

Université de Montréal

Rôles des protéines d'échafaudage Gab
dans la signalisation et l'angiogenèse médiées par le VEGF

Par Christine Caron

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de médecine

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

octobre, 2014

© Christine Caron, 2014

Résumé

La protéine d'échafaudage Gab1 amplifie la signalisation de plusieurs récepteurs à fonction tyrosine kinase (RTK). Entre autres, elle promeut la signalisation du VEGFR2, un RTK essentiel à la médiation de l'angiogenèse via le VEGF dans les cellules endothéliales. En réponse au VEGF, Gab1 est phosphorylé sur tyrosine, ce qui résulte en la formation d'un complexe de protéines de signalisation impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration des cellules endothéliales. Gab1 est un modulateur essentiel de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, malgré l'importance de Gab1 dans les cellules endothéliales, les mécanismes moléculaires impliqués dans la médiation de ses fonctions, demeurent mal définis et la participation du second membre de la famille, Gab2, reste inconnue.

Dans un premier temps, nous avons démontré que tout comme Gab1, Gab2 est phosphorylé sur tyrosine, qu'il s'associe de façon similaire avec des protéines de signalisation et qu'il médie la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Cependant, contrairement à Gab1, Gab2 n'interagit pas avec le VEGFR2 et n'est pas essentiel pour l'activation d'Akt et la promotion de la survie cellulaire. En fait, nous avons constaté que l'expression de Gab2 atténue l'expression de Gab1 et l'activation de la signalisation médiée par le VEGF. Ainsi, Gab2 semble agir plutôt comme un régulateur négatif des signaux pro-angiogéniques induits par Gab1.

La migration cellulaire est une des étapes cruciales de l'angiogenèse. Nous avons démontré que Gab1 médie l'activation de la GTPase Rac1 via la formation et la localisation d'un complexe protéique incluant la GEF VAV2, la p120Caténine et la Cortactine aux lamellipodes des cellules endothéliales en réponse au VEGF. De plus, nous montrons que l'assemblage de ce complexe corrèle avec la capacité du VEGF à induire l'invasion des cellules endothéliales et le bourgeonnement de capillaires, deux phénomènes essentiels au processus angiogénique.

La régulation des RhoGTPases est également régulée par des inactivateurs spécifiques les « Rho GTPases activating proteins », ou GAPs. Nous décrivons ici pour la première fois le rôle de la GAP CdGAP dans les cellules endothéliales et démontrons son importance dans la médiation de la signalisation du VEGF via la phosphorylation sur tyrosine de Gab1 et l'activation des RhoGTPases Rac1 et Cdc42. Ainsi, dû à son importance sur l'activation de voies de signalisation du VEGF, CdGAP représente un régulateur crucial de la promotion de diverses activités biologiques essentielles à

l'angiogenèse telles que la migration cellulaire, et le bourgeonnement de capillaires *in vitro* et d'aortes de souris *ex vivo*. De plus, les embryons de souris CdGAP KO présentent des hémorragies et de l'œdème, et ces défauts vasculaires pourraient être responsables de la mortalité de 44% des souris CdGAP knock-out attendues.

Nos études amènent donc une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires induits par le VEGF et démontrent l'implication centrale de Gab1 et des régulateurs des RhoGTPases dans la promotion de l'angiogenèse. Cette meilleure compréhension pourrait mener à l'identification de nouvelles cibles ou approches thérapeutiques afin d'améliorer le traitement des patients souffrant de maladies associées à une néovascularisation incontrôlée telles que le cancer.

Mots-clés :

Angiogenèse, Gab1, Gab2, CdGAP, Migration Cellulaire, Cellules Endothéliales, VEGF, Cortactine, VAV2, cytosquelette d'actine

Abstract

The Gab1 scaffolding protein allows signaling of multiple Receptors Tyrosine Kinase (RTKs). Among other things, it allows VEGFR2 signaling, an essential RTK to mediate angiogenesis via VEGF in endothelial cells. In response to VEGF, Gab1 is tyrosine phosphorylated, resulting in the formation of a signaling protein complex involved in the remodeling of the actin cytoskeleton and the migration of endothelial cells. Gab1 is a key modulator of angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. However, despite the importance of Gab1 in endothelial cells, the molecular mechanisms involved in mediating its functions remain poorly defined and the participation of the second family member, Gab2, remains unknown.

Initially, we demonstrated that as with Gab1, Gab2 is tyrosine phosphorylated, it associates with similar signaling proteins and induces cell migration in response to VEGF in endothelial cells. However, Gab2 does not interact with VEGFR2 and is not essential for the activation of Akt and the promotion of cell survival. In fact, we found that the expression of Gab2 attenuates the expression of Gab1 and activation of VEGF-mediated signaling. In light of these results, we propose that in endothelial cells stimulated with VEGF, Gab2 acts as a negative regulator of pro-angiogenic signals induced by Gab1.

Cell migration is a crucial step in angiogenesis, though, few studies have investigated the involvement of Gab1 in regulating different molecular mechanisms for actin remodeling leading to endothelial cell migration. We demonstrated that Gab1 mediates activation of Rac1 GTPase via the formation and localization of a protein complex including the GEF VAV2, p120 Catenin and Cortactin to lamellipodia of endothelial cells in response to VEGF. Furthermore, we show that the assembly of this complex correlates with the ability of VEGF to induce endothelial cell invasion and capillary sprouting, phenomena essential to the angiogenic process.

RhoGTPases are also regulated by specific inactivators, "Rho GTPase activating proteins" or GAPs. The involvement of GAPs in promoting angiogenesis is relatively poorly described. Here we describe for the first time the role of the GAP CdGAP in endothelial cells and demonstrate its importance in mediating VEGF signaling via tyrosine phosphorylation of Gab1 and activation of Rac1 and Cdc42

RhoGTPases. Due to its importance in the activation of signaling pathways critical in VEGF signaling, CdGAP is thus an important protein for the regulation of various essential biological activities such as cell migration, sprouting and therefore *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis. In addition, embryos of CdGAP knock-out mice exhibit vascular defects, excessive branching vessels, haemorrhages and edema which may be responsible for the 44% mortality seen in CdGAP knock-out mice expected.

Our studies contribute to a better understanding of the molecular mechanisms induced by VEGF and demonstrate the central involvement of Gab1 and regulators of RhoGTPases in promoting angiogenesis. This understanding could lead to the identification of new targets and therapeutic approaches to improve the treatment of patients with uncontrolled neovascularization associated with diseases such as cancer.

Keywords :

Angiogenesis, Gab1, Gab2, CdGAP, Cell Migration, Endothelial Cells, VEGF, Cortactin, VAV2, actin cytoskeleton

Table des matières

Résumé	ii
Mots-clés :	iii
Abstract	iv
Keywords :	v
Table des matières.....	vi
Liste des Figures.....	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 : Introduction	17
1. L'angiogenèse.....	17
1.1 L'angiogenèse tumorale.....	20
1.2 Les facteurs de croissance angiogénique	20
1.2.1 Le VEGF	21
1.2.2 Les Récepteurs à Fonction Tyrosine Kinase (RTK)	23
1.2.2.1 Le VEGFR1	23
1.2.2.2 Le VEGFR2	24
1.2.2.3 Le VEGFR3	25
1.3 Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'angiogenèse	26
1.3.1 La régulation de la cellule meneuse lors de l'angiogenèse	28
1.4 La signalisation cellulaire dépendante du VEGF.....	29
1.4.1 La prolifération cellulaire	30
1.4.2 La survie cellulaire	30
1.4.3 La perméabilité vasculaire	31
1.4.4 La migration cellulaire	33
2. Les protéines d'échafaudage	36
2.1 Les protéines d'échafaudage de la famille Gab1.....	37
2.1.1 Gab1	38
2.1.2 Gab2	42
2.1.3 Gab3	45

3. La régulation du cytosquelette d'actine par les RhoGTPases	46
3.1 Les RasGTPases	47
3.1.1 Les RhoGTPases.....	48
3.1.1.1 La RhoGTPase Rac	50
3.1.1.2 La RhoGTPase Cdc42	51
3.1.1.3 La RhoGTPase RhoA	54
3.2 Les mécanismes de la polymérisation d'actine	55
3.2.1 Les effecteurs des RhoGTPases.....	59
3.2.1.1 La Cortactine	60
3.2.1.1.1 L'implication de la Cortactine dans la formation d'invadopodes dans le cancer	61
3.2.1.1.2 La Cortactine et l'angiogenèse	62
3.3 La régulation des RhoGTPases	63
3.3.1 Les GEFs.....	63
3.3.1.1 Les GEFs DH-PH	63
3.3.1.1.1 La GEF VAV2	64
3.3.1.1.2 La GEF β -PIX.....	67
3.3.1.2 Les GEFs DOCK	68
3.3.2 Les GAPs	70
3.3.2.1 La GAP CdGAP	70
3.3.3 Les GDIs.....	72
3.4 La régulation du cytosquelette d'actine par Gab1	73
3.5 Le rôle de Gab1 dans l'angiogenèse <i>in vivo</i>	75
Travaux précédents et objectifs de la thèse	76

Chapitre 2 : Non-Redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells	82
Abstract.....	83
1. Introduction	84
2. Materials and methods	87
3. Results.....	91
4. Discussion.....	96
5. Conclusions	99
Figure legends	102

Chapitre 3 : The scaffolding adapter Gab1 mediates the interaction of p120catenin with the VAV2 guanine nucleotide exchange factor and Cortactin to promote VEGF-induced Rac1 activation and endothelial cell invasion.....	113
Abstract.....	114
1. Introduction	115
2. Materials and Methods.....	117
3. Results.....	121
4. Discussion.....	127
5. Conclusion.....	132
Figure Legends	133
 Chapitre 4 : CdGAP Regulates Vascular Development and VEGF-Mediated Signaling in Angiogenesis.....	149
Abstract.....	150
1. Introduction	151
2. Materials and Methods.....	154
3. Results.....	159
4. Discussion.....	164
5. Conclusion.....	169
Figure legends	170
 Chapitre 5 : Discussion.....	181
 Chapitre 6 : Références.....	212

Liste des Figures

Chapitre 1

Figure 1. La formation d'un nouveau capillaire par angiogenèse	19
Figure 2. Le VEGF et les récepteurs	26
Figure 3. Les étapes de l'angiogenèse : formation de nouveaux capillaires.....	28
Figure 4. La signalisation cellulaire régulée par le VEGF.....	32
Figure 5. La signalisation cellulaire régulée par le VEGF via le VEGFR2 pour induire la migration cellulaire endothéliale.	35
Figure 6. Les protéines d'échafaudage de la famille Gab	38
Figure 7. Les structures d'actine régulées par les RhoGTPases chez les cellules endothéliales.....	46
Figure 8. La régulation des RhoGTPases.....	49
Figure 9 : Les mécanismes de polymérisation d'actine	58
Figure 10. La structure de la Cortactine.	62
Figure 11. La GEF VAV2.....	67
Figure 12. La GAP CdGAP.....	72

Chapitre 2

Figure 1 : Gab2 is tyrosine phosphorylated and associates with PI3K and SHP2 in VEGF-stimulated endothelial cells.....	106
Figure 2 : Grb2 binding sites mediate Gab2 tyrosine phosphorylation, but not via its stable association to VEGFR2 protein complexes	106
Figure 3 : Gab2 is involved in the promotion of VEGF-dependent cell migration.	107
Figure 4 : The depletion of Gab2 promotes Gab1-dependent signalling and increases Gab1 protein levels.....	108
Figure 5 : Re-expression of Gab2 in Gab2 ^{-/-} MEFs decreases activation of signalling proteins and Gab1 protein levels.	109
Figure 6 : Gab1, but not Gab2, mediates endothelial cell survival in response to VEGF.....	110
Figure 7 : Gab1 tyrosine phosphorylation downstream of VEGFR2 Y801 and Y1214 correlates with Akt activation.....	111

Chapitre 3

Figure 1 : Gab1 mediates the activation of Rac1 and the phosphorylation of the GEF VAV2 in VEGF-stimulated endothelial cells.....	137
Figure 2 : Gab1 associates with p120 Catenin and VAV2 and promotes their association in response to VEGF stimulation.	138
Figure 3 : Gab1 mediates the association of Cortactin to p120Catenin, and is essential for Cortactin phosphorylation.	139
Figure 4 : Gab1 is important for the localization of Cortactin, VAV2, and p120 Catenin in VEGF-induced membrane protrusions.....	140
Figure 5 : Gab1 is important for invasion and sprouting in response to VEGF.....	141
Figure 6 : The VEGF-induced phosphorylation of Cortactin and endothelial cell invasion are dependent on VAV2.....	142
Figure 7 : The Gab1 PH domain is important for the association of VAV2 with Gab1 and p120 Catenin, and promotes Rac1 activation and invasion induced by VEGF.....	143
.....	144
Figure 8 : WT Gab1, but not the Δ PH mutant, rescues the formation of capillary sprouts.....	144
Supplementary Figure 1 : Gab1 negatively regulates the GEF β -PIX and Cdc42 in response to VEGF in endothelial cells.....	145
Supplementary Figure 2 : Gab1 and Cortactin are associated in endothelial cells.	146
Supplementary Figure 3 : Gab1 membrane localisation is enhanced in response to VEGF.	146
Supplementary Figure 4 : Depletion of Gab1 results in a lower induction of the phosphorylation of Pak4 in endothelial cells in response to VEGF.....	147
Supplementary Figure 5 : Gab1 WT and Gab1 Δ PH are both tyrosine phosphorylated in response to VEGF in endothelial cells.	147

Chapitre 4

Figure 1 : CdGAP $-/-$ mice exhibit partially penetrant embryonic lethality, edema, and vascular defects.....	174
Figure 2 : CdGAP promotes sprouting angiogenesis from mouse aortic rings.	175
Figure 3 : VEGF-induced migration and capillary formation is decreased by CdGAP depletion in HUVECs.....	176
Figure 4 : VEGF-induced sprouting from endothelial spheroids is decreased by CdGAP depletion....	177
Figure 5 : VEGF-induced Rac1 and Cdc42 activation is attenuated after CdGAP depletion in endothelial cells.....	178
Figure 6 : CdGAP is associated to VEGFR2 and its depletion doesn't perturb its phosphorylation....	179
Figure 7 : VEGF-induced signaling and Gab1 tyrosine phosphorylation is inhibited by CdGAP depletion.	180

Chapitre 5

Figure 13 : La perte d'expression de Gab1 ou Gab2 diminue le potentiel de formation de capillaires sur Fibrine.....	183
Figure 14 : Modèle.....	193
.....	206
Figure 15 : Signalisation du VEGF dans la cellule endothéliale.....	206

Liste des abréviations

ADF : Actin Depolymerizing Factor
ADP : Adénosine Diphosphate
APC : Adenomatous Polyposis Coli
Ang1 : Angiopoietin 1
ARF : ADP Ribosylation Factor
ARNm: Acide Ribonucléique Messenger
ARNi : ARN interférent
Arp2/3 : Actin-Related Protein-2/3
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
BAD : Bcl-2 Associated Death Promoter
BAEC : Bovine Aortic Endothelial Cells
BCR : Récepteur des cellules B
BSA : Bovine serum albumin
Cat : Cool-Associated tyrosine phospho substrate protein
Cbl : Casitas B-Lineage Lymphoma
CCM1 : Cerebral Cavernous Malformation protein
Cdc42 : Cell division center protein
CdGAP : Cdc42 GAP
Cool-1 : Cloned out of Library
Crk : CT10 Chicken Tumor Virus number 10
CSW : Crokscrew
Dbl : Diffuse B Lymphoma
DH : Dbl homology
DHRI : DOCK homology region 1
DII4 : Delta Like Ligand 4
DMEM : Dulbecco's modified eagle's medium
DNA: Acide Déoxyribonucléique
DOCK : Deducator of Cytokinesis
DOS : Daughter Of Sevenless
ECKO : Endothelial Cell-specific Knock-Out
EGF : Epidermal Growth Factor
ELMO : Engulfment and Cell Motility
eNOS : Synthase endothéliale de NO
Erk1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK : Focal Adhesion Kinase
FBS : Fetal Bovine Serum
FGF : Fibroblast Growth Factor
FLK : Fetal-Liver Kinase
FLT : Fms-Like Tyrosine Kinase
FOXO1/4 : Forkhead box protein
GFP : Green Fluorescent Protein

