Ang-1 stimulation and 6 significantly down-regulated peptides to Ang-1 treatment. A cutoff of  $\log_2$  fold-change  $> 0.5$

and  $\log_2$  fold-change  $< 0.5$  was applied to define regulated phosphopeptides.  $-\log_{10}$  of  $p$ -value  $> 1.3$  ( $P$ -value  $< 0.05$ ) represents significant peptides. **(C)** Venn diagram showing the number of phosphopeptides and their corresponding phosphoproteins significantly regulated by VEGF and/or Ang-1. Data represents four to five replicates per condition. **(D,E)** A representative mass spectrum of the phosphopeptide corresponding to phosphorylation of Ser252 (D) and Ser268 (E) of p120-catenin. **(F,G)** The intensities of the phosphopeptide corresponding to phosphorylation of Ser252 (F) and Ser268 (G) of p120-catenin were used to calculate the fold-change ratio in VEGF or Ang-1 treatment. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Red represents the intensity of the technical replicates. **(H)** Immunoblotting validation of p120-catenin phosphorylation sites identified by mass spectrometry. BAECs were treated with VEGF (40 ng/ml) or Ang-1 (100 ng/ml) for the indicated times. Phosphorylation of Ser252 and Ser268 of p120-catenin was monitored using site-specific antibodies. Histogram represents the ratio of the phosphorylation levels over total protein measured by densitometry of three independent experiments. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.



**Figure 2.2: Comparative analysis of the phosphoproteomes of VEGF and Ang-1 treated cells.**

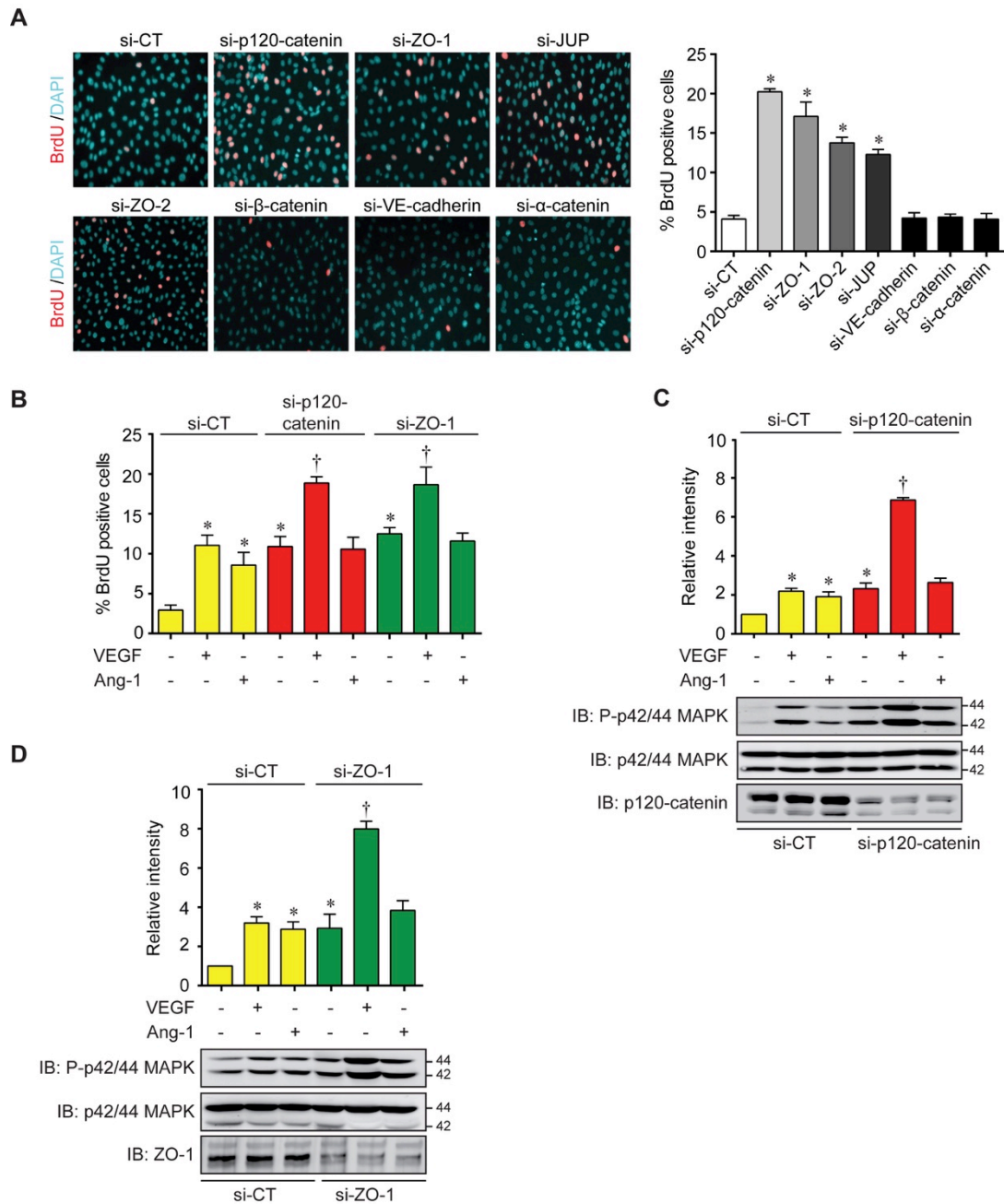
(A) A hierarchical clustering heatmap showing three different clusters of biological processes enrichment of VEGF or Ang-1 regulated phosphoproteins. Phosphoproteins regulated by VEGF or Ang-1 were analyzed using the GO biological process annotation built in STRING database. Red corresponds to GO terms significantly enriched ( $P$ -value<0.05) and blue represents non-significant biological processes ( $P$ -value > 0.05). (B) VEGF and Ang-1 regulated proteins were applied into IPA and the top pathways significantly enriched of each condition were represented and compared. A  $-\log_{10}$  of p-value > 1.3 correspond to the

pathway significantly enriched calculated by Fisher's exact test. (C) Phosphorylation sites and fold-change of selected phosphoproteins that are linked to the regulation of cell junctions. NS: not significant. INF: infinity indicates the ratio of phosphopeptides that were only identified in VEGF or Ang-1 samples but not in control samples.

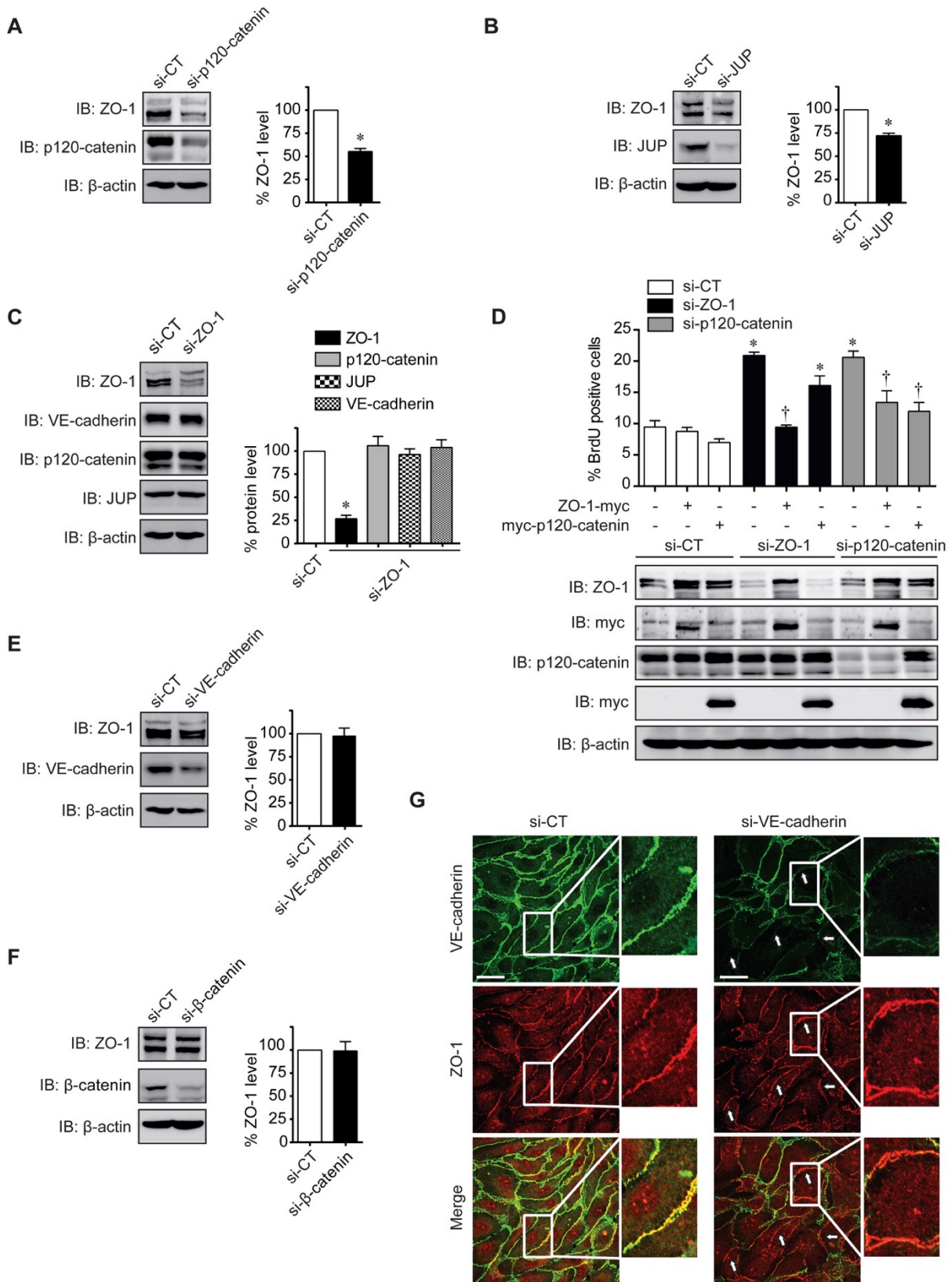




white are not part of any cluster. The tables contain the gene names and the functional enrichment of VEGF **(C)** and Ang-1 **(D)** clusters. The functional enrichment was manually annotated using GO terms of the biological process category and Uniprot database. The green cluster shows the junctional proteins in the same cluster with MAPK1 in VEGF but not in Ang-1 interaction network.

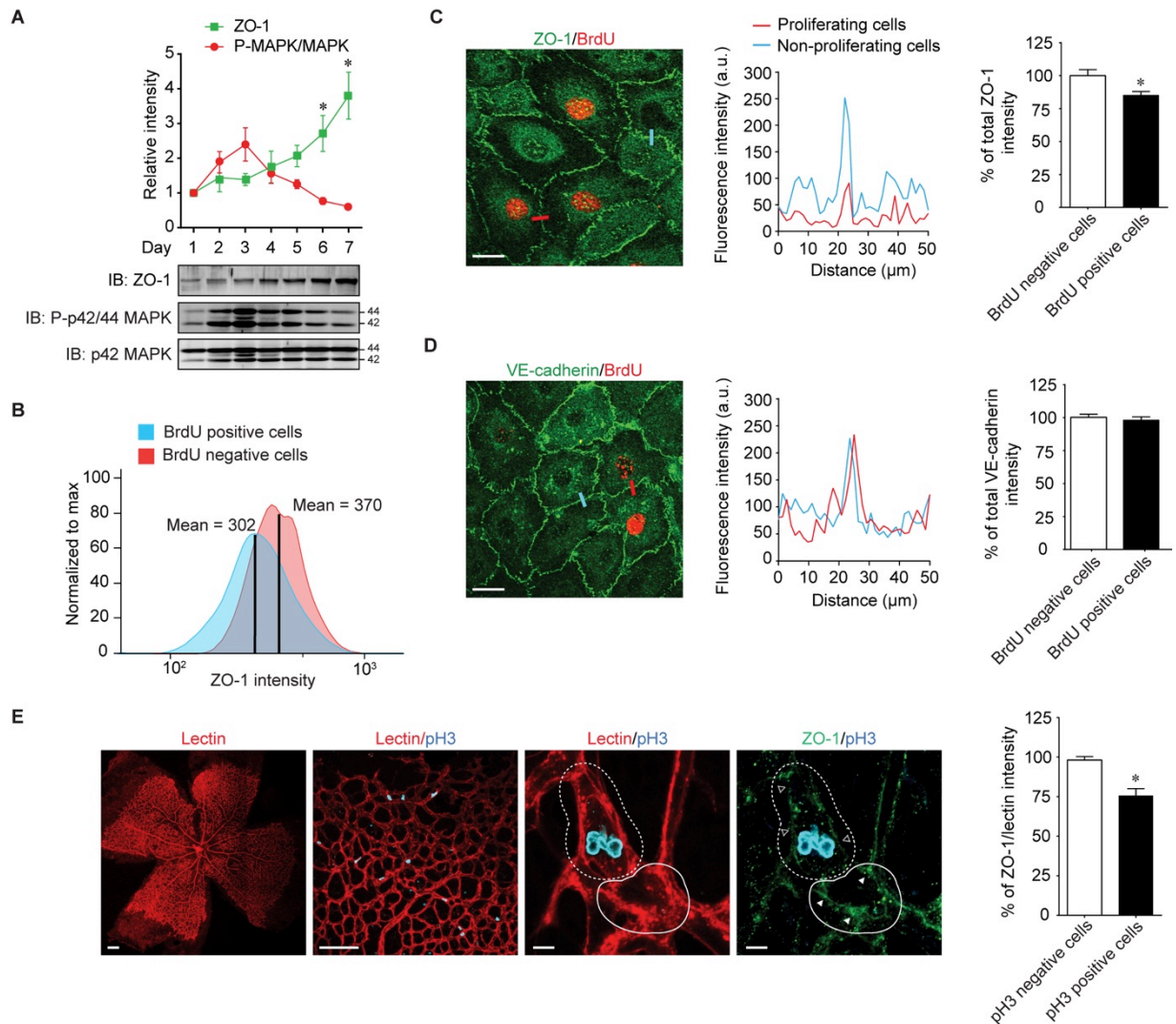


different experiments ( $*P<0.05$  compared to si-CT). **(B)** Quantification of the percentage of BrdU incorporation in p120-catenin or ZO-1 siRNA transfected BAECs in response to VEGF (40 ng/ml) or Ang-1 (100 ng/ml) treatment in 1% serum overnight. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments ( $*P<0.05$  as compared to CT,  $\dagger P<0.05$  as compared to VEGF treatment). **(C,D)** BAECs were transfected with p120-catenin (C) or ZO-1 (D) siRNA and phosphorylation of p42/44 MAPK was monitored by immunoblotting. Total p42/44 MAPK was used as loading control. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of at least three different experiments ( $*P<0.05$  as compared to CT,  $\dagger P<0.05$  as compared to VEGF treatment).



**Figure 2.2: ZO-1 is a major regulator of endothelial cell proliferation.**

**(A,B)** Immunoblot showing ZO-1 expression levels in p120-catenin (A) or JUP (B) siRNA transfected BAECs. Quantification of ZO-1 protein levels of three different experiments was represented as mean  $\pm$  SEM ( $*P < 0.05$  as compared to CT). **(C)** BAECs were transfected with ZO-1 siRNA and the expression levels of p120-catenin, ZO-1, VE-cadherin and JUP was monitored by immunoblotting. Histograms represent the mean  $\pm$  SEM of three different experiments ( $*P < 0.05$  as compared to CT,  $\dagger P < 0.05$  as compared to VEGF treatment). White bar represents the basal level of each protein. **(D)** Quantification of BrdU incorporation in BAECs transfected with siRNA against bovine ZO-1 or p120-catenin and expression plasmids for human ZO-1-myc or for myc-p120-catenin. Data are presented as mean  $\pm$  SEM of at least three experiments ( $*P < 0.05$  compared to si-CT,  $\dagger P < 0.05$  compared to si-ZO-1). Representative immunoblots, showing ZO-1 and p120-catenin protein levels, from at least three experiments with similar results. **(E,F)** Immunoblot showing ZO-1 protein levels in BAECs transfected with siRNA against VE-cadherin (E) or  $\beta$ -catenin (F). Histograms show the quantification of ZO-1 protein levels in VE-cadherin (top panel) or  $\beta$ -catenin (bottom panel) siRNA transfected cells. Data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $*P < 0.05$  as compared to CT). **(G)** Representative confocal images of immunofluorescence staining of ZO-1 and VE-cadherin (green) in BAECs transfected with control or VE-cadherin siRNA. White arrowheads point to staining at cell-cell junctions and higher magnification view of the boxed region is shown. Scale bar represents 20  $\mu$ m.

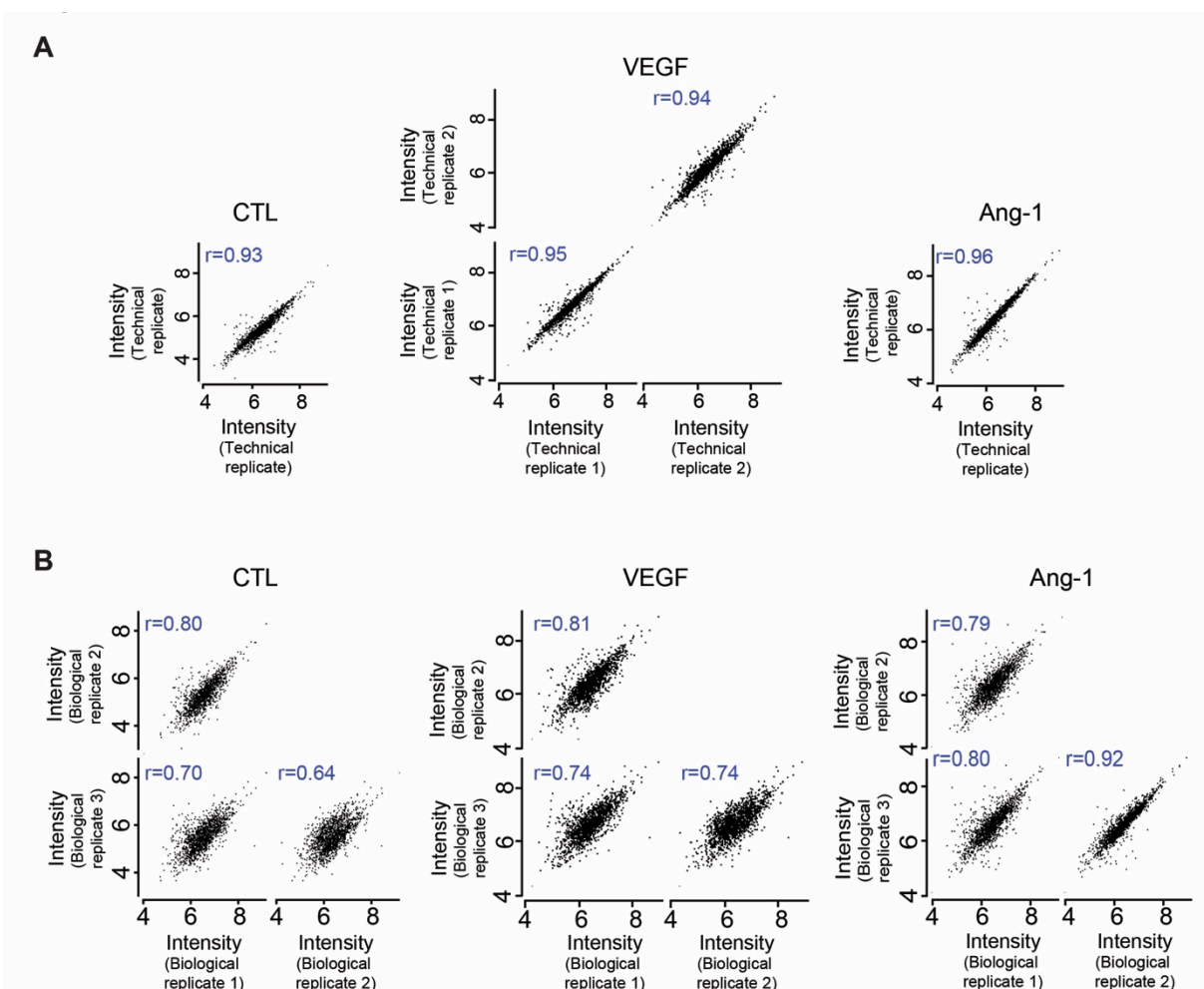


**Figure 2.3: ZO-1 levels correlate with endothelial cell proliferation *in vitro* and *in vivo*.**

(A) Equal amount of BAECs were grown at low density at day 1 and cultured until they reached maximal cell density at day 7. Cells were harvested each day and equal amount of protein were analyzed by immunoblotting. Representative immunoblot of three different experiments was shown. The relative intensity of ZO-1 (green) and P-p42/44 MAPK were quantified and the data are represented as mean  $\pm$  SEM ( $*P < 0.05$  compared to day 1). (B) Flow cytometry analysis showing overlay histograms of ZO-1 intensity in BrdU positive and

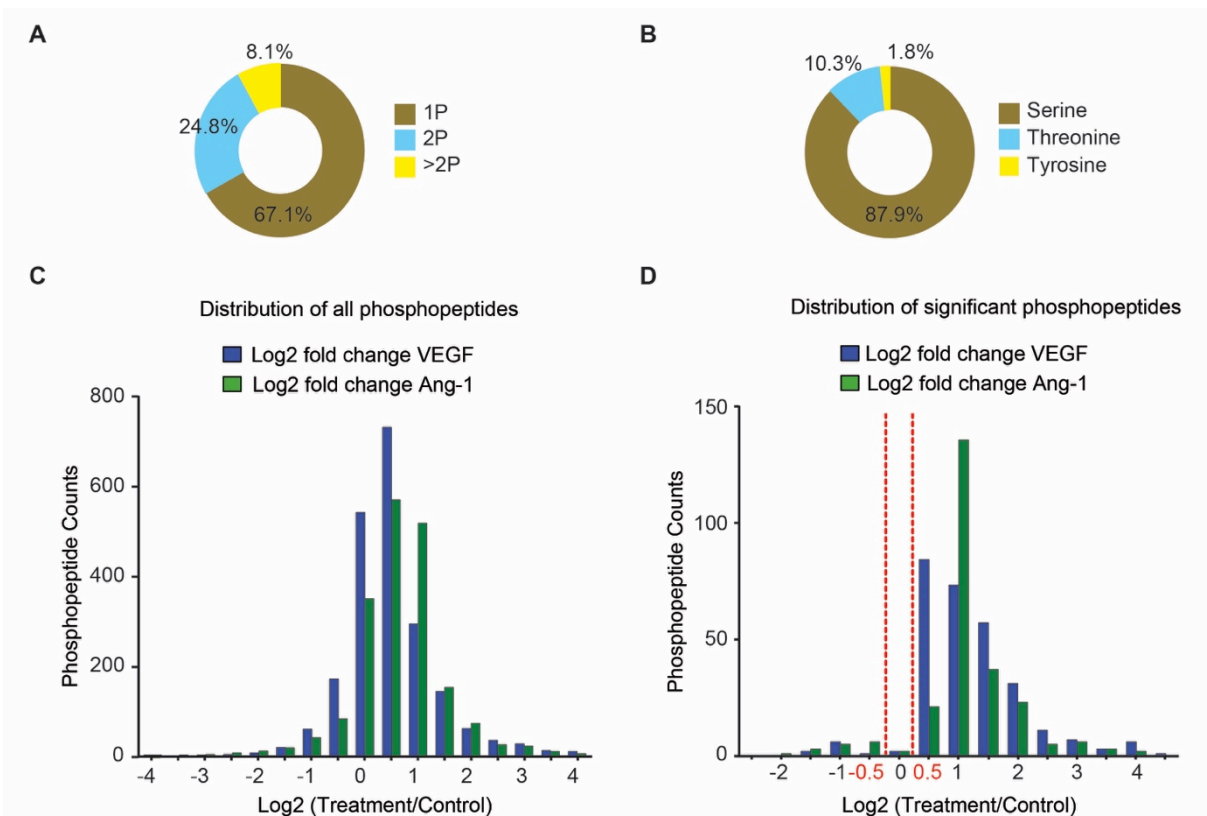
negative (blue) confluent BAECs. Samples are scaled to the percentage of its maximum signal. The mean of ZO-1 intensity in BrdU positive and negative cells was shown. **(C,D)** Immunofluorescence staining of BAECs showing ZO-1 (C) or VE-cadherin (D) levels (green) in the proliferative cells stained with BrdU versus non-proliferating cells. Representative fluorescence intensity profiles of ZO-1 or VE-cadherin in proliferating and non-proliferating cells (blue) measured along the lines drawn across cell-cell junctions is shown. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . Quantification of ZO-1 or VE-cadherin levels in the BrdU positive cells was expressed as percentage of decrease relative to non-proliferating cells. Each column represents at least 50 measurements. Values are represented as mean  $\pm$  SEM ( $*P < 0.05$  compared to BrdU negative cells). **(E)** Low magnification confocal micrographs of a P5 mouse retina show lectin I (panel 1) staining to indicate retinal vessels in which the proliferating cells were stained with pH3 (panel 2). Scale bar represents 200  $\mu\text{m}$ . Panel 3 and 4 show a higher magnification images of lectin I (panel 3) or ZO-1 (panel 4) staining. Empty arrows indicate ZO-1 staining in the proliferating cell (dashed line). Full arrows indicate ZO-1 staining in the non-proliferating cell (solid line). Quantification of the percentage of total ZO-1 intensity normalized to lectin I intensity in the pH3 positive cells compared to pH3 negative cells. Each column represents the average of 25 measurements. Data are represented as mean  $\pm$  SEM (n=6,  $*P < 0.05$  compared to BrdU negative cells). Scale bar represents 5  $\mu\text{m}$ .





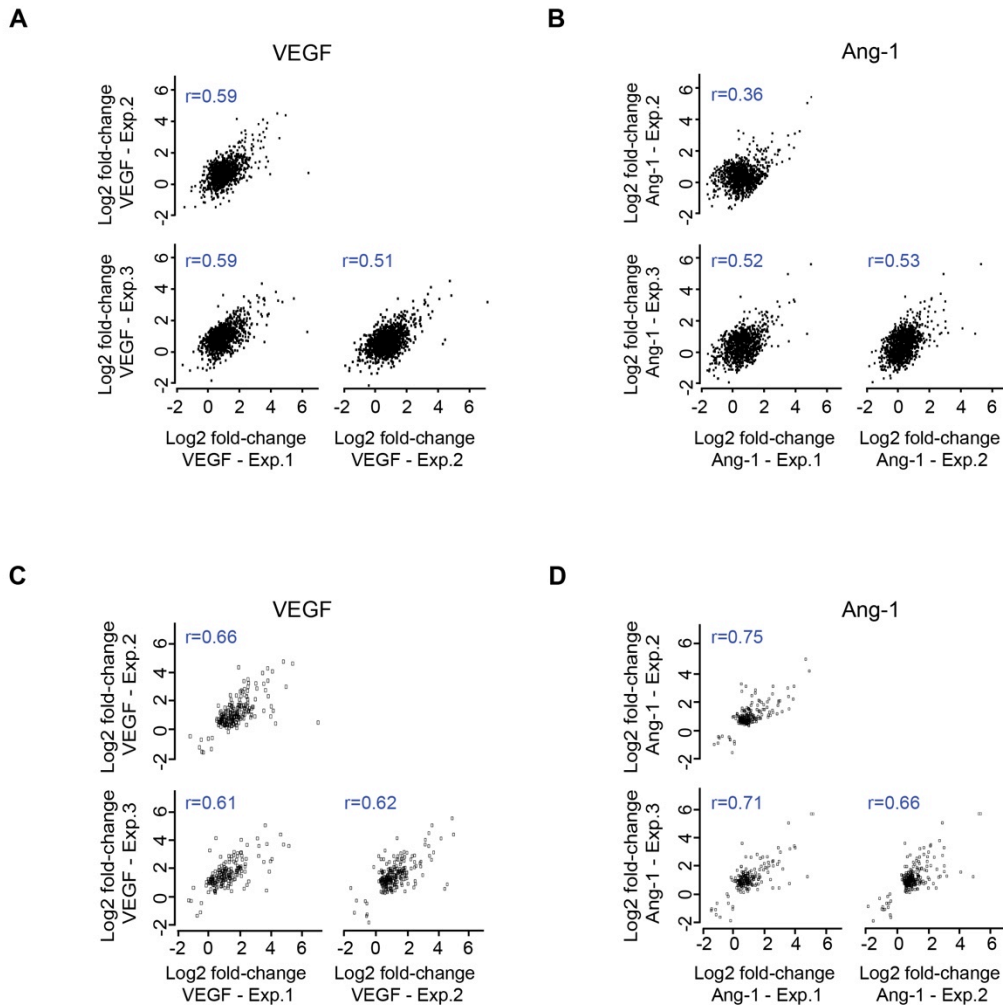
**Supplemental Figure S2.1: Correlations between phosphopeptide intensities of biological and technical replicates.**

(A,B) Correlation scatter plots of peptide intensities between technical replicates (A) or biological replicates (B) in Control (CTL), VEGF and Ang-1 treated cells. Correlation between measurements is determined by Pearson coefficient ( $r$ ). Log10 transformation of peptide intensities was used to visualize the correlation.



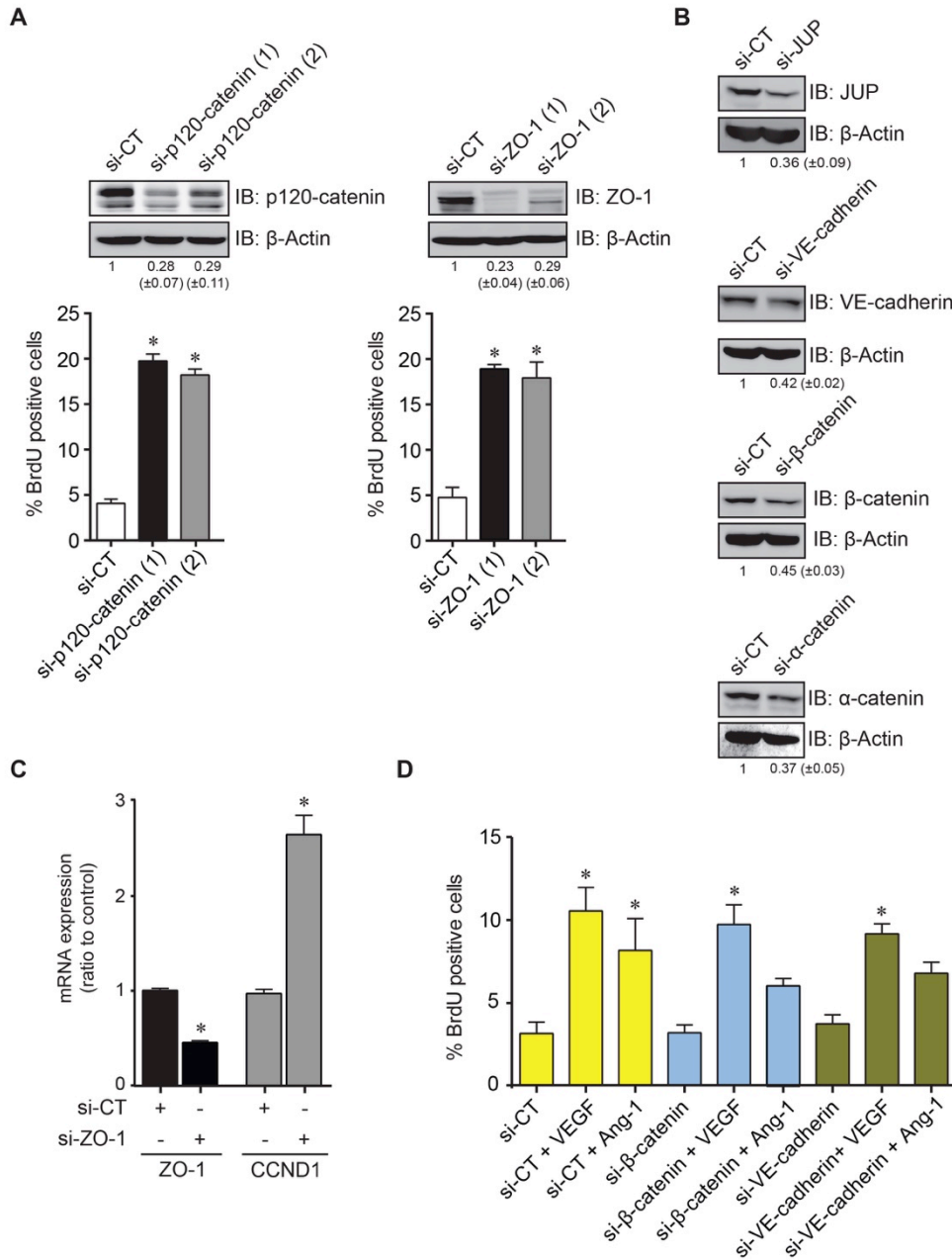
### Supplemental Figure S2.2: Overview of the phosphoproteome profiling.

(A) A pie chart indicating the percentage of singly, doubly and multiply phosphorylated peptides identified in VEGF or Ang-1 treatment. (B) The relative abundance of non-redundant Serine, Threonine and Tyrosine phosphorylation sites identified in VEGF or Ang-1 treatment. (C) The distribution of the treated/non-treated ratios of all phosphopeptides shows a median distribution of 0.40 and 0.65 for VEGF and Ang-1 phosphopeptides, respectively. (D) The distribution of significant phosphopeptide abundance in VEGF or Ang-1 treated cells showed that 95% of the phosphopeptides are regulated. Vertical dashed lines indicate the cut-offs that defines the regulated peptides ( $-0.5 > \log_2 \text{ fold change} > 0.5$ ).



**Supplemental Figure S2.3: Correlations between log<sub>2</sub> fold-changes of phosphopeptides for the VEGF and Ang-1 treatment conditions.**

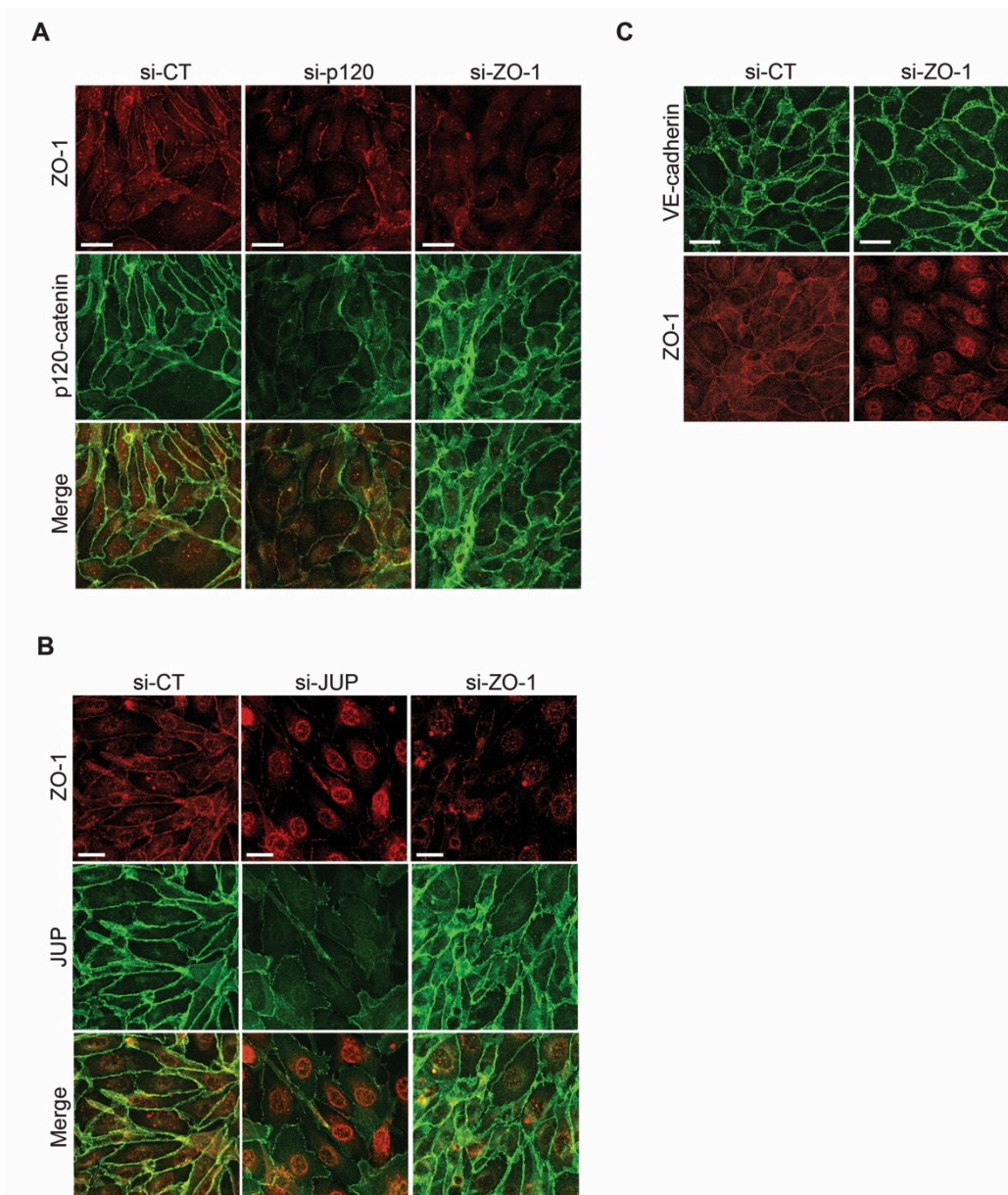
(A,B) Log<sub>2</sub> fold-changes for all quantified phosphopeptides between independent experiments of (A) VEGF or (B) Ang-1 treatment are plotted against each other and correlation between measurements is determined by Pearson coefficient ( $r$ ). (C,D) Log<sub>2</sub> fold-changes of significantly regulated phosphopeptides between independent experiments of (C) VEGF or (D) Ang-1 treatment are plotted against each other and correlation between measurements is determined by Pearson coefficient ( $r$ ).



**Supplemental Figure S2.4: Knockdown efficiency of siRNAs and effect of ZO-1, p120-catenin, β-catenin and VE-cadherin siRNA on endothelial cell proliferation.**

(A) Quantification of the percentage of BrdU incorporation in BAECs transfected with two independent siRNAs against p120-catenin, ZO-1. Data are represented as mean ± SEM of three different experiments (\* $P < 0.05$  as compared to CT). The knockdown efficiency of p120-

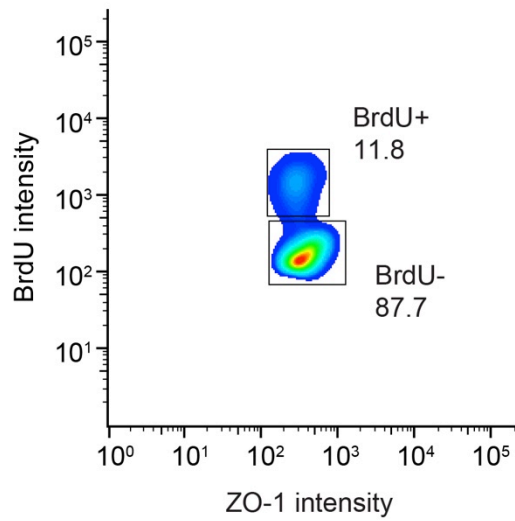
catenin and ZO-1 siRNAs was verified by immunoblot.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Knockdown efficiency was measured by the densitometry of the protein expression levels in three independent experiments and the ratio is shown under the corresponding blot. (B) BAECs were transfected with siRNAs against p120-catenin, ZO-1, ZO-2, JUP, VE-cadherin,  $\alpha$ -catenin or  $\beta$ -catenin for 48 hours and the corresponding protein expression was verified by immunoblot.  $\beta$ -actin was used as a loading control. Knockdown efficiency of the protein was measured by densitometry and the average ratio of three independent experiments is indicated. (C) Cyclin D1 mRNA expression increases significantly in ZO-1 downregulated cells. Real-time PCR analysis of Cyclin D1 and ZO-1 mRNAs in BAECs transfected with a ZO-1 siRNA or control siRNA. Data was normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression and represented as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by the standard two-tailed student's *t*-test ( $*P < 0.05$  compared to control siRNA). (D) Downregulation of VE-cadherin or  $\beta$ -catenin does not affect proliferation in VEGF and Ang-1 treated cells. Quantification of the percentage of BrdU incorporation in BAECs transfected with VE-cadherin or  $\beta$ -catenin siRNA in response to VEGF (40 ng/ml) or Ang-1 (100 ng/ml) treatment. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments. ( $*P < 0.05$  compared to si-CT).



**Supplemental Figure S2.5: The localization of p120-catenin, JUP or VE-cadherin was not affected in BAECs transfected with ZO-1 siRNA.**

(A) Representative confocal micrographs of immunofluorescence staining of BAECs transfected with control, ZO-1 or p120-catenin siRNA using antibodies against ZO-1 (red) and p120-catenin (green). (B) Representative confocal micrographs of immunofluorescence

staining of BAECs transfected with control, ZO-1 or JUP siRNA using antibodies against ZO-1 (red) and JUP (green). The peri-nuclear ZO-1 staining is an artifact of the rabbit antibody used to visualize ZO-1. Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ . (C) Representative confocal micrographs of immunofluorescence staining of BAECs transfected with control or ZO-1 siRNA using antibodies against ZO-1 (red) and VE-cadherin (green). Scale bar represents 20  $\mu\text{m}$ .



**Supplemental Figure S2.6: Representative FACS plot of ZO-1 intensity in BrdU positive or negative cells.**

ZO-1 stained cell population was divided into BrdU negative cells (87.7%) and BrdU positive cells (11.8%). ZO-1 mean intensity was calculated in each population. Control for primary and secondary antibodies was performed and non-specific staining was removed from the two populations.



## **CHAPITRE 3**

### **ZO-1 phosphorylation at Ser617 influences endothelial cell proliferation and junction assembly**

Rony Chidiac<sup>1</sup> et Jean-Philippe Gratton<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal

<sup>2</sup>Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal

## **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

J'ai réalisé toutes les expériences.

L'écriture du manuscrit a été faite par moi-même et mon directeur de recherche Dr Jean-Philippe Gratton.

### **3.1. Introduction**

In ECs, the tight junction protein ZO-1 is known as a major cytoskeletal organizer that links junctional proteins to cytoplasmic and cortical cytoskeleton proteins (318). ZO-1 is required for the formation and maintenance of vascular integrity. Previous studies have reported that post-translational modifications of junction proteins, such as phosphorylation, play an essential role in the regulation of EC junctions (145,203). The phosphorylation of junction proteins such as VE-cadherin or occludin has been shown to affect the integrity of the junctions complex and therefore the junction assembly (349-351). Thus, phosphorylation/dephosphorylation events on specific ZO-1 residues are likely to control ZO-1 activity, function and protein-protein interactions.

Very little is known about the protein kinases and protein phosphatases involved in the regulation of ZO-1 phosphorylation. It has been shown that PKC-mediated ZO-1 phosphorylation on the serine/threonine residues is required for the proper assembly of tight junctions in epithelial cells (352). In contrast, inhibition of MAPK was shown to enhance tight junction assembly in MDCK cells by stabilizing ZO-1 expression, inducing its localization to the cell membrane and increasing its tyrosine phosphorylation. This suggests that tyrosine phosphorylation of ZO-1 may also play an important role in tight junction assembly (353). Moreover, the tyrosine phosphatase DEP-1 was shown to interact with ZO-1 and influence its phosphorylation state. An increase in the expression of DEP-1 leads to ZO-1 tyrosine residues dephosphorylation and enhances junction formation (354). It has been reported that phosphorylation/dephosphorylation events on specific ZO-1 residues control ZO-1 function. We previously identified, using a large scale phosphoproteomics, novel phosphorylation sites

on ZO-1. We found that ZO-1 is phosphorylated on Ser617 in response to VEGF stimulation and on Ser912 and Ser926 in response to Ang-1 treatment in ECs.

The basic mechanisms that influence ZO-1 function during EC junction assembly, cell proliferation and angiogenesis are poorly defined. In this study, we investigated the role of the phosphorylation of ZO-1 on Ser617 and Ser912 on ZO-1 activity at the cell junction and its influence on EC proliferation. We found that ZO-1 phosphorylation on the Ser617 alters ZO-1-mediated inhibition of EC proliferation and that Ser617 is important for cell-cell junction assembly.

## **3.2. Methods**

### ***Cell culture and reagents***

Bovine aortic endothelial cells (BAECs), obtained from VEC Technologies (Rensselaer, NY), were cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. The primary antibodies used were: Anti-myc (monoclonal antibody [mAb]), β-actin (mAb) and BrdU (mAb) from Cell Signaling Technology. Anti-p120-catenin (mAb) and anti-ZO-1 (polyclonal antibody [pAb]) were from Santa Cruz.

### ***Plasmids and transfections***

ZO-1 small interfering RNA (siRNA) as well as nonsilencing control siRNA were obtained from IDT technology. si-CT AUGAACGUGAAUUGCUCUAAUU, si-ZO-1 GCAGAGAGGAAGAGAGAAUUU. Human ZO-1 tagged myc was obtained from Addgene. Murine p120-catenin was a generous gift from Dr. Albert Reynolds (Vanderbilt University Medical Center). p120-catenin was inserted in a pCMV-myc tag. BAECs were transfected with plasmids or siRNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

### ***Immunoblotting***

For immunoblotting, cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% deoxycholic acid, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM sodium Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Lysate were incubated for 30 minutes at 4°C, centrifuged at 14000 g for 10 minutes, boiled in SDS sample

buffer, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham), and western blotted. Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL; GE healthcare).

### ***Calcium switch assay***

BAECs were cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips. Cells were then incubated with 5 mM ethyleneglycotetraacetic acid (EGTA) at 37°C for 30 minutes. Cells were washed with cold PBS. EGTA was then removed and calcium restored adding fresh medium for the time indicated. Cells were then fixed and processed for immunofluorescence as described below.

### ***Immunofluorescence***

Cells grown to confluency on glass coverslips were fixed for 20 minutes in Methanol:Acetone (1:1) at -20°C. Fixed cells were rinsed with PBS and blocked with 1% BSA for 1 hour at room temperature. After blocking, cells were incubated with primary antibodies overnight in 0.1% BSA in PBS. Bound primary antibodies were visualized after 1 hour of incubation using Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-goat and Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-mouse. Coverslips were mounted using Fluoromount (Sigma-Aldrich) and observed on Zeiss LSM700 confocal laser-scanning microscope using a 63X objective and a 1X digital zoom. Images were analyzed using Fiji software.

### ***BrdU immunostaining***

BAECs were transfected and then cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips for 24 hours in 10% FBS. Cells were incubated with 0.03 mg/ml BrdU at 37°C for 30 minutes and then fixed

with 70% ethanol for 5 minutes. Cells were rinsed with PBS and denatured with 1.5 M HCl for 30 minutes at room temperature. After incubation with 1% BSA to block non-specific staining for 60 minutes, they were incubated with BrdU antibody overnight at 4°C. After three washes with PBS, cells were incubated with Alexa-Fluor 568-labeled goat anti-mouse for one hour. DAPI was used to stain the nuclei.

### ***Endothelial permeability assay***

Permeability across endothelial cell monolayers was measured using type I collagen-coated Transwell units (6.5mm diameter, 3.0  $\mu$ m pore size polycarbonate filter; Corning Costar). BAECs were plated 24 hours after transfection at a density of  $10^5$  cells per well and were cultured for 24 hours until the formation of a tight monolayer. Then, 1 mg/mL FITC-labeled dextran (molecular mass: 40 kDa) was added for 30 min. Endothelial permeability was measured by collecting 25  $\mu$ l sample from the lower compartment, which was diluted with 150  $\mu$ l phosphate-buffered saline (PBS) and measured for fluorescence at 520 nm when excited at 492 nm with a Wallac Victor 3V spectrophotometer (PerkinElmer).

### ***Statistical analyses***

Data are represented as the means  $\pm$  SEM. Comparisons between multiple groups were made using one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferoni's multiple comparisons test among groups. *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

## **3.2. Results**

### **3.2.1. The effects of ZO-1 on endothelial cell proliferation is dependent on cell-cell junctions**

We have previously found that reduction in the cellular levels of ZO-1 increases proliferation of ECs (355). To investigate whether the effects of ZO-1 on EC proliferation are dependent on the presence of cell-cell junctions, we downregulated ZO-1 by siRNA and plated ECs in a cell density-dependent manner starting from sparse to confluent monolayers. In confluent ECs, the downregulation of ZO-1 promotes proliferation of ECs when compared to control siRNA (Figure 3.1A). However, in sparse cells (in the absence of cell-cell contacts), the proliferation of ECs was not affected in ZO-1 downregulated cells compared to control siRNA transfected cells. This indicates that the presence of ZO-1 at the cell-cell junctions is necessary for the inhibitory actions of ZO-1 on EC proliferation. To determine whether the effects of ZO-1 on EC proliferation are specific to ZO-1, we overexpressed WT-ZO-1 and another component of EC junction, p120-catenin. Overexpression of ZO-1, but not of p120-catenin, inhibited EC proliferation (Figure 3.1B).

Together, these results show that ZO-1-mediated inhibition of EC proliferation is dependent on cell junctions.

### **3.2.2. ZO-1 is essential for endothelial junction assembly**

Next, we investigated if ZO-1 is important for cell junction assembly. We monitored the effect of the downregulation of ZO-1 on cell junction formation using a calcium switch assay. VE-cadherin-mediated cell-cell contacts is dependant on calcium binding. Therefore,



EDTA treatment, which depletes the extracellular calcium, dissociates VE-cadherins at cell junctions. To re-establish cell-cell contacts, cells are switched to regular culture medium containing calcium and efficient restoration of cell junction is monitored. We confirmed that EDTA treatment disrupts VE-cadherin localisation at the cell junctions in a similar manner in control and in ZO-1 downregulated cells. In control siRNA transfected cells, endothelial junction recovery starts after 60min of calcium re-addition. Interestingly, the downregulation of ZO-1 significantly delays VE-cadherin re-localization after calcium re-addition and consequently cell junction reformation (Figure 3.2). This confirms that ZO-1 plays a critical role in the assembly of EC junction.

### **3.2.3. ZO-1 phosphorylation on Ser617 alters ZO-1-mediated inhibition of endothelial cell proliferation**

We have previously found that ZO-1 is phosphorylated on Serine 617 and 912. To study the role of these phosphorylation sites on the proliferative effects of ZO-1 in ECs, we generated ZO-1 constructs where Ser617 and Ser912 residues are mutated to alanine (S617A and S912A). We observed that the expression of wild-type ZO-1 (WT-ZO-1) or S912A-ZO-1 blocks the proliferation of ECs. Interestingly, we found that the overexpression of S617A-ZO-1 does not inhibit EC proliferation (Figure 3.3A). Similarly, expression of WT-ZO-1 or S912A-ZO-1 inhibited proliferation of ECs where ZO-1 was downregulated by siRNA. However, S617A-ZO-1 expression does not prevent the proliferation induced by ZO-1 downregulation (Figure 3.3B). This indicates that mutation of serine 617 to alanine (S617A) prevents ZO-1 from acting as an inhibitor of cell proliferation. Nevertheless, both S617A-ZO-1 and S912A-ZO-1 mutants show a normal localization at the membrane similar to WT-ZO-1

suggesting that both Ser617 and Ser912 are not important for the localization of ZO-1 (Figure 4). These results indicate that the phosphorylation of ZO-1 on residue Ser617 is necessary for ZO-1-mediated inhibition of EC proliferation and this is not due to a defect in ZO-1 localisation.

#### **3.2.4. Ser617 of ZO-1 is important for endothelial cell permeability**

To address the role of Ser617 and Ser912 on EC junctions, we examined the permeability of ECs monolayers to macromolecules transfected with WT-ZO-1, S617A-ZO-1 and S912A-ZO-1 constructs. As expected, we found that overexpression of WT-ZO-1 restrains the permeability of ECs by blocking the passage of FITC-labeled dextran across a monolayer of BAECs compared to control (empty vector). Similarly, the overexpression of the S912A-ZO-1 mutant inhibited endothelial permeability (Figure 3.4). However, expression of the S617A-ZO-1 mutant does not inhibit the permeability of EC monolayers when compared to expression of WT-ZO-1 (Figure 3.5). These results indicate that Ser617 is important for ZO-1 signaling at cell-cell junctions.

#### **3.2.5. Ser617 of ZO-1 is necessary for cell junction assembly**

To determine the effect of Ser617 and Ser912 on cell junction dynamics, we investigated junction formation of ZO-1 mutants in a calcium switch assay. ZO-1 was downregulated by siRNA and then we monitored the junction reformation by VE-Cadherin immunofluorescence between two adjacent cells transfected with WT-ZO-1, S617A-ZO-1 or S912A-ZO-1 constructs. As mentioned before, the downregulation of ZO-1 did not allow

junction assembly after 60min of a calcium switch. When WT-ZO-1 is expressed, we observed that junctions were re-assembled after 60min of calcium addition. Similar to WT-ZO-1, expression of the S912A-ZO-1 mutant also allowed for junction reformation. Interestingly, junction assembly was not completed when S617A-ZO-1 is expressed in ECs. Although, S617A-ZO-1 transfected cells were confluent, VE-Cadherin was not present at cell contacts compared to cells expressing WT-ZO-1 and S912A-ZO-1 (Figure 3.6). These results show that Ser617 of ZO-1 is necessary for junction formation.

Taken together, our results reveal that Ser617 of ZO-1 is important for ZO-1 signaling at cell-cell junctions and appears to be necessary for ZO-1-mediated inhibition of EC proliferation.

### 3.3. Discussion

Herein, we investigated the role of the phosphorylation site Ser617 of ZO-1 in cell junction formation and EC proliferation. We found that ZO-1-mediated inhibition of EC proliferation is dependent on cell junctions. Importantly, our results show that the residue Ser617 of ZO-1 is necessary for junction formation and for the role of ZO-1 in inhibiting EC proliferation.