Gab1 : Grb2-Associated Binding Protein 1
GAP : GTPase-Activating Protein
GDI : Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP : Guanine DiPhosphate
GEF : Guanine Nucleotide Exchange Factor
GIT : G-protein-coupled receptor (GPCR) –kinase-interacting protein
GSK-3 β : Glycogen Synthase Kinase-3 β
GST-PBD : Glutathione S-Transferase Pak-Binding Pull-Down
GTP : Guanine Triphosphate
HA : Hemagglutinine
HEK 293: Cellules Embryonnaires Humaines de Rein
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIFs : Hypoxia-inducible factors
HUVECs : Human Umbilical Venous Endothelial Cells
HMVEC : Human microvascular endothelial cells
HRP : Horseradish peroxidase
HSP : Heat shock protein
IGF1 : Insulin-Like Growth Factor-1
IL-8 : Interleukin-8
IRS1 : Insulin Receptor Substrate 1
kDa : kilo Dalton
KDR : Kinase Insert Domain Receptor
KI : Knock-In
KO : Knock-Out
kpb : kilo paires de bases
LIMK1 : LIM kinase 1
LOAD : Late Onset Alzheimer Disease
LPA : Lysophosphatidic Acid
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MAPKAP2/MK2 : Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Activated Protein Kinase 2
M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
MET : Mesenchymal Epithelial Transition Factor
MBD : Met-Binding-Domain
MBS : Met-Binding Sequence
MDCK : Madin-Darby Canine kidney
MTOC : Micro Tubule Organization Center
Nck : Non-Catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
NRG-1 β : Neuregulin-1
NO : Nitric Oxide
NICD : Notch Intracellular Domain
NPF : Facteur Promoteur de la Nucléation : Nucleator Promoting Factor
NRP-1 : Neuropiline-1
PAK : p21-Activated Kinases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PH : Pleckstrin Homology
PDGF β : Platelet-Derived Growth Factor
PIP3 : Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PI3K : Kinase du Phosphatidyl Inositol-3
PIX : Pak Interacting Exchange Factor
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PKB : Protein Kinase B ou aussi nommé AKT
PLCy: Phospholipase Cy
PIGF : Placenta Growth Factor
PTK : Protéine à Activité Tyrosine Kinase
PTP : Protéine Tyrosine Phosphatase
PT-PEST : Protein-Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 12
Pyk : Proline Rich Tyrosine Kinase
Ras : Rat Sarcoma
Rho : Ras Homologous
ROCK : Rho-Associated Protein Kinase
ROS : Reactive Oxygen Species
RTK : Tyrosine Kinase Receptors
SAPK : Stress-activated protein kinase
Ser : Sérine
SFK : Src Family Kinases
SH : Src Homology
Shb : Src Homology2 Domain containing Adaptor Protein B
Shp2 : Src Homology Phosphatase 2
SOC : Suppressor of Clear
svVEGF : Snake Venom VEGF
TAF : Tumor-Associated Factor
TBST : Tris-Buffered Saline Tween 20
TCR : récepteur des cellules T
TGF : Transforming Growth Factor
Thr : Thréonine
TIAM-1 : T-cell Lymphoma Invasion and Metastasis protein-1
Tks4/5 : Tyrosine Kinase Substrate with 4/5 SH3 domains
TNF-a : Tumor Necrosis Factor-a
Tsad : T-cell specific adapter protein
Tyr : Tyrosine
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1 : Récepteur au Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire-1
VEGFR-2/KDR/Flk-1 : Récepteur au Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire-2
VEGFR-3 : Récepteur au Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire-3
VPF : Vascular Permeability Factor
Wasp : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE2 : Wasp Family Verprolin-Homologous Protein
WT : Wild-Type

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dr Isabelle Royal, pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir donné la chance de participer à un programme de recherche stimulant, pour son encadrement et pour sa passion de la recherche. Merci.

Je désire également remercier les membres actuels ou passés du laboratoire qui ont partagé conseils techniques et plaisir ; Dr Raphaëlle Stenne, Mélanie Laramée, Vivianne Paradis, Dr Catherine Chabot, Simon Langlois, Line Lapointe, Jacinthe Roussy, Patrick Fournier et tout particulièrement Dr Kathleen Spring qui a partagé une très grande partie de mes sept années de Doctorat avec de nombreux conseils scientifiques, mais surtout un très grand support, une écoute et une constante compréhension.

J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'Institut du cancer de Montréal qui ont grandement contribué au plaisir de mon doctorat et ont aussi grandement facilité son déroulement ; tous les professeurs, les étudiants, les responsables de l'Institut, qui chacun à leurs manières ont pu contribuer à aider au développement de mon projet.

De plus, je tiens à remercier les différents membres de mon comité qui ont suivi mon projet tout au long de ses années avec des conseils critiques constructifs, Dr Anne-Marie Mes-Masson, Dr Nathalie Lamarche-Vanne, Dr Jean-François Coté et je tiens aussi à remercier les membres du jury d'évaluation de ma thèse de Doctorat.

Un merci spécial aux différents organismes subventionnaires, sans qui, tout ceci n'aurait été possible. Soit l'Institut du cancer de Montréal, Canderel, la Bourse de Congrès Lee Wall, la Fondation de recherche de l'Assemblée Nationale fonds Robert Bourrassa, les programmes de biologie moléculaire de l'Université de Montréal, la FESP, la Fondation Marc-Bourgie, et le support financier au laboratoire, soit les IRSC, le FRQS et la SRC.

En dernier lieu, un immense merci à mes parents, ma p'tite sœur et mon copain Etienne, pour leur inconditionnel encouragement dans les moments de découragements et pour leurs félicitations

dans chacun des petits moments de réussite mais surtout pour leur perpétuelle démonstration de fierté qui m'a permis de poursuivre dans les moments plus difficiles. *Merci !*

Chapitre 1 : Introduction

1. L'angiogenèse

La grande ramification des vaisseaux sanguins sous forme de réseau constitue le système vasculaire. Trois types de vaisseaux sanguins diffèrent selon leurs structures, leurs fonctions et leurs tailles soit les capillaires, les veines et les artères. Ils forment ainsi le système vasculaire. Ces vaisseaux sanguins permettent le transport du sang assurant ainsi l'irrigation des organes de façon adéquate. Tous ces vaisseaux sont tapissés par une couche de cellules endothéliales à l'intérieur du vaisseau sanguin, soit du côté de la lumière de celui-ci. Ainsi, ils permettent d'initier le transport de l'oxygène et des nutriments. Ils permettent aussi de former une barrière physique qui contrôle le passage de petites molécules tel que l'eau et les ions à partir du sang vers les différents tissus et ce, de façon sélective.

La formation de vaisseaux sanguins peut se faire via deux principaux processus, soit la vasculogenèse, et l'angiogenèse. Ainsi, lors du développement chez l'embryon, le réseau vasculaire est formé en premier lieu via la vasculogenèse, qui initie le plexus vasculaire primitif à se former. Par la suite vient l'angiogenèse, qui permettra la formation de nouveaux vaisseaux qui vont croître à partir des vaisseaux sanguins pré-existants et de cette façon va permettre le remodelage et la maturation de ces dits vaisseaux (Risau, 1997).

La vasculogenèse est initiée par des précurseurs mésenchymateux et induit la formation de vaisseaux sanguins, constitués principalement par des cellules endothéliales. Ces cellules, ainsi que les cellules hématopoïétiques dérivent d'un même précurseur, soit l'hémangioblaste. Les hémangioblastes se regroupent et les cellules au centre de l'amas se transforment en cellules hématopoïétiques. Par la suite, elles se différencient en globules rouges, globules blancs et mégacaryocytes. Les cellules sur le pourtour, quant à elles, se différencient en angioblastes, soit les précurseurs des cellules endothéliales (Risau & Flamme, 1995).

L'angiogenèse est la formation de vaisseaux sanguins à partir d'un vaisseau pré-existant. Il s'agit d'un phénomène biologique essentiel qui est fortement contrôlé de diverses façons et qui permet l'expansion du plexus vasculaire primitif et ainsi forme le réseau vasculaire adulte. L'angiogenèse est l'un des processus utilisés lors du développement, toutefois, chez l'adulte, une fois la maturité vasculaire atteinte, la majorité des vaisseaux deviennent quiescents et vont rarement

former de nouvelles ramifications. Par contre, les cellules endothéliales maintiennent une haute plasticité à percevoir et à répondre aux signaux pro-angiogéniques de leur environnement. L'angiogenèse est donc cruciale lors de plusieurs événements physiologiques tels la réparation de blessures, le cycle ovarien chez la femme et la formation du placenta durant la grossesse. Un mauvais contrôle de l'angiogenèse peut mener à certaines pathologies. Le déséquilibre positif et négatif peut tout autant provoquer des situations problématiques. Par exemple, une trop grande production de nouveaux capillaires pourra être impliquée lors de maladies inflammatoires, lors de rétinopathies ou lors de la croissance tumorale. À l'inverse une quantité insuffisante de nouveaux vaisseaux sanguins sera présente lors de maladies vasculaires ischémiques. Ainsi, un fin contrôle de l'angiogenèse s'avère primordial pour demeurer en condition physiologique saine (Carmeliet & Jain, 2000).

Les mécanismes moléculaires qui régulent l'angiogenèse physiologique et pathologique sont très similaires (Walsh, 2007). Trois mécanismes différents peuvent mener à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, soit l'angiogenèse par bourgeonnement ("sprouting"), l'angiogenèse par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés ("intussusception") ou l'angiogenèse par septation, soit lorsque les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux ce qui permet de former des canaux vasculaires séparés.

L'angiogenèse est fortement régulée de multiples façons pour s'assurer de la formation adéquate d'un nouveau vaisseau sanguin. Ainsi, plusieurs voies de signalisations seront activées pour initier l'angiogenèse sous le contrôle de différents régulateurs positifs, soit pro-angiogéniques ou négatifs, soit anti-angiogéniques. De nombreux processus sont impliqués dans les différentes étapes qui mènent à la formation d'un nouveau capillaire sanguin. Les cellules endothéliales répondent à de multiples facteurs de croissance et devront induire des mécanismes de perméabilité vasculaire, d'invasion cellulaire à travers la matrice extracellulaire suivie de la migration cellulaire, de la prolifération cellulaire, ainsi que des mécanismes de survie cellulaire pour maintenir l'intégrité du nouveau capillaire suite à une normalisation et une stabilisation du réseau nouvellement formé. Ainsi, tel que présenté dans la figure 1, de nombreuses étapes permettent la formation d'un nouveau capillaire (Carmeliet, 2003) (Carmeliet, 2005).

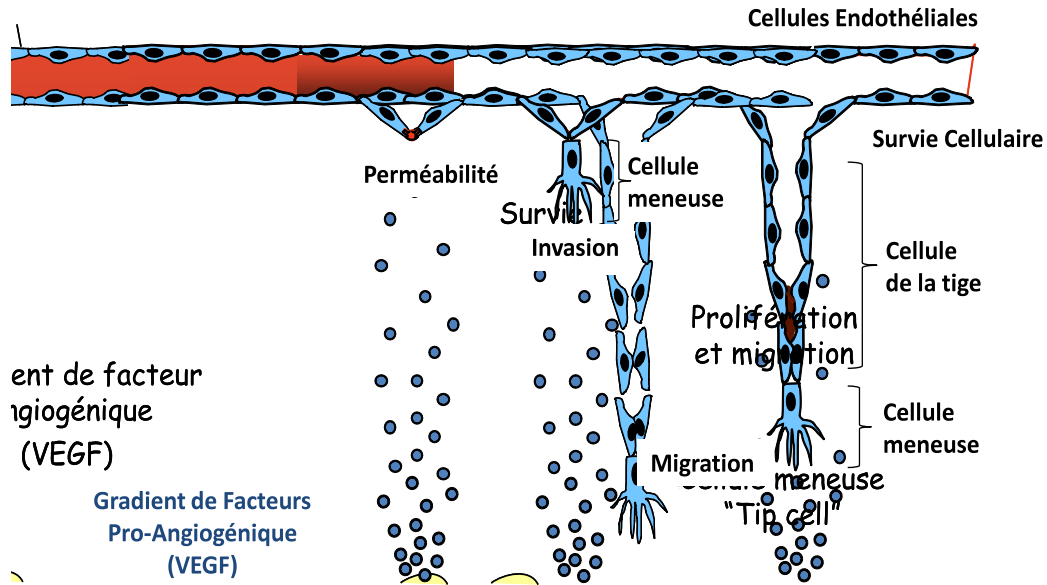


Figure 1. La formation d'un nouveau capillaire par angiogénèse

En présence d'une stimulation du VEGF, les cellules endothéliales sentent le gradient pro-angiogénique médié par le VEGF grâce à leurs nombreux filopodes. Les cellules endothéliales relâchent leurs liens cellules-cellules ce qui induit la perméabilité vasculaire et la libération de la matrice provisionnelle. S'ensuit un relâchement de différentes protéases permettant la dégradation de la membrane basale et l'initiation de la migration et l'invasion des cellules vers le stimulus angiogénique. Par la suite, les cellules de la tige qui suivent la cellule meneuse vont permettre l'élongation du capillaire grâce à la prolifération. Le recrutement de péricytes sur les capillaires nouvellement formés entraîne la stabilisation et la quiescence du vaisseau via entre autres l'induction de liens cellules-cellules forts qui permettront de soutenir la pression du flux sanguin.

1.1 L'angiogenèse tumorale

Les travaux de Judah Folkman apportèrent les premières hypothèses et démonstrations de l'angiogenèse tumorale en 1971. Ses travaux ont mené à l'isolation d'un facteur (Tumor Associated Factor; TAF) qui permet la promotion de l'angiogenèse dans un modèle de « Dorsal Air Sac » sur un rat démontrant de cette manière que ce facteur induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Folkman, Merler, Abernathy, & Williams, 1971) (Ferrara, 2002).

L'angiogenèse pathologique est impliquée dans la vascularisation tumorale. À la suite de différents stimuli présents dans l'environnement tumoral, la génération de facteurs pro-angiogéniques induit la formation des nouveaux vaisseaux sanguins. La présence de facteurs angiogéniques tel que le VEGF ou le FGF permet d'induire la croissance vasculaire en agissant directement sur les cellules endothéliales (Cross & Claesson-Welsh, 2001) (Ferrara, 2002). Aussi, d'autres facteurs pro-angiogéniques tel que le TGF- β , le PDGF ou l'Ang-1 pourront quant à eux moduler la fonction des péricytes ou des cellules de muscle lisse pour stabiliser les cellules endothéliales et ainsi permettre la maturation du nouveau réseau vasculaire. Pour qu'il y ait croissance tumorale, un « switch angiogénique » doit se produire où il y a passage d'une phase de croissance tumorale avasculaire à une phase de croissance vasculaire. L'angiogenèse tumorale est essentielle pour permettre l'oxygénation et le recrutement de nutriments au sein de la tumeur. Ainsi, certains traitements tentent de freiner l'angiogenèse pathologique de diverses façons. L'une de ces façons s'avèrent être l'inhibition de l'activité des récepteurs impliqués dans l'angiogenèse, soit à la suite de l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou après l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI).