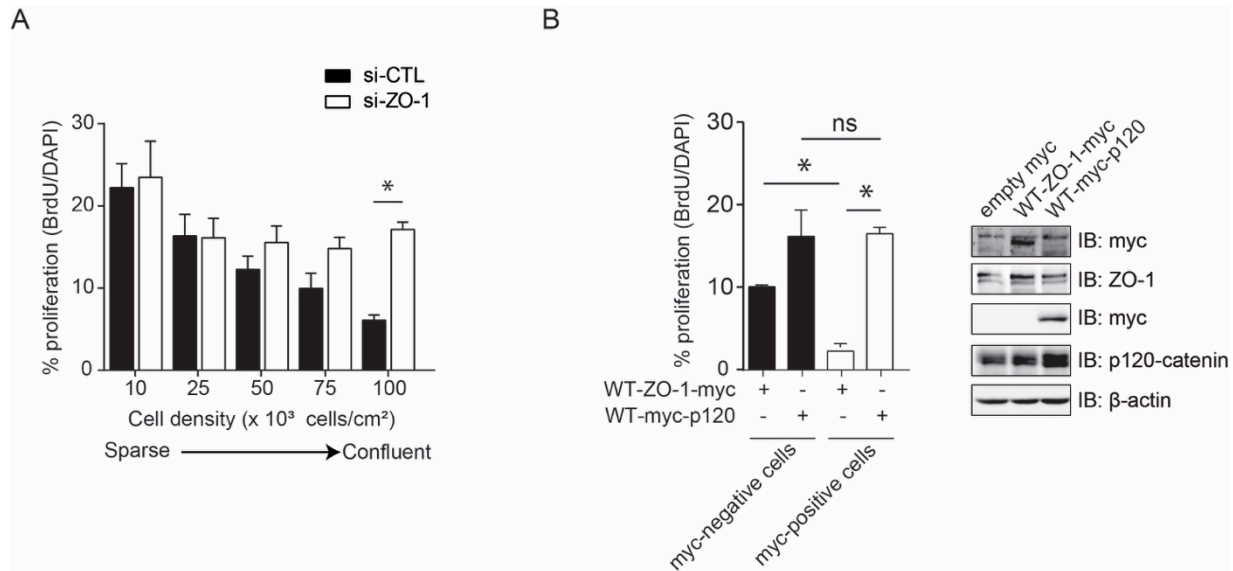
Junction proteins such as VE-cadherin, occludin and ZO-1 are required for junction assembly. Dynamic phosphorylation of occludin and VE-cadherin plays an important role in the assembly and disassembly of junctions (349-351). Moreover, few studies showed that ZO-1 phosphorylation disrupts its function and localization. In lung cancer, PKC $\epsilon$  induces the phosphorylation of ZO-1 at Ser168 which controls the localization of ZO-1 and its association with  $\alpha$ 5 integrin (356). Also, PKC $\epsilon$ -dependent phosphorylation of ZO-1 at Ser168 impairs cytokinesis and the localization of  $\alpha$ 5-integrin and ZO-1 at the cleavage furrow of lung cancer cells (357). In ECs, PKC $\epsilon$ -mediated ERK1/2 activation phosphorylates ZO-1 at Thr770/772 which disrupts endothelial junctions and induces barrier dysfunction (358). These studies show that the phosphorylation state of ZO-1 controls its function at the cell junctions and alters junction formation. The functional role of other ZO-1 phosphorylation sites is still unknown. Using mass spectrometry, we previously identified that ZO-1 is phosphorylated on Ser617, Ser912 and Ser926 (355). Although not all the serine residues were investigated in this study, we found that a mutation on the Ser617 residue of ZO-1 can dramatically alter the function of ZO-1 at the cell junctions. Our results showed that Ser617 but not Ser912 is necessary for junction formation. This suggests that the phosphorylation of Ser617 controls

ZO-1-mediated cell junction assembly. Moreover, our study reveals another important phosphorylation site on ZO-1 that plays a role in endothelial junctions. Interestingly, kinase prediction analysis using PhosphoNet indicated that PIM1/2/3, PKCs and p70S6Kb are potential candidates that could be responsible for the phosphorylation of Ser617 of ZO-1. Chemical inhibitors for these kinases could be used in an attempt to determine the intracellular signaling pathways that mediate the regulation of ZO-1 function.

Endothelial junctions are formed by the assembly of a multi-protein complex at the junctions (16). Dissociation of protein–protein interactions or disassembly of the actin cytoskeleton leads to disruption of junctions and an increase in cellular permeability (101). In epithelial cells, ZO-1 downregulation leads to the disruption of cell junction assembly (359). Our results show that ZO-1 downregulation causes a significant delay in EC junction assembly as measured after the calcium switch. This is in agreement with the known role of ZO-1 as a scaffolding protein that links junctional and cytoplasmic proteins in ECs. Furthermore, we found that the phosphorylation of ZO-1 on the residue Ser617, but not Ser912, is essential for junction formation. The expression of the S617A-ZO-1 mutant does not inhibit the permeability of EC monolayers indicating altered signaling at cell-cell junctions. However, the proper localization of S617A-ZO-1 at the membrane indicates that the effect of ZO-1 on the permeability is not due to a defect in the localization. It has been reported that ZO-1 interacts with junction proteins such as occludin,  $\alpha$ -catenin and cingulin (194,196,203). This could suggest that the phosphorylation of Ser617 of ZO-1 is important for its interaction with proteins such as occludin,  $\alpha$ -catenin or other endothelial junction proteins implicated in cell-cell junction formation. Moreover, it is known that ZO-1 interacts and sequesters ZONAB to the junctions and away from the nucleus which represses epithelial cell proliferation (359).

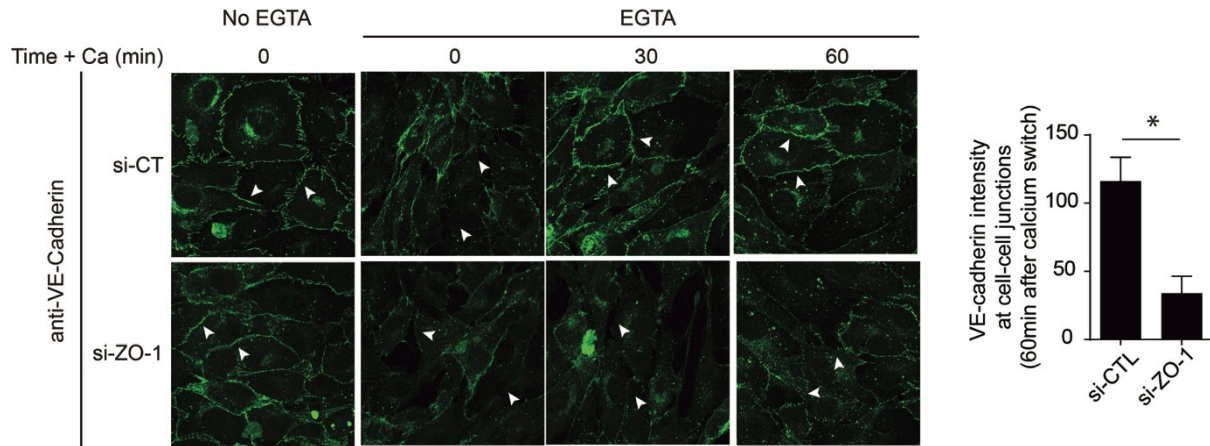
Our results show that mutation of serine 617 to alanine prevents ZO-1 from acting as an inhibitor of cell proliferation. It is established that the junctional proteins control contact-mediated inhibition of cell proliferation. Thus, it is possible that phosphorylation of ZO-1 on the residue Ser617 is somehow inactivating ZO-1 function at the cell junctions which disrupt the junctions between adjacent cells, thereby facilitating and activating the proliferative signals of ECs.

Although further work is required to define the exact function and signaling pathway that involves the phosphorylation of ZO-1 on Ser617, our results suggest that the residue Ser617 of ZO-1 appears to be necessary for ZO-1-mediated inhibition of EC proliferation and junction formation. This requires further studies to determine the role of ZO-1 phosphorylation on Ser617 during the development and in angiogenesis.



**Figure 3.1: The effects of ZO-1 on endothelial cell proliferation is dependent on cell-cell junctions.**

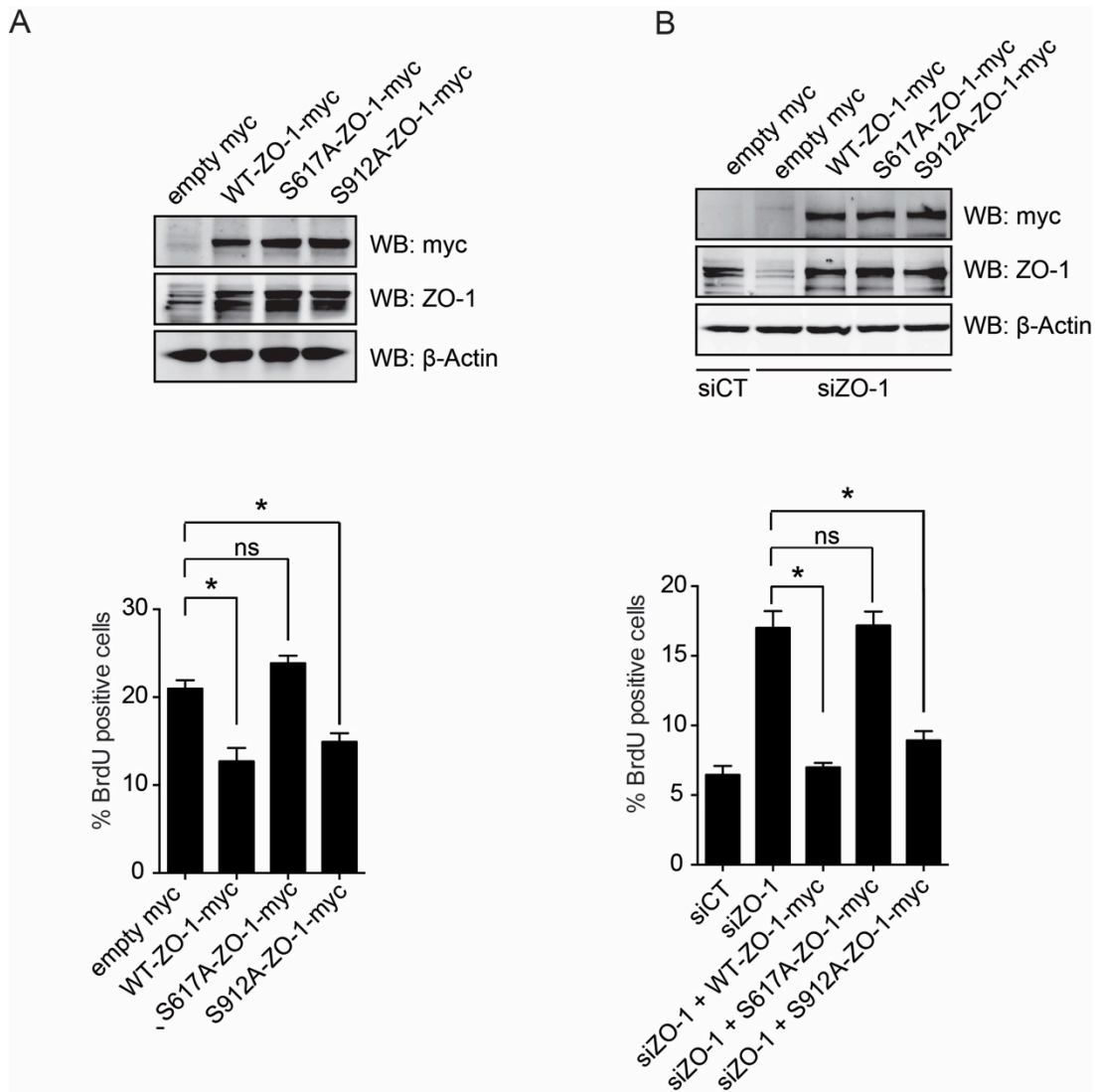
A) BAECs were transfected with control or ZO-1 siRNA for 24 hours and then plated in different confluency starting from sparse to confluent cells. Cell density vary between 5,000 and 50,000 cells/cm<sup>2</sup>. After 24 hours, the percentage of BrdU incorporation was quantified. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments (\*  $P < 0.05$ ). B) BAECs transfected with WT-ZO-1-myc or WT-myc-p120-catenin plasmids for 48 hours and the percentage of BrdU incorporation was measured in myc-tag positive and negative cells. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments (\*  $P < 0.05$ ). Immunoblot validation of WT-ZO-1-myc and WT-myc-p120-catenin overexpression was shown.



**Figure 3.2: ZO-1 downregulation delays cell junction assembly in endothelial cells.**

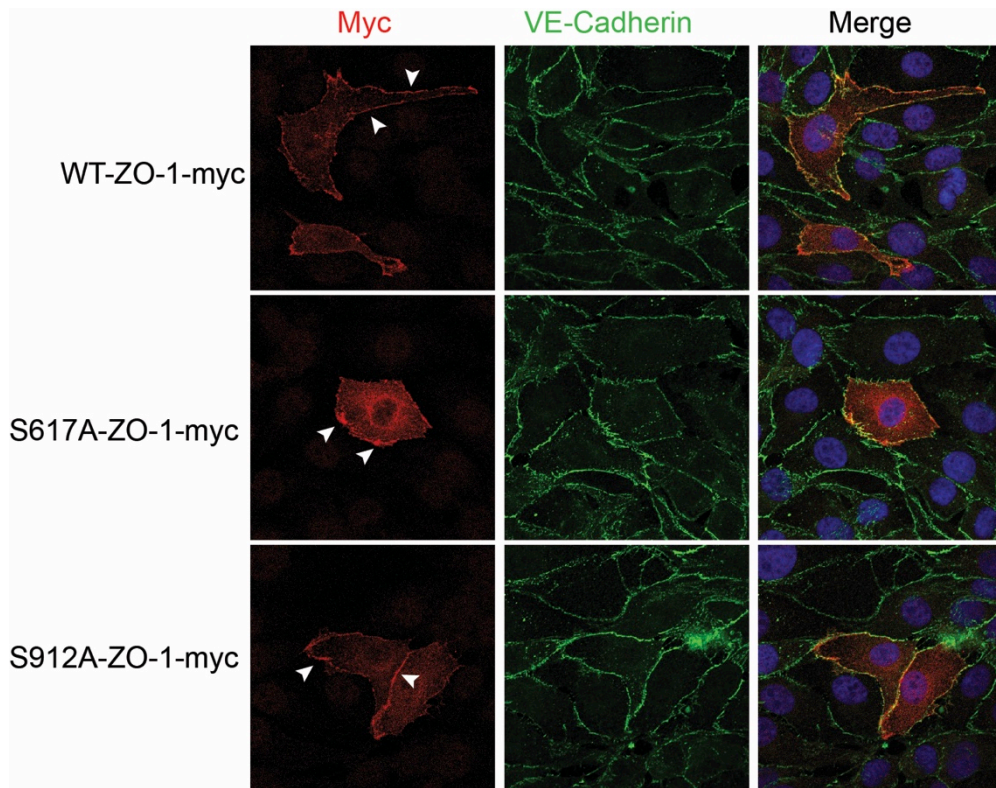
BAECs transfected with control or ZO-1 siRNA were treated or not with EGTA 2mM for 30min to deplete extracellular calcium and then switched to a regular medium containing calcium for the indicated times (0, 30 and 60min). Cells were fixed and stained for VE-cadherin (green) and visualized by confocal microscopy. The intensity of VE-cadherin at the junctions was quantified at 60 min after calcium switch. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments (\*  $P < 0.05$ ).





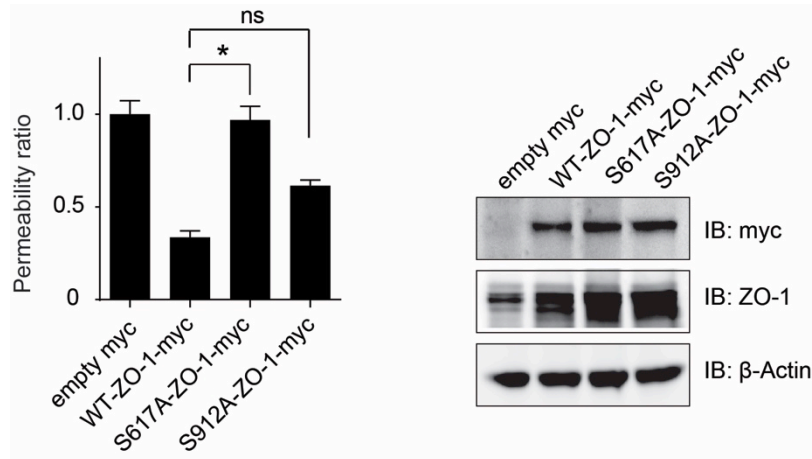
**Figure 3.3: Ser617 of ZO-1 but not Ser912 is essential to inhibit cell proliferation.**

A) Quantification of the percentage of BrdU incorporation in BAECs transfected with siRNA against control or ZO-1 and human myc-tagged WT-ZO-1, S617A-ZO-1 or S912A-ZO-1 were expressed. \* $P < 0.05$  when compared to si-ZO-1. B) Quantification of the percentage of BrdU incorporation in BAECs transfected with empty myc, human myc-tagged WT-ZO-1, S617A-ZO-1 or S912A-ZO-1. \* $P < 0.05$  when compared to S617A-ZO-1 mutant.



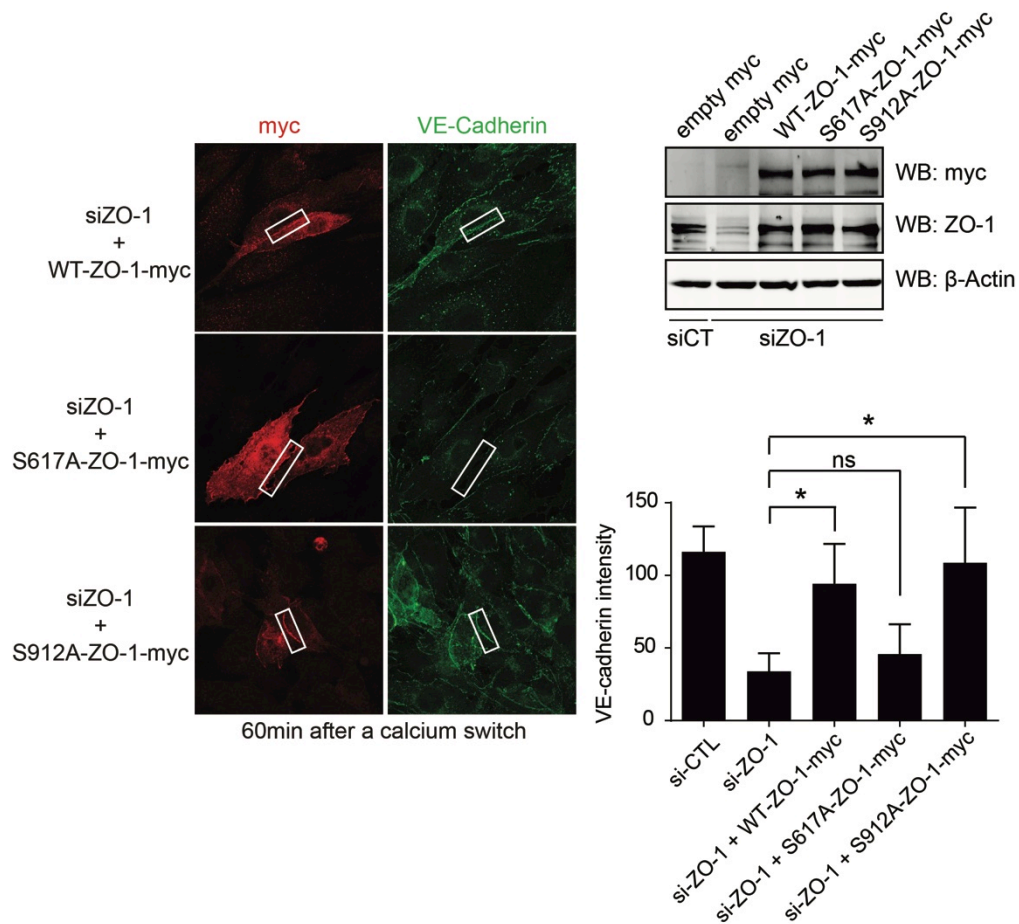
**Figure 3.4: Substitution of Ser617 or Ser912 to alanine does not affect localization of ZO-1 at the junctions.**

Representative confocal microscopy images of immunofluorescence staining of myc-tag (red) and VE-cadherin (green) in BAECs transfected with myc tagged WT-ZO-1, S617A-ZO-1 or S912A-ZO-1. Arrows indicates ZO-1 localisation.



**Figure 3.5: Ser617 of ZO-1 is necessary for inhibition of endothelial permeability.**

Transendothelial permeability was determined by measuring the passage of FITC-dextran through a monolayer of BAEC. Passage of FITC-dextran was measured following the expression of myc-tagged WT-ZO-1, S617A-ZO-1, S912A-ZO-1 constructs. The data represent permeability to FITC-dextran expressed as the mean fold compared to empty-myc transfected cells.



**Figure 3.6: Ser617 of ZO-1 is necessary for the formation of endothelial junctions.**

BAECs transfected with siRNA against ZO-1 were treated with EGTA and then incubated with a regular medium containing calcium for 60min. The cells were then fixed and stained for myc-tag (red) or VE-cadherin (green) and visualized by confocal microscopy. Quantification of cell junction assembly after a calcium switch was done by calculating the intensity of VE-cadherin between two transfected cells shown in the white rectangle. \* $P < 0.05$ .

## **CHAPITRE 4**

### **Analysis of the ZO-1 interactome in endothelial cells reveals its association with RNA binding proteins and a role in stress granule formation (*En préparation*)**

Rony Chidiac<sup>1</sup>, Ashley Chin<sup>2</sup>, Éric Lécuyer<sup>2</sup> et Jean-Philippe Gratton<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal

<sup>2</sup>Laboratoire de biologie des ARN, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Canada

<sup>3</sup>Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal

## **CONTRIBUTION DES AUTEURS**

J'ai réalisé toutes les expériences à l'exception de :

- Les expériences de protéomique ont été faites et analysées par le plateforme de découvertes en protéomique à l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM).
- Ashley Chin et Dr Éric Lécuyer nous ont fourni des anticorps spécifiques et un accès à leur base de données d'imagerie pour les protéines qui lient l'ARN.
- L'analyse et l'interprétation des résultats ont été faites par tous les auteurs.

L'écriture du manuscrit a été faite par moi-même et mon directeur de recherche Dr Jean-Philippe Gratton.

## 4.1. Introduction

Cell-cell junctions must be formed between ECs during the formation of blood vessels (360,361). In general, intercellular junctions between ECs are formed by homotypic interactions between transmembrane proteins connected to a network of intracellular cytosolic proteins that integrate signaling events essential for angiogenesis (146,362). For instance, genetic deletion of VE-cadherin,  $\beta$ -catenin or ZO-1 in ECs of mice leads to embryonic lethality due to vascular defects (174,175,177,315). The tight junction protein ZO-1 is known to function as a major cytoskeletal organizer in ECs that orchestrates adherens junctions to control barrier function, cell migration and angiogenesis (318). ZO-1 is part of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family of proteins and consists of three PDZ domains, a SH3 domain, and a guanylate kinase (GUK) domain (313,314,362). ZO proteins including ZO-1, ZO-2 and ZO-3 interact with each other. ZO-1 binds ZO-2 and ZO-3 through binding of their corresponding PDZ-2 domains (205,363,364). ZO-1 also interacts with several membrane proteins. For instance, ZO-1 interacts with claudins through the PDZ-1 domain, JAM-A via the PDZ-2 domain and it binds occludin through the guanylate kinase domain (188,203,204,365). On the other hand, ZO-1 interacts with cytoplasmic proteins such as actin and myosin binding proteins, signaling molecules and transcriptional regulators (313,366). ZO-1 interacts with several actin-binding proteins including cortactin,  $\alpha$ -catenin and the Ras target AF6/afadin as well as the actin- and myosin-binding proteins cingulin and Shroom (211-213,367,368). ZO-1 is not only a structural component of junctions, it is also involved in signal transduction and transcriptional modulation. For instance, ZO-1 associates with the transcription factor ZONAB to influence cell proliferation (215,216,369). It has been previously reported that VEGF induces tyrosine phosphorylation of ZO-1, increases the

permeability of EC monolayers, and reduces expression levels of occludin, which disrupts the localization of ZO-1 at cell junctions (218,370). Hence, ZO-1 does not act alone and must interact with transmembrane, cytoplasmic and cytoskeletal proteins to regulate biological functions such as cell-cell communication and proliferation.

RNA binding proteins (RBPs) control post-transcriptional mechanisms responsible for the protein synthesis and contribute to mRNA splicing, transport, turnover and cellular localization of RNAs (371). RBPs have multiple binding domains that allow their interaction with RNAs to form ribonucleoprotein complexes (RNPs). Protein-protein interactions determine the formation of the RNPs by RBPs and modulate its downstream functional activity (372). A cellular stress response often involves the inhibition of translation initiation and the formation of highly specialized cytoplasmic structures known as stress granules (SGs) (373). SGs have been reported to function as a site of mRNA triage that allow translation re-initiation, storage or degradation of mRNA. SGs assembly is triggered upon cell exposure to various stresses such heat shock, oxidative stress and hypoxia (280). SGs have also been implicated in cancer, viral infection, inflammatory disease and neurological diseases (373). Under stress conditions, translation is inhibited and SG formation requires specific RBPs including TIA-1 and G3BP1 (282). Knockdown of TIA1 or G3BP1 severely impairs SG assembly under stress conditions (275,276). Moreover, storage of mRNAs in SGs protects them and inhibits their degradation during stress conditions. This allows cells to rapidly restore the translation of mRNAs after recovery from cell stress (277). Recently, it has been reported the pre-existence of SGs protein interaction network in unstressed cells that facilitates rapid remodeling into larger functional SGs that appears under stress conditions (283,284).



In summary, ZO-1 is a scaffold protein that is known to be crucial for endothelial junction formation, migration and cell proliferation. The function of ZO-1 is determined by its association to transmembrane, cytoplasmic and cytoskeletal proteins. Thus, investigating ZO-1 interactome in ECs will allow us to better understand its function. In this study, we used affinity purification followed by mass spectrometry (AP-MS) to identify proteins that interact with ZO-1 in ECs and determine the effect of VEGF on the ZO-1 interactome. Interestingly, we uncovered novel interactions between ZO-1 and multiple RBPs that are involved in the RNA processing machinery. Moreover, we found that ZO-1 influence SGs formation and the decrease levels of ZO-1 protect the cells under stress conditions by increasing the assembly of SGs.

## 4.2. Methods

### *Cell culture and reagents*

Bovine aortic endothelial cells (BAECs), obtained from VEC Technologies (Rensselaer, NY) were cultured in Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), obtained from VEC Technologies (Rensselaer, NY) were cultured in M199 media supplemented with 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. BAECs were treated with the recombinant human VEGF-A obtained from R&D System.

### *Plasmids and transfections*

ZO-1 and VE-cadherin small interfering RNA (siRNA) as well as nonsilencing control siRNA were obtained from IDT technology. si-CT AUGAACGUGAAUUGCUCAAUU, si-VE-cadherin (bovine) ACAAAGAACUGGACAGAGAAU, si-ZO-1 (bovine) GCAGAGAGGAAGAGAGAAUUU. BAECs and HUVECs were transfected with plasmids or siRNAs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

### *Immunoblotting*

Cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% deoxycholic acid, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM sodium Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Lysate were incubated for 30 minutes at 4°C, centrifuged at 14000 g for 10 minutes, boiled in SDS sample buffer, separated

12 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham), and western blotted. Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL; GE healthcare).

### ***Immunoprecipitation***

BAECS cultured in 10 cm dishes were treated with VEGF (40 ng/ml) for 10 min. Cell treatment were done in three independent experiments, and then lysed in 1% Nonidet P-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% deoxycholic acid, 50 mM Tris (pH 7.4), 75 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM sodium  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  and 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Lysates were centrifuged at 20,000g for 10 min and 1 mg of proteins were then used for immunoprecipitation with 1  $\mu\text{g}$  of ZO-1 antibody overnight. Immunoglobulin G (IgG) control IPs were used as a negative control. Immunocomplexes were incubated with protein A agarose beads for 1 hour. For immunoblot experiments, immunoprecipitates were precipitated by centrifugation, washed three times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. For MS experiments, immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer and then three times with 50 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EGTA, 75 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM NaF, 1 mM sodium  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  and 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  to remove detergent. Then, immunoprecipitated proteins were eluted in Urea 8 M, 50 mM Tris (pH 7.4), and proteases and phosphatases inhibitors. Beads were incubated with 50  $\mu\text{l}$  eluting buffer at room temperature for 30 min with frequent agitation. Supernatants were used for mass spectrometry analysis.

### ***Trypsin digestion***

Eluted proteins were reduced at 37°C using dithiothreitol (DTT) for one hour and alkylated by iodoacetamide for 60 minutes at room temperature in the dark. Then, the mixture was digested using trypsin (ratio enzyme/total protein of 1:50) followed by incubation at 37°C overnight. The tryptic digestion was quenched by adding 1% TFA (trifluoroacetic acid).