1.2 Les facteurs de croissance angiogénique

Plusieurs facteurs de croissance pro-angiogénique sont responsables de moduler l'angiogenèse tels que le FGF, PDGF, TGF β , EGF, HGF et le VEGF. Malgré le fait que certains d'entre eux ne sont pas spécifiques à l'endothélium vasculaire (FGF, le PDGF et l'EGF), ils peuvent tout de même moduler l'angiogenèse. Ces différents facteurs de croissance permettront entre autres la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Ils sont sécrétés par les cellules tumorales mais aussi par les

cellules du stroma tissulaire normal tel que les macrophages ou les fibroblastes ou à la suite de la dégradation de la matrice extra-cellulaire qui permettra la libération de ces différents facteurs. Le principal médiateur de l'angiogenèse demeure le VEGF. Il module l'angiogenèse physiologique et pathologique, et est le facteur angiogénique le mieux caractérisé et le plus étudié.

1.2.1 Le VEGF

Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le plus puissant inducteur de l'angiogenèse. Il représente une famille de glycoprotéines homodimériques détenant des rôles critiques pour le développement embryonnaire (la vasculogenèse), pour le système lymphatique (la lymphangiogenèse) et pour la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants (l'angiogenèse). Le VEGF a été décrit en premier lieu en 1983 par Senger, après la purification d'une molécule sécrétée par des cellules d'hépatocarcinome, nommée Vascular-Permeability Factor (VPF). Cette molécule induisait l'extravasation du bleu d'Evans après son injection chez le cochon d'Inde, démontrant de cette façon son rôle dans l'induction de la perméabilité vasculaire (Senger et al., 1983). Par la suite, en 1989, Napoleone Ferrara identifia un facteur mitogénique pour les cellules endothéliales, qu'il nomma VEGF pour Vascular Endothelial Growth Factor. L'isolation du VEGF et l'identification de la séquence d'acides aminés de l'« Endothelial Cell Mitogen », a permis de déterminer qu'il s'agissait de la même séquence protéique et d'acides aminés que le VPF de Senger (Leung, Cachianes, Kuang, Goeddel, & Ferrara, 1989).

Chez l'humain, on dénote cinq ligands membres de la famille du VEGF soit, le VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PLGF (Placental Growth Factor) (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Parmi ceux-ci, le VEGF-A est le plus étudié puisqu'il est le principal médiateur de l'angiogenèse. Il est présent en six isoformes issus d'un épissage alternatif d'un même ARNm (Robinson & Stringer, 2001). Il s'agit du VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉, et VEGF-A₂₀₆. Les différentes isoformes du VEGF-A se distinguent par leur biodisponibilité et leurs effets cellulaires (Ferrara et al., 2003). Parmi les plus fréquents on retrouve le VEGF-A₁₈₉ et le VEGF-A₂₀₆ qui contiennent un domaine de liaison à l'héparine. Leur haute affinité de liaison à l'héparine les maintient séquestrés dans la matrice extra-cellulaire. Le VEGF-A₁₈₉ permet la maintenance et la spécification vasculaire. Les isoformes VEGF-A₁₂₁ et VEGF-A₁₆₅ ne détiennent pas de domaine de liaison à l'héparine, elles sont donc présentes sous formes solubles, de par leur incapacité à se lier à l'héparine. Le VEGF-A₁₆₅ est sécrété par les cellules dans l'environnement cellulaire et est l'isoforme la plus abondante chez l'humain et la plus active au

niveau biologique (Houck, Leung, Rowland, Winer, & Ferrara, 1992) (Park, Keller, & Ferrara, 1993) (Nagy, Dvorak, & Dvorak, 2007) (Chung & Ferrara, 2011) (Ferrara et al., 2003) .

Des travaux dans des modèles murins ont pu déterminer l'importance du VEGF dans le développement vasculaire. La souris VEGF-A KO (knock-out) meurt à jour embryonnaire E9,5-10,5 à la suite de défauts sévères dans le développement vasculaire (Carmeliet et al., 1996). La perte d'un seul allèle du VEGF-A mène aussi à des défauts vasculaires et est aussi létale chez la souris à jour embryonnaire E11-E12, ce qui révèle la haute importance de cette protéine (Ferrara et al., 1996).

Le VEGF-A (nommé VEGF pour la suite du texte) peut être régulé par le facteur de transcription HIF1 α (Ahluwalia & Tarnawski, 2012) (Kurihara, Westenskow, & Friedlander, 2014). Celui-ci permet en condition d'hypoxie l'augmentation de l'expression du VEGF de façon normale lors de la réparation de blessures, lors du développement embryonnaire ou dans le contexte de certaines conditions pathologiques, entre autre, lors de la formation de tumeurs. HIF1 α est très instable en condition de normoxie puisqu'il est rapidement hydroxylé par des enzymes, les Proly Hydroxylases (PHD) ce qui mène à son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Ahluwalia & Tarnawski, 2012) (Kurihara et al., 2014). Ainsi, en condition hypoxique, HIF1 α est beaucoup plus stable puisqu'il ne peut être hydroxylé par les PHD dont l'activité dépend de l'oxygène. Les cellules tumorales peuvent générer des ROS (Reactive Oxygen Species), en réaction à la stimulation d'oncogènes, à l'activité métabolique accrue, à la suite d'un mauvais fonctionnement mitochondrial ou suite à des conditions hypoxiques (Ahluwalia & Tarnawski, 2012) (Kurihara et al., 2014). Les ROS permettent l'activation de plusieurs facteurs de transcription qui mènent à l'expression de protéines essentielles à la survie tumorale, à la prolifération et à l'angiogenèse puisque les ROS peuvent réguler positivement l'expression du VEGF. Le VEGF est sécrété à la suite de l'établissement d'une condition hypoxique ou à cause de l'induction d'un stress. Dans les tumeurs, l'hypoxie résultante de la croissance tumorale va ainsi entrainer l'expression du VEGF et induire une angiogenèse pathologique (Bates, Hillman, Williams, Neal, & Pocock, 2002).

Comme le démontrent les travaux de Carmeliet et al. et ceux de Stalmans et al., le VEGF-A₁₆₅ est l'isoforme la plus importante pour induire l'angiogenèse tumorale. Le sauvetage de la perte d'expression du VEGF dans les souris VEGF KO, après la ré-expression de l'isoforme VEGF-A₁₆₅ peut entièrement sauver l'angiogenèse, comparativement au sauvetage non-fonctionnel après la ré-expression des isoformes VEGF-A₁₂₁ et VEGF-A₁₈₉ (Carmeliet et al., 1999) (Stalmans et al., 2002).

1.2.2 Les Récepteurs à Fonction Tyrosine Kinase (RTK)

Les facteurs de croissance vont stimuler leur signalisation via des récepteurs à fonction tyrosine Kinase (RTK). Il s'agit de protéines trans-membranaires détenant un domaine intra-cytoplasmique et une région extra-cellulaire leur permettant de reconnaître et de fixer le ligand. Ces deux domaines sont reliés par une région hydrophobe qui permet au récepteur d'être ancré à la membrane des cellules. Une fois le ligand lié au récepteur, il y a dimérisation et auto-phosphorylation dans le domaine intra-cytoplasmique. Ceci enclenche plusieurs voies de signalisation et diverses fonctions biologiques.

Pour médier l'angiogenèse, le VEGF se lie à différents RTK de la même famille, soit le VEGFR1 (aussi nommé FLT-1, Fms-Like-Tyrosine kinase 1), le VEGFR2 (FLK, Fetal Liver Kinase 1 ou KDR, Kinase insert Domain Receptor) et le VEGFR3 (FLT4, Fms Like Tyrosine kinase 4) schématisés à la figure 2 (Koch, Tugues, Li, Gualandi, & Claesson-Welsh, 2011). Le VEGFR1 et VEGFR2 sont exprimés à la surface des cellules endothéliales, tandis que le VEGFR3 est principalement exprimé au niveau du système lymphatique. Ainsi, chaque VEGF peut se lier à un ou plusieurs RTKs et donc réguler les diverses fonctions biologiques. Le VEGFR1 est surtout important pour le développement de cellules hématopoïétique, le VEGFR2 pour le développement de cellules endothéliales vasculaires et le VEGFR3 pour le développement du système lymphatique (Koch et al., 2011).

L'angiogenèse peut aussi être régulé via l'activation d'autres RTKs que les VEGFRs grâce entre autres à l'activation de l'angiopoiétine ou de l'éphrine (Carmeliet, 2003). Les différents membres de la famille de l'angiopoiétine vont lier les récepteurs Tie1 et Tie2, alors que les différents membres de la famille de l'éphrine, principalement l'éphrine-B2, liera son récepteur EphB4 (Yancopoulos et al., 2000). De plus, d'autres facteurs et d'autres RTKs non-spécifiques aux cellules endothéliales tels que le β FGF (Compagni, Wilgenbus, Impagnatiello, Cotten, & Christofori, 2000) (M. Presta et al., 2005), le PDGF (Rolny et al., 2006) (Zeller, Skalak, Ponce, & Price, 2001) et l'EGF (Amin, Hida, Bielenberg, & Klagsbrun, 2006) vont aussi être impliqué dans l'angiogenèse (Carmeliet, 2003).

1.2.2.1 Le VEGFR1

Le récepteur VEGFR1 peut lier le VEGF-A, le VEGF-B ou le PLGF, et est principalement exprimé à la surface des cellules souches endothéliales hématopoïétiques, les hémangioblastes, les monocytes, les macrophages, et des cellules endothéliales. Le VEGF-A lie avec une plus forte affinité le VEGFR1 que le

VEGFR2 (Koch et al., 2011). Toutefois, le VEGFR1 présente une plus faible activité kinase que le VEGFR2 (Shinkai et al., 1998). Ceci peut être expliqué par la présence d'une séquence répressive dans son domaine juxta-membranaire (Gille et al., 2001). Aussi, la faible quantité de résidu tyrosine phosphorylé à régulation positive contribue à sa faible activité.

La souris VEGFR1 KO meurt au jour embryonnaire E8,5-E9,0 à cause d'une prolifération excessive des angioblastes (Fong, Rossant, Gertsenstein, & Breitman, 1995) (Fong, Zhang, Bryce, & Peng, 1999). Comme conséquence, ces souris présentent une sur-croissance des vaisseaux sanguins désorganisés, ce qui démontre l'effet inhibiteur du VEGFR1 sur la signalisation du VEGF (Fong et al., 1995) (Kappas et al., 2008). Ainsi, ces souris meurent par la présence de trop grands défauts de sur-croissance de vaisseaux sanguins ce qui semble démontrer le rôle « suppresseur » du VEGFR1 sur l'angiogénèse. Toutefois, si on procède à la délétion du domaine kinase du VEGFR1 seulement, plutôt que sa délétion totale, le développement vasculaire de la souris demeure normal (Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, & Shibuya, 1998). Ces travaux suggèrent donc, que lors du développement embryonnaire, le VEGFR1 permet une fine régulation des activités du VEGF en contrôlant sa liaison au VEGFR2. Le domaine kinase du VEGFR1 ne semble pas responsable de la suppression de l'effet angiogénique apporté par le celui-ci. Comme le VEGFR1 peut lier le VEGF de façon plus efficace que le VEGFR2, mais que le VEGFR1 ne transduit que peu de signalisation, celui-ci semble agir comme une éponge pour séquestrer l'excédant de VEGF et agit donc comme un inhibiteur de la signalisation du VEGF. De plus, il existe une forme soluble du VEGFR1 (sVEGFR1) qui est produit à la suite d'un épissage alternatif (Hornig & Weich, 1999). Cette forme est fortement sécrétée par plusieurs tissus lors du développement embryonnaire normal et permet elle aussi d'inhiber les activités du VEGF (Hornig & Weich, 1999). Par contre, dans d'autres types cellulaires tel que les cellules hématopoïétiques ou les macrophages, la liaison du VEGF au VEGFR1 promeut le recrutement de ces cellules aux sites angiogéniques où celles-ci contribuent à la production de facteur pro-angiogénique.

1.2.2.2 Le VEGFR2

Le VEGFR2 (aussi nommé FLK-1 ou KDR) est le plus important des récepteurs du VEGF pour médier plusieurs signalisations essentielles à l'angiogénèse. Le VEGF lie le deuxième et le troisième domaine extra-cellulaire « immunoglobuline-like » du récepteur VEGFR2. Cette liaison induit ensuite une dimérisation et une auto-phosphorylation du récepteur sur ses sites catalytiques et sur plusieurs

autres sites tyrosines, et s'en suit une cascade signalétique régulant la variété d'activités biologiques régulées par le VEGF.

La souris VEGFR2 KO meurt à jour embryonnaire E8,5-E9,5 à cause des défauts de développement des îlots de sang, des cellules endothéliales immatures et des cellules hématopoïétiques, ce qui mène à des défauts de vasculogénèse mais aussi d'angiogénèse (Shalaby et al., 1995).

Chez l'adulte, le VEGFR2 est exprimé essentiellement à la surface de cellules vasculaires endothéliales, mais il peut aussi être détecté sur des cellules neuronales, des mégakaryocytes, des cellules souches hématopoïétiques, des cellules endothéliales lymphatiques et de certaines lignées cellulaires de cancer (Koch et al., 2011).

La signalisation du VEGF via le VEGFR2 est essentielle pour plusieurs fonctions biologiques importantes lors de l'angiogénèse, telles que la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la perméabilité vasculaire et la migration cellulaire (Claesson-Welsh & Welsh, 2013). Ainsi, plusieurs études ont démontré que l'association du VEGF-A₁₆₅ au VEGFR2 était requise pour la médiation de l'angiogénèse lors du développement et chez l'adulte (Gille et al., 2001) (Kanno et al., 2000) (Rahimi, Dayanir, & Lashkari, 2000) (Zeng, Sanyal, & Mukhopadhyay, 2001) (Li et al., 2000) (Shalaby et al., 1995) (Flamme, Breier, & Risau, 1995; Flamme, von Reutern, Drexler, Syed-Ali, & Risau, 1995) (Clauss et al., 1996).

1.2.2.3 Le VEGFR3

Le VEGFR3 se lie au VEGF-C ou VEGF-D. Il est surtout exprimé sur l'endothélium lymphatique et est donc important pour la lymphangiogénèse. Toutefois, son expression sur les cellules endothéliales peut être induite lors de l'angiogénèse, soit lors du développement du système vasculaire tumoral, soit lors du bourgeonnement. De plus, le VEGFR3 est aussi impliqué dans la formation de la lumière des vaisseaux sanguins. Les souris VEGFR3 KO meurent au jour embryonnaire E10.5 à la suite de défauts cardiovasculaires et d'une vasculature désorganisée (Dumont et al., 1998) (Holmes, Roberts, Thomas, & Cross, 2007).