### ***Liquid chromatography-tandem mass spectrometry***

Peptides were re-solubilized under agitation for 15 minutes in 21 µL of 1% ACN / 1% formic acid. The LC column was a PicoFrit fused silica capillary column (17 cm x 75 µm i.d; New Objective, Woburn, MA), self-packed with C-18 reverse-phase material (Jupiter 5 µm particles, 300 Å pore size; Phenomenex, Torrance, CA) using a high-pressure packing cell. This column was installed on the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark) and coupled to the LTQ Orbitrap Velos (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a Proxeon nanoelectrospray Flex ion source. The buffers used for chromatography were 0.2% formic acid (buffer A) and 100% ACN / 0.2% formic acid (buffer B). Peptides were loaded on-column at a flow rate of 600 nL/minute and eluted with a 2 slopes gradient at a flow rate of 250 nL/minute. Solvent B first increased from 1 to 40% in 110 minutes and then from 40 to 80% B in 50 minutes.

### ***Mass spectrometry and data analysis***

Raw mass spectrometry data were processed using the MaxQuant software (version 1.5.3.17). Database searching was performed using the Andromeda search engine (version 1.5.3.17) integrated into MaxQuant against the bovine UniProt database and against the human UniProt

database. MaxQuant default parameters were used with the exception of minimum ratio count and LFQ minimum ratio count set to 1. Enzyme specificity was set to trypsin and up to two missed cleavages was allowed. Cysteine carbamidomethylation (C) was set as fixed modification and oxidation (M) and phosphorylation (STY) were set as variable modification. The minimum required peptide length was 6 amino acids. Mass tolerances for precursor ions and fragment ions were set to 20 ppm and 0.5 Da, respectively. The “matching between runs” algorithm in MaxQuant was enabled. The false discovery rate (FDR) was estimated by searching against the databases with the reversed sequences. For protein and peptide identification, the maximum FDR was set to 1%. Three independent biological replicates and two technical replicates were performed. For proteins quantification, LFQ intensity values from biological and technical replicates that represent protein abundance were used for statistical analysis. Protein identification in at least two biological replicates was required for further analysis. Also, at least two peptides of a protein have to be identified in order to consider it as potential ZO-1 interacting protein. LFQ intensities across different samples were first normalized according to the intensities of the bait protein ZO-1 in each sample in order to have equal amounts of ZO-1 in each replicate. Then, intensities of ZO-1 interactors across different samples were adjusted according to the normalized ZO-1 intensities in each sample. Normalized LFQ intensities were used for determination of specific protein–protein interactions.

Significant interactors were determined by performing a statistical analysis of the bait IPs of each condition versus IgG control IPs. Datasets were log<sub>2</sub> transformed and using Perseus tools, we imputed normal distributed values for missing values using a normal distribution with width of 0.3 and a downshift of the mean by 1.8 compared to distribution of all LFQ

intensities. Then, we performed a student's t-test-based comparisons of bait IPs versus IgG control IPs to identify significant interactors with false discovery threshold set at 0.05. Permutation-based FDR method in Perseus was used to perform multiple testing corrections. We calculated the average intensities of ZO-1 interacting proteins between the replicates and the treated/nontreated ratio for each protein was determined. To determine the interactors that are modulated by each treatment, we compared statistically using a student's t-test the bait IPs of each condition versus control condition. Only interactors with more than 2-fold change compared to control condition were considered as affected by VEGF treatment. Interactors that are statistically influenced by VEGF treatment with a p-value<0.05 were considered significantly modulated by VEGF.

### ***Bioinformatic Analysis***

Gene ontology annotations for biological processes were obtained from the Gene Ontology integrated in STRING database (version 10.1). Only GO annotations that were significantly enriched with a p value of less than 0.05 were used in the analysis. To generate protein interactions network, STRING interactions database was used. The published or informatic-predicted interactions were first determined using standard STRING-defined confidence (medium confidence 0.4). Protein enrichment in the protein interaction network was manually annotated based on the GO biological process enrichment. The obtained STRING network data were imported into the Cytoscape software (<http://www.cytoscape.org>) (38). For clustering analysis, MCL plugin in Cytoscape was used to identify functional protein clusters within the networks.

### ***Immunofluorescence***

BAECs and HUVECs were transfected and then cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips. Cells were washed with cold PBS and fixed for 20 minutes in paraformaldehyde (374) 4% at -20°C and permeabilized with 0.3% Triton X-100. Cells were rinsed with PBS and blocked with 1% BSA for 1 hour at room temperature. After blocking, cells were incubated with primary antibodies overnight in 0.1% BSA in PBS. Bound primary antibodies were visualized after 1 hour of incubation using Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-goat, Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-mouse, Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse. Coverslips were mounted using Fluoromount (Sigma-Aldrich) and observed using an Zeiss confocal laser-scanning microscope. Samples were viewed with a  $\times 60/1.5$  zoom oil objective. Images were assembled via ImageJ and Photoshop CS4 (Adobe Systems). The number of SGs was quantified using the ImageJ software. IF images were randomly taken with a  $60\times$  objective lens in 10 different fields. The plug-in “Analyze particles” was used to count the number of SGs. The percentage of cells with SGs was calculated by counting the number of cells displaying SGs and expressing them divided by the total number of cells.

### ***Statistical analyses***

Data are represented as the means  $\pm$  SEM. Two-tailed independent Student’s tests were used when comparing two groups. Comparisons between multiple groups were made using one-way ANOVA followed by post-hoc Bonferoni’s multiple comparisons test among groups. P-value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## 4.3. Results

### 4.3.1. Identification of ZO-1 interacting proteins by LC-MS/MS

To study the effect of VEGF stimulation of ECs on the ZO-1 interactome, we immunoprecipitated endogenous ZO-1 from lysates of BAECs treated or not with VEGF. ZO-1 immunocomplexes from each cell treatment were processed for LC-MS/MS (Figure 4.1A,B). In total, three biological replicates and two technical replicates of each condition were performed. First, we normalized the intensities of ZO-1 in the immunoprecipitates in order to have equal amounts of ZO-1 in each replicate and then, intensities of interactors across different samples were normalized according to the intensities of the bait protein ZO-1 in each sample (Fig. 4.1C). Normalized intensities were used to identify proteins that are specific interactors of ZO-1 when compared to non-immune IgG immunoprecipitates. To identify the proteins that were enriched significantly in ZO-1 immunoprecipitates, we compared each treatment condition to non-immune IgG condition and only proteins with a  $FDR < 0.05$  were considered as ZO-1 interacting proteins (Fig. 4.1D). In total, we identified 132 proteins that are specific ZO-1 interacting proteins (Figure 4.1C). These proteins were considered to constitute the ZO-1 interactome and were used for further gene ontology (GO) and network analyses.

Next, we determined ZO-1 interacting proteins that were influenced by VEGF treatment. We calculated the average intensities of ZO-1 interacting proteins between the replicates and the treated/nontreated ratio for each protein was determined. Only interactors with more than 2-fold regulation compared to control condition were considered as affected by VEGF treatment. We found that the interactions of 58 proteins with ZO-1 were influenced by more than 2 fold change following VEGF treatment compared to control (Figure 4.1D).



### **4.3.2. Functional analysis of the ZO-1 interactome and the effect of VEGF on ZO-1 interacting proteins**

In order to examine the global ZO-1 interactome, we generated a protein-protein interaction network using the STRING database (Figure 4.2A). Then, we manually regrouped proteins based on GO analyses and the Uniport database to determine their functions. We found that ZO-1 interacts with proteins involved in essential biological processes such as the formation of cell-cell junctions, cytoskeleton organization, cellular transport, RNA processing, transcription and translation. As expected, our results show that ZO-1 interacts with cell-cell junction and cytoskeleton organization proteins such as ZO-2, GJA1 (gap junction protein-1), DSP (desmoplakin), CGN (cingulin) and JUP (junction plakoglobin), drebrin-1 (DBN1), myosin proteins (MYL1/6, MYH11) (148,375-377). Moreover, VEGF treatment increased the interaction of ZO-1 with 57 proteins and decreased its interaction with one protein (Figure 4.1D,4.2A). Consistent with the known modulatory role of VEGF on EC junctions and on cytoskeletal organization, the interactions of DBN1, MYH11, and MYL1/6 with ZO-1 were influenced by VEGF treatment of ECs.

Interestingly, we observed that several ZO-1 interacting proteins identified in our screen are RNA binding proteins involved in RNA processing, translation and transcription (Figure 4.2A). We found that among the 132 ZO-1 interacting proteins, 54 proteins are RBPs such as AIMP1 (Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1), RBM3 (RNA-binding motif protein 3), SF3B2 (splicing factor 3B subunit 2), HNRNPA3 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3), RPL23A (60S ribosomal protein L23a) (378-381). Moreover, VEGF treatment increased the interaction of ZO-1 with 27 RBPs. For instance, VEGF regulated the interaction of ZO-1 with RBM3, SF3B2 and AIMP1. Similarly,

GO enrichment analyses using the STRING database also showed that ZO-1 interacting proteins and VEGF-regulated ZO-1 interactors are highly enriched in RBPs (Figure 4.2B,C).

### **4.3.3. Validation of ZO-1 interacting proteins**

Many of ZO-1 partners observed in our screen were not reported before. However, our results identified interactions of ZO-1 with ZO-2, Cingulin and ZONAB (YBX3), which were previously reported as ZO-1 partners (203,212,216). It is known that ZO-1 interacts with components of EC junctions (193,203,235). Our interactome revealed a novel interaction between ZO-1 and junction plakoglobin (382), a constituent of EC junction. Thus, we validated the interaction between JUP and ZO-1 by immunoprecipitation. Similar to our mass spectrometry results, we found that ZO-1 interacts with JUP and that VEGF treatment increases this interaction (Figure 4.3A).

Finally, to validate the link between ZO-1 and RBPs, we examined interactions of ZO-1 with AIMP1 and RPL23A by immunoprecipitation. We found that ZO-1 interacts with RPL23A and AIMP1 and that VEGF treatment of BAECs increased the interaction of ZO-1 with both proteins (Figure 4.3B). Overall, our results uncover a novel link between ZO-1 and RBPs and these interactions are influenced by the angiogenic growth factor VEGF.

### **4.3.4. ZO-1 interacts with RBPs related to SGs formation**

Based on our interaction network, we performed a protein interaction clustering using Markov Cluster Algorithm in order to regroup highly interconnected proteins based on known protein-protein interactions. We identified 8 subnetworks in the ZO-1 interactome (Figure 4.4A). Four out of eight clusters are highly enriched in RBPs. Clusters 1, 2, 5 and 8 contain

RBPs such as RPL23A, AIMP1, FUS, RBM3. Cluster 3 contains proteins involved in the binding with other protein complexes such as GAPDH and HSP27. Cytoskeletal proteins are enriched in cluster 4 and cell-cell junction proteins are enriched in clusters 6 and 7. Moreover, we observed that clusters 1, 2 and 4, which contain RBPs and cytoskeletal proteins, were highly influenced by VEGF treatment of ECs. Next, we investigated the function of the RBPs associated to ZO-1 and we found that these RBPs regrouped into RNP complexes (Figure 4.4B). Multiple RBPs identified in our screen were shown to be recruited into the SGs under stress conditions. Taken together, our results indicate a novel link between ZO-1 and a network of RBPs important for SGs formation.

#### **4.3.5. ZO-1 downregulation increased SGs formation under stress conditions**

In order to investigate the link between ZO-1 and SGs related proteins, we tested whether ZO-1 influence stress granule formation. We performed a siRNA-mediated ZO-1 downregulation in HUVECs and BAECs, and monitored SGs formation treated or not with arsenite using the SGs specific marker G3BP1. Similar to siRNA control, the downregulation of ZO-1 did not induce SGs formation (Figure 4.5A,B). Interestingly, ZO-1 downregulation increased SGs formation under arsenite treatment (both treatment arsenite and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as shown by immunofluorescence in figure 4.5A and B. We found that the number of SGs and the percentage of cells with SGs increased in ZO-1 downregulated HUVECs and BAECs treated with arsenite by 2 fold and 20% respectively (Figure 4.5C,D). Moreover, we investigated SGs formation in ZO-1 downregulated BAECs under heat shock (44°C) using G3BP1 and another specific SG marker, TIA-1. Similar to arsenite condition, ZO-1

downregulation increased the formation of SGs under heat shock condition (Figure 4.5E). These results indicate that ZO-1 levels influence SGs formation under stress conditions. Next, we investigated whether ZO-1 downregulation increased SGs formation is specific to the junction protein ZO-1. Thus, we performed a siRNA-mediated VE-cadherin, another constituent of EC junctions. In contrast to ZO-1 downregulated cells, we found that downregulation of VE-Cadherin did not increase SGs formation in BAECs and HUVECs (Figure 4.5F,G,H). This shows that under stress conditions, ZO-1 is a critical regulator for SGs formation.

In our interactome, we identified that ZO-1 interacts with YB-1, a known regulator of SG formation. We examined whether ZO-1 downregulation could allow YB-1 to localize more into SGs under stress conditions. Indeed, we found that the downregulation of ZO-1 increased the association between G3BP1 and YB-1 in BAECs treated with arsenite (Figure 4.6A,B). Moreover, we examined the colocalization between YB-1 and G3BP1 in SGs in response to arsenite treatment and we observed that the decrease levels of ZO-1 increased YB-1 and G3BP1 colocalization suggesting that ZO-1 modulates the association between YB-1 and G3BP1 (Figure 4.6C). Taken together, these results indicate the critical role of ZO-1 in the assembly of SGs.

#### **4.3.6. ZO-1 downregulation increased SGs formation and protects cells against stress conditions**

To examine the effect of arsenite treatment on ZO-1 levels, we treated BAECs in a dose- and time- dependent manner with arsenite. We found that arsenite treatment decreased

ZO-1 levels, however VE-cadherin levels were not affected. This indicates that, in order for the SG to assemble, ECs have to reduce ZO-1 levels (Figure 4.7A). Moreover, to investigate the role of ZO-1 in modulating SG formation, we observed the morphology of BAECs treated with long (2h) or higher (2mM) dose of arsenite. The treatment with arsenite altered the morphology of cells and caused significant cell death in siCT transfected BAECs. Interestingly, we observed that BAECs transfected with siZO-1 were less affected by arsenite treatment and formed more SGs than control transfected cells (Figure 4.7B). These results show that ZO-1 downregulation protects the cells against stress conditions by increasing SG formation.

## 4.4. Discussion

Herein, we used affinity purification followed by mass spectrometry to determine the ZO-1 interactome and the influence of VEGF treatment of ECs on ZO-1 interacting proteins. These experiments uncovered a novel link between ZO-1 and RBPs, which was also affected by VEGF treatment.

In general, ZO-1 links transmembrane proteins with cortical actin cytoskeletal proteins and this is instrumental in assembling cell junctions (318). The interaction of ZO-1 with numerous membrane and cytoplasmic proteins indicates that the network complex of ZO-1 is critical for its downstream molecular function. Our results validate specific interactions of ZO-1 with previously reported proteins such as CGN, ZONAB, and ZO-2 (203,212,216). Nevertheless, many of the ZO-1 interactors that we identified were not previously reported. These interactions could highlight important signaling pathways that are linked to ZO-1 function in ECs. Furthermore, we found that the interactome of ZO-1 was significantly influenced by VEGF treatment. Consistent with the well-studied effects of VEGF on the regulation of EC permeability and migration, it was expected to observe that VEGF treatment regulates the interaction of ZO-1 with junction and cytoskeletal proteins such as DBN1, MYH11, MYL1/6 and CGN. Many of these interactions are novel and further studies of these interactions could allow us to increase our knowledge on the role of ZO-1 in the regulation of cell-cell junction and actin cytoskeleton organization.

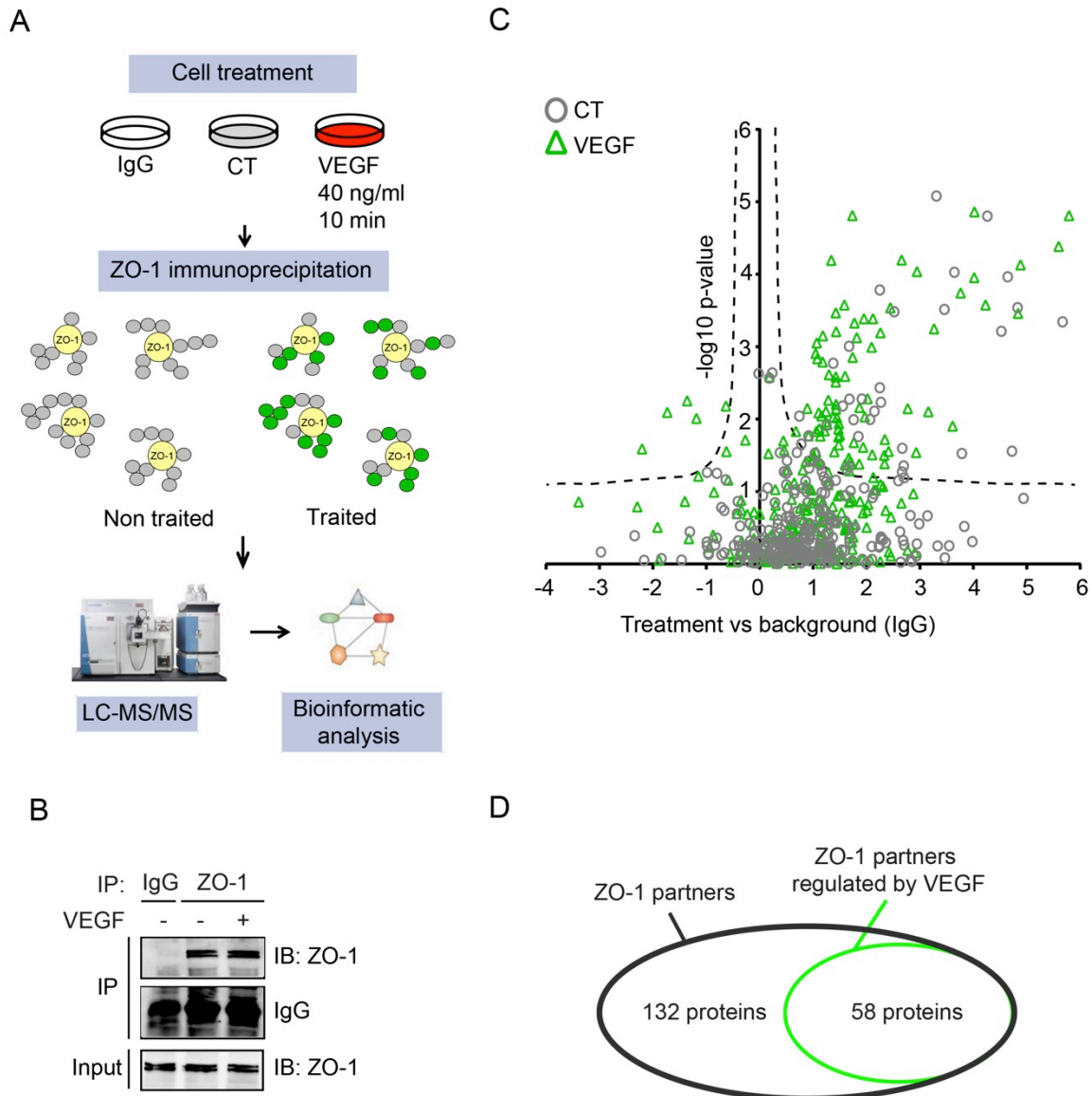
Interestingly, our results indicate a novel link between ZO-1 and RBPs, which is influenced by VEGF treatment. The specific cellular distribution of RNAs mediated by the RBPs could control the function of the proteins (255,267,383). For instance, the proper localization of  $\beta$ -actin RNA is necessary for adherens junction assembly in epithelial cells

(384). It is tempting to suggest that ZO-1 interacts with RBPs in order to ensure an appropriate localization of the RNA processing machinery at cell-cell junctions for localized protein synthesis. Also, the proper expression of junctional proteins is critical for the function of the cell-cell junctions. Some studies show that RBPs influence cell-cell junctions by interacting with ZO-1 mRNA and inhibiting its translation (261). This could suggest that interactions of RBPs with ZO-1 might be required for a fast and efficient translation in order to maintain endothelial junction integrity.

SGs are strongly enriched with RBPs and their assembly involves protein-protein interaction domains present on numerous RBPs. SGs are formed only in stressed cells, however the pre-existing network complex of SG proteins and other proteins that interact even in unstressed cells have been reported (283,284). Several RBPs identified in our ZO-1 interactome are associated to SGs such as YBX1, FUS, RBMX and RBM3. The interaction of ZO-1 with RBPs related to SGs could indicate that ZO-1 could participate in SGs assembly. Indeed, our results show that the downregulation of ZO-1 increases the number of SGs under stress conditions and increases the interaction between SGs markers. Several studies showed that SG formation is protective against stress-induced cell death, however the role of ZO-1 in SGs remains unknown. Our results indicate that stress exposure decreases ZO-1 expression and the downregulation of ZO-1 is protective against stress-induced cell damage and death. During angiogenesis, ECs are exposed to many environmental stresses, thus it is possible that ECs must reduce ZO-1 levels in order to form SGs that protect against stress conditions. Therefore, ECs may exert its protective effects against stress in part by decreasing ZO-1 levels which facilitating SG assembly.

In summary, this proteomics analysis of the ZO-1 interactome in ECs revealed a novel link between ZO-1 and RBPs and a critical role for ZO-1 in SGs formation under stress conditions. This novel function for ZO-1 in ECs will require further studies to define its role in endothelial cells, vascular development and in angiogenesis.



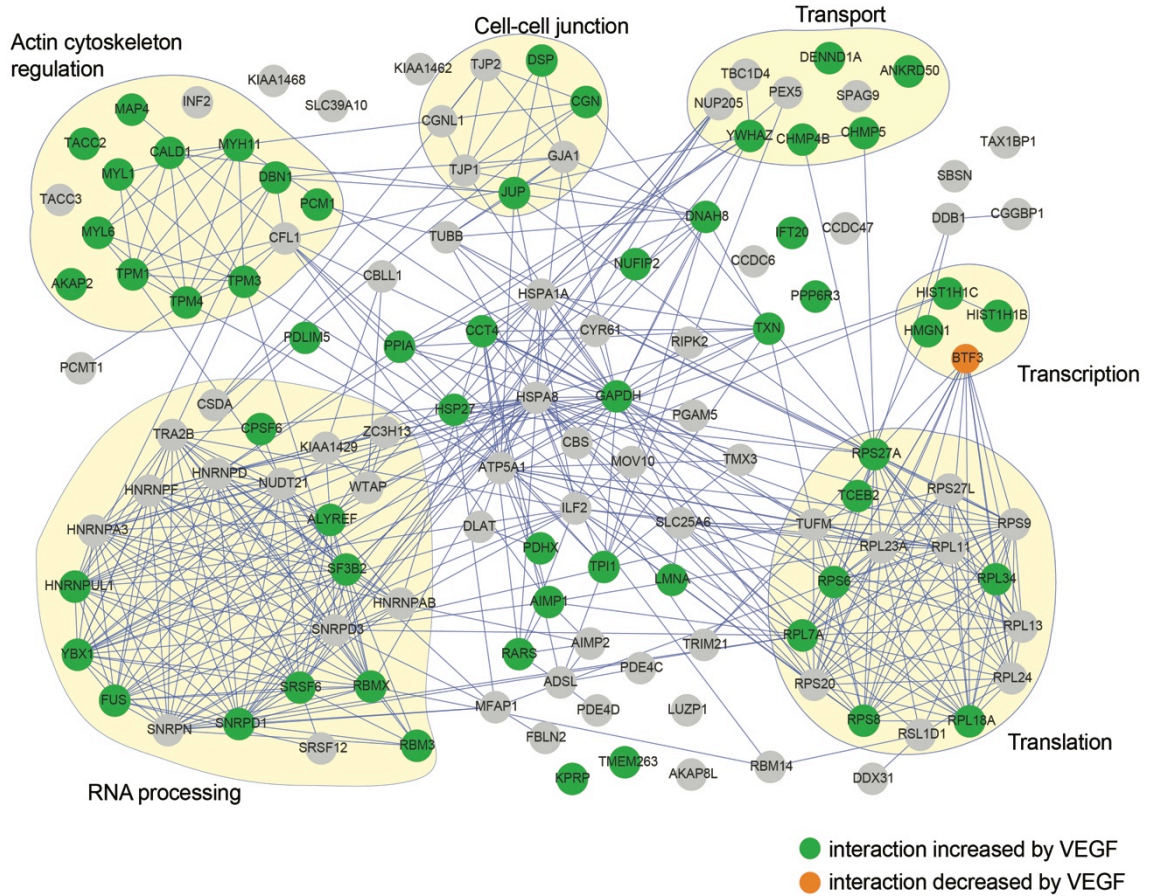


**Figure 4.1: Biochemical and computational workflow of ZO-1 interactome.**

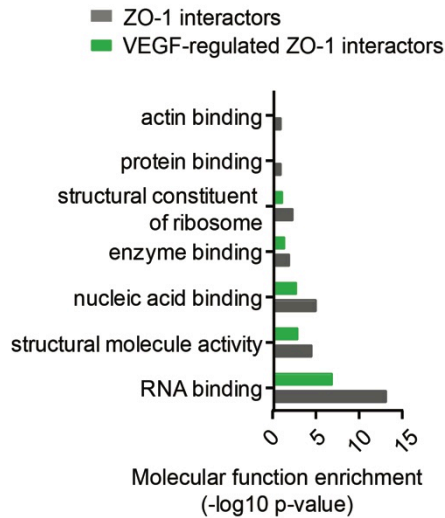
A) Overview of the experimental pipeline. Briefly, BAECs were treated with VEGF (40 ng/ml, 10min) and endogenous ZO-1 was immunoprecipitated using ZO-1 antibody (1  $\mu$ g). Lysate were processed by LC-MS/MS and then the bioinformatics analysis was done as indicated in materials and methods. B) Immunoprecipitation of ZO-1 from BEACs treated or

not with VEGF using anti-ZO-1 antibody. Immunoblots show an equal amount of ZO-1 immunoprecipitated and in the lysate. C) Volcano plot showing the distribution of proteins abundance of CT and VEGF conditions over IgG control (fold-change, x axis) as a function of statistical significance ( $-\log_{10}$  of p value, y axis). A hyperbolic curve indicates a false discovery rate (FDR) cutoff of 0.05 and separates specific from non-specific interactors. Every point represents one protein. D) Venn diagram showing the number of ZO-1 interacting proteins and ZO-1 interactors that are regulated by VEGF treatment.

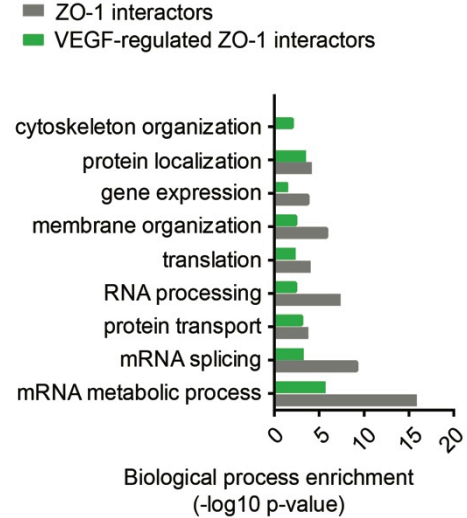
A



B



C

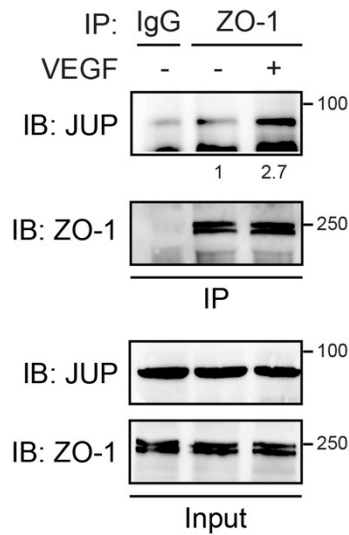


**Figure 4.2: Gene ontology and network analysis of ZO-1 interacting proteins and VEGF-regulated ZO-1 partners.**

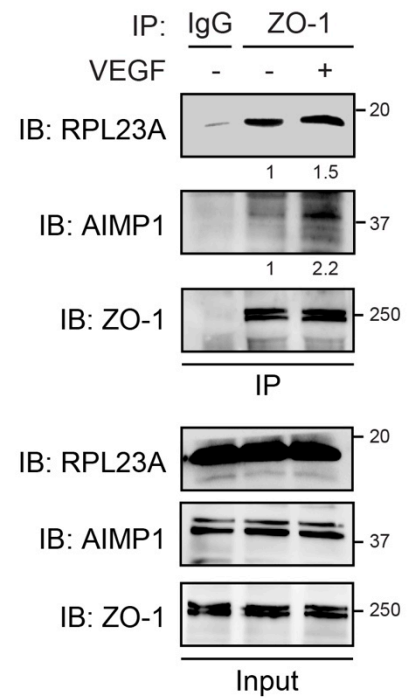
A) Protein interaction networks generated with ZO-1 interacting proteins using STRING database version 10.1 with medium confidence and visualized by Cytoscape. The functional enrichment was manually annotated using GO terms of the biological process category and Uniprot database. Green corresponds to ZO-1 associated proteins that increased by VEGF treatment. Orange corresponds to ZO-1 associated proteins that decreased by VEGF treatment.