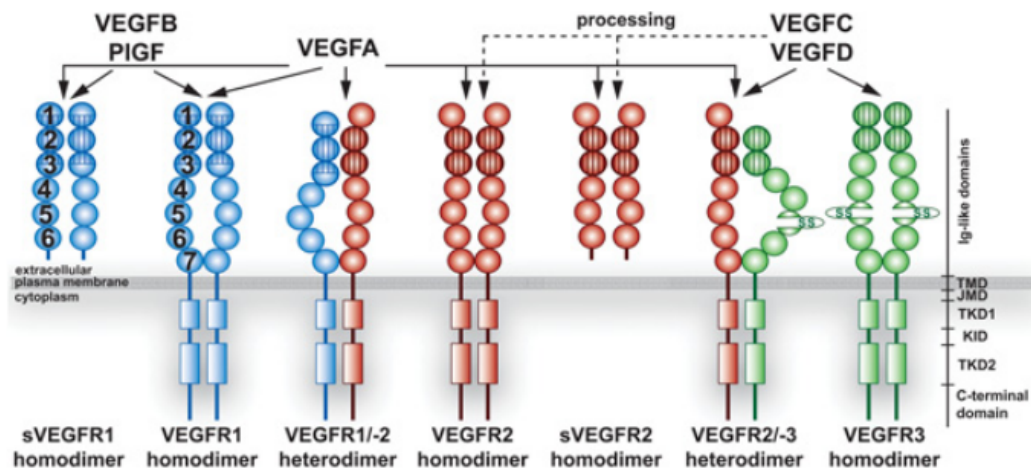


Figure 2. Le VEGF et les récepteurs

Représentation schématique des cinq VEGFs (VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et PIGF) et de leurs liaisons aux VEGFRs ainsi que de leurs différentes affinités pour les trois récepteurs VEGFRs (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) qui initie la formation d'homo- et d'hétéro-dimères. Le processus de protéolyse du VEGF-C et VEGF-D permet la liaison au VEGFR2. Les domaines, de type Immunoglobulines 2 et 3 du VEGFR médient la liaison du VEGF (cercles hachurés). Les sVEGFR1 et 2 sont solubles et ne présentent par le septième domaine de type immunoglobuline. JMD, Juxtamembrane domain KID, kinase insert domain TMD, transmembrane domain TKD1, ATP-binding domain TKD2, phosphotransferase domain.

Tiré de (Koch et al., 2011)
Permission obtenue

1.3 Les mécanismes cellulaires impliqués dans l'angiogenèse

Plusieurs mécanismes peuvent mener à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, tels que l'intussusception, la septation ou, le phénomène le plus courant, le bourgeonnement de capillaires, communément désigné en tant que « sprouting angiogenesis » (Gerhardt et al., 2003) (De Smet, Segura, De Bock, Hohensinner, & Carmeliet, 2009) (Carmeliet, De Smet, Loges, & Mazzone, 2009). Les cellules endothéliales seront tout d'abord activées par des signaux pro-angiogéniques et après plusieurs étapes, permettront la formation du nouveau capillaire tel que démontré dans la figure 3.

En premier lieu, la cellule meneuse (« Tip Cell »), fortement polarisée, permet la formation d'un nouveau bourgeon et sent son micro-environnement pour détecter et répondre à des stimuli de guidance. Grâce à la formation continue de plusieurs filopodes, la cellule meneuse explore donc son

environnement à l'affût de signaux pro-angiogéniques. La cellule meneuse va initier et diriger les cellules subséquentes à la suivre en direction du gradient de facteur de croissance (Carmeliet et al., 2009) (De Smet et al., 2009).

Deuxièmement, tout juste derrière la cellule meneuse, les cellules de la tige (« Stalk Cells ») ne produiront que très peu de filopodes, mais vont plutôt contribuer à la ramification du vaisseau sanguin. Elles agissent de la sorte à la suite d'une forte prolifération cellulaire qui mène à l'élongation de la tige, et donc l'élongation du bourgeonnement, et elles initient aussi la formation d'une lumière au centre du capillaire ainsi formé (De Smet et al., 2009) (Carmeliet et al., 2009).

En troisième lieu, les cellules phalanges (« Phalanx Cells »), ressemblent en partie aux cellules de la tige à la différence de leur faible potentiel de prolifération, elles ont donc un plus grand état de quiescence. Aux jonctions cellules-cellules, elles expriment des facteurs tel que le PDGF β et Jagged-1 qui attirent les péricytes et ainsi stabilisent leur association avec le vaisseau nouvellement formé (Eilken & Adams, 2010). L'établissement d'une membrane basale et le recrutement de cellules murales (péricytes) permettront de stabiliser les différentes connections suite à la prolifération cellulaire et à la formation des jonctions cellules-cellules et cellules-matrice extra-cellulaire. Les jonctions serrées permettront de lier les cellules phalanges aux péricytes. De cette façon, il y a formation de lumière dû à la stabilisation des liens cellules-cellules. Ainsi, les cellules de type phalange permettent la circulation sanguine, la perfusion et l'oxygénation des tissus, puisqu'elles recouvrent l'intérieur du vaisseau une fois que les nouvelles branches de ce vaisseau ont bel et bien été consolidées, en formant un agencement régulier et très compact.

En résumé, la cellule meneuse est motile et polarisée, tandis que les cellules de la tige présentent une forte prolifération et induisent la formation de la lumière du vaisseau naissant et les cellules phalanges vont stabiliser le vaisseau et permettre la circulation sanguine. Ces différentes caractéristiques acquises par une cellule sont transitoires et réversibles et démontrent l'implication de la motilité cellulaire, de la perméabilité, de l'invasion cellulaire et de la prolifération cellulaire dans le processus angiogénique (Carmeliet et al., 2009) (De Smet et al., 2009) (Gerhardt et al., 2003; Horowitz & Simons, 2008).

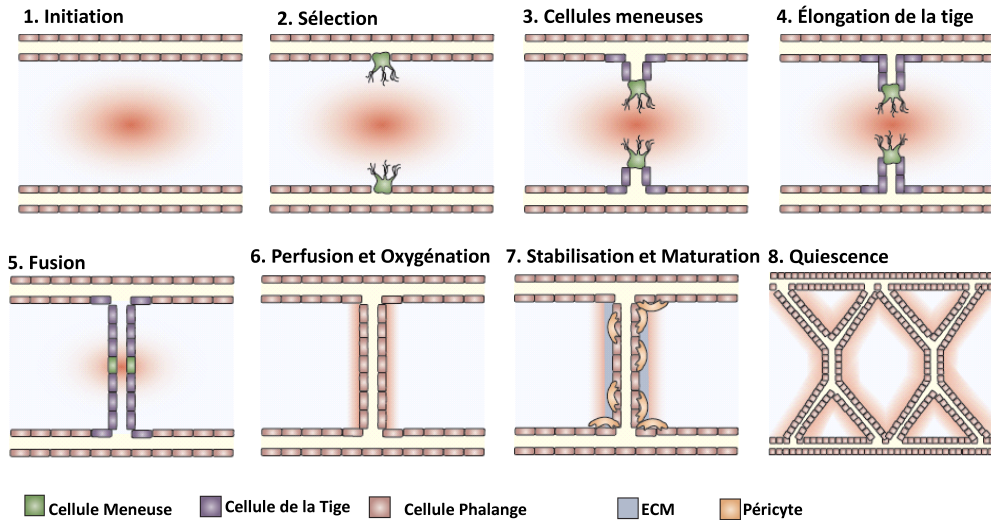


Figure 3. Les étapes de l'angiogenèse : formation de nouveaux capillaires.

1. En réponse à l'hypoxie, des cellules non-vasculaires vont permettre la production d'un gradient de VEGF (ici indiqué par le rouge, où l'intensité révèle la concentration du VEGF) 2. Les cellules endothéliales qui ont été exposées à la plus grande concentration de VEGF seront sélectionnées pour devenir des cellules meneuses (vert). 3. La cellule meneuse va diriger la formation d'un bourgeonnement et l'invasion des tissus environnants grâce à la formation de nombreux filopodes. 4. Le bourgeonnement va s'allonger grâce à la prolifération des cellules endothéliales de la tige (mauve) qui vont suivre derrière la cellule meneuse. 5. La nouvelle branche ainsi formée va pouvoir connecter et fusionner avec une autre branche. 6. La formation de la lumière du vaisseau va permettre l'initiation du flux sanguin et ainsi permettre l'oxygénation du tissu, ce qui va par conséquent, réduire les niveaux de VEGF. 7. La maturation et la stabilisation de ce réseau va dépendre du recrutement des péricytes (orange) et de la déposition de la matrice extra-cellulaire (bleu). 8. Dans le réseau vasculaire établi, les cellules endothéliales vont pouvoir s'adapter et vont devenir quiescentes, soit les cellules de type phalange (beige).

Adapté de (Carmeliet et al., 2009)
Permission obtenue

1.3.1 La régulation de la cellule meneuse lors de l'angiogenèse

Ces différents processus sont finement régulés afin de générer un réseau de capillaires fonctionnels. Les vaisseaux sanguins sont fortement exposés à de nombreux stimuli pro-angiogéniques tel que le VEGF. Il est ainsi important que seulement une fraction des cellules endothéliales acquiert le phénotype des cellules meneuses et ainsi que les autres cellules contribuent plutôt à l'extension de la tige. Ce phénomène est fortement contrôlé par la voie de signalisation de Notch. Les cellules meneuses expriment fortement la protéine transmembranaire et ligand de Notch,

le Dll4, alors que les cellules de la tige quant à elle expriment plutôt un autre ligand Jagged1. Lors de l'angiogenèse par bourgeonnement, le gradient de VEGF sera important pour la sélection et l'induction de la cellule meneuse. Une fois le VEGF lié au VEGFR2, une cascade signalétique est déclenchée ce qui induit la future cellule meneuse à prendre le devant et inhibe les cellules voisines à procéder de la même façon, en leur indiquant plutôt de devenir des cellules de la tige. Cette inhibition latérale se produit grâce à une communication cellulaire entre les cellules meneuses et les cellules de la tige, grâce à la voie de signalisation Dll4/Notch. Les cellules endothéliales expriment certains récepteurs Notch, tel que Notch1, Notch3 et Notch4 et détiennent leurs ligands tel que Dll1 Dll4 et Jagged1, Jagged2. À la suite de la liaison du ligand, le récepteur Notch est clivé au niveau intracellulaire, ce qui génère un fragment intracellulaire, le NICD (Notch IntraCellular Domain), qui agit comme un facteur de transcription (Carmeliet et al., 2009) (De Smet et al., 2009). Puisque la cellule meneuse est celle au devant du nouveau capillaire, il s'agit de la cellule qui est exposée à la plus haute concentration de VEGF, il y a donc une forte induction du ligand Dll4 dans cette cellule. Le Dll4 pourra se lier au récepteur Notch sur une cellule voisine qui deviendra ainsi une cellule de la tige. De cette façon, l'inhibition de l'expression de Notch (suite à un inhibiteur ou la délétion allélique) génère une forte présence de cellules meneuses et ainsi une plus grande ramification des vaisseaux sanguins (Carmeliet et al., 2009) (De Smet et al., 2009) (Estrach, Legg, & Watt, 2007) (Roca & Adams, 2007) (Hellstrom, Phng, & Gerhardt, 2007) (Hellstrom, Phng, Hofmann, et al., 2007) (Noguera-Troise et al., 2006). De plus, le sVEGFR1 qui se retrouve dans l'environnement de nouvelles protrusions permet d'accroître de façon prononcée la signalisation du VEGF-A et ainsi guide la cellule meneuse et ses filopodes. Le sVEGFR1 va réduire la concentration de VEGF-A libre et disponible suite à son association au sVEGFR1, sans toutefois médier de signalisation. Ainsi, la présence de sVEGFR1 au pourtour de la cellule meneuse pourra ainsi contribuer à l'émergence du bourgeonnement (Chappell, Taylor, Ferrara, & Bautch, 2009) (Shibuya, 2006).

1.4 La signalisation cellulaire dépendante du VEGF

Le VEGFR2 est le principal récepteur médiateur de la signalisation dépendante du VEGF dans les cellules endothéliales. Il promeut la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la perméabilité vasculaire et la migration cellulaire. La phosphorylation de divers résidus tyrosine du VEGFR2 va réguler divers sentiers signalétiques découlant en la régulation de nombreuses activités biologiques tel que présentées à la figure 4. Les principaux sites phosphorylés sont la Y801 dans le domaine intra-

cellulaire, la Y951 dans l'insertion du domaine catalytique, les Y1054 et Y1059 dans le domaine kinase, la Y1175 et la Y1214 dans la queue C-Terminale (Holmes et al., 2007) (Koch et al., 2011) (Claesson-Welsh & Welsh, 2013).

1.4.1 La prolifération cellulaire

La majorité des RTKs permet la prolifération cellulaire après une stimulation de la voie de signalisation des MAPK, Erk1/2 via la voie Grb2-Sos-Ras (Takahashi T. et al., Oncogene 1999). Toutefois, quant à lui, le VEGFR2 induit la prolifération cellulaire via l'activation de la voie signalétique atypique de la PLC γ (Phospho Lipase C γ) qui permet l'activation de la PKC (Protein Kinase C) et de Erk1/2 (Takahashi, Yamaguchi, Chida, & Shibuya, 2001) (M. J. Kim, Kim, Ryu, & Suh, 2000) (Cunningham, Arrate, Brock, & Waxham, 1997). Ainsi, la phosphorylation de la Y1175 du VEGFR2 qui recrute la PLC γ en réponse à une stimulation par le VEGF induit la prolifération des cellules endothéliales (Cunningham et al., 1997) (Takahashi et al., 2001). De façon plus détaillée, la PLC γ pourra s'associer à cette tyrosine via son domaine SH2 et cette activation permet l'activation subséquente de la PKC. Cette cascade permettra d'activer la MAP Kinase Erk1/2 en aval de la PLC γ (Takahashi et al., 2001). Cette voie de signalisation est critique puisque la génération de souris transgéniques exprimant un variant muté du VEGFR2 au site du résidu Y1175 résulte en une létalité embryonnaire et empêche la synthèse d'ADN (Sakurai, Ohtsuki, & Watanabe, 2005).

1.4.2 La survie cellulaire

La PI3K joue un rôle dans la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Cantley, 2002). Les phospholipides générés à la membrane des cellules par la PI3K permettent le recrutement de certaines protéines telles que la protéine kinase B (PKB), aussi nommé Akt, au niveau de la membrane et de la Ser/Thr Kinase PDK1. Cette kinase peut phosphoryler de façon activatrice la protéine kinase Akt qui s'avère être un important régulateur de la survie cellulaire (Gerber, Dixit, & Ferrara, 1998; Gerber, McMurtrey, et al., 1998). De cette façon, Akt peut induire de nombreux mécanismes de survie cellulaire, entre autres, via la phosphorylation inhibitrice de la protéine pro-apoptotique Bad et de la Caspase 9. Suite à la stimulation par le VEGF, Akt phosphoryle également les facteurs de transcription FOXOs (Forkhead Box Protein) ce qui entraîne l'association de ces facteurs aux protéines 14-3-3 et induit leur rétention au cytoplasme. Toutefois, en absence de stimulation, ces facteurs de transcription seront entraînés au noyau où ils permettent la transcription de gènes pro-apoptotiques

tel que le gène codant pour le ligand Fas. Ainsi, la phosphorylation de FOXOs par Akt induit une signalisation de survie cellulaire (Fu & Tindall, 2008) (Brunet et al., 1999).

1.4.3 La perméabilité vasculaire

Le VEGF est un important inducteur de la perméabilité vasculaire, d'où son acronyme, VPF pour « Vascular Permeability Factor ». Plusieurs mécanismes mènent à l'induction de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF. Un des plus importants mécanismes est la relâche des liens cellules-cellules qui va dégrader l'intégrité des liens et ainsi induire la perméabilité vasculaire. Ce mécanisme est régulé par la phosphorylation par Src de la VE-cadhérine qui se retrouve présente aux liens cellules-cellules suite à la stimulation du VEGF (Ha, Bennett, & Jin, 2008) (Dejana, Orsenigo, & Lampugnani, 2008). Aussi, en réponse au VEGF, la voie de signalisation de la kinase Src, qui active la GEF VAV2 et la GTPase Rac permet d'induire l'activation de l'effecteur Pak. De cette façon, la Ser/Thr kinase Pak, phosphoryle la VE-cadhérine sur la Ser665 ce qui recrute la β -arrestine2 à la VE-cadhérine et entraîne l'internalisation de la VE-cadhérine. Cette internalisation a pour conséquence le désassemblage des jonctions cellules-cellules et donc l'induction de la perméabilité (Gavard & Gutkind, 2006).