B,C) ZO-1 interacting proteins and VEGF-regulated ZO-1 partners were analyzed using the GO molecular function (B) and biological process (C) annotation built in STRING database. Grey corresponds to GO terms significantly enriched in ZO-1 interactome and Green corresponds to GO terms significantly enriched in VEGF treatment (A  $-\log_{10}$  of p-value  $> 1.3$  correspond to P-value  $< 0.05$ ).

A



B



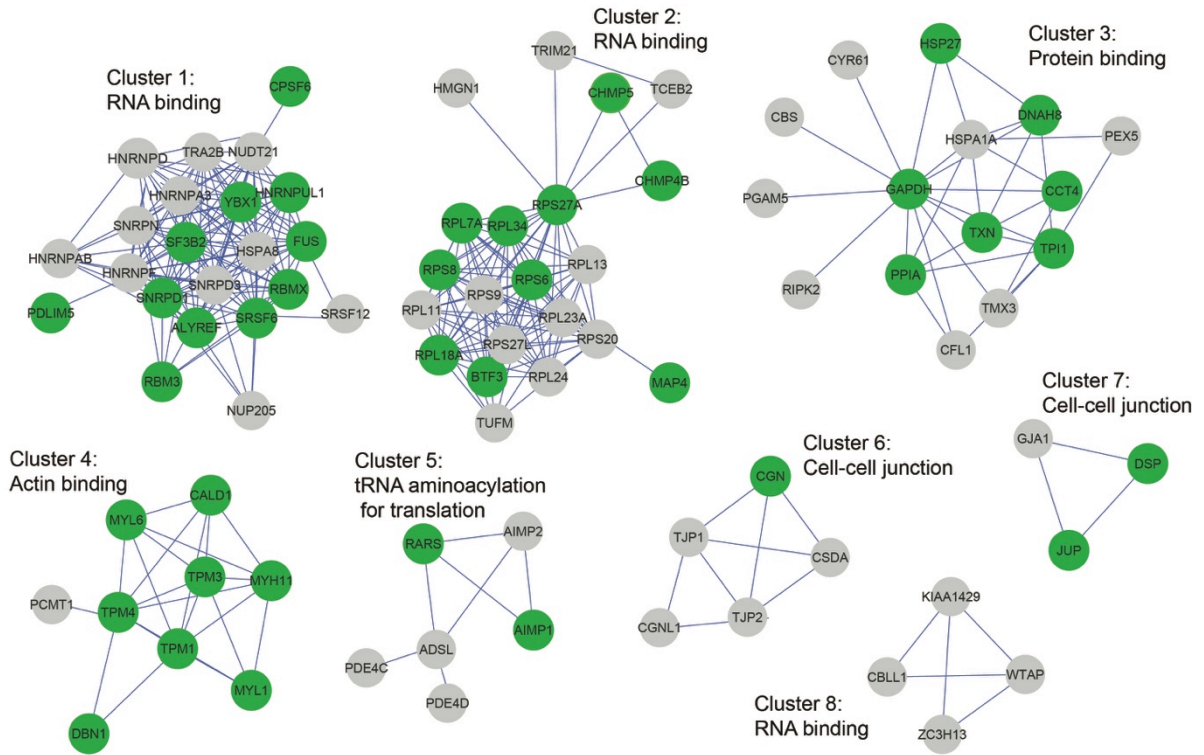
C

ZO-1 partners	Fold change in MS	Fold change in IP
JUP	+2.7	+2.7
RPL23A	+1.2	+1.5
AIMP1	+6.1	+2.2

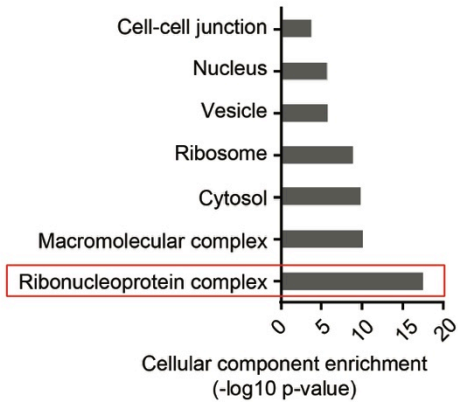
### Figure 4.3: Validation of ZO-1 protein-protein interactions.

A,B) Proteins were immunoprecipitated using ZO-1 antibody from whole BAECs lysate treated or not with VEGF. Then, proteins interactions were detected by immunoblot using specific antibodies against JUP (A) or AIMP1 and RPL23A proteins (B). C) Table showing the interaction fold-change of selected proteins with ZO-1 in mass spectrometry or immunoprecipitation experiments.

A

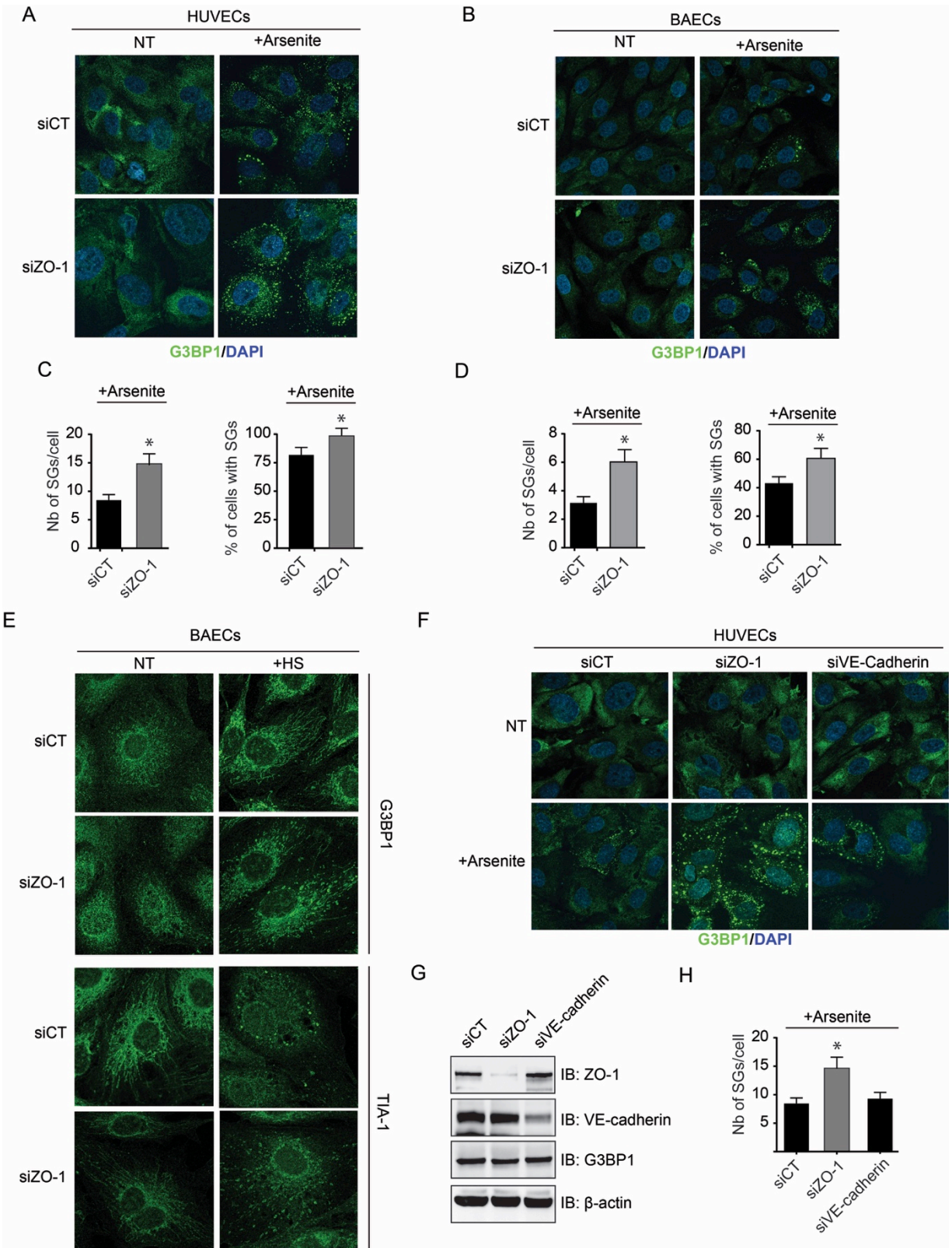


B



**Figure 4.4: Functional analysis of ZO-1 interactome.**

A) The interaction network was subjected to a cluster analysis using the algorithm MCL based on the protein interaction level. The functional enrichment was manually annotated using GO terms of the biological process category and Uniprot database. Green shows the proteins regulated by VEGF treatment. B) ZO-1 interacting proteins were analyzed using the cell component annotation built in STRING database. Selected GO terms significantly enriched in ZO-1 interactome were shown. The ribonucleoprotein complex term highlighted in red was the most enriched (A  $-\log_{10}$  of p-value  $> 1.3$  correspond to P-value  $< 0.05$ ).

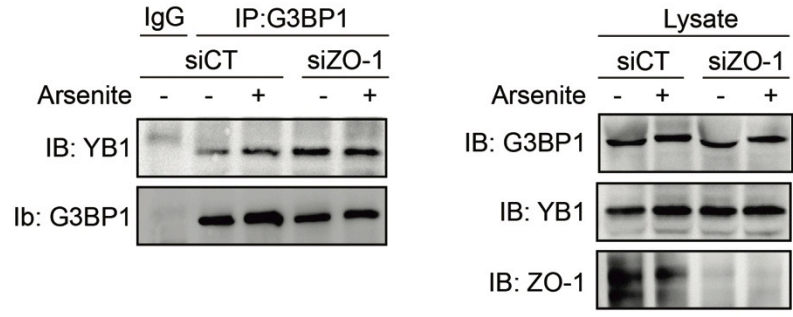




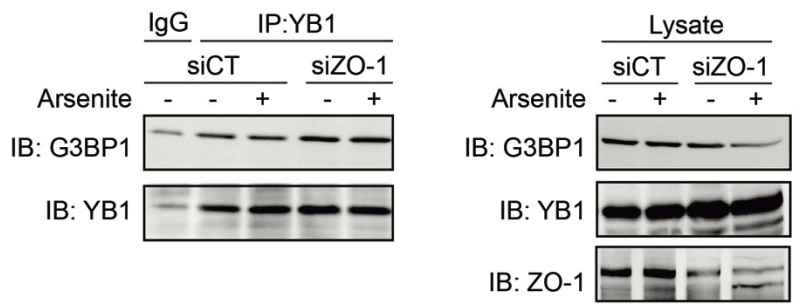
**Figure 4.5: ZO-1 downregulation increases SGs formation.**

HUVECs (A) or BAECs (B) transfected with control or ZO-1 siRNAs were treated or not with arsenite (500  $\mu$ M) for 30 min and SGs were detected by immunofluorescence using G3BP1 antibody. Slides were counterstained with DAPI to detect nuclei. C,D) SGs were quantified by counting the number of SGs in control or ZO-1 downregulated cells and the number of cells containing SGs divided by the total number of cells (see methods). Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments (\*  $P < 0.05$ ). E) BAECs transfected with control or ZO-1 siRNAs were treated or not with heat shock (HS; 44°C) for 30 min and SGs were detected by immunofluorescence using G3BP1 or TIA-1 antibodies. F) HUVECs transfected with siRNAs against control, ZO-1 or VE-cadherin were treated or not with arsenite (500  $\mu$ M) for 30 min and SGs were detected by immunofluorescence using G3BP1 antibody. Slides were counterstained with DAPI to detect nuclei. G) Immunoblot showing protein levels of ZO-1, VE-cadherin and G3BP1 in BAECs transfected with siRNAs against control, ZO-1, or VE-cadherin for 48 hours.  $\beta$ -actin was used as a loading control. H) SGs were quantified by counting the number of SGs in control, ZO-1 or VE-cadherin downregulated cells. Data are represented as mean  $\pm$  SEM of three different experiments (\*  $P < 0.05$ ).

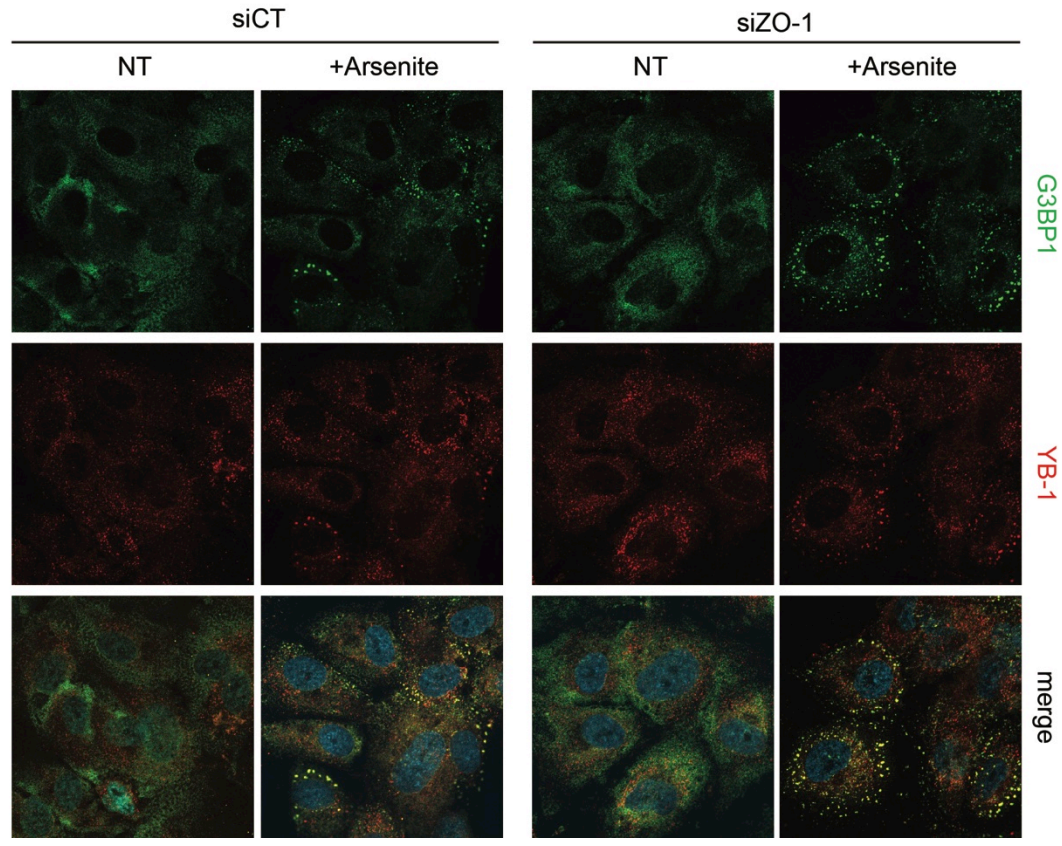
A



B

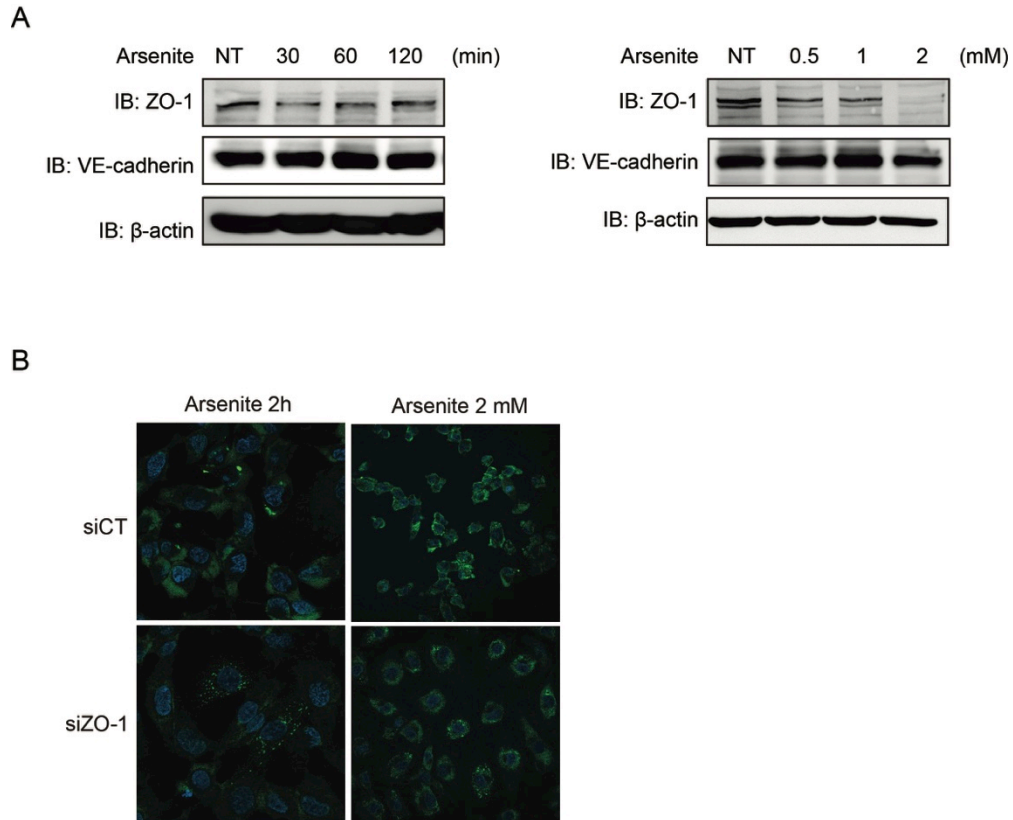


C



**Figure 4.6: ZO-1 downregulation increases G3BP1 and YB-1 interaction during SGs formation.**

A,B) Immunoblots showing co-immunoprecipitation of G3BP1 and YB-1 in BAECs transfected with siRNAs against control and ZO-1 treated or not with arsenite (500  $\mu$ M) for 30 min. C) Colocalization of G3BP1 and YB-1 in BAECs transfected with siRNAs against control and ZO-1 and treated or not with arsenite (500  $\mu$ M) for 30 min. Cells were fixed and stained using G3BP1 and YB-1 antibodies.



**Figure 4.7: ZO-1 downregulation increased SGs formation is protective against stress conditions.**

A) Immunoblot showing protein levels of ZO-1 and VE-cadherin in BAECs treated or not with arsenite (500  $\mu$ M) for the indicated time. B) Immunoblot showing protein levels of ZO-1 and VE-cadherin in BAECs treated or not with different doses of arsenite for 30 min.  $\beta$ -actin was used as a loading control. C) Cell morphology of BAECs transfected with siRNAs against control or ZO-1 were treated with arsenite (500  $\mu$ M) for 2h (left) or arsenite (2 mM) for 30 min (58). SGs were detected by immunofluorescence using G3BP1 antibody. Slides were counterstained with DAPI to detect nuclei.

## **CHAPITRE 5 : DISCUSSION**

Il est bien établi que le VEGF et l'Ang-1, deux facteurs pro-angiogéniques, via leurs récepteurs VEGFR-2 et Tie-2, activent des cascades de signalisation similaires et distinctes lors de l'angiogenèse. Cependant, les nœuds de signalisation uniques qui contribuent à des réponses biologiques spécifiques demeurent inconnus. ZO-1 est une protéine d'échafaudage qui permet le recrutement de différentes protéines à la membrane cytoplasmique au niveau des jonctions intercellulaires. Au cours de mes études doctorales, nous avons utilisé des approches protéomiques afin de révéler des nouveaux acteurs moléculaires qui constituent la base des fonctions cellulaires durant l'angiogenèse. Nous avons investigué par une approche phosphoprotéomique comparative, les voies de signalisation activées dans des cellules endothéliales traitées avec le VEGF ou l'Ang-1. Les résultats ont permis de mettre en évidence un rôle principal de ZO-1 dans la prolifération des cellules endothéliales durant l'angiogenèse. Nos résultats montrent que les niveaux cellulaires de ZO-1 diminuent dans les cellules endothéliales en prolifération et cela a été observé dans des cellules en culture ou lors du développement vasculaire rétinien postnatal chez la souris. D'autre part, nous avons effectué une étude protéomique afin d'analyser le complexe protéique de ZO-1. Nous avons découvert un nouveau lien d'interaction entre ZO-1 et les protéines de liaison à l'ARN.

En résumé, le travail de ma thèse révèle que ZO-1 joue un rôle essentiel dans la prolifération durant l'angiogenèse. Nos études ont aussi montré un lien intéressant entre ZO-1 et les protéines qui lient l'ARN dont la fonction demeure à être défini. Les résultats seront discutés en détails dans la prochaine section.

## **5.1. Le phosphoprotéome des cellules endothéliales traitées par le VEGF ou l'Ang-1**

Au cours des dernières années, les approches protéomiques sont devenues très utilisées par plusieurs groupes pour analyser à grande échelle le comportement des cellules endothéliales suite à de multiples stimuli comme la thrombine et le VEGF (292,293). Ces études ont investigué l'effet de stimuler avec un seul facteur de croissance par étude, et non plusieurs à la fois. En effet, notre étude phosphoprotéomique nous a permis de caractériser pour la première fois de façon comparative les voies de signalisation activées par les deux facteurs de croissance très puissants, le VEGF ou l'Ang-1, dans les cellules endothéliales.

Plusieurs sites de phosphorylation identifiés par notre méthode ont déjà été rapportés et caractérisés comme des sites phosphorylés par la stimulation au VEGF ou à l'Ang-1. Par exemple, il est connu que la phosphorylation des résidus Thr185 et Tyr187 de la protéine MAPK augmente suite à des stimulations aux VEGF et l'Ang-1. La phosphorylation de ces sites sur MAPK est impliquée dans l'activation de la prolifération cellulaire (306). De plus, notre étude a montré que la protéine HSP27, une protéine chaperonne impliquée dans la réponse au stress thermique, est phosphorylée sur le site Ser82. Le site Ser82 de la protéine HSP27 est connu d'être phosphorylé par la protéine kinase D et participe à la migration des cellules endothéliales stimulées par le VEGF (335). Le fait que nous avons identifié des sites de phosphorylation bien caractérisés suite à une stimulation par le VEGF et l'Ang-1 valide nos analyses.

L'identification des sites de phosphorylation sur des protéines dont leurs fonctions sont connues permet de mieux comprendre l'effet de la stimulation au VEGF ou à l'Ang-1 sur des voies de signalisation spécifiques dans les cellules endothéliales. Des sites de phosphorylation

sur des protéines connues d'être impliquées dans la migration cellulaire et la réorganisation du cytosquelette tels que Dock1 (Ser1857) (341), Dock6 (Ser1343) (343), ARHGEF7 (Ser694/673) (344) et eNOS (Ser633/635) (346) ont également été identifiés dans nos analyses. En outre, nous avons observé un groupe de protéines phosphorylées par le VEGF et/ou l'Ang-1 et qui sont liées à la traduction de l'ARNm tels que EIF4B (Ser406), EIF4EBP1 (Ser65), EIF4G1 (Ser1077) et RPS6 (Ser235, Ser236) (336,337,339,340). Ces observations sont en accord avec le rôle du VEGF et/ou de l'Ang-1 dans l'organisation du cytosquelette ou la synthèse des protéines.

Parallèlement, nous avons identifié plusieurs événements de phosphorylation sur des protéines impliquées dans le remodelage des jonctions cellulaires et qui sont affectées par le VEGF et l'Ang-1. Il est bien établi que la fonction des protéines de jonctions est influencée par la phosphorylation. Par exemple, la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF conduit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le résidu Y685 par la kinase Src ou sur le résidu S665 par la kinase PAK2. Cela augmente la perméabilité des cellules endothéliales stimulées par le VEGF (152,153). De même, la phosphorylation des résidus tyrosines de la  $\beta$ -caténine (Y654 et Y142) augmente la perméabilité des cellules endothéliales suite à la dissociation de l'interaction VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine et  $\beta$ -caténine/ $\alpha$ -caténine (159,160). Dans notre étude phosphoprotéomique, nous avons identifié que p120-caténine est phosphorylée sur les sites Ser252 et Ser268 par le VEGF et l'Ang-1. L' $\alpha$ -caténine est phosphorylée sur le site Ser453 par l'Ang-1 et la JUP est phosphorylée sur le site Ser665 par le VEGF. Les protéines p120-caténine,  $\alpha$ -caténine et JUP sont des composantes des jonctions d'ancrage. La fonction de la phosphorylation de ces sites induite par le VEGF ou l'Ang-1 dans les cellules endothéliales demeure inconnue. Il est connu que l'Ang-1 contrecarre les effets de la



perméabilité induite par le VEGF. Donc, il est très plausible que ces phosphorylations affectent la fonction de ces protéines au niveau des jonctions intercellulaires. Il sera très intéressant d'identifier le rôle de ces sites dans la perméabilité cellulaire suite à une stimulation au VEGF et/ou à l'Ang-1. Cependant, une investigation poussée serait nécessaire pour comprendre la fonction biologique associée à chacun de ces sites de phosphorylation et les kinases responsables de la phosphorylation de ces sites par le VEGF ou l'Ang-1 durant l'angiogenèse.

## **5.2. Identification de ZO-1 comme un régulateur important de la prolifération des cellules endothéliales durant l'angiogenèse**

Les protéines de jonctions jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire (146,315). Il est connu que la translocation de la  $\beta$ -caténine et la p120-caténine au noyau et l'interaction avec leur facteur de transcription Tcf/Lef et Kaiso, respectivement, active la prolifération cellulaire (316,317). Parmi les protéines de jonctions, nous avons identifié ZO-1 en tant que nœud d'une voie de signalisation qui lie les jonctions intercellulaires et la prolifération des cellules endothéliales. Il faut souligner que le rôle de ZO-1 dans la prolifération des cellules endothéliales est très peu étudié. Des souris dépourvues du gène codant pour ZO-1 ou ZO-2 sont létales au stade embryonnaire et meurent à cause d'un défaut dans le développement vasculaire du sac vitellin et une diminution de la prolifération cellulaire (222). De plus, ZO-1 participe dans l'activation du cycle cellulaire des cellules épithéliales via son interaction avec le facteur de transcription ZONAB (216). Il est important de noter que le taux cellulaire des protéines de jonctions augmente avec la densité cellulaire

pour inhiber la prolifération cellulaire (146,216). La diminution de l'expression de ZO-1 ou le changement de sa localisation dans plusieurs types de cancers démontre l'implication de ZO-1 dans la progression tumorale (223-225). Notre étude révèle que la diminution de l'expression de ZO-1 est une étape nécessaire pour activer les signaux prolifératives des cellules endothéliales. Il reste à déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels ZO-1 affecte la prolifération dans l'angiogenèse physiologique et tumorale.