De plus, la production d'oxyde nitrique (NO), un gaz vasodilatateur, est également impliquée dans la régulation de la perméabilité vasculaire. La relâche d'oxyde nitrique est dépendante de l'activation de la synthase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) dans les cellules endothéliales. L'activation d'eNOS peut être induite à la suite de l'activation de deux voies de signalisation. D'une part, l'influx de calcium déclenché par la PLC γ et la relâche de Diacylglycérol (DAG) induisent l'activation de la Calmodulim (CaM). L'association de la CaM activée à eNOS induit un changement conformationnel de eNOS, ce qui mène à son activation et à la relâche de NO (Sessa, 2004). D'autre part, l'activation de la voie PI3K-Akt, qui est déclenchée après la phosphorylation de la Y801 du VEGFR2, permet à la kinase Akt de phosphoryler la Ser1179 de eNOS pour induire son activité kinase et ainsi permettre la perméabilité vasculaire (Dimmeler et al., 1999) (Blanes, Oubaha, Rautureau, & Gratton, 2007).

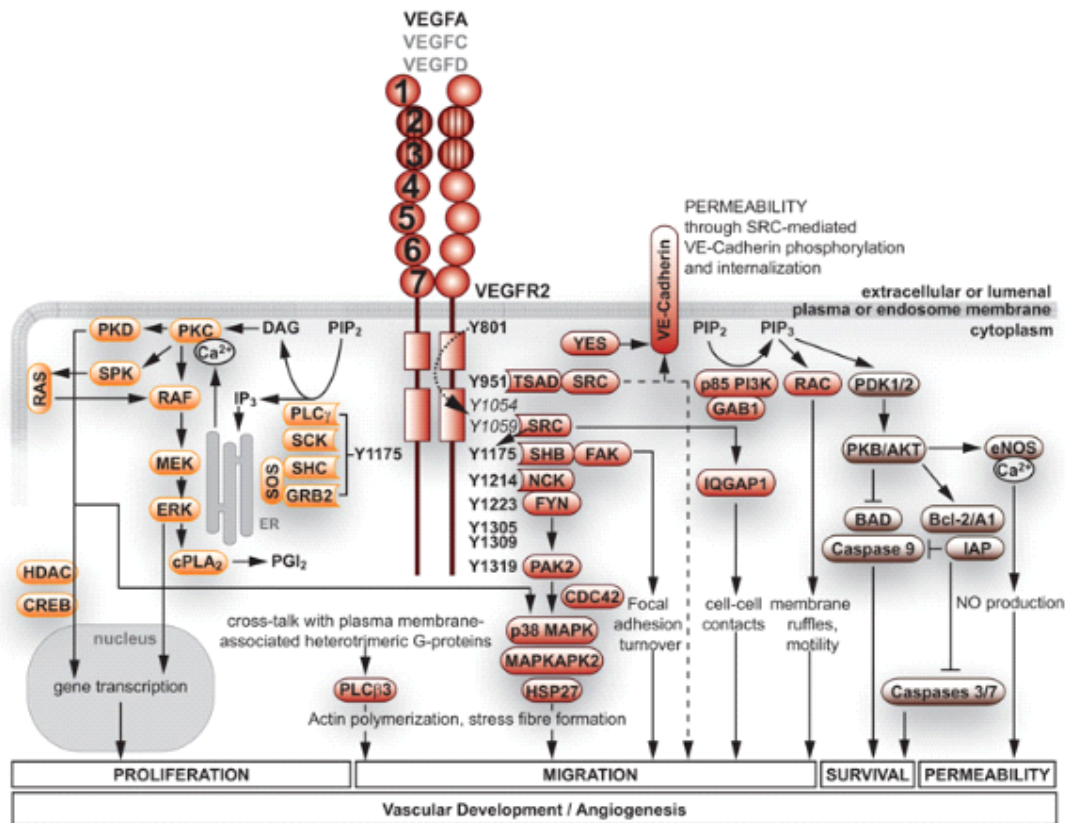


Figure 4. La signalisation cellulaire régulée par le VEGF

Schémas des voies de signalisation activées suite à la dimérisation et à l'activation du VEGFR2. Suite à la liaison du VEGF au VEGFR2 (cercles hachurés), les molécules de signalisation lient de façon spécifique les tyrosines phosphorylées du VEGFR2 dans son domaine intracellulaire et permettent ainsi l'activation de voies de signalisation. Les résidus 1054-1059 sont critiques pour l'activité kinase du VEGFR2. Le réseau complexe de signalisation intracellulaire résulte en plusieurs réponses biologiques telles que la prolifération cellulaire, la migration cellulaire, la survie cellulaire et la perméabilité vasculaire. Toutes ces réponses biologiques sont essentielles pour former et maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins.

Tiré de (Koch et al., 2011)
 Permission obtenue

1.4.4 La migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus essentiel lors du développement embryonnaire, pour la maintenance et l'homéostasie des tissus et pour la réponse immunitaire en contexte physiologique sain (Lamalice, Le Boeuf, & Huot, 2007). Toutefois, la migration cellulaire est aussi impliquée dans certaines conditions pathologiques telle que la dissémination tumorale par la formation de métastases (Lamalice et al., 2007). Pour initier la formation d'un vaisseau sanguin, les cellules endothéliales vont devoir répondre à différents stimuli et acquérir des capacités motrices.

Lors de la formation du capillaire, les cellules endothéliales doivent migrer pour former le nouveau vaisseau sanguin. Cette migration implique une importante réorganisation du cytosquelette d'actine afin de soutenir les changements morphologiques nécessaires à ce processus. Les cellules endothéliales devront aussi polariser leur cytosquelette d'actine en direction de la migration cellulaire, donc en direction du chemoattractant. L'activation du VEGFR2 par le VEGF entraîne la réorganisation du cytosquelette d'actine et la génération de différentes structures d'actine responsables de la migration cellulaire tels que la formation de filopodes, de lamellipodes et de fibres de stress (Lamalice et al., 2007). Différents mécanismes moléculaires mènent à ces réarrangements d'actine et ainsi permettent la migration des cellules endothéliales dans la direction du stimulus angiogénique tel que présenté à la figure 5.

Pour induire la génération de fibres de stress dans la cellule endothéliale, la phosphorylation de la Y1214 du VEGFR2 induit le recrutement de la protéine d'échafaudage Nck, via son domaine SH2 en complexe avec la kinase Fyn, de la famille Src (Lamalice, Houle, & Huot, 2006). La phosphorylation subséquente de la Ser/Thr kinase Pak2 (p21-Activated protein Kinase) à la suite de l'activation de la GTPase Cdc42 (Cell Division Cycle 42) induit l'activation de la MAPK p38 (Lamalice et al., 2006). Cette voie de signalisation induit la génération de fibres de stress essentielles pour la médiation de la migration cellulaire (Lamalice, Houle, Jourdan, & Huot, 2004) (Rousseau, Houle, Landry, & Huot, 1997) (Lamalice et al., 2006).

La génération de fibres de stress est aussi régulée par la protéine Tsad/Vrap (T-cell-specific adapter molecule ou aussi nommé VRAP pour VEGFR-associated protein). À la suite de la phosphorylation du résidu Y951 du VEGFR2 en réponse au VEGF, il y a association de cette protéine

via son domaine SH2 (L. W. Wu et al., 2000) (Zeng et al., 2001). Ce recrutement induit le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration des cellules endothéliales (Zeng et al., 2001). L'utilisation d'une construction du VEGFR2 muté pour la Y951 en phénylalanine, ou l'utilisation d'un peptide Y951 phosphorylé, ou l'inhibition de l'expression de Tsad suite à la transfection d'ARN interférents résultent tous en une diminution de la formation de fibres de stress et une diminution de la migration cellulaire. De plus, les souris Tsad KO présentent une moins grande vasculature tumorale, ce qui démontre l'impact et l'importance de cette voie de signalisation pour la migration cellulaire et l'angiogenèse (Matsumoto et al., 2005) (Zeng et al., 2001).

La génération d'adhésions focales, régulée par la kinase FAK (Focal-Adhesion Kinase), est un phénomène essentiel à la migration cellulaire. En réponse au VEGF, la phosphorylation de la Y1175 permet le recrutement de Shb via son domaine SH2 et sa phosphorylation sur tyrosine par Src. Il s'ensuit une phosphorylation sur tyrosine de la kinase FAK et la formation d'adhésions focales et de fibres de stress pour permettre la migration cellulaire (Holmqvist et al., 2004). De plus, FAK peut être activé en aval de la GTPase RhoA et de son effecteur ROCK après l'activation de HSP90 en réponse au VEGF. ROCK génère la Ser phosphorylation du résidu 732 de FAK qui induit un changement conformationnel essentiel pour la phosphorylation sur tyrosine de FAK sur le résidu Y407 par la kinase Pyk2 (Proline Rich Tyrosine Kinase 2). S'ensuit un roulement des adhésions focales et une migration cellulaire des cellules endothéliales (Le Boeuf, Houle, & Huot, 2004) (Le Boeuf, Houle, Sussman, & Huot, 2006) (Duval, Le Boeuf, Huot, & Gratton, 2007).

Après la stimulation au VEGF, l'activation de la PI3K permet la génération de lipides Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) présents à la membrane et induit de cette façon le recrutement et l'activation de la GTPase Rac, responsable de la formation des lamellipodes. La protéine d'échafaudage Gab1 induit l'activation de cette voie de signalisation. Les protéines d'échafaudage peuvent être responsables du remodelage de l'actine (Dance et al., 2006) (Laramee et al., 2007) (Chapitre 3).

Les différentes étapes de migration et d'invasion cellulaire s'avèrent cruciales lors de la formation d'un nouveau capillaire sanguin. Le VEGF régule de diverses manières les différentes signalisations qui mènent au remodelage du cytosquelette d'actine pour initier la migration cellulaire. Il est donc primordial de bien caractériser les différentes étapes qui régulent ces processus puisque plusieurs mécanismes demeurent à ce jour mal caractérisés.

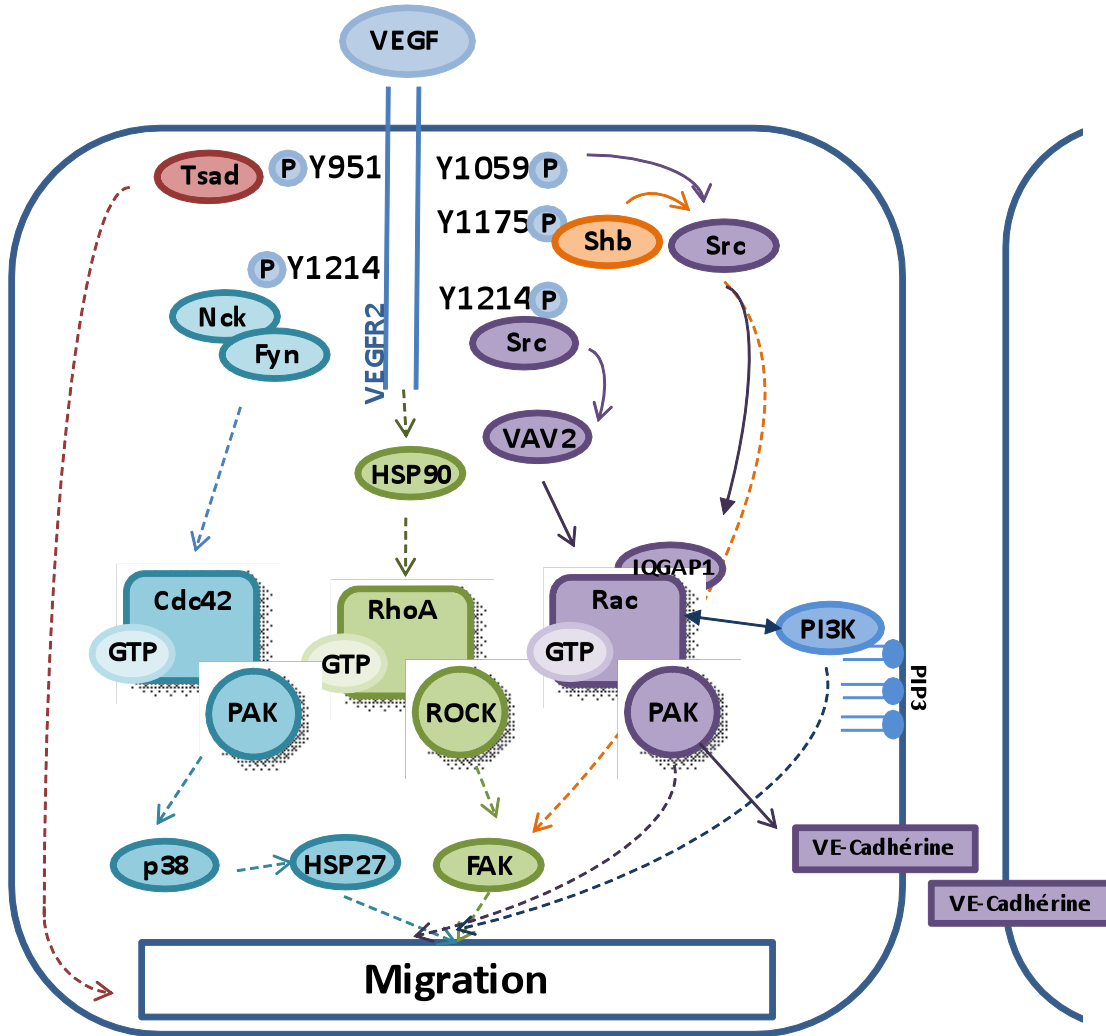


Figure 5. La signalisation cellulaire régulée par le VEGF via le VEGFR2 pour induire la migration cellulaire endothéliale.

Le VEGF permet l'activation du VEGFR2 au sein des cellules endothéliales et l'activation subséquente de plusieurs signalisations permettant le remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de lamellipodes, de filopodes et de fibres de stress résultant en un processus de migration cellulaire.

Inspiré de (Lamallice et al., 2007)

2. Les protéines d'échafaudage

Les récepteurs à fonction tyrosine kinase peuvent moduler la signalisation de plusieurs façons, soit à la suite de la liaison directe des protéines nécessaires à leur signalisation ou via la liaison de protéines d'échafaudage. Ces dernières sont des protéines ne détenant pas d'activité enzymatique qui modulent l'interaction d'autres molécules de signalisation. Elles permettent d'établir une plateforme signalétique suite au recrutement de diverses enzymes et protéines et ainsi amplifient cette signalisation. Elles permettent aussi une régulation spatiale et temporelle de la signalisation intracellulaire à la suite de la formation de complexes protéiques spécifiques. Il existe plusieurs protéines d'échafaudage tel que les protéines de la famille IRS1, MyD88 et Gab1 (Pawson, 2007). Une des premières protéines d'échafaudage identifiées fut la protéine Ste5 chez la levure. Cette protéine permet le recrutement des protéines responsables de la cascade signalétique MAPK et mène à l'activation de Erk1/2 (Choi, Satterberg, Lyons, & Elion, 1994). Cette identification fut suivie de la découverte de nombreuses protéines adaptatrice et protéines d'échafaudage incluant Gab1, Gab2, Gab3, IRS1, IRS2 et plusieurs autres (Gu & Neel, 2003).

Il existe des protéines adaptatrices et des protéines d'échafaudage. Toutes peuvent relier différentes protéines de signalisation et sont essentielles à bon nombre de voies de signalisation malgré leur absence d'activité enzymatique intrinsèque. Toutefois, les protéines d'échafaudage sont généralement plus grandes et agissent comme une plateforme pour permettre l'assemblage de protéines pour permettre l'induction d'une plus grande signalisation qui s'avère plus diversifiée (Buday & Tompa, 2010a, 2010b) (Alexa, Varga, & Remenyi, 2010) (Pawson & Scott, 1997).

La famille des protéines d'échafaudage IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) permet d'amplifier la signalisation de l'insuline via le récepteur IGF1 (Insulin Like Growth Factor-1). Elle amplifie la signalisation de la PI3K et des MAPK Erk1/2. Elle détient un domaine PH et un domaine PTB présentant plusieurs tyrosines phosphorylables.