### **5.3. L'effet de la phosphorylation sur la fonction de ZO-1**

D'une manière intéressante, nous avons identifié plusieurs sites de phosphorylation sur ZO-1 dans les cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF ou à l'Ang-1. La phosphorylation des protéines de jonctions contrôle leur rôle au niveau des jonctions intercellulaires. Par exemple, il est connu que la phosphorylation de la VE-cadhérine,  $\beta$ -caténine et l'occludine augmente la perméabilité cellulaire (349-351). De même, quelques études ont démontré auparavant que la phosphorylation de ZO-1 influence sa fonction au niveau des jonctions intercellulaires. La phosphorylation de ZO-1 sur des résidus sérines/thréonines semble affectée sa localisation et son rôle dans la formation des jonctions. Il a été montré que la kinase PKC $\epsilon$  stimule la phosphorylation de ZO-1 sur la Ser168 et les sites Thr770 et Thr772. La phosphorylation de ZO-1 sur la Ser168 est nécessaire pour son interaction avec l'intégrine alpha-5 au front migratoire des cellules cancéreuses du poumon (356,357). De plus, la phosphorylation de ZO-1 sur les sites Thr770 et Thr772 par la kinase PKC $\epsilon$  dissocie ZO-1 de l'occludine et augmente la perméabilité des cellules endothéliales (358). De même, l'EGF stimule la phosphorylation de ZO-1 sur des résidus tyrosines et ceci

induit une réorganisation de la distribution de ZO-1 dans les cellules épithéliales (385). Par contre, l'inhibition du MAPK phosphoryle des résidus tyrosines qui par la suite stabilise l'expression de ZO-1 et augmente sa localisation aux jonctions. D'autre part, la déphosphorylation de ZO-1 a aussi été démontrée comme étant un mécanisme important dans la fonction adéquate de ZO-1 au niveau des jonctions intercellulaires. La phosphatase PP2A déphosphoryle les résidus sérines/thréonines de ZO-1 et ceci augmente la perméabilité et la formation des jonctions des cellules épithéliales (386). Par contre, la phosphatase DEP-1 interagit et déphosphoryle les résidus tyrosines de ZO-1 qui provoquent la formation des jonctions (354). En considérant ces études, nous pouvons conclure que la phosphorylation de ZO-1 contrôle sa fonction au niveau des jonctions intercellulaires.

Il est connu que le VEGF et l'Ang-1 ont un effet distinct au niveau de la perméabilité cellulaire qui peut être due à la phosphorylation des protéines de jonctions. De plus, il est important de noter que le VEGF et l'Ang-1 contrôlent de façon différentielle l'expression de ZO-1 ou ZO-2 dans les cellules endothéliales. L'Ang-1 augmente l'expression de ZO-2 pour empêcher l'augmentation de la perméabilité cellulaire stimulée par le VEGF dans les cellules endothéliales des vaisseaux du cerveau (348). Aussi, le VEGF diminue l'expression de ZO-1 en réponse aux produits provenant de la dégradation du glucose (221). Donc, l'identification de la phosphorylation de ZO-1 sur la sérine 617 suite à une stimulation au VEGF et sur les sérines 912 et 927 suite à une stimulation à l'Ang-1 pourra suggérer que le VEGF et l'Ang-1 affectent d'une manière différentielle la fonction de ZO-1 via la phosphorylation de ces sites. Par contre, la fonction de la phosphorylation de ZO-1 sur les sites identifiés demeure inconnue.

ZO-1 est une protéine de la famille des MAGUK composée de trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine homologue à la guanylate kinase (GuK) (194,196). Le domaine GuK est connu pour être impliqué dans les interactions protéiques. Le domaine GuK de ZO-1 est un domaine de liaison avec des protéines de jonctions comme l'occludine, l' $\alpha$ -caténine et cinguline (194,196,203). Nos résultats suggèrent que le résidu Ser617 de ZO-1 est nécessaire afin d'inhiber la prolifération et la perméabilité assurées par le rôle principale de ZO-1. Le résidu Ser617 se situe dans le domaine GuK de la protéine ZO-1. Il est très plausible que la phosphorylation du site Ser617 est nécessaire pour la formation du complexe protéique assurée par ZO-1 au niveau des jonctions durant la formation des nouveaux vaisseaux sanguins. Donc, il est très possible que la phosphorylation du résidu Ser617 sur ZO-1 soit important pour l'interaction de ZO-1 avec des partenaires qui jouent un rôle dans la prolifération ou la perméabilité cellulaire. Nous pouvons aussi spéculer que la phosphorylation du résidu Ser617 est essentielle pour la bonne conformation de la protéine ZO-1. Une mutation qui empêche la phosphorylation ou une déphosphorylation de ce résidu pourrait changer la conformation de la protéine et par suite la fonction antiproliférative de ZO-1.

Il reste à voir pourquoi le VEGF induit la phosphorylation de ZO-1 sur le site Ser617. Il a été montré que le VEGF induit la phosphorylation de ZO-1 et la dissociation des jonctions en corrélation avec son rôle connu dans l'augmentation de la perméabilité cellulaire. Une injection intraoculaire du VEGF stimule la phosphorylation des résidus tyrosines de l'occludine et ZO-1. Ceci contribue à une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à la pathophysiologie de la rétinopathie diabétique et le développement des tumeurs (218). La phosphorylation de ZO-1 est aussi associée à une stimulation par l'hypoxie ou une surexpression du VEGF dans les cellules endothéliales. Cette phosphorylation crée un défaut

dans la formation des jonctions intercellulaires et par la suite, une barrière hémato-encéphalique endommagée dans le cerveau (387). Il est très probable que le VEGF stimule indirectement la phosphorylation du site Ser617 suite à une conséquence de phosphorylation de ZO-1 sur un autre site. Il faut noter que la cinétique de la phosphorylation des protéines est très dynamique. La phosphorylation que nous avons identifiée après une stimulation par le VEGF pour 10 minutes pourrait être rapidement déphosphorylée. En d'autres mots, avec le temps, le VEGF pourrait inhiber la phosphorylation du site Ser617 pour diminuer la perméabilité cellulaire et l'activité antiproliférative de ZO-1.

Le remodelage des jonctions durant l'angiogenèse est très dynamique. La majorité des études discutées auparavant montrent que la phosphorylation de ZO-1 influence la perméabilité cellulaire. Nos résultats révèlent que le site Ser617 de ZO-1 est nécessaire pour la formation des jonctions intercellulaires et la prolifération cellulaire. Donc, nous pourrions imaginer que le contrôle de la phosphorylation du site Ser617 de ZO-1 est important pour la perméabilité vasculaire ou la stimulation des signaux prolifératives durant le développement vasculaire et l'angiogenèse. Finalement, il reste à comprendre le rôle des sites de phosphorylation sur ZO-1 et déterminer les mécanismes cellulaires par lequel VEGF et l'Ang-1 phosphorylent ZO-1 afin de moduler la prolifération et la perméabilité cellulaire.

L'ensemble de ces résultats révèle la complexité de l'étude du rôle de la phosphorylation d'un résidu unique, en réponse à un facteur de croissance tel que le VEGF, impliqué dans de multiples voies de signalisation.

## 5.4. Interaction de ZO-1 avec des protéines de liaison à l'ARN

ZO-1 est une protéine d'échafaudage qui joue un rôle dans la formation des jonctions intercellulaires et dans l'inhibition de la prolifération suite aux contacts intercellulaires (318). Il est connu que ZO-1, via son interaction avec de multiples protéines membranaires et cytoplasmiques, participe à de nombreuses fonctions biologiques. L'analyse de l'interactome de ZO-1 dans notre étude appuie le paradigme que ZO-1 interagit avec plusieurs protéines de jonctions comme la cinguline, ZO-2 et les protéines de myosines. Par contre, nos observations révèlent un nouveau lien entre ZO-1 et les protéines qui lient l'ARN suggérant un rôle pour ZO-1 dans la régulation de la machinerie de l'ARN.

La localisation de l'ARN permet une synthèse efficace de la protéine à un site approprié. Les jonctions des cellules endothéliales sont très flexibles et subissent des remodelages suite à multiples facteurs externes comme le VEGF et l'Ang-1. Afin d'optimiser le remodelage rapide des jonctions, il est très probable qu'il existe une localisation d'une machinerie de traduction près de la membrane plasmique. Ceci pourrait assurer une synthèse plus rapide et efficace des protéines de jonctions quand les jonctions intercellulaires sont dissociées. Il a été déjà rapporté que la localisation de l'ARNm de la  $\beta$ -actine au niveau des lamellipodes dans les fibroblastes permet la traduction locale des transcrits d'actine et assure une migration plus efficace (270). De plus, la traduction locale de la  $\beta$ -actine est nécessaire pour la formation des jonctions des cellules épithéliales (272). Plus récemment, il a été démontré que la localisation apicale de l'ARNm qui code pour ZO-1 est nécessaire pour la formation des jonctions serrées dans les cellules épithéliales (274). Donc, il est plausible que la traduction locale de ZO-1 est aussi importante pour réguler la formation des jonctions dans les cellules endothéliales. Pour cela, une interaction de ZO-1 avec des protéines qui lient

l'ARN et qui assurent le transport de ZO-1 à un endroit spécifique est nécessaire pour un remodelage rapide des jonctions des cellules endothéliales. Aussi, ZO-1 est connue comme une protéine d'échafaudage qui lie plusieurs protéines cytoplasmiques et membranaires. Il est possible aussi que ZO-1 régule la machinerie de la localisation de l'ARN pour participer à un processus biologique spécifique comme la prolifération.

Les protéines qui lient l'ARN peuvent contrôler négativement et positivement l'efficacité de la traduction (260). Selon les conditions, elles vont favoriser ou inhiber la fixation des facteurs d'initiation de la traduction ou des ribosomes de l'ARNm. Il a déjà été montré que JunD inhibe la traduction de ZO-1 et ceci en augmentant l'interaction entre l'ARNm de ZO-1 et la protéine qui lient l'ARN, TIAR (261). L'interaction de ZO-1 avec des protéines de ribosomes identifiées dans notre étude pourrait indiquer une influence de ZO-1 sur la machinerie de la traduction.

## **5.5. ZO-1 joue un rôle essentiel dans la formation des granules de stress**

Dans des conditions de stress, une inhibition de l'initiation de la traduction provoque la formation des granules de stress. Plusieurs études sont parvenues à identifier certaines protéines de liaison à l'ARN comme étant des constituants principaux des granules de stress (374). Nos résultats ont permis l'identification de plusieurs protéines de liaison à l'ARN qui interagissent avec ZO-1 et qui sont impliquées dans la formation des granules de stress comme YBX-1, RBM3, RBMX. Nos résultats révèlent que la diminution de l'expression de ZO-1 augmente la formation des granules de stress à la suite d'un traitement à l'arsenite ou au choc

thermique et cela protège contre le stress cellulaire. Plusieurs évidences montre le rôle protecteur des granules de stress dans des conditions de stress. Durant une angiogenèse physiologique ou pathologique, les cellules endothéliales sont affectées par différents types de stress. La déplétion des protéines de liaison à l'ARN essentielles pour la formation des granules de stress sensibilise les cellules cancéreuses à des divers stress chimiothérapeutiques (389). La diminution de l'expression des marqueurs des granules de stress comme TIA-1, G3BP1 et YB-1 diminue la formation des granules et sensibilise les cellules à la mort cellulaire. Nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression de ZO-1 augmente le nombre des granules de stress afin de protéger les cellules contre la mort cellulaire. Nous pourrions imaginer que les cellules diminuent leur niveaux d'expression de ZO-1 afin d'augmenter la formation des granules de stress et surpasser le stress.

Il faut noter que la formation des granules de stress dépend des partenaires protéiques et de la compétition entre les différents partenaires ou des régulateurs. Récemment, des études ont montrées la préexistence d'un complexe de protéines impliquées dans la formation des granules de stress même en absence du stress. Sous des conditions de stress, ce complexe subit un remodelage d'interaction protéique qui va former des granules de stress (283,284). Il serait possible que ZO-1 interagisse avec des protéines de liaison à l'ARN important pour la formation des granules de stress et ceci empêche certaines protéines de jouer leur rôle dans l'assemblage des granules de stress dans des conditions de stress. Par la suite, la diminution de l'expression de ZO-1 pourra les libérer et augmenter la protection des cellules contre le stress qui est induite par l'augmentation de la formation des granules de stress.



En sommes, la découverte de cette interaction entre une protéine de jonction ZO-1 et des protéines qui lient l'ARN pourrait aider à introduire un nouveau rôle pour ZO-1 dans les cellules endothéliales.

## **5.6. Limites des méthodes utilisées**

Les approches protéomiques par spectrométrie de masse sont devenues très utiles et efficaces pour l'identification et la quantification avec précision des changements du protéome ou du phosphoprotéome dans différents types cellulaires et pour caractériser des complexes protéiques (390). Par contre, la faible abondance de plusieurs protéines/phosphoprotéines ainsi que la nature dynamique et sensible de la phosphorylation augmentent la complexité de la stratégie nécessaire pour étudier le protéome et la phosphoprotéome par spectrométrie de masse. La limite de l'utilisation d'une méthode de quantification sans marquage est que les échantillons ne sont pas analysés simultanément et que les différentes injections influencent la précision de la quantification. D'autre part, il faut noter que les approches protéomique de purification par affinité possèdent une composante biochimique cruciale. Néanmoins, le succès de ces expériences dépend autant de la qualité des étapes biochimiques que celles de l'analyse protéomique en elle-même. Le défi de cette technique est la présence des faux positifs causée par les interactions non spécifiques avec l'anticorps ou le support solide ainsi que d'autres contaminants qui peuvent être présents dans le lysat. Par contre, l'utilisation d'une approche protéomique quantitative sans marquage basée sur la comparaison de l'intensité des peptides/phosphopeptides et l'utilisation de plusieurs répliques biologiques combinées avec une méthode statistique efficace est nécessaire.

L'utilisation de la technique de l'interférence par ARN n'inhibe pas une protéine dans une localisation précise. Donc, nos expériences d'interférence par l'ARN ne ciblent pas ZO-1 dans une localisation particulière. Les cellules endothéliales en prolifération montrent une diminution de l'expression de ZO-1 au niveau des jonctions intercellulaires en quantifiant l'intensité de ZO-1 aux jonctions. Pour cela, nous avons conclu que la diminution de l'expression de ZO-1 au niveau des jonctions augmente la prolifération cellulaire. Par contre, il est toujours possible qu'un autre pool de ZO-1 soit responsable de ces effets. C'est difficile de cibler un bloc de protéines dans une localisation précise, pour cela nous avons utilisé la technique de calcium switch qui sert à diminuer la localisation des protéines sur les jonctions intercellulaires.

## **CHAPITRE 6 : PERSPECTIVES ET CONCLUSION**

## 6.1. Perspectives

La caractérisation des sites de phosphorylation sur des protéines régulées avec le VEGF et/ou l'Ang-1 nous a permis de comprendre l'effet de ces stimulations sur plusieurs voies de signalisation importantes durant l'angiogenèse. D'ailleurs, des nouveaux sites phosphorylés par le VEGF et/ou l'Ang-1 sur plusieurs protéines de jonctions comme p120-caténine (Ser252 par le VEGF; Ser268 par le VEGF et l'Ang-1),  $\alpha$ -caténine (Ser453 par l'Ang-1) et JUP (Ser665 par le VEGF) ont été identifiés. Étant donné que le VEGF et l'Ang-1 déclenchent des voies de signalisation distinctes qui affectent la perméabilité cellulaire, il serait intéressant d'examiner l'effet de ces phosphorylations sur la perméabilité des cellules endothéliales (143). Le VEGF dissocie l'interaction entre la VE-cadhérine et ses partenaires  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ -caténine et p120-caténine afin d'augmenter la perméabilité, par contre l'Ang-1 augmente l'interaction de ce complexe (101,148). Donc, l'association de ces protéines à la VE-cadhérine est cruciale pour l'organisation des jonctions intercellulaires matures et stables. Afin d'investiguer le rôle de la phosphorylation de p120-caténine (Ser252; Ser268),  $\alpha$ -caténine (Ser453) et JUP (Ser665), il serait possible de muter les résidus sérine par des résidus alanine non-phosphorylables. Ces mutants pourraient être exprimés dans les cellules endothéliales et ensuite la capacité de VEGF à induire la perméabilité des cellules endothéliales pourrait être évaluée. De même, ces expériences de mutagenèse dirigées contre ces sites de phosphorylation des protéines de jonctions pourraient être un modèle pour étudier la localisation et l'interaction à la VE-cadhérine. Dans ce modèle, une démonstration de la localisation des protéines mutées non-phosphorylables sur les sites identifiés et leurs associations avec VE-cadhérine pourraient expliquer en partie l'implication de ces sites dans la régulation de la perméabilité cellulaire. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires qui affectent la perméabilité en aval

de la signalisation VEGF/VEGFR2 et Ang-1/Tie2 pourraient être d'intérêts afin de pouvoir contrôler la perméabilité vasculaire durant l'angiogenèse.

Notre étude montre que ZO-1 est phosphorylé sur le résidu Ser617 suite à une stimulation au VEGF. De plus, nous avons déterminé que le résidu Ser617 de ZO-1 joue un rôle essentiel au niveau des jonctions cellulaires et dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales. Pour cela, l'investigation de la phosphorylation de ce site pourrait expliquer son implication dans la prolifération et les jonctions des cellules endothéliales. Il serait pertinent de confirmer que la phosphorylation du sérine 617 de ZO-1 est essentielle pour la formation des jonctions et la prolifération des cellules endothéliales. Pour cela, l'expression de ZO-1 dans les cellules endothéliales où la sérine 617 est mutée pour un acide aspartique (S617D) pourrait être réalisée. D'autre part, il serait intéressant de découvrir le mécanisme cellulaire qui induit la phosphorylation de ce site. L'analyse de prédiction des kinases en utilisant la base de donnée PhosphoNet suggère que PIM1/2/3, PKCs et p70S6Kb peuvent phosphoryler le site Ser617 de ZO-1. L'utilisation des inhibiteurs chimiques contre ces kinases pourrait identifier la kinase responsable de la phosphorylation de ZO-1 induite par le VEGF. Nous avons trouvé que la Ser617 de ZO-1 est essentielle pour la formation des jonctions intercellulaires. Il a été démontré que ZO-1 interagit avec la protéine  $\alpha$ -caténine et qu'elle établit un lien entre les jonctions d'ancrage et la cytosquelette d'actine (318). Afin d'examiner le rôle de la phosphorylation de ZO-1 sur le Ser617 dans la formation des jonctions intercellulaires, il serait intéressant de déterminer, par immunoprécipitation, l'effet de la mutation de la Ser617 de ZO-1 sur l'interaction de ZO-1 avec des constituants des protéines de jonctions d'ancrage comme VE-cadhérine et  $\alpha$ -caténine. Aussi, il serait pertinent d'étudier le lien mécanistique entre la phosphorylation de ZO-1 sur la Ser617 et la prolifération des

cellules endothéliales. Il est connu que ZO-1 interagit avec son facteur de transcription ZONAB afin d'augmenter la prolifération (216). Des études de protéomique pourraient être effectuées afin de déterminer l'effet de la mutation de la Ser617 de ZO-1 sur le changement de l'interactome de ZO-1. Cela permettra d'identifier des partenaires de ZO-1 dépendant de la phosphorylation du site Ser617 et qui sont impliqués dans la prolifération ou d'autres fonctions biologiques importantes durant l'angiogenèse. D'ailleurs, plusieurs études ont montré que la phosphorylation ou l'expression de ZO-1 affecte des processus biologiques importants comme la croissance des tumeurs et la perméabilité vasculaire. Il serait intéressant d'identifier des nouveaux sites de phosphorylation de ZO-1 influencés par le VEGF et l'Ang-1. Pour ce faire, il serait possible d'immunoprécipiter ZO-1 du lysat des cellules endothéliales traités par le VEGF ou l'Ang-1 et investiguer à la suite les sites de phosphorylation par spectrométrie de masse. Ceci pourrait aider à élucider la fonction de ZO-1 dans les cellules endothéliales durant l'angiogenèse.

Nous observons que la diminution de l'expression de ZO-1 est une étape essentielle pour l'augmentation de la prolifération durant l'angiogenèse. Il serait intéressant de déterminer le rôle de ZO-1 dans l'angiogenèse tumorale. Pour étudier ce rôle, des souris dépourvues conditionnellement du gène qui code pour ZO-1 pourraient être générées grâce au système Flox/loxP inducible par injection de tamoxifène qui active la recombinaison Cre. Le modèle de souris où l'expression de ZO-1 est supprimée conditionnellement des cellules endothéliales pourrait permettre de mesurer l'effet de la diminution de l'expression de ZO-1 sur la croissance des tumeurs, la métastase et l'angiogenèse tumorale dans des modèles de xénogreffes des tumeurs chez la souris. Il serait attendu que la suppression de l'expression de

ZO-1 dans les cellules endothéliales augmentera la croissance des tumeurs et induira potentiellement la formation des métastases.

L'interaction de ZO-1 avec les protéines qui lient l'ARN pourrait être une indication que ZO-1 affecte la machinerie de l'ARN. Pour mieux comprendre cette association, les mécanismes impliqués doivent être investigués en profondeur pour évaluer si cette association influence la prolifération affectée par ZO-1 ou d'autres fonctions biologiques. D'ailleurs, étudier le transcriptome des cellules endothéliales dépourvues de ZO-1 serait avantageux afin d'examiner si un nœud moléculaire existe entre les protéines de l'ARN et les gènes impliqués dans la prolifération dont leur expression augmente généralement suite à la délétion de ZO-1. Plusieurs protéines de liaison à l'ARN identifiées dans notre étude ont été trouvées dans des granules de stress. Nos résultats ont montré un rôle de ZO-1 dans la formation des granules de stress et que la diminution de l'expression de ZO-1 semble protéger les cellules contre la mort cellulaire. Il serait possible de diminuer l'expression de ZO-1 par une interférence à l'ARN et investiguer la formation des granules de stress suite à un autre type de stress plus physiologique que l'arsenite comme le stress oxydatif. L'augmentation de la formation des granules de stress semble protéger les cellules contre l'apoptose et par la suite il serait pertinent d'examiner la voie de signalisation des caspases, connue d'être un signe d'apoptose. En plus, si la diminution de l'expression de ZO-1 augmente les granules de stress donc on s'attend à ce que la traduction est inhibée. Donc, il serait intéressant de vérifier la phosphorylation de eIF2a sur la sérine 51 dans des cellules dépourvues de ZO-1. Finalement, il serait pertinent d'investiguer l'aspect physiologique de l'augmentation de la formation des granules de stress induite par la diminution de l'expression de ZO-1 durant le développement vasculaire ou l'angiogenèse pathologique.

## 6.2. Conclusion

Au cours des dernières années, plusieurs études ont investigué les mécanismes cellulaires activés par les facteurs angiogéniques afin de mieux comprendre la biologie des cellules endothéliales. Cette thèse apportera des avancées considérables dans l'identification des nouvelles voies de signalisation importantes dans les cellules endothéliales durant le développement vasculaire et l'angiogenèse.

Dans la première partie de la thèse, nous avons comparé les voies de signalisation activées par le VEGF et l'Ang-1 dans les cellules endothéliales. Nous avons identifié ZO-1 en tant que nœud d'une voie de signalisation qui lie les jonctions intercellulaires et la prolifération des cellules endothéliales. Nous avons trouvé que la diminution de l'expression de ZO-1 est une étape nécessaire pour la prolifération des cellules endothéliales en culture *in vitro*. Nos résultats mettent en évidence des nouvelles voies de signalisation dans les cellules endothéliales. L'identification des nouveaux sites de phosphorylation sur des centaines de protéines de différentes fonctions biologiques fournit un large plateforme d'investigation nécessaire pour comprendre la complexité des voies de signalisation activées par le VEGF et l'Ang-1 dans les cellules endothéliales. Le rôle principal de ZO-1 dans la prolifération des cellules endothéliales et son rôle bien établi comme suppresseur de tumeurs indiquent que ZO-1 est un cible important pour contrôler l'angiogenèse physiologique et tumorale.

Dans la deuxième partie, suite à l'identification par phosphoprotéomique que ZO-1 est phosphorylée sur les résidus Ser617 et Ser912, nous avons caractérisé la fonction de ses résidus. Nos résultats démontrent que le résidu Ser617 de ZO-1 joue un rôle essentiel dans la



formation des jonctions cellulaires et dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales.

Dans la troisième partie, nous avons identifié les partenaires de ZO-1 par une étude protéomique et nous avons découvert un lien entre ZO-1 et les protéines qui lient l'ARN indiquant un rôle pour ZO-1 dans la régulation de la machinerie de l'ARN et la formation des granules de stress. Nos résultats ouvrent un nouveau champ d'investigation. Néanmoins, des études plus approfondies sont nécessaires afin d'examiner l'implication de ces mécanismes moléculaires dans l'angiogenèse physiologique et pathologique et l'implication de ce lien dans la biologie des cellules endothéliales.

Ma thèse de doctorat a permis d'identifier des mécanismes fondamentaux dans les cellules endothéliales et de révéler un rôle inattendu de ZO-1 dans la prolifération et la régulation de l'ARN. Ceci contribuera à la clarification de la fonction de ZO-1 dans la biologie des cellules endothéliales et mènera à une meilleure compréhension du développement vasculaire et de l'angiogenèse.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257
2. Mulvany, M. J., and Aalkjaer, C. (1990) Structure and function of small arteries. *Physiological reviews* **70**, 921-961
3. Campbell, N. A., and Jane B. Reece. (2008),
4. Feletou, M. (2011). in *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*, San Rafael (CA). pp
5. Jaffe, E. A. (1987) Cell biology of endothelial cells. *Human pathology* **18**, 234-239
6. Pries, A. R., Secomb, T. W., and Gaetgens, P. (2000) The endothelial surface layer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **440**, 653-666
7. Bennett, H. S., Luft, J. H., and Hampton, J. C. (1959) Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *The American journal of physiology* **196**, 381-390
8. Cleaver, O., and Melton, D. A. (2003) Endothelial signaling during development. *Nature medicine* **9**, 661-668
9. Florey. (1966) The endothelial cell. *British medical journal* **2**, 487-490
10. Aird, W. C. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* **100**, 158-173
11. McEver, R. P., Moore, K. L., and Cummings, R. D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *The Journal of biological chemistry* **270**, 11025-11028
12. Languino, L. R., Plescia, J., Duperray, A., Brian, A. A., Plow, E. F., Geltosky, J. E., and Altieri, D. C. (1993) Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**, 1423-1434
13. Tanaka, K. A., Key, N. S., and Levy, J. H. (2009) Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesthesia and analgesia* **108**, 1433-1446
14. Nagy, J. A., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (2012) Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006544
15. Mehta, D., and Malik, A. B. (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews* **86**, 279-367
16. Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R., and Malik, A. B. (2008) Regulation of endothelial junctional permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1123**, 134-145
17. Komarova, Y., and Malik, A. B. (2010) Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annual review of physiology* **72**, 463-493
18. Carmeliet, P. (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-936
19. Risau, W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674
20. Herbert, S. P., and Stainier, D. Y. (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 551-564

21. Goldie, L. C., Nix, M. K., and Hirschi, K. K. (2008) Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis* **4**, 257-263
22. Adams, R. H., and Alitalo, K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 464-478
23. Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* **9**, 653-660
24. Asahara, T., and Isner, J. M. (2002) Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Journal of hematology & stem cell research* **11**, 171-178
25. Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 165-177
26. Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalen, M., Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-780
27. Gerhardt, H. (2008) VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* **4**, 241-246
28. Horowitz, A., and Simons, M. (2008) Branching morphogenesis. *Circulation research* **103**, 784-795
29. De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J., and Carmeliet, P. (2009) Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**, 639-649
30. van Hinsbergh, V. W., and Koolwijk, P. (2008) Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular research* **78**, 203-212
31. Kurz, H., Burri, P. H., and Djonov, V. G. (2003) Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society* **18**, 65-70
32. Djonov, V., Baum, O., and Burri, P. H. (2003) Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and tissue research* **314**, 107-117
33. Azzi, S., Hebda, J. K., and Gavard, J. (2013) Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Frontiers in oncology* **3**, 211
34. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985
35. Ferrara, N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews. Cancer* **2**, 795-803
36. Ferrara, N., Schweigerer, L., Neufeld, G., Mitchell, R., and Gospodarowicz, D. (1987) Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5773-5777
37. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309

38. Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312
39. Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006502
40. Yamazaki, Y., Tokunaga, Y., Takani, K., and Morita, T. (2005) C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* **34**, 197-199
41. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular endocrinology* **5**, 1806-1814
42. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry* **266**, 11947-11954
43. Harper, S. J., and Bates, D. O. (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews. Cancer* **8**, 880-887
44. Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T. G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J. D., Whittles, C. E., Mushens, R. E., Gillatt, D. A., Ziche, M., Harper, S. J., and Bates, D. O. (2004) VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer research* **64**, 7822-7835
45. Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S. J. (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer research* **62**, 4123-4131
46. Olofsson, B., Pajusola, K., von Euler, G., Chilov, D., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996) Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *The Journal of biological chemistry* **271**, 19310-19317
47. Li, X., Lee, C., Tang, Z., Zhang, F., Arjunan, P., Li, Y., Hou, X., Kumar, A., and Dong, L. (2009) VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell adhesion & migration* **3**, 322-327
48. Bellomo, D., Headrick, J. P., Silins, G. U., Paterson, C. A., Thomas, P. S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M. M., Tonks, I. D., Grimmond, S. M., Townson, S., Wells, C., Little, M., Cummings, M. C., Hayward, N. K., and Kay, G. F. (2000) Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circulation research* **86**, E29-35
49. Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T. V., Jeltsch, M., Jackson, D. G., Talikka, M., Rauvala, H., Betsholtz, C., and Alitalo, K.