Les protéines d'échafaudage permettent la régulation de nombreuses activités biologiques importantes entre autre lors de l'angiogenèse. La protéine adaptatrice Shc détient un domaine SH2, un domaine PTB et un domaine CH1, et plusieurs tyrosines phosphorylées. Shc peut être en complexe avec Gab1 et le VEGFR2 en réponse au VEGF. Il a été montré que Shc module la signalisation cellulaire

responsable de la survie en réponse au VEGF et aux intégrines, et module la migration des cellules endothéliales dépendante des intégrines (Sweet, Chen, Wiley, Bautch, & Tzima, 2012). La protéine adaptatrice Grb2, qui se lie à Shc, régule aussi plusieurs voies de signalisation importantes pour l'angiogenèse tumorale (Giubellino, Burke, & Bottaro, 2008). Shc est une protéine adaptatrice importante pour induire l'activation de Rac en réponse au VEGF, et pour induire l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Telle que lors de la formation de capillaires sur matrigel, le bourgeonnement de capillaires chez le poisson zèbre ou le développement vasculaire de la rétine de souris (Oshikawa et al., 2012).

2.1 Les protéines d'échafaudage de la famille Gab1

Gab1 (Grb2 Associated Binding protein 1) a d'abord été clonée dans une banque de cDNA de glioblastome en 1996 dans le cadre d'une étude qui avait pour but d'identifier des partenaires phosphorylés de Grb2 en réponse à l'EGF (Epidermal Growth Factor) et à l'insuline (Holgado-Madruga, Emler, Moscatello, Godwin, & Wong, 1996). De plus, parallèlement à ces études, il fut aussi identifié en réponse au HGF (Weidner et al., 1996). Gab1 est le premier membre de la famille qui inclut également Gab2 et Gab3 (Nakaoka & Komuro, 2013). Ils détiennent entre 40 et 50% d'homologie de séquence et présentent donc certaines fonctions similaires. Assez conservé entre les espèces, on retrouve DOS (Daughter Of Sevenless) chez la *drosophile* et SOC-1 (Suppressor Of Clear) chez *Caenorhabditis elegans* possédant une forte homologie avec Gab1. DOS a été identifié comme un substrat potentiel de la phosphatase CSW (Corkscrew), soit l'homologue de Shp2 chez la drosophile et est essentielle au développement de la mouche (Herbst et al., 1996) (Raabe et al., 1996) (Bausenwein, Schmidt, Mielke, & Raabe, 2000). De la même façon, Soc1 est essentielle à la signalisation de l'homologue du FGF chez *C. elegans* (Y. Liu & Rohrschneider, 2002). Elle s'associe avec l'homologue de Shp2 et est essentielle pour le développement du nématode (Schutzman et al., 2001).

Les trois membres de la famille Gab détiennent une structure similaire tel que démontré à la figure 6 (Simister & Feller, 2012). Ils présentent un domaine PH en N-terminale qui leur permet de s'associer aux phospholipides (PIP3) générés à la membrane des cellules. Leur région centrale détient un domaine riche en Proline qui module leur association à des domaines SH3 (Src Homology 3) d'autres protéines de signalisation. Les nombreuses tyrosines phosphorylables en C-terminale leurs permettent de s'associer à des protéines possédant des domaines SH2 (Src Homology 2). Gab s'associe à différentes molécules de signalisation telles que Grb2, PI3K, PLC γ et Shp2. Ces trois

protéines d'échafaudage permettent donc d'amplifier la signalisation de nombreux récepteurs grâce à la formation de complexes de protéines localisés dans la cellule à la suite de leur tyrosine phosphorylation en réponse à différents stimuli tels que des facteurs de croissances, mais aussi en réponse à différentes cytokines et antigènes (Wohrle, Daly, & Brummer, 2009) (Vaughan, Verma, & Bunting, 2011) (Gu & Neel, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002) (Sarmay, Angyal, Kertesz, Maus, & Medgyesi, 2006) (Simister & Feller, 2012) (Nishida & Hirano, 2003).

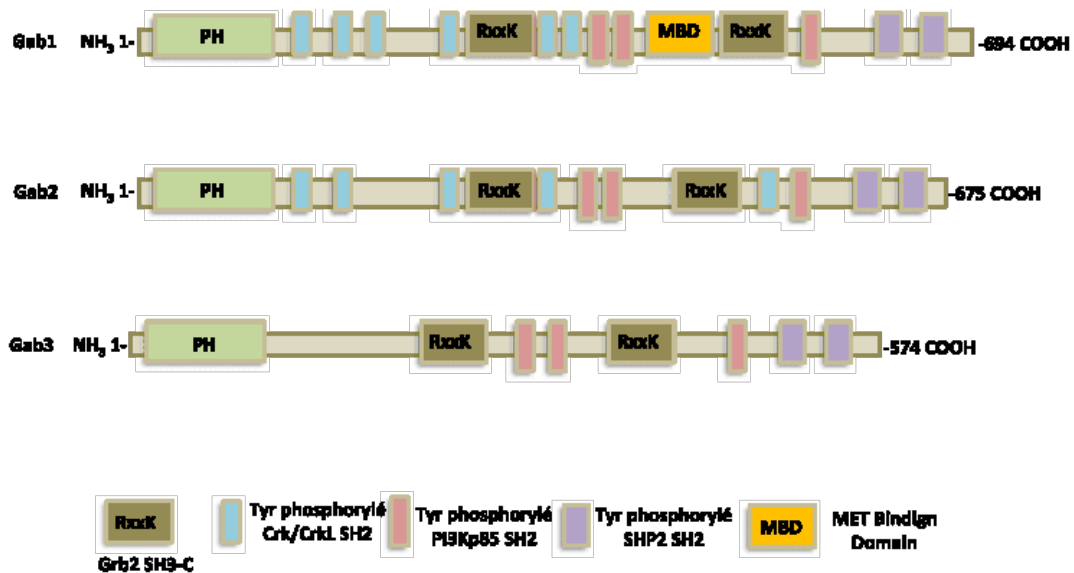


Figure 6. Les protéines d'échafaudage de la famille Gab

Représentation schématique de la structure des protéines d'échafaudage de la famille Gab. Toutes les protéines Gab détiennent à leur extrémité N-Terminale un domaine PH fortement conservé qui leur permet de s'ancrer aux phospholipides présents à la membrane plasmique des cellules. Elles détiennent aussi une région riche en Proline qui permet une association aux protéines détenant des domaines SH3 (tel que Grb2). De plus, elles présentent des motifs de liaisons pouvant lier les domaines SH2 de d'autres protéines (tel que Shp2, Crk, PLCy) suite à la tyrosine phosphorylation.

Inspiré de (Simister & Feller, 2012)

2.1.1 Gab1

Gab1 est un élément crucial de la signalisation cellulaire et est employé par une myriade de récepteurs tel que c-MET, EGFR et le VEGFR2 (Wohrle et al., 2009) (Vaughan et al., 2011) (Gu & Neel, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002) (Sarmay et al., 2006) (Simister & Feller, 2012) (Nishida & Hirano,

2003). Les souris Gab1 KO meurent entre les jours E13.5 et E18,5 *in utero* à cause de défauts de développement au niveau du cœur, du placenta et de la peau (Itoh et al., 2000) (Sachs et al., 2000). De plus, ces souris présentent des défauts au niveau du développement de leurs muscles causés par une inhibition de la migration cellulaire. Gab1 est entre autres responsable de l'activation des voies de signalisation de la PI3K/Akt et de la voie Shp2/Erk1/2. De plus, Gab1 stimule d'importantes fonctions biologiques telles que la survie cellulaire, la différenciation cellulaire et la morphogénèse.

Le domaine PH de Gab1, qui s'associe aux phospholipides membranaires, permet une localisation à la membrane cellulaire de Gab1 et des différentes protéines qui lui sont associées (Maroun, Moscatello, et al., 1999) (Maroun, Holgado-Madruga, et al., 1999) (Maroun, Naujokas, & Park, 2003) (Dance et al., 2006). Le domaine PH de Gab1 est essentiel pour médier la morphogénèse dépendante de MET, puisque l'utilisation de constructions mutantes pour le domaine PH empêche ce processus (Maroun, Moscatello, et al., 1999). Ceci démontre l'importance de la localisation de Gab1 pour la médiation de ces activités biologiques.

Le domaine riche en proline de Gab1 permet de lier de nombreuses protéines détenant des domaines SH3, dont la protéine adaptatrice Grb2. Cette association est connue pour permettre le recrutement de Gab1 à différents RTKs tel que le VEGFR2. Les fibroblastes isolés de souris Grb2 KO ne présentent pas de tyrosines phosphorylées sur Gab1 en réponse au EGF. De plus, un mutant de Gab1 ne se liant pas à Grb2 exprimé dans les MDCK ou 293T en présence de TPR-MET ou VEGFR2 est également non-phosphorylé, ce qui démontre l'importance du domaine Proline et de sa liaison à Grb2 pour la phosphorylation de Gab1 par les RTKs (Saxton et Cheng 2001). Toutefois, Gab1 est le seul membre de la famille à détenir aussi à l'intérieur du domaine PRD le domaine MBD (Met-Binding Domain) constitué d'une séquence de seize acides aminés qu'on appelle MBS pour Met Binding Sequences, qui permet une association directe entre Gab1 et le récepteur MET (Lock, Royal, Naujokas, & Park, 2000). La génération de souris KI (knock-in) exprimant un mutant de Gab1 incapable de se lier à Grb2 (Gab1 Δ Grb2) est létale au jour embryonnaire E14,5 à cause des défauts au niveau du foie et du placenta (Schaeper et al., 2007). Il est intéressant de noter que ces défauts sont assez similaires à ceux de la souris KI exprimant un mutant de Gab1 incapable de lier Met (Gab1 Δ MET). De plus, les défauts au niveau du développement des muscles, qu'on peut observer dans la souris Gab1 KO ne sont pas présents dans ces deux modèles de souris KI ce qui laisse présager l'importance d'un autre domaine pour cette fonction (Schaeper et al., 2007).

Les différentes tyrosines phosphorylées permettent de lier des domaines SH2 de différentes protéines de signalisation. Le motif YXXV/I/L entraîne plus particulièrement la liaison du domaine SH2 de la phosphatase Shp2. Cette association permet l'activation de la voie de signalisation MAPK/Erk1/2 (Cunnick, Dorsey, Munoz-Antonia, Mei, & Wu, 2000) (Cunnick et al., 2002) (Laramée et al., 2007). La phosphatase Shp2 détient deux domaines SH2 qui lui confère une conformation repliée inactive. La liaison de ces deux domaines SH2 sur des tyrosines phosphorylées de Gab1 permet une conformation ouverte et active de la phosphatase. Il a été démontré qu'en réponse au EGF suite à la stimulation du EGFR, la phosphorylation sur tyrosine de Gab1 permet l'association de Shp2 à Gab1 (Cunnick et al., 2000). Ainsi, ils proposent comme modèle que la phosphatase pourrait déphosphoryler certains résidus sur la Paxilline qui est associée à Gab1. De cette façon, Csk cesserait de phosphoryler le résidu inactivateur de Src, lui aussi associé à la paxilline, ce qui résulterait en la phosphorylation activatrice de Erk1/2 par Src actif et la phosphorylation d'autres substrats essentiels à l'induction de différents processus de motilité cellulaire (Y. Ren et al., 2004) (Montagner et al., 2005).

De plus, l'association de Shp2 à Gab1 régule aussi des signalisations cruciales dans la cellule, dont la morphogénèse épithéliale médiée par MET, puisque l'utilisation d'une construction mutante des tyrosines en phénylalanine des résidus requis pour l'association de Shp2 à Gab1 empêche cette morphogénèse (Maroun, Naujokas, Holgado-Madruga, Wong, & Park, 2000). À l'inverse, la souris KI exprimant un mutant de Gab1 incapable de se lier à Shp2 (Gab1 Δ Shp2) corrèle elle aussi avec une diminution de l'activation de Erk1/2 et une migration cellulaire altérée. En effet, cette souris meurt à jour E12,5 à cause de défauts au niveau du placenta, et du développement des muscles, puisque les progéniteurs de ceux-ci présentent des défauts au niveau de la migration (Schaeper et al., 2007).

Il a été démontré que Gab1 pouvait lier la sous-unité p85 de la PI3K et ainsi permettre son recrutement et son activation au récepteur VEGFR2 (Dance et al., 2006) (Laramée et al., 2007). Les trois tyrosines appartenant au motif YXXM de Gab1 permettent de lier cette sous-unité. De cette façon, Gab1 active la signalisation dépendante de la PI3K et ainsi induit la croissance cellulaire, la survie cellulaire, la migration cellulaire et la prolifération cellulaire (Fan et al., 2001) (Laramée et al., 2007) (Lemarie & Lehoux, 2011). Comme la PI3K génère des phospholipides à la membrane, elle induit aussi une boucle de rétro-action positive puisque ces phospholipides vont permettre d'augmenter l'association de Gab1 à la membrane via son domaine PH. La souris KI exprimant un mutant de Gab1 incapable de s'associer à la PI3K (Gab1 Δ PI3K) présente certains défauts tels que

l'ouverture de la paupière des souris à la naissance (Schaeper et al., 2007). De plus, la culture de cellules provenant de cette souris démontre l'importance de l'association de la PI3K à Gab1 pour la migration cellulaire puisque celles-ci ont un défaut de motilité. Malgré l'importance de cette signalisation, la souris Gab1 Δ PI3K KI demeure viable. Ce fait pourrait être en partie expliqué puisqu'aucune apoptose n'est observée dans la paupière des souris exprimant le mutant Gab1 Δ PI3K, de même qu'aucune différence de prolifération n'est observable entre les souris mutantes et sauvages. Ainsi, la signalisation du VEGFR2 via Gab1 pour médier l'activation de la PI3K demeure une voie cruciale entre autre pour la migration cellulaire quoique non-essentielle pour la survie des animaux probablement du à l'utilisation de voies compensatoires.

Gab1 est un modulateur important pour la réponse morphogénique induite par le récepteur MET actif (Weidner et al., 1996) (Maroun, Moscatello, et al., 1999) (Sachs et al., 2000). De plus, il est important pour la transformation oncogénique en aval de MET et de EGF. Les souris Gab1 KO présentent des défauts similaires aux souris mutantes pour divers récepteurs tels que HGFR KO, PDGFR KO, EGFR KO (Sachs et al., 2000). La plus grande similarité se retrouve en les souris MET KO et Gab1 KO. Ceci suggère que Gab1 est un amplificateur crucial de la signalisation de ce récepteur, ce qui s'explique peut-être en partie par la liaison directe et unique de Gab1 et MET (Yamasaki, Nishida, Sakuma, et al., 2003) (Maroun, Holgado-Madruga, et al., 1999) (Gual et al., 2000) (Maroun et al., 2000) (Schaeper et al., 2000) (Lamorte, Rodrigues, Naujokas, & Park, 2002) (Lock, Maroun, Naujokas, & Park, 2002) (Yamasaki, Nishida, Sakuma, et al., 2003).

Plusieurs études ont démontré l'implication de Gab1 dans la signalisation des cellules endothéliales (Dance et al., 2006) (Jin, Wong, Wu, & Berk, 2005) (Kallin et al., 2004) (Dixit et al., 2005) (Chabot, Spring, Gratton, Elchebly, & Royal, 2009) (Laramee et al., 2007) (Caron et al., 2009). En réponse au VEGF, Gab1 est phosphorylé sur tyrosine et recruté au VEGFR2 via Grb2. Cette phosphorylation et ce recrutement permettent la liaison de diverses protéines de signalisation telles que la sous-unité p85 de la PI3K, la phosphatase Shp2, Shc et PLC γ . La perte d'expression de Gab1, sa déplétion, et l'utilisation de constructions mutantes de Gab1 révèlent que Gab1 est requis pour induire la signalisation du VEGF via le VEGFR2 (Dance et al., 2006) (Laramee et al., 2007) (Shioyama et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011). Certaines études ont démontré l'importance de Gab1 pour induire la réorganisation du cytosquelette d'actine, la migration cellulaire et la formation de capillaires. Celles-ci révèlent l'importance de Gab1 dans les cellules endothéliales en réponse au

VEGF pour la signalisation cellulaire et l'angiogenèse (Dance et al., 2006) (Laramée et al., 2007). Aussi, en réponse au PDGF, Gab1 est phosphorylé sur tyrosine, recruté au récepteur PDGFR via Grb2, s'associe à Shp2 et induit ainsi les voies de signalisation Erk1/2 et p38. Cette activation provoque un remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de lamellipodes et la migration de cellules endothéliales (Kallin et al., 2004). De plus, en réponse aux forces de cisaillement endothélial, Gab1 est phosphorylé sur tyrosine en aval du VEGFR2 via l'activation de la kinase Src, et induit de cette façon la signalisation PI3K/Akt/eNOS (Jin et al., 2005) et active la voie de signalisation PKA, et la sécrétion de NO (Dixit et al., 2005). Malgré plusieurs évidences de l'implication de Gab1 au sein des cellules endothéliales, encore plusieurs mécanismes moléculaires contrôlés par Gab1 demeurent inconnus ou mal-caractérisés.

2.1.2 Gab2

Gab2 a été identifié en 1998 comme étant une protéine majoritairement associée à la phosphatase Shp2 (Gu, Pratt, Burakoff, & Neel, 1998) (Nishida et al., 1999) (C. Zhao, Yu, Shen, & Feng, 1999). Toutefois, une phosphoprotéine de 97-100 kDa associée à la sous-unité p85 de la PI3K après stimulation à l'IL3 ou le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) avait aussi été reconnue plus tôt (Carlberg & Rohrschneider, 1997) (Gu et al., 1998). Gab2 possède entre 40 et 50 % d'homologie de séquence avec Gab1 et est aussi exprimé de façon ubiquitaire dans tous les organes, quoique son expression semble être moins forte que Gab1 dans la majorité des tissus, à l'exception de cellules hématopoïétiques (Gu et al., 2001) (Adams, Aydin, & Celebi, 2012). Bien que similaires et détenant certaines fonctions communes, Gab1 et Gab2 semblent toutefois détenir certaines activités différentes l'un de l'autre. Contrairement à la délétion de Gab1 chez la souris qui est létale au niveau embryonnaire, la souris Gab2 KO est viable et présente surtout des défauts au niveau de son système immunitaire (Gu et al., 2001). La réponse allergique des souris Gab2 KO est largement altérée, ce qui pourrait être en lien avec sa plus forte expression dans les cellules hématopoïétiques (Gu et al., 2001) (Nishida et al., 2002).

Gab2 joue un rôle dans la promotion de différents types de cancers incluant le cancer de l'ovaire, la leucémie, le gliome, le mélanome, le cancer du poumon et le cancer du sein (Adams et al., 2012). Il est impliqué dans la leucémie myéloïde chronique (MLC) qui se caractérise par l'activation de BCR/ABL. Il s'agit d'une fusion entre le gène BCR et ABL du à une translocation qui code pour une tyrosine kinase. Cela mène à la production du gène de fusion BCR/ABL entraînant ainsi l'activation

constante de cette kinase (translocation entre les chromosomes 9 et 22). De nombreuses études démontrent que Gab2 est essentiel en aval de cette tyrosine kinase pour mener au développement de la leucémie (Sattler et al., 2002). De plus, une amplification génique du locus 11q13-14, contenant le gène *GAB2*, est fréquemment observée dans de nombreux cas de cancers du sein et de l'ovaire (Adams et al., 2012) (Nakaoka & Komuro, 2013). Dans le contexte du cancer du sein, une étude en 2002 a démontré une augmentation de l'expression de Gab2 dans des lignées de cancer du sein invasives comparativement aux lignées normales mammaires (Daly et al., 2002), et ces résultats furent confirmés par la démonstration de l'amplification du gène *GAB2* dans plusieurs cancers du sein humain et l'amplification du locus 11q13 (Bentires-Alj et al., 2006) (Bocanegra et al., 2010). Des expériences *in vitro* démontrent également que Gab2 contribue au phénotype invasif du cancer du sein, puisque la surexpression de Gab2 dans une lignée épithéliale mammaire immortalisée (MCF10A) induit une augmentation de la prolifération cellulaire et induit la production d'acinis plus grands et désorganisés sur Matrigel (Brummer et al., 2006) (Bentires-Alj et al., 2006) (Bennett, Brummer, Jeanes, Yap, & Daly, 2008). À l'inverse, l'inhibition de l'expression de Gab2 dans différentes lignées de cancer du sein invasif, présentant une amplification génique de *GAB2*, diminue la prolifération cellulaire et réduit le potentiel migratoire et invasif de ces lignées cellulaires (Ke et al., 2007) (Bocanegra et al., 2010). Gab2 semble moduler son rôle sur la migration et l'invasion des cellules du cancer du sein à la suite de son association à Shp2 et à l'activation subséquente de la voie des MAPK Erk1/2 (Brummer et al., 2006) (Bentires-Alj et al., 2006) (Bennett et al., 2008). De plus, le recrutement de Shp2 à Gab2 induit l'activation de la voie de la GEF VAV2 et la localisation de la GAP p190RhoAGAP à la membrane (Herrera Abreu et al., 2011). Cette localisation permet l'inhibition de la RhoGTPase RhoA et atténue le roulement des adhésions focales. Ces modulations sur le cytosquelette d'actine résultent en une augmentation de la migration et de l'invasion *in vitro* de cellules de cancer du sein (Herrera Abreu et al., 2011). Ce phénomène est aussi observé lorsque la Ser/Thr Kinase RSK phosphoryle Gab2, ce qui inhibe la liaison de Shp2 à Gab2 et se répercute en des résultats similaires sur la migration cellulaire de cellules mammaires (MCF10A) (Y. Zhang et al., 2007). Des expériences *in vivo* avec des souris transgéniques MMTV Neu NT Gab2^{+/+} ou MMTV Neu NT Gab2^{-/-} démontrent le lien entre l'initiation de la tumorigenèse du cancer du sein induite par Neu (ErbB2 / HER2) et Gab2 puisque les souris transgéniques ne détenant pas Gab2 développent moins de tumeurs (Bentires-Alj et al., 2006). De plus, l'absence de Gab2 diminue de 75% à 25% la génération de métastases aux poumons dans ce modèle murin (Ke et al., 2007). Ces différentes études démontrent l'importance de

Gab2 et certains des mécanismes moléculaires impliqués dans la promotion de divers cancers (Adams et al., 2012).

Certaines études tendent aussi à démontrer un lien entre le gène de Gab2 et l'Alzheimer, plus particulièrement le « Late Onset Alzheimer Disease » ou LOAD. Depuis la première étude démontrant ce rôle (Reiman et al., 2007) plus d'une trentaine d'études évaluent l'implication de Gab2 dans le développement de cette maladie. Il semble que Gab2 pourrait avoir un impact sur l'Alzheimer via la voie de la PI3K/GSK3 et la phosphorylation du substrat de GSK3, Tau. Certaines contradictions sont cependant soulevées (Pan, Ren, Wang, Tang, & Chen, 2010). Plusieurs études démontrent une corrélation positive entre le gène *GAB2* et la maladie d'Alzheimer, telles que des études provenant des États-Unis, des Pays-Bas, de la Belgique et de l'Italie (Slegers et al., 2009) (Schjeide et al., 2009) (Ikram et al., 2009) (Nacmias et al., 2009). Toutefois, plusieurs autres études sont incapables de démontrer cette association, soit les études en provenance de la Grande-Bretagne, du Japon, de l'Espagne et de la Chine (Miyashita et al., 2009) (Ramirez-Lorca et al., 2009) (Chapuis et al., 2008). Ainsi, des études demeurent à être conduites pour démontrer la réelle implication ou non de Gab2 dans cette maladie.

Contrairement à Gab2, moins d'études démontrent un rôle pour Gab1 dans le cancer. Toutefois, Gab1 est un amplificateur important de la signalisation en aval de plusieurs oncogènes. Par exemple, la génération de souris transgéniques développant des tumeurs mammaires sous l'influence de l'oncogène ErbB2 a démontré l'implication essentielle de Gab1 dans cette signalisation et dans la formation de tumeurs (Gillgrass, Cardiff, Sharan, Kannan, & Muller, 2003). L'utilisation de souris transgéniques sous le contrôle du promoteur MMTV, ErbB2 en présence d'un EGFR actif ou catalytiquement inactif, démontre que la tumorigenèse nécessite l'activation du EGFR et de la tyrosine phosphorylation de Gab1 qui en découle pour être efficace (Gillgrass et al., 2003). On peut aussi faire le parallèle de l'importance de Gab1 pour amplifier la signalisation de l'oncogène MET, puisque les souris Gab1 KO et MET KO ont des phénotypes très similaires. De plus, le criblage de cancer du sein humain a permis d'identifier la présence de deux mutations somatiques dans le gène *GAB1*, soit T387N et Y83C. La validation *in vitro* de ces mutations démontrent des changements morphologiques des cellules MCF10A à la suite de l'expression de constructions présentant ces mutations et l'induction de tubulogénèse dans ces cellules épithéliales. La mutation sur T387 mène à

l'incapacité d'activer la voie de rétro-inhibition négative ce qui pourrait résulter en une sur-activation de la signalisation (Ortiz-Padilla et al., 2013).

2.1.3 Gab3

Gab3 est moins étudié que ses deux précédents homologues. Il a été identifié en 2002, grâce au projet de séquençage génomique suivant une stratégie basée sur la similarité de séquence à Gab1 (Wolf et al., 2002). Il détient une structure similaire à ses homologues et peut lui aussi être phosphorylé sur tyrosine en réponse aux facteurs de croissance et ainsi permettre l'amplification de leur signalisation. Son expression est toutefois restreinte aux tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, tel que la rate, le thymus, les lymphocytes et les macrophages dérivés de la moelle osseuse. Malgré cette expression localisée, les souris déficientes en Gab3 ne présentent pas de défaut d'hématopoïèse, ni de défaut de développement de macrophage et ces souris sont immunocompétentes (Seiffert et al., 2003).

3. La régulation du cytosquelette d'actine par les RhoGTPases

Le remodelage du cytosquelette d'actine est essentiel à la promotion de la migration et l'invasion des cellules endothéliales lors de la formation de nouveaux capillaires. Les RhoGTPases sont d'importants médiateurs de la réorganisation du cytosquelette d'actine et induisent la formation de différentes structures d'actine telles que les filopodes, les lamellipodes et les fibres de stress tel que présenté à la figure 7.

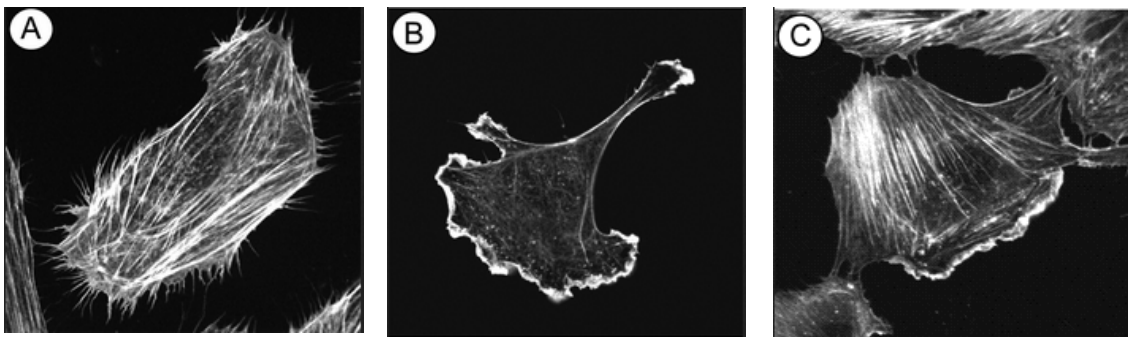


Figure 7. Les structures d'actine régulées par les RhoGTPases chez les cellules endothéliales

A. Les filopodes sont des projections membranaires qui contiennent de longues protrusions de filaments d'actine disposés de façon parallèle. Ces structures servent de « senseurs » de l'environnement de la cellule et sont présentes entre autres sur les cellules meneuses lors du bourgeonnement des capillaires. B. Les lamellipodes sont des protrusions de la membrane où se concentre un réseau de filament d'actine corticale. Elles se retrouvent au front de migration de cellules en mouvement. C. Les fibres de stress sont constituées de filaments d'actine en association avec la myosin II et des protéines accessoires telles que la tropomyosin. Ces structures servent à ancrer la cellule aux adhésions focales et sont requises pour la rétraction de l'arrière de la cellule vers l'avant pendant la migration cellulaire.

Tiré de (Lamallice et al., 2007)
Permission obtenue

3.1 Les RasGTPases

Les membres de la Super-Famille RasGTPases sont des enzymes liés au GTP qui sont impliquées dans plusieurs signalisations cellulaires qui découlent en différentes activités biologiques telles que la croissance cellulaire, la différenciation, la survie cellulaire, le transport vésiculaire et la réorganisation de l'actine. Dans la grande famille des petites GTPases on retrouve cinq sous-familles, regroupées selon leur structure et leur séquence, qui sont chacune responsable de différentes fonctions cellulaires. Les protéines Arf (formation et trafic de vésicules), Rab (trafic de vésicules), Ran (transport nucléaire et mitose), Ras (prolifération et différenciation cellulaire) et les protéines Rho (prolifération cellulaire et morphologie cellulaire/cytosquelette) (Hall, 1998b) (Hall, 1998a).

Les GTPases fonctionnent comme des « commutateurs moléculaires » et vont cycler entre une conformation active, lorsque liés au GTP, qui est de façon prédominante associée aux membranes plasmiques et une conformation inactive, liée au GDP, qui se retrouve au cytoplasme. Ce cycle est schématisés à la figure 8 pour les RhoGTPases. La liaison du GTP induit un changement conformationnel dans les GTPases, ce qui permet une promotion de leur interaction avec plusieurs effecteurs qui eux permettent de contrôler la signalisation en aval. La régulation temporelle et spatiale des GTPases est un élément clé dans le contrôle de leur signalisation et se déroule à trois niveaux, soient l'échange du GDP au GTP, l'hydrolyse du GTP, et l'inhibition de la dissociation du GDP. L'activation des GTPases implique l'échange du GDP pour le GTP, qui est stimulé par les « Guanine Nucleotide-Exchange Factors » (GEFs). Les GEFs ont plusieurs domaines et déterminent la signalisation en amont des GTPases grâce à la liaison de différentes protéines. L'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP est très faible et doit être augmentée grâce à la liaison de protéines « GTPase-Activating Proteins » (GAPs). Cette liaison résulte en une GTPase maintenant liée au GDP, elle devient inactive et donc, la signalisation contrôlée par cette dite GTPase se termine. Tout comme les GEFs, les GAPs peuvent détenir plusieurs domaines de liaison à d'autres protéines et ainsi contrôler leurs interactions. La relâche du GDP d'une RhoGTPase est inhibée par les « Guanine Nucleotide-Dissociation Inhibitors » (GDIs). Les GDIs, empêchent de cette façon la translocation membranaire des RhoGTPases en masquant leur extrémité C-Terminale (région requise pour l'interaction des GTPases aux phospholipides). Ainsi, les RhoGTPases en liaison avec un GDIs sont séquestrées au cytosol et ne peuvent être activées.