- (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature immunology* **5**, 74-80
50. Baldwin, M. E., Halford, M. M., Roufail, S., Williams, R. A., Hibbs, M. L., Grail, D., Kubo, H., Stacker, S. A., and Achen, M. G. (2005) Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Molecular and cellular biology* **25**, 2441-2449
51. De Falco, S., Gigante, B., and Persico, M. G. (2002) Structure and function of placental growth factor. *Trends in cardiovascular medicine* **12**, 241-246
52. Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T., DiPalma, T., Dewerchin, M., Noel, A., Stalmans, I., Barra, A., Blacher, S., VandenDriessche, T., Ponten, A., Eriksson, U., Plate, K. H., Foidart, J. M., Schaper, W., Charnock-Jones, D. S., Hicklin, D. J., Herbert, J. M., Collen, D., and Persico, M. G. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine* **7**, 575-583
53. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* **93**, 1493-1495
54. Chua, C. C., Hamdy, R. C., and Chua, B. H. (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat heart endothelial cells. *Free radical biology & medicine* **25**, 891-897
55. Brogi, E., Schatteman, G., Wu, T., Kim, E. A., Varticovski, L., Keyt, B., and Isner, J. M. (1996) Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *The Journal of clinical investigation* **97**, 469-476
56. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439
57. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442
58. Gerber, H. P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**, 1149-1159
59. Shibuya, M., and Claesson-Welsh, L. (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research* **312**, 549-560
60. de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L. T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991
61. Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., Aonuma, M., and Shibuya, M. (1996) Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell growth & differentiation : the*

- molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **7**, 213-221
62. Shibuya, M. (2011) Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & cancer* **2**, 1097-1105
  63. Kendall, R. L., and Thomas, K. A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 10705-10709
  64. Peters, K. G., De Vries, C., and Williams, L. T. (1993) Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8915-8919
  65. Jakeman, L. B., Winer, J., Bennett, G. L., Altar, C. A., and Ferrara, N. (1992) Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *The Journal of clinical investigation* **89**, 244-253
  66. Grosskreutz, C. L., Anand-Apte, B., Duplaa, C., Quinn, T. P., Terman, B. I., Zetter, B., and D'Amore, P. A. (1999) Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvascular research* **58**, 128-136
  67. Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M., Shitara, K., Nakahata, T., and Shibuya, M. (2001) Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* **97**, 785-791
  68. Schwartz, J. D., Rowinsky, E. K., Youssoufian, H., Pytowski, B., and Wu, Y. (2010) Vascular endothelial growth factor receptor-1 in human cancer: concise review and rationale for development of IMC-18F1 (Human antibody targeting vascular endothelial growth factor receptor-1). *Cancer* **116**, 1027-1032
  69. Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70
  70. Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9349-9354
  71. Ito, N., Wernstedt, C., Engstrom, U., and Claesson-Welsh, L. (1998) Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *The Journal of biological chemistry* **273**, 23410-23418
  72. Meyer, R. D., Mohammadi, M., and Rahimi, N. (2006) A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 867-875
  73. Kendall, R. L., Wang, G., and Thomas, K. A. (1996) Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochemical and biophysical research communications* **226**, 324-328
  74. Albuquerque, R. J., Hayashi, T., Cho, W. G., Kleinman, M. E., Dridi, S., Takeda, A., Baffi, J. Z., Yamada, K., Kaneko, H., Green, M. G., Chappell, J., Wilting, J., Weich,

- H. A., Yamagami, S., Amano, S., Mizuki, N., Alexander, J. S., Peterson, M. L., Brekken, R. A., Hirashima, M., Capoor, S., Usui, T., Ambati, B. K., and Ambati, J. (2009) Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature medicine* **15**, 1023-1030
75. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66
76. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* **437**, 169-183
77. Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., and Alitalo, K. (1996) VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* **122**, 3829-3837
78. Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V. W., Fang, G. H., Dumont, D., Breitman, M., and Alitalo, K. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3566-3570
79. Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomaki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellstrom, M., Schomber, T., Peltonen, R., Freitas, C., Duarte, A., Isoniemi, H., Laakkonen, P., Christofori, G., Yla-Herttuala, S., Shibuya, M., Pytowski, B., Eichmann, A., Betsholtz, C., and Alitalo, K. (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* **454**, 656-660
80. Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**, 946-949
81. Zhang, L., Zhou, F., Han, W., Shen, B., Luo, J., Shibuya, M., and He, Y. (2010) VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis. *Cell research* **20**, 1319-1331
82. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal* **20**, 2768-2778
83. Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J. H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A., and Claesson-Welsh, L. (2005) VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *The EMBO journal* **24**, 2342-2353
84. Meyer, R. D., Latz, C., and Rahimi, N. (2003) Recruitment and activation of phospholipase Cgamma1 by vascular endothelial growth factor receptor-2 are required for tubulogenesis and differentiation of endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16347-16355

85. Dougher, M., and Terman, B. I. (1999) Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* **18**, 1619-1627
86. Kendall, R. L., Rutledge, R. Z., Mao, X., Tebben, A. J., Hungate, R. W., and Thomas, K. A. (1999) Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *The Journal of biological chemistry* **274**, 6453-6460
87. Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shibuya, M. (2005) Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1076-1081
88. Blanes, M. G., Oubaha, M., Rautureau, Y., and Gratton, J. P. (2007) Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **282**, 10660-10669
89. Lamalice, L., Houle, F., and Huot, J. (2006) Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *The Journal of biological chemistry* **281**, 34009-34020
90. Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F., and Hirsch, E. (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine* **46**, 372-383
91. Thakker, G. D., Hajjar, D. P., Muller, W. A., and Rosengart, T. K. (1999) The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10002-10007
92. Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews* **30**, 193-204
93. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**, 597-601
94. Jiang, B. H., and Liu, L. Z. (2009) PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Advances in cancer research* **102**, 19-65
95. Abedi, H., and Zachary, I. (1997) Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **272**, 15442-15451
96. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., and Jain, R. K. (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2604-2609
97. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605



98. Thibeault, S., Rautureau, Y., Oubaha, M., Faubert, D., Wilkes, B. C., Delisle, C., and Gratton, J. P. (2010) S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Molecular cell* **39**, 468-476
99. Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., and Cheresh, D. A. (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular cell* **4**, 915-924
100. Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M. G. (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* **121**, 2115-2122
101. Gavard, J. (2009) Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS letters* **583**, 1-6
102. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* **15**, 2169-2177
103. Mudgett, J. S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N. A., Yang, L., Gopal, S., and Shen, M. M. (2000) Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10454-10459
104. Eklund, L., and Olsen, B. R. (2006) Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental cell research* **312**, 630-641
105. Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan, T. E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. C., and Yancopoulos, G. D. (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169
106. Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60
107. Valenzuela, D. M., Griffiths, J. A., Rojas, J., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Zhou, H., McClain, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Huang, T., Papadopoulos, N., Maisonpierre, P. C., Davis, S., and Yancopoulos, G. D. (1999) Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1904-1909
108. Kim, I., Kim, J. H., Moon, S. O., Kwak, H. J., Kim, N. G., and Koh, G. Y. (2000) Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene* **19**, 4549-4552
109. Teichert-Kuliszewska, K., Maisonpierre, P. C., Jones, N., Campbell, A. I., Master, Z., Bendeck, M. P., Alitalo, K., Dumont, D. J., Yancopoulos, G. D., and Stewart, D. J. (2001) Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovascular research* **49**, 659-670
110. Das, A., Fanslow, W., Cerretti, D., Warren, E., Talarico, N., and McGuire, P. (2003) Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **83**, 1637-1645

111. Mochizuki, Y., Nakamura, T., Kanetake, H., and Kanda, S. (2002) Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn. *Journal of cell science* **115**, 175-183
112. Kim, K. T., Choi, H. H., Steinmetz, M. O., Maco, B., Kammerer, R. A., Ahn, S. Y., Kim, H. Z., Lee, G. M., and Koh, G. Y. (2005) Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2. *The Journal of biological chemistry* **280**, 20126-20131
113. Davis, S., Papadopoulos, N., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Huang, T., Kovac, L., Xu, A., Leidich, R., Radziejewska, E., Rafique, A., Goldberg, J., Jain, V., Bailey, K., Karow, M., Fandl, J., Samuelsson, S. J., Ioffe, E., Rudge, J. S., Daly, T. J., Radziejewski, C., and Yancopoulos, G. D. (2003) Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nature structural biology* **10**, 38-44
114. Dallabrida, S. M., Ismail, N., Oberle, J. R., Himes, B. E., and Rupnick, M. A. (2005) Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circulation research* **96**, e8-24
115. Schubert, S. Y., Benarroch, A., Monter-Solans, J., and Edelman, E. R. (2011) Primary monocytes regulate endothelial cell survival through secretion of angiopoietin-1 and activation of endothelial Tie2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 870-875
116. Xu, Y., and Yu, Q. (2001) Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix via its linker peptide region. *The Journal of biological chemistry* **276**, 34990-34998
117. Oh, H., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Matsumura, M., and Honda, Y. (1999) Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 15732-15739
118. Yuan, H. T., Khankin, E. V., Karumanchi, S. A., and Parikh, S. M. (2009) Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Molecular and cellular biology* **29**, 2011-2022
119. Lee, H. J., Cho, C. H., Hwang, S. J., Choi, H. H., Kim, K. T., Ahn, S. Y., Kim, J. H., Oh, J. L., Lee, G. M., and Koh, G. Y. (2004) Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1200-1208
120. Milner, C. S., Hansen, T. M., Singh, H., and Brindle, N. P. (2009) Roles of the receptor tyrosine kinases Tie1 and Tie2 in mediating the effects of angiopoietin-1 on endothelial permeability and apoptosis. *Microvascular research* **77**, 187-191
121. Kim, K. L., Shin, I. S., Kim, J. M., Choi, J. H., Byun, J., Jeon, E. S., Suh, W., and Kim, D. K. (2006) Interaction between Tie receptors modulates angiogenic activity of angiopoietin2 in endothelial progenitor cells. *Cardiovascular research* **72**, 394-402
122. Marron, M. B., Hughes, D. P., Edge, M. D., Forder, C. L., and Brindle, N. P. (2000) Evidence for heterotypic interaction between the receptor tyrosine kinases TIE-1 and TIE-2. *The Journal of biological chemistry* **275**, 39741-39746

123. Tsiamis, A. C., Morris, P. N., Marron, M. B., and Brindle, N. P. (2002) Vascular endothelial growth factor modulates the Tie-2:Tie-1 receptor complex. *Microvascular research* **63**, 149-158
124. Saharinen, P., Kerkela, K., Ekman, N., Marron, M., Brindle, N., Lee, G. M., Augustin, H., Koh, G. Y., and Alitalo, K. (2005) Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *The Journal of cell biology* **169**, 239-243
125. Fagiani, E., and Christofori, G. (2013) Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters* **328**, 18-26
126. Singh, H., Tahir, T. A., Alawo, D. O., Issa, E., and Brindle, N. P. (2011) Molecular control of angiopoietin signalling. *Biochemical Society transactions* **39**, 1592-1596
127. Puri, M. C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., and Partanen, J. (1995) The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *The EMBO journal* **14**, 5884-5891
128. Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., and Qin, Y. (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-74
129. Dumont, D. J., Gradwohl, G., Fong, G. H., Puri, M. C., Gertsenstein, M., Auerbach, A., and Breitman, M. L. (1994) Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & development* **8**, 1897-1909
130. Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180
131. Peters, K. G., Kontos, C. D., Lin, P. C., Wong, A. L., Rao, P., Huang, L., Dewhirst, M. W., and Sankar, S. (2004) Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent progress in hormone research* **59**, 51-71
132. Kim, I., Kim, H. G., Moon, S. O., Chae, S. W., So, J. N., Koh, K. N., Ahn, B. C., and Koh, G. Y. (2000) Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circulation research* **86**, 952-959
133. Kontos, C. D., Cha, E. H., York, J. D., and Peters, K. G. (2002) The endothelial receptor tyrosine kinase Tie1 activates phosphatidylinositol 3-kinase and Akt to inhibit apoptosis. *Molecular and cellular biology* **22**, 1704-1713
134. DeBusk, L. M., Hallahan, D. E., and Lin, P. C. (2004) Akt is a major angiogenic mediator downstream of the Ang1/Tie2 signaling pathway. *Experimental cell research* **298**, 167-177
135. Daly, C., Wong, V., Burova, E., Wei, Y., Zabski, S., Griffiths, J., Lai, K. M., Lin, H. C., Ioffe, E., Yancopoulos, G. D., and Rudge, J. S. (2004) Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes & development* **18**, 1060-1071
136. Master, Z., Jones, N., Tran, J., Jones, J., Kerbel, R. S., and Dumont, D. J. (2001) Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *The EMBO journal* **20**, 5919-5928

137. Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L. C., Phng, L. K., Cain, R. J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cutillas, P. R., Smith, A. J., Ridley, A. J., Ruhrberg, C., Gerhardt, H., and Vanhaesebroeck, B. (2008) Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* **453**, 662-666
138. Brindle, N. P., Saharinen, P., and Alitalo, K. (2006) Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circulation research* **98**, 1014-1023
139. Oubaha, M., Lin, M. I., Margaron, Y., Filion, D., Price, E. N., Zon, L. I., Cote, J. F., and Gratton, J. P. (2012) Formation of a PKCzeta/beta-catenin complex in endothelial cells promotes angiopoietin-1-induced collective directional migration and angiogenic sprouting. *Blood* **120**, 3371-3381
140. Kim, I., Moon, S. O., Park, S. K., Chae, S. W., and Koh, G. Y. (2001) Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circulation research* **89**, 477-479
141. Hughes, D. P., Marron, M. B., and Brindle, N. P. (2003) The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circulation research* **92**, 630-636
142. Gavard, J., Patel, V., and Gutkind, J. S. (2008) Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Developmental cell* **14**, 25-36
143. Oubaha, M., and Gratton, J. P. (2009) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood* **114**, 3343-3351
144. Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1997) Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Current opinion in cell biology* **9**, 674-682
145. Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., and Weinstein, B. M. (2009) The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental cell* **16**, 209-221
146. Wallez, Y., and Huber, P. (2008) Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 794-809
147. Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews* **84**, 869-901
148. Dejana, E. (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 261-270
149. Hendrix, M. J., Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Gardner, L. M., Hess, A. R., Kirschmann, D. A., Schatteman, G. C., and Seftor, R. E. (2001) Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 8018-8023
150. Boda-Heggemann, J., Regnier-Vigouroux, A., and Franke, W. W. (2009) Beyond vessels: occurrence and regional clustering of vascular endothelial (VE-)cadherin-containing junctions in non-endothelial cells. *Cell and tissue research* **335**, 49-65

151. Potter, M. D., Barbero, S., and Cheresch, D. A. (2005) Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *The Journal of biological chemistry* **280**, 31906-31912
152. Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., and Huber, P. (2007) Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* **26**, 1067-1077
153. Gavard, J., and Gutkind, J. S. (2006) VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* **8**, 1223-1234
154. Baumer, S., Keller, L., Holtmann, A., Funke, R., August, B., Gamp, A., Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Deutsch, U., and Vestweber, D. (2006) Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* **107**, 4754-4762
155. Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T. O., and Dejana, E. (2003) Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of cell biology* **161**, 793-804
156. Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., and Dejana, E. (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *The Journal of cell biology* **118**, 1511-1522
157. Suzuki, S., Sano, K., and Tanihara, H. (1991) Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell regulation* **2**, 261-270
158. Lilien, J., and Balsamo, J. (2005) The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Current opinion in cell biology* **17**, 459-465
159. Vincent, P. A., Xiao, K., Buckley, K. M., and Kowalczyk, A. P. (2004) VE-cadherin: adhesion at arm's length. *American journal of physiology. Cell physiology* **286**, C987-997
160. Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (2003) p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Molecular and cellular biology* **23**, 2287-2297
161. Zhurinsky, J., Shtutman, M., and Ben-Ze'ev, A. (2000) Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin. *Molecular and cellular biology* **20**, 4238-4252
162. Kowalczyk, A. P., Navarro, P., Dejana, E., Bornslaeger, E. A., Green, K. J., Kopp, D. S., and Borgwardt, J. E. (1998) VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *Journal of cell science* **111** ( Pt 20), 3045-3057
163. Reynolds, A. B. (2007) p120-catenin: Past and present. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 2-7

164. Reynolds, A. B., and Rocznik-Ferguson, A. (2004) Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* **23**, 7947-7956
165. Xiao, K., Garner, J., Buckley, K. M., Vincent, P. A., Chiasson, C. M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2005) p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Molecular biology of the cell* **16**, 5141-5151
166. Xiao, K., Oas, R. G., Chiasson, C. M., and Kowalczyk, A. P. (2007) Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 8-16
167. Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003) A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of cell biology* **163**, 525-534
168. Xiao, K., Allison, D. F., Buckley, K. M., Kottke, M. D., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003) Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *The Journal of cell biology* **163**, 535-545
169. Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, H. E., Behrens, J., Sommer, T., and Birchmeier, W. (2002) Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature cell biology* **4**, 222-231
170. Daniel, J. M. (2007) Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochimica et biophysica acta* **1773**, 59-68
171. Nieset, J. E., Redfield, A. R., Jin, F., Knudsen, K. A., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1997) Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *Journal of cell science* **110 ( Pt 8)**, 1013-1022
172. Rimm, D. L., Koslov, E. R., Kebriaei, P., Cianci, C. D., and Morrow, J. S. (1995) Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8813-8817
173. Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006) Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Developmental cell* **11**, 601-612
174. Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., and Huber, P. (1997) Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 6273-6278
175. Gory-Faure, S., Prandini, M. H., Pointu, H., Rouillot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., and Huber, P. (1999) Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**, 2093-2102
176. Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., and Kemler, R. (1995) Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* **121**, 3529-3537
177. Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bianco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., Kemler, R., and Dejana, E. (2003) The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *The Journal of cell biology* **162**, 1111-1122
178. Oas, R. G., Xiao, K., Summers, S., Wittich, K. B., Chiasson, C. M., Martin, W. D., Grossniklaus, H. E., Vincent, P. A., Reynolds, A. B., and Kowalczyk, A. P. (2010) p120-Catenin is required for mouse vascular development. *Circulation research* **106**, 941-951

179. Venkiteswaran, K., Xiao, K., Summers, S., Calkins, C. C., Vincent, P. A., Pumiglia, K., and Kowalczyk, A. P. (2002) Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin. *American journal of physiology. Cell physiology* **283**, C811-821
180. Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L. L. (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *Journal of cell science* **110 ( Pt 14)**, 1603-1613
181. Huber, J. D., Egleton, R. D., and Davis, T. P. (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in neurosciences* **24**, 719-725
182. Morita, K., Sasaki, H., Furuse, K., Furuse, M., Tsukita, S., and Miyachi, Y. (2003) Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Experimental dermatology* **12**, 289-295
183. Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* **161**, 653-660
184. Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E. H., Kalbacher, H., and Wolburg, H. (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* **100**, 323-331
185. Steinemann, A., Galm, I., Chip, S., Nitsch, C., and Maly, I. P. (2016) Claudin-1, -2 and -3 Are Selectively Expressed in the Epithelia of the Choroid Plexus of the Mouse from Early Development and into Adulthood While Claudin-5 is Restricted to Endothelial Cells. *Frontiers in neuroanatomy* **10**, 16
186. Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., and Imhof, B. A. (2001) Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* **98**, 3699-3707
187. Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., and Macara, I. G. (2000) The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nature cell biology* **2**, 531-539
188. Ebnet, K., Schulz, C. U., Meyer Zu Brickwedde, M. K., Pendl, G. G., and Vestweber, D. (2000) Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *The Journal of biological chemistry* **275**, 27979-27988
189. Anderson, J. M., Stevenson, B. R., Jesaitis, L. A., Goodenough, D. A., and Mooseker, M. S. (1988) Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of cell biology* **106**, 1141-1149
190. Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., and Goodenough, D. A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of cell biology* **103**, 755-766
191. Howarth, A. G., Hughes, M. R., and Stevenson, B. R. (1992) Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *The American journal of physiology* **262**, C461-469

192. Kausalya, P. J., Reichert, M., and Hunziker, W. (2001) Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS letters* **505**, 92-96
193. Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997) Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *The Journal of cell biology* **138**, 181-192
194. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Seminars in cell & developmental biology* **11**, 315-324
195. Funke, L., Dakoji, S., and Bredt, D. S. (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annual review of biochemistry* **74**, 219-245
196. Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H. C. (2010) The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2010**, 402593
197. Harris, B. Z., and Lim, W. A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of cell science* **114**, 3219-3231
198. te Velthuis, A. J., Admiraal, J. F., and Bagowski, C. P. (2007) Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes. *BMC evolutionary biology* **7**, 129
199. Balda, M. S., and Anderson, J. M. (1993) Two classes of tight junctions are revealed by ZO-1 isoforms. *The American journal of physiology* **264**, C918-924
200. Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B. E. (2003) Tight junction proteins. *Progress in biophysics and molecular biology* **81**, 1-44
201. Gonzalez-Mariscal, L., Islas, S., Contreras, R. G., Garcia-Villegas, M. R., Betanzos, A., Vega, J., Diaz-Quinonez, A., Martin-Orozco, N., Ortiz-Navarrete, V., Cerejido, M., and Valdes, J. (1999) Molecular characterization of the tight junction protein ZO-1 in MDCK cells. *Experimental cell research* **248**, 97-109
202. Willott, E., Balda, M. S., Heintzelman, M., Jameson, B., and Anderson, J. M. (1992) Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. *The American journal of physiology* **262**, C1119-1124
203. Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* **147**, 1351-1363
204. Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A., and Anderson, J. M. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry* **273**, 29745-29753
205. Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. (1991) Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3460-3464
206. Jesaitis, L. A., and Goodenough, D. A. (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *The Journal of cell biology* **124**, 949-961
207. Sjodahl, J., Emmer, A., Karlstam, B., Vincent, J., and Roeraade, J. (1998) Separation of proteolytic enzymes originating from Antarctic krill (*Euphausia superba*) by



- capillary electrophoresis. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **705**, 231-241
208. Fanning, A. S., Ma, T. Y., and Anderson, J. M. (2002) Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1835-1837
  209. Fanning, A. S., Little, B. P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z., and Anderson, J. M. (2007) The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Molecular biology of the cell* **18**, 721-731
  210. Huo, L., Wen, W., Wang, R., Kam, C., Xia, J., Feng, W., and Zhang, M. (2011) Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCKbeta complex at the leading edge controls cell migration. *The EMBO journal* **30**, 665-678
  211. Katsube, T., Takahisa, M., Ueda, R., Hashimoto, N., Kobayashi, M., and Togashi, S. (1998) Cortactin associates with the cell-cell junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *The Journal of biological chemistry* **273**, 29672-29677
  212. D'Atri, F., Nadalutti, F., and Citi, S. (2002) Evidence for a functional interaction between cingulin and ZO-1 in cultured cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 27757-27764
  213. Etournay, R., Zwaenepoel, I., Perfettini, I., Legrain, P., Petit, C., and El-Amraoui, A. (2007) Shroom2, a myosin-VIIa- and actin-binding protein, directly interacts with ZO-1 at tight junctions. *Journal of cell science* **120**, 2838-2850
  214. Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S., and Louvard, D. (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10779-10784
  215. Balda, M. S., and Matter, K. (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *The EMBO journal* **19**, 2024-2033
  216. Balda, M. S., Garrett, M. D., and Matter, K. (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *The Journal of cell biology* **160**, 423-432
  217. Ryeom, S. W., Paul, D., and Goodenough, D. A. (2000) Truncation mutants of the tight junction protein ZO-1 disrupt corneal epithelial cell morphology. *Molecular biology of the cell* **11**, 1687-1696
  218. Antonetti, D. A., Barber, A. J., Hollinger, L. A., Wolpert, E. B., and Gardner, T. W. (1999) Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *The Journal of biological chemistry* **274**, 23463-23467
  219. Rieckmann, P., and Engelhardt, B. (2003) Building up the blood-brain barrier. *Nature medicine* **9**, 828-829
  220. Zhu, Y., Shwe, Y., Du, R., Chen, Y., Shen, F. X., Young, W. L., and Yang, G. Y. (2006) Effects of angiopoietin-1 on vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mouse brain. *Acta neurochirurgica. Supplement* **96**, 438-443
  221. Leung, J. C., Chan, L. Y., Li, F. F., Tang, S. C., Chan, K. W., Chan, T. M., Lam, M. F., Wieslander, A., and Lai, K. N. (2005) Glucose degradation products downregulate ZO-

- 1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **20**, 1336-1349
222. Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (2008) Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular biology of the cell* **19**, 2465-2475
223. Hoover, K. B., Liao, S. Y., and Bryant, P. J. (1998) Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *The American journal of pathology* **153**, 1767-1773
224. Cao, Z., Wu, H. K., Bruce, A., Wollenberg, K., and Panjwani, N. (2002) Detection of differentially expressed genes in healing mouse corneas, using cDNA microarrays. *Investigative ophthalmology & visual science* **43**, 2897-2904
225. Martin, T. A., and Jiang, W. G. (2009) Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochimica et biophysica acta* **1788**, 872-891
226. Kaihara, T., Kusaka, T., Nishi, M., Kawamata, H., Imura, J., Kitajima, K., Itoh-Minami, R., Aoyama, N., Kasuga, M., Oda, Y., Hattori, M., and Fujimori, T. (2003) Dedifferentiation and decreased expression of adhesion molecules, E-cadherin and ZO-1, in colorectal cancer are closely related to liver metastasis. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **22**, 117-123
227. Kaihara, T., Kawamata, H., Imura, J., Fujii, S., Kitajima, K., Omotehara, F., Maeda, N., Nakamura, T., and Fujimori, T. (2003) Redifferentiation and ZO-1 reexpression in liver-metastasized colorectal cancer: possible association with epidermal growth factor receptor-induced tyrosine phosphorylation of ZO-1. *Cancer science* **94**, 166-172
228. Kimura, Y., Shiozaki, H., Hirao, M., Maeno, Y., Doki, Y., Inoue, M., Monden, T., Ando-Akatsuka, Y., Furuse, M., Tsukita, S., and Monden, M. (1997) Expression of occludin, tight-junction-associated protein, in human digestive tract. *The American journal of pathology* **151**, 45-54
229. Reichert, M., Muller, T., and Hunziker, W. (2000) The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *The Journal of biological chemistry* **275**, 9492-9500
230. Takai, E., Tan, X., Tamori, Y., Hirota, M., Egami, H., and Ogawa, M. (2005) Correlation of translocation of tight junction protein Zonula occludens-1 and activation of epidermal growth factor receptor in the regulation of invasion of pancreatic cancer cells. *International journal of oncology* **27**, 645-651
231. Polette, M., Gilles, C., Nawrocki-Raby, B., Lohi, J., Hunziker, W., Foidart, J. M., and Birembaut, P. (2005) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase expression is regulated by zonula occludens-1 in human breast cancer cells. *Cancer research* **65**, 7691-7698
232. Kleeff, J., Shi, X., Bode, H. P., Hoover, K., Shrikhande, S., Bryant, P. J., Korc, M., Buchler, M. W., and Friess, H. (2001) Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas* **23**, 259-265

233. Smalley, K. S., Brafford, P., Haass, N. K., Brandner, J. M., Brown, E., and Herlyn, M. (2005) Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion. *The American journal of pathology* **166**, 1541-1554
234. Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004) Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *The Journal of biological chemistry* **279**, 44785-44794
235. Kausalya, P. J., Phua, D. C., and Hunziker, W. (2004) Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Molecular biology of the cell* **15**, 5503-5515
236. Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and Gonzalez-Mariscal, L. (2007) ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Experimental cell research* **313**, 1533-1547
237. Xu, J., Kausalya, P. J., Phua, D. C., Ali, S. M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008) Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Molecular and cellular biology* **28**, 1669-1678
238. Islas, S., Vega, J., Ponce, L., and Gonzalez-Mariscal, L. (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Experimental cell research* **274**, 138-148
239. Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I. A., Weiger, T. M., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2003) The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *The Journal of biological chemistry* **278**, 2692-2700
240. Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004) The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Experimental cell research* **292**, 51-66
241. Traweger, A., Lehner, C., Farkas, A., Krizbai, I. A., Tempfer, H., Klement, E., Guenther, B., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2008) Nuclear Zonula occludens-2 alters gene expression and junctional stability in epithelial and endothelial cells. *Differentiation; research in biological diversity* **76**, 99-106
242. Huerta, M., Munoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramirez, L., Recillas-Targa, F., Gonzalez-Mariscal, L., and Lopez-Bayghen, E. (2007) Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Molecular biology of the cell* **18**, 4826-4836
243. Lechuga, S., Alarcon, L., Solano, J., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2010) Identification of ZASP, a novel protein associated to Zona occludens-2. *Experimental cell research* **316**, 3124-3139
244. Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G. D., Sidhu, S. S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., and Sudol, M. (2010) Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *The Biochemical journal* **432**, 461-472

245. Inoko, A., Itoh, M., Tamura, A., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003) Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **8**, 837-845
246. Wittchen, E. S., Haskins, J., and Stevenson, B. R. (2000) Exogenous expression of the amino-terminal half of the tight junction protein ZO-3 perturbs junctional complex assembly. *The Journal of cell biology* **151**, 825-836
247. Wittchen, E. S., Haskins, J., and Stevenson, B. R. (2003) NZO-3 expression causes global changes to actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells: linking a tight junction protein to Rho GTPases. *Molecular biology of the cell* **14**, 1757-1768
248. Adachi, M., Inoko, A., Hata, M., Furuse, K., Umeda, K., Itoh, M., and Tsukita, S. (2006) Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Molecular and cellular biology* **26**, 9003-9015
249. Evans, W. H., and Martin, P. E. (2002) Gap junctions: structure and function (Review). *Molecular membrane biology* **19**, 121-136
250. Figueroa, X. F., and Duling, B. R. (2009) Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants & redox signaling* **11**, 251-266
251. Kruger, O., Plum, A., Kim, J. S., Winterhager, E., Maxeiner, S., Hallas, G., Kirchhoff, S., Traub, O., Lamers, W. H., and Willecke, K. (2000) Defective vascular development in connexin 45-deficient mice. *Development* **127**, 4179-4193
252. Simon, A. M., and McWhorter, A. R. (2002) Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Developmental biology* **251**, 206-220
253. Walker, D. L., Vacha, S. J., Kirby, M. L., and Lo, C. W. (2005) Connexin43 deficiency causes dysregulation of coronary vasculogenesis. *Developmental biology* **284**, 479-498
254. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008) RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters* **582**, 1977-1986
255. Martin, K. C., and Ephrussi, A. (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719-730
256. Holt, C. E., and Bullock, S. L. (2009) Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* **326**, 1212-1216
257. Hoskins, A. A., and Moore, M. J. (2012) The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends in biochemical sciences* **37**, 179-188
258. Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., and Gorospe, M. (2004) Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal* **23**, 3092-3102
259. Ceolotto, G., De Kreutzenberg, S. V., Cattelan, A., Fabricio, A. S., Squarcina, E., Gion, M., Semplicini, A., Fadini, G. P., and Avogaro, A. (2014) Sirtuin 1 stabilization by HuR represses TNF-alpha- and glucose-induced E-selectin release and endothelial cell adhesiveness in vitro: relevance to human metabolic syndrome. *Clinical science* **127**, 449-461
260. Jackson, R. J., Hellen, C. U., and Pestova, T. V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 113-127

261. Chen, J., Xiao, L., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Bellavance, E., Gorospe, M., and Wang, J. Y. (2008) JunD represses transcription and translation of the tight junction protein zona occludens-1 modulating intestinal epithelial barrier function. *Molecular biology of the cell* **19**, 3701-3712
262. Yu, T. X., Wang, P. Y., Rao, J. N., Zou, T., Liu, L., Xiao, L., Gorospe, M., and Wang, J. Y. (2011) Chk2-dependent HuR phosphorylation regulates occludin mRNA translation and epithelial barrier function. *Nucleic acids research* **39**, 8472-8487
263. St Johnston, D. (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 363-375
264. Kloc, M., Zearfoss, N. R., and Etkin, L. D. (2002) Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* **108**, 533-544
265. Jansen, R. P. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 247-256
266. Lecuyer, E., Yoshida, H., and Krause, H. M. (2009) Global implications of mRNA localization pathways in cellular organization. *Current opinion in cell biology* **21**, 409-415
267. Medioni, C., Mowry, K., and Besse, F. (2012) Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development* **139**, 3263-3276
268. Paquin, N., and Chartrand, P. (2008) Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in cell biology* **18**, 105-111
269. Becalska, A. N., and Gavis, E. R. (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* **136**, 2493-2503
270. Condeelis, J., and Singer, R. H. (2005) How and why does beta-actin mRNA target? *Biology of the cell* **97**, 97-110
271. Lin, A. C., and Holt, C. E. (2007) Local translation and directional steering in axons. *The EMBO journal* **26**, 3729-3736
272. Kourtidis, A., Necela, B., Lin, W. H., Lu, R., Feathers, R. W., Asmann, Y. W., Thompson, E. A., and Anastasiadis, P. Z. (2017) Cadherin complexes recruit mRNAs and RISC to regulate epithelial cell signaling. *The Journal of cell biology* **216**, 3073-3085
273. de Bruin, R. G., van der Veer, E. P., Prins, J., Lee, D. H., Dane, M. J., Zhang, H., Roeten, M. K., Bijkerk, R., de Boer, H. C., Rabelink, T. J., van Zonneveld, A. J., and van Gils, J. M. (2016) The RNA-binding protein quaking maintains endothelial barrier function and affects VE-cadherin and beta-catenin protein expression. *Scientific reports* **6**, 21643
274. Nagaoka, K., Udagawa, T., and Richter, J. D. (2012) CPEB-mediated ZO-1 mRNA localization is required for epithelial tight-junction assembly and cell polarity. *Nature communications* **3**, 675
275. Tourriere, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J. M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of cell biology* **160**, 823-831
276. Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., and Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Molecular biology of the cell* **15**, 5383-5398

277. Kedersha, N., and Anderson, P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochemical Society transactions* **30**, 963-969
278. Takahashi, M., Higuchi, M., Matsuki, H., Yoshita, M., Ohsawa, T., Oie, M., and Fujii, M. (2013) Stress granules inhibit apoptosis by reducing reactive oxygen species production. *Molecular and cellular biology* **33**, 815-829
279. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *The Journal of cell biology* **147**, 1431-1442
280. Anderson, P., Kedersha, N., and Ivanov, P. (2015) Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1849**, 861-870
281. Sheth, U., and Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**, 805-808
282. Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., and Gitler, A. D. (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *The Journal of cell biology* **201**, 361-372
283. Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K. L., Mak, R., Jin, W., Fang, M. Y., Luo, E. C., Krach, F., Yang, D., Sen, A., Fulzele, A., Wozniak, J. M., Gonzalez, D. J., Kankel, M. W., Gao, F. B., Bennett, E. J., Lecuyer, E., and Yeo, G. W. (2018) Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* **172**, 590-604 e513
284. Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D. R., Bashkurov, M., Chen, G. I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S. W. M., Angers, S., Morris, Q., Fabian, M., Cote, J. F., and Gingras, A. C. (2018) High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Molecular cell* **69**, 517-532 e511
285. Kenyon, G. L., DeMarini, D. M., Fuchs, E., Galas, D. J., Kirsch, J. F., Leyh, T. S., Moos, W. H., Petsko, G. A., Ringe, D., Rubin, G. M., Sheahan, L. C., and National Research Council Steering, C. (2002) Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **1**, 763-780
286. Cohen, P. (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature cell biology* **4**, E127-130
287. Pawson, T., and Scott, J. D. (2005) Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends in biochemical sciences* **30**, 286-290
288. Hunter, T. (2000) Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127
289. Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**, 25-29
290. Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., Vinh, J., Vaubourdolle, M., and Baudin, B. (2003) Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics* **3**, 714-723
291. Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., Royer, N., Vinh, J., Pernet, P., Vaubourdolle, M., and Baudin, B. (2005) Proteomics of human umbilical vein endothelial cells applied to etoposide-induced apoptosis. *Proteomics* **5**, 3876-3884

292. Zhuang, G., Yu, K., Jiang, Z., Chung, A., Yao, J., Ha, C., Toy, K., Soriano, R., Haley, B., Blackwood, E., Sampath, D., Bais, C., Lill, J. R., and Ferrara, N. (2013) Phosphoproteomic analysis implicates the mTORC2-FoxO1 axis in VEGF signaling and feedback activation of receptor tyrosine kinases. *Science signaling* **6**, ra25
293. van den Biggelaar, M., Hernandez-Fernaud, J. R., van den Eshof, B. L., Neilson, L. J., Meijer, A. B., Mertens, K., and Zanivan, S. (2014) Quantitative phosphoproteomics unveils temporal dynamics of thrombin signaling in human endothelial cells. *Blood* **123**, e22-36
294. van den Eshof, B. L., Hoogendijk, A. J., Simpson, P. J., van Alphen, F. P. J., Zanivan, S., Mertens, K., Meijer, A. B., and van den Biggelaar, M. (2017) Paradigm of Biased PAR1 (Protease-Activated Receptor-1) Activation and Inhibition in Endothelial Cells Dissected by Phosphoproteomics. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **37**, 1891-1902
295. Gautier, V., Mouton-Barbosa, E., Bouyssie, D., Delcourt, N., Beau, M., Girard, J. P., Cayrol, C., Burlet-Schiltz, O., Monsarrat, B., and Gonzalez de Peredo, A. (2012) Label-free quantification and shotgun analysis of complex proteomes by one-dimensional SDS-PAGE/NanoLC-MS: evaluation for the large scale analysis of inflammatory human endothelial cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, 527-539
296. Pawlowska, Z., Baranska, P., Jerczynska, H., Koziolkiewicz, W., and Cierniewski, C. S. (2005) Heat shock proteins and other components of cellular machinery for protein synthesis are up-regulated in vascular endothelial cell growth factor-activated human endothelial cells. *Proteomics* **5**, 1217-1227
297. Jorge, I., Navarro, P., Martinez-Acedo, P., Nunez, E., Serrano, H., Alfranca, A., Redondo, J. M., and Vazquez, J. (2009) Statistical model to analyze quantitative proteomics data obtained by 18O/16O labeling and linear ion trap mass spectrometry: application to the study of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in endothelial cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **8**, 1130-1149
298. Verano-Braga, T., Schwammle, V., Sylvester, M., Passos-Silva, D. G., Peluso, A. A., Etelvino, G. M., Santos, R. A., and Roepstorff, P. (2012) Time-resolved quantitative phosphoproteomics: new insights into Angiotensin-(1-7) signaling networks in human endothelial cells. *Journal of proteome research* **11**, 3370-3381
299. Zibrova, D., Vandermoere, F., Goransson, O., Peggie, M., Marino, K. V., Knierim, A., Spengler, K., Weigert, C., Viollet, B., Morrice, N. A., Sakamoto, K., and Heller, R. (2017) GFAT1 phosphorylation by AMPK promotes VEGF-induced angiogenesis. *The Biochemical journal* **474**, 983-1001
300. Katanasaka, Y., Asai, T., Naitou, H., Ohashi, N., and Oku, N. (2007) Proteomic characterization of angiogenic endothelial cells stimulated with cancer cell-conditioned medium. *Biological & pharmaceutical bulletin* **30**, 2300-2307
301. Chung, A. S., Lee, J., and Ferrara, N. (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **10**, 505-514
302. Jain, R. K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine* **9**, 685-693
303. Tremolada, G., Del Turco, C., Lattanzio, R., Maestroni, S., Maestroni, A., Bandello, F., and Zerbini, G. (2012) The role of angiogenesis in the development of proliferative

- diabetic retinopathy: impact of intravitreal anti-VEGF treatment. *Experimental diabetes research* **2012**, 728325
304. Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G., and Lappe, R. (2010) Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nature reviews. Cancer* **10**, 575-585
  305. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 359-371
  306. D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J., and Weiner, R. I. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6374-6378
  307. Harfouche, R., Gratton, J. P., Yancopoulos, G. D., Nosedá, M., Karsan, A., and Hussain, S. N. (2003) Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1523-1525
  308. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 30336-30343
  309. Kim, I., Kim, H. G., So, J. N., Kim, J. H., Kwak, H. J., and Koh, G. Y. (2000) Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circulation research* **86**, 24-29
  310. Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R. G., O'Connor, D. S., Li, F., Altieri, D. C., and Sessa, W. C. (2000) Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *The Journal of biological chemistry* **275**, 9102-9105
  311. Jho, D., Mehta, D., Ahmmed, G., Gao, X. P., Tiruppathi, C., Broman, M., and Malik, A. B. (2005) Angiopoietin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca<sup>2+</sup> influx. *Circulation research* **96**, 1282-1290
  312. Wang, Y., Pampou, S., Fujikawa, K., and Varticovski, L. (2004) Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC beta. *Journal of cellular physiology* **198**, 53-61
  313. Matter, K., and Balda, M. S. (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 225-236
  314. Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003) Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* **112**, 535-548
  315. Beckers, C. M., Garcia-Vallejo, J. J., van Hinsbergh, V. W., and van Nieuw Amerongen, G. P. (2008) Nuclear targeting of beta-catenin and p120ctn during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction. *Cardiovascular research* **79**, 679-688
  316. Nelson, W. J., and Nusse, R. (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-1487



317. Zhu, Y. T., Chen, H. C., Chen, S. Y., and Tseng, S. C. (2012) Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *Journal of cell science* **125**, 3636-3648
318. Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., Schwartz, M. A., Matter, K., and Balda, M. S. (2015) ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *The Journal of cell biology* **208**, 821-838
319. Thingholm, T. E., Jorgensen, T. J., Jensen, O. N., and Larsen, M. R. (2006) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides using titanium dioxide. *Nature protocols* **1**, 1929-1935
320. Larsen, M. R., Thingholm, T. E., Jensen, O. N., Roepstorff, P., and Jorgensen, T. J. (2005) Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **4**, 873-886
321. Cantin, G. T., Shock, T. R., Park, S. K., Madhani, H. D., and Yates, J. R., 3rd. (2007) Optimizing TiO<sub>2</sub>-based phosphopeptide enrichment for automated multidimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry* **79**, 4666-4673
322. Cox, J., and Mann, M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **26**, 1367-1372
323. Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., and Mann, M. (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research* **10**, 1794-1805
324. Vizcaino, J. A., Deutsch, E. W., Wang, R., Csordas, A., Reisinger, F., Rios, D., Dianes, J. A., Sun, Z., Farrah, T., Bandeira, N., Binz, P. A., Xenarios, I., Eisenacher, M., Mayer, G., Gatto, L., Campos, A., Chalkley, R. J., Kraus, H. J., Albar, J. P., Martinez-Bartolome, S., Apweiler, R., Omenn, G. S., Martens, L., Jones, A. R., and Hermjakob, H. (2014) ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. *Nature biotechnology* **32**, 223-226
325. Von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., and Snel, B. (2003) STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic acids research* **31**, 258-261
326. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research* **13**, 2498-2504
327. Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Benedito, R., and Adams, R. H. (2010) Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nature protocols* **5**, 1518-1534
328. Hunter, T., and Sefton, B. M. (1980) Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 1311-1315

329. Sharma, K., D'Souza, R. C., Tyanova, S., Schaab, C., Wisniewski, J. R., Cox, J., and Mann, M. (2014) Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell reports* **8**, 1583-1594
330. Hornbeck, P. V., Chabra, I., Kornhauser, J. M., Skrzypek, E., and Zhang, B. (2004) PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics* **4**, 1551-1561
331. Bader, G. D., and Hogue, C. W. (2003) An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC bioinformatics* **4**, 2
332. Stahl, A., Connor, K. M., Sapiha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krahe, N. M., Seaward, M. R., Willett, K. L., Aderman, C. M., Guerin, K. I., Hua, J., Lofqvist, C., Hellstrom, A., and Smith, L. E. (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science* **51**, 2813-2826
333. Cox, J., and Mann, M. (2011) Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annual review of biochemistry* **80**, 273-299
334. Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648
335. Evans, I. M., Britton, G., and Zachary, I. C. (2008) Vascular endothelial growth factor induces heat shock protein (HSP) 27 serine 82 phosphorylation and endothelial tubulogenesis via protein kinase D and independent of p38 kinase. *Cellular signalling* **20**, 1375-1384
336. van Gorp, A. G., van der Vos, K. E., Brenkman, A. B., Bremer, A., van den Broek, N., Zwartkruis, F., Hershey, J. W., Burgering, B. M., Calkhoven, C. F., and Coffey, P. J. (2009) AGC kinases regulate phosphorylation and activation of eukaryotic translation initiation factor 4B. *Oncogene* **28**, 95-106
337. Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., and Sonenberg, N. (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development* **13**, 1422-1437
338. Shin, S., Wolgamott, L., Tcherkezian, J., Vallabhapurapu, S., Yu, Y., Roux, P. P., and Yoon, S. O. (2014) Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates protein synthesis and cell proliferation through the regulation of translation initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene* **33**, 1690-1699
339. Dobrikov, M. I., Shveygert, M., Brown, M. C., and Gromeier, M. (2014) Mitotic phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4G1 (eIF4G1) at Ser1232 by Cdk1:cyclin B inhibits eIF4A helicase complex binding with RNA. *Molecular and cellular biology* **34**, 439-451
340. Roux, P. P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M. K., Cohen, M. S., Taunton, J., Sonenberg, N., and Blenis, J. (2007) RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *The Journal of biological chemistry* **282**, 14056-14064
341. Cote, J. F., and Vuori, K. (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *Journal of cell science* **115**, 4901-4913
342. Laurin, M., and Cote, J. F. (2014) Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes & development* **28**, 533-547

343. Shaheen, R., Faqeih, E., Sunker, A., Morsy, H., Al-Sheddi, T., Shamseldin, H. E., Adly, N., Hashem, M., and Alkuraya, F. S. (2011) Recessive mutations in DOCK6, encoding the guanidine nucleotide exchange factor DOCK6, lead to abnormal actin cytoskeleton organization and Adams-Oliver syndrome. *American journal of human genetics* **89**, 328-333
344. Kuo, J. C., Han, X., Hsiao, C. T., Yates, J. R., 3rd, and Waterman, C. M. (2011) Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for beta-Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nature cell biology* **13**, 383-393
345. Yu, H. W., Chen, Y. Q., Huang, C. M., Liu, C. Y., Chiou, A., Wang, Y. K., Tang, M. J., and Kuo, J. C. (2015) beta-PIX controls intracellular viscoelasticity to regulate lung cancer cell migration. *Journal of cellular and molecular medicine*
346. Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2000) Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circulation research* **86**, 892-896
347. Charpentier, E., Lavker, R. M., Acquista, E., and Cowin, P. (2000) Plakoglobin suppresses epithelial proliferation and hair growth in vivo. *J Cell Biol* **149**, 503-520
348. Lee, S. W., Kim, W. J., Jun, H. O., Choi, Y. K., and Kim, K. W. (2009) Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2. *International journal of molecular medicine* **23**, 279-284
349. Murakami, T., Frey, T., Lin, C., and Antonetti, D. A. (2012) Protein kinase cbeta phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability in vivo. *Diabetes* **61**, 1573-1583
350. Murakami, T., Felinski, E. A., and Antonetti, D. A. (2009) Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *The Journal of biological chemistry* **284**, 21036-21046
351. Sidibe, A., and Imhof, B. A. (2014) VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. *Nature immunology* **15**, 215-217
352. Stuart, R. O., and Nigam, S. K. (1995) Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6072-6076
353. Chen, Y., Lu, Q., Schneeberger, E. E., and Goodenough, D. A. (2000) Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* **11**, 849-862
354. Sallee, J. L., and Burridge, K. (2009) Density-enhanced phosphatase 1 regulates phosphorylation of tight junction proteins and enhances barrier function of epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **284**, 14997-15006
355. Chidiac, R., Zhang, Y., Tessier, S., Faubert, D., Delisle, C., and Gratton, J. P. (2016) Comparative Phosphoproteomics Analysis of VEGF and Angiopoietin-1 Signaling Reveals ZO-1 as a Critical Regulator of Endothelial Cell Proliferation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **15**, 1511-1525
356. Tuomi, S., Mai, A., Nevo, J., Laine, J. O., Vilkki, V., Ohman, T. J., Gahmberg, C. G., Parker, P. J., and Ivaska, J. (2009) PKCepsilon regulation of an alpha5 integrin-ZO-1

- complex controls lamellae formation in migrating cancer cells. *Science signaling* **2**, ra32
357. Hamalisto, S., Pouwels, J., de Franceschi, N., Saari, M., Ivarsson, Y., Zimmermann, P., Brech, A., Stenmark, H., and Ivaska, J. (2013) A ZO-1/alpha5beta1-integrin complex regulates cytokinesis downstream of PKCepsilon in NCI-H460 cells plated on fibronectin. *PloS one* **8**, e70696
  358. Chattopadhyay, R., Dyukova, E., Singh, N. K., Ohba, M., Mobley, J. A., and Rao, G. N. (2014) Vascular endothelial tight junctions and barrier function are disrupted by 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid partly via protein kinase C epsilon-mediated zona occludens-1 phosphorylation at threonine 770/772. *The Journal of biological chemistry* **289**, 3148-3163
  359. McNeil, E., Capaldo, C. T., and Macara, I. G. (2006) Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Molecular biology of the cell* **17**, 1922-1932
  360. Le Guelte, A., and Gavard, J. (2011) Role of endothelial cell-cell junctions in endothelial permeability. *Methods in molecular biology* **763**, 265-279
  361. Murakami, M., and Simons, M. (2009) Regulation of vascular integrity. *Journal of molecular medicine* **87**, 571-582
  362. Hartsock, A., and Nelson, W. J. (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* **1778**, 660-669
  363. Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E. S., Hibbard, J., and Stevenson, B. R. (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *The Journal of cell biology* **141**, 199-208
  364. Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *The Journal of biological chemistry* **274**, 5981-5986
  365. Schmidt, A., Utepbergenov, D. I., Mueller, S. L., Beyermann, M., Schneider-Mergener, J., Krause, G., and Blasig, I. E. (2004) Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61**, 1354-1365
  366. Balda, M. S., and Matter, K. (2008) Tight junctions at a glance. *Journal of cell science* **121**, 3677-3682
  367. Muller, S. L., Portwich, M., Schmidt, A., Utepbergenov, D. I., Huber, O., Blasig, I. E., and Krause, G. (2005) The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha-catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *The Journal of biological chemistry* **280**, 3747-3756
  368. Yamamoto, T., Harada, N., Kano, K., Taya, S., Canaani, E., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Ide, C., and Kaibuchi, K. (1997) The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *The Journal of cell biology* **139**, 785-795
  369. Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R. R., Pestell, R., Matter, K., and Balda, M. S. (2006) Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial

- morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Molecular and cellular biology* **26**, 2387-2398
370. Wang, W., Dentler, W. L., and Borchardt, R. T. (2001) VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **280**, H434-440
371. Hogan, D. J., Riordan, D. P., Gerber, A. P., Herschlag, D., and Brown, P. O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS biology* **6**, e255
372. Mitchell, S. F., and Parker, R. (2014) Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Molecular cell* **54**, 547-558
373. Buchan, J. R., and Parker, R. (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell* **36**, 932-941
374. Bley, N., Lederer, M., Pfalz, B., Reinke, C., Fuchs, T., Glass, M., Moller, B., and Huttelmaier, S. (2015) Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic acids research* **43**, e26
375. Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B., and Kendrick-Jones, J. (1988) Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* **333**, 272-276
376. Giannotta, M., Trani, M., and Dejana, E. (2013) VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell* **26**, 441-454
377. Hayashi, K., Ishikawa, R., Kawai-Hirai, R., Takagi, T., Taketomi, A., and Shirao, T. (1999) Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin. *Experimental cell research* **253**, 673-680
378. Quevillon, S., Robinson, J. C., Berthonneau, E., Siatecka, M., and Mirande, M. (1999) Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *Journal of molecular biology* **285**, 183-195
379. Danno, S., Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Xue, J. H., Itoh, K., Matsuda, T., and Fujita, J. (1997) Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochemical and biophysical research communications* **236**, 804-807
380. Fredericks, A. M., Cygan, K. J., Brown, B. A., and Fairbrother, W. G. (2015) RNA-Binding Proteins: Splicing Factors and Disease. *Biomolecules* **5**, 893-909
381. Ma, A. S., Moran-Jones, K., Shan, J., Munro, T. P., Snee, M. J., Hoek, K. S., and Smith, R. (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **277**, 18010-18020
382. Croft, D., O'Kelly, G., Wu, G., Haw, R., Gillespie, M., Matthews, L., Caudy, M., Garapati, P., Gopinath, G., Jassal, B., Jupe, S., Kalatskaya, I., Mahajan, S., May, B., Ndegwa, N., Schmidt, E., Shamovsky, V., Yung, C., Birney, E., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., and Stein, L. (2011) Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic acids research* **39**, D691-697
383. Blower, M. D. (2013) Molecular insights into intracellular RNA localization. *International review of cell and molecular biology* **302**, 1-39

384. Gutierrez, N., Eromobor, I., Petrie, R. J., Vedula, P., Cruz, L., and Rodriguez, A. J. (2014) The beta-actin mRNA zipcode regulates epithelial adherens junction assembly but not maintenance. *Rna* **20**, 689-701
385. Van Itallie, C. M., Balda, M. S., and Anderson, J. M. (1995) Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junction protein ZO-1 in A431 cells. *Journal of cell science* **108** ( Pt 4), 1735-1742
386. Nunbhakdi-Craig, V., Machleidt, T., Ogris, E., Bellotto, D., White, C. L., 3rd, and Sontag, E. (2002) Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *The Journal of cell biology* **158**, 967-978
387. Nico, B., Mangieri, D., Crivellato, E., Longo, V., De Giorgis, M., Capobianco, C., Corsi, P., Benagiano, V., Roncali, L., and Ribatti, D. (2007) HIF activation and VEGF overexpression are coupled with ZO-1 up-phosphorylation in the brain of dystrophic mdx mouse. *Brain pathology* **17**, 399-406
388. Mokaş, S., Mills, J. R., Garreau, C., Fournier, M. J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., Pelletier, J., and Mazroui, R. (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Molecular biology of the cell* **20**, 2673-2683
389. Fournier, M. J., Coudert, L., Mellaoui, S., Adjibade, P., Gareau, C., Cote, M. F., Sonenberg, N., Gaudreault, R. C., and Mazroui, R. (2013) Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation. *Molecular and cellular biology* **33**, 2285-2301
390. Roux, P. P., and Thibault, P. (2013) The coming of age of phosphoproteomics--from large data sets to inference of protein functions. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **12**, 3453-3464