3.1.1 Les RhoGTPases

La sous-famille Rho (Ras homologous) compte vingt membres chez l'humain (Wennerberg & Der, 2004) (Raftopoulou & Hall, 2004). Cette sous-famille est importante pour réguler plusieurs fonctions biologiques comme la progression du cycle cellulaire, l'expression génique et la régulation du cytosquelette d'actine. Les trois membres les plus étudiés sont Rac1, Cdc42 et RhoA, (Vega & Ridley, 2008). Ces GTPases sont exprimées de façon ubiquitaire.

La majorité des Rho GTPases sont ancrées à la membrane pour leur permettre d'agir de façon efficace grâce à une modification lipidique à leur C-terminus (prénylation et/ou palmitoylation). À la suite de leur liaison au GTP, leur nouvelle conformation induit leur activation. De cette façon, elles peuvent médier leurs effets en interagissant avec leurs différents effecteurs, et ainsi stimuler une multitude d'activités telles que : la morphogenèse, la migration cellulaire, la polarité cellulaire, le développement neuronal, la division cellulaire, l'adhésion, le transport vésiculaire, la dynamique des microtubules, la progression du cycle cellulaire, et l'expression génique (Wennerberg & Der, 2004) (Raftopoulou & Hall, 2004). Toutefois leur fonction la plus étudiée, et donc la mieux caractérisée, demeure la régulation de l'organisation de l'actine filamenteuse. En régulant le cytosquelette d'actine, les GTPases contrôlent le mouvement cellulaire, la morphologie cellulaire, la polarité cellulaire et l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice (Paterson et al., 1990) (Hall, 2009, 2012; Jaffe & Hall, 2005; Raftopoulou & Hall, 2004).

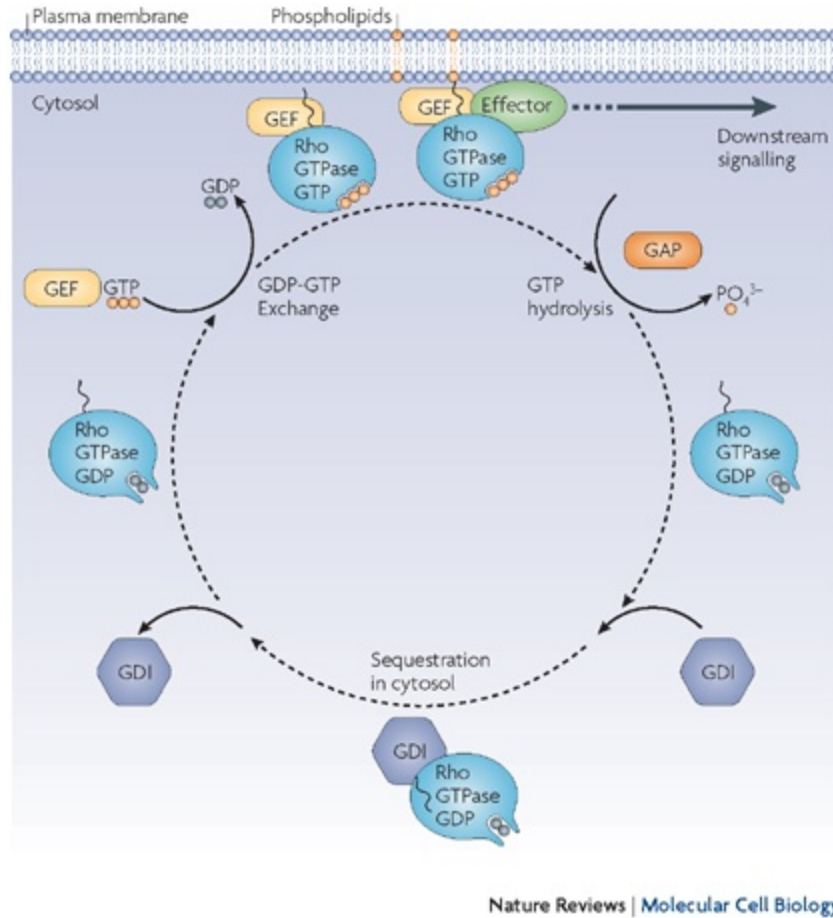


Figure 8. La régulation des RhoGTPases

Les RhoGTPases sont des enzymes qui alternent entre une forme active liées au GTP et inactive liées au GDP. Les différents régulateurs permettent cet échange. Une RhoGTPase inactive, liée au GDP sera activée par une GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) qui permet l'échange du GDP pour le GTP. À la suite de cette activation, la RhoGTPase peut lier un effecteur qui est responsable de médier la signalisation en aval. Par la suite, une GAP (GTPase Activating Protein) permet l'hydrolyse du GTP au GDP et ainsi l'inactivation de la RhoGTPase. Le GDI (Guanine Dissociation Inhibitor) entraîne la séquestration de la RhoGTPase au cytosol.

Tiré de (Iden & Collard, 2008)
Permission obtenue

3.1.1.1 La RhoGTPase Rac

La sous-famille Rac comprend Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG. Rac1, Rac3 et RhoG sont exprimés de façon ubiquitaire dans tous les tissus, avec un enrichissement observé au cerveau pour Rac3 (Wennerberg & Der, 2004) (Hall, 1998b) (Hall, 2012). Rac2 quant à lui est présent uniquement dans les cellules hématopoïétiques, ce qui corrèle avec l'incapacité des souris Rac2 KO de développer un système hématopoïétique fonctionnel (Roberts et al., 1999). Rac1 représente le membre le plus étudié et le mieux caractérisé. Rac1 est important pour médier le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, l'adhésion cellules-cellules et la motilité cellulaire (Hall, 2012). Rac1 module positivement la motilité cellulaire via la formation de lamellipodes dans la cellule (Wennerberg & Der, 2004) (Burrige & Wennerberg, 2004) (Ridley & Hall, 2004).

Rac fut purifié et séquencé pour la première fois en 1989 par Didsbury comme étant un « Ras-Related C-3 transferase substrate » (Didsbury, Weber, Bokoch, Evans, & Snyderman, 1989). C'est toutefois en 1992 qu'on comprit l'importance de Rac dans le remodelage de l'actine alors qu'il était démontré pour la première fois que la GTPase Rac était responsable de la formation de lamellipodes et de la formation de « ruffles » à la membrane (Ridley, Paterson, Johnston, Diekmann, & Hall, 1992). Les lamellipodes sont des protrusions de la membrane plasmique où se concentre un réseau de filament d'actine corticale grandement branché (Ridley et al., 1992). Les lamellipodes se retrouvent au front de migration de cellules en mouvement et sont donc essentielles à la migration cellulaire (Ridley & Hall, 1992).

L'étude de la souris Rac1 KO révèle le rôle et l'implication cruciale de Rac1 pour la génération de lamellipodes et la formation d'adhésions cellulaires, qui sont tous deux essentiels à la migration cellulaire. Les souris Rac1 KO meurent au jour embryonnaire E9,5 probablement à cause de graves défauts dans l'établissement des trois couches germinales durant la gastrulation (Sugihara et al., 1998). Les cellules provenant des souris Rac1 KO, malgré l'absence de lamellipodes, présentent tout-de-même la génération de filopodes, démontrant l'implication spécifique de Rac1 dans le remodelage de l'actine (Sugihara et al., 1998).

L'angiogenèse est en grande partie régulée par la migration des cellules endothéliales. Ainsi, plusieurs études ont démontré l'implication de Rac1 dans la formation de capillaires (Bayless & Davis,

2002) (Cascone et al., 2003) (Connolly, Simpson, Hewlett, & Hall, 2002) (Davis & Bayless, 2003) (Davis, Bayless, & Mavila, 2002) (Hoang, Whelan, & Senger, 2004) (Koh, Mahan, & Davis, 2008) et dans l'angiogenèse (Tan et al., 2008) (Sawada, Salomone, Kim, Kwiatkowski, & Liao, 2008) (Vader et al., 2011). L'induction d'une délétion conditionnelle de l'expression de Rac1 de façon spécifique aux cellules endothéliales (Rac1 ECKO (Endothelial Cell-specific Knock-Out)) *in vitro* a démontré son rôle essentiel pour la migration et l'adhésion des cellules endothéliales en plus de son importance pour la formation de capillaires induite par le VEGF (Tan et al., 2008). De plus, Rac1 détient un rôle crucial chez la souris, puisque la perte d'un seul allèle de Rac1 dans les cellules endothéliales est suffisante pour induire ces défauts d'angiogenèse post-natale, à la suite d'expériences d'ischémie induite dans les membres inférieures, soit la ligature de l'artère fémorale (Sawada et al., 2008). De plus, l'absence partielle de Rac1 atténue le bourgeonnement de capillaires à partir d'aortes de souris *ex vivo* en réponse au VEGF. Ces études démontrent clairement le rôle important de Rac1 dans la régulation de l'angiogenèse *in vivo*, et particulièrement dans les premières étapes « invasives » de l'angiogenèse lors de la formation de bourgeonnements (Sawada et al., 2008). Aussi, la diminution d'expression de Rac1, suite à la transfection d'ARN interférant (ARNi) diminue le potentiel invasif des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Vader et al., 2011). Ce résultat corrèle avec la diminution de la formation de vaisseaux sanguins induite en réponse au VEGF dans le Matrigel injecté dans une souris de façon concomitante avec un ARNi ciblant Rac1 (Vader et al., 2011). Dans ces conditions, on observe aussi une diminution de la masse tumorale et une diminution de l'angiogenèse tumorale en absence de Rac1 (Vader et al., 2011). Les souris ayant subi une délétion conditionnelle des deux allèles de Rac1 dans les cellules endothéliales (Rac1 ECKO) meurent au jour embryonnaire E9,5 (Tan et al., 2008). La présence des structures vasculaires telle que l'aorte dorsale en comparaison à l'absence de capillaires suggère néanmoins que Rac1 est important pour l'angiogenèse plutôt que la vasculogenèse (Tan et al., 2008).

3.1.1.2 La RhoGTPase Cdc42

La sous-famille Cdc42 (Cell division cycle 42), qui regroupe Cdc42, RhoQ et RhoJ, est responsable de la formation de filopodes et de la polarité cellulaire (Etienne-Manneville, 2004). Elle a en premier lieu été identifiée lors d'un large criblage par l'équipe de Hartwell en 1973 comme étant le « 42nd Cell Division Cycle mutant » (Hartwell, 1973). En 1990, Johnson démontre son implication comme RhoGTPase et dès ces premières études, on peut évaluer son rôle important dans la polarité cellulaire

(Johnson & Pringle, 1990). On l'identifie aussi chez la levure (Shinjo et al., 1990), et chez l'humain (Drubin, 1991) (Munemitsu et al., 1990).

Suite à la micro-injection de Cdc42 Actif (Cdc42^{V12}) dans des fibroblastes Swiss3T3, il a été démontré que Cdc42 régulaient la formation de filopodes à la surface des cellules (Nobes & Hall, 1995). Cdc42 est donc essentielle à la formation de filopodes. Les filopodes sont des projections membranaires qui contiennent de longues protrusions de filaments d'actine disposés de façon parallèle en faisceau d'actine filamenteuse serrée. Ces structures sont très dynamiques et servent de « senseurs » de l'environnement de la cellule et sont présentes, entre autres, sur les cellules meneuses lors du bourgeonnement des capillaires (Hu et al., 2011).

Dès son identification, il a été démontré que Cdc42 agissait de façon spécifique sur l'établissement de la polarité cellulaire qui est essentielle lors de la différenciation, de la morphogénèse et de la migration cellulaire. Ainsi, Cdc42 présente une contribution importante et plutôt spécifique pour la maintenance de la polarité (Etienne-Manneville, 2004). Cdc42 agit sur la polarité cellulaire principalement via son association au complexe des protéines Par3, Par6 et aPKCζ (Partitioning-defective et Atypical Protein Kinase C ζ). Dans les cellules en processus migratoire, Cdc42 actif recrute le complexe des protéines Par au front de migration cellulaire. Cdc42 se lie au domaine CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) de Par6, ce qui induit un changement conformationnel de Par6 qui lui permet son association à aPKCζ (Etienne-Manneville & Hall, 2002) (Etienne-Manneville, 2004) (Etienne-Manneville, Manneville, Nicholls, Ferenczi, & Hall, 2005) (Etienne-Manneville, 2008). L'activation de aPKCζ qui s'ensuit permet la phosphorylation et l'activation subséquente de Par3. Ce complexe joue un rôle dans la migration polarisée et permet la capture et la stabilisation des microtubules, la réorientation de l'appareil de golgi, du MTOC (Micro-Tubule Organizing Center) et des centrosomes face au front de migration (D. Lin et al., 2000) (Joberty, Petersen, Gao, & Macara, 2000) (Etienne-Manneville & Hall, 2003a) (Pegtel et al., 2007).

L'étude de Cdc42 dans les cellules endothéliales a démontré de multiples façons son importance pour la régulation de l'angiogénèse. Ainsi, l'inhibition d'expression de Cdc42 suite à la transfection d'ARNi va diminuer le potentiel migratoire des cellules et diminuer la formation de capillaires sur Matrigel *in vitro* (Kusuhara et al., 2012). Les embryons de souris Cdc42 KO meurent de façon précoce au jour E7,5 alors que les cellules souches provenant de ces embryons sont plus petites et plus rondes à cause d'un défaut de leur cytosquelette d'actine (Chen et al., 2000). Quant à eux, les embryons de

souris Cdc42 ECKO meurent aussi au stade embryonnaire, sont plus petits et présentent une moins grande quantité de vaisseaux sanguins (Hu et al., 2011). À l'inverse, l'expression de Cdc42 actif dans une « plug » de Matrigel chez la souris en réponse au VEGF induit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Hoang, Nagy, & Senger, 2011). Ainsi, Cdc42 a donc un rôle important lors de l'angiogenèse (M. Jain, Bhat, Vijayraghavan, & Inamdar, 2012).

La formation de la lumière du vaisseau est une étape cruciale lors de l'angiogenèse. Il y a deux mécanismes actuellement proposés pour expliquer la formation de la lumière. La formation de petits trous ou « gaps » extra-cellulaires qui vont progresser en de plus grands diamètres pour former la lumière du vaisseau. La séparation initiale entre les cellules se produit à la suite d'une polarisation des protéines de jonctions cellulaires telles que la VE-cadhérine ce qui va permettre de créer une polarité apico-basale et initier la formation de la lumière (Iruela-Arispe & Davis, 2009) (Lizama & Zovein, 2013). Les cellules endothéliales vont subir une répulsion aux niveaux des jonctions cellules-cellules. Une fois la lumière formée, le flot sanguin émet une force dynamique dans la lumière du vaisseau. Le stress induit par cette pression (la force de cisaillement), contribue à augmenter le diamètre de la lumière du vaisseau (Davis, Koh, & Stratman, 2007) (Lizama & Zovein, 2013) (Iruela-Arispe & Davis, 2009) (Sacharidou, Stratman, & Davis, 2012) (Davis, Stratman, Sacharidou, & Koh, 2011) (Schuermann, Helker, & Herzog, 2014).

Il a été démontré que grâce à son implication dans la polarité cellulaire, Cdc42 est essentiel à la formation de la lumière. Ainsi, lors de cette formation, il y a activation, en aval de Cdc42 actif, d'une voie de signalisation régulée par Src et les kinases Pak2 et Pak4. De plus, pendant la formation de la lumière des capillaires, on observe une augmentation de la formation du complexe Par3/Pak2-Pak4/Cdc42-GTP. L'inhibition de l'expression par transfection d'ARNi d'un de ces membres ou l'utilisation de constructions dominants négatifs de Pak2DN ou de Pak4DN résultent en une diminution de la formation de la lumière (Koh et al., 2008). La GTPase Cdc42 est cruciale pour permettre la génération de filopodes, pour sentir son environnement, est un promoteur de la polarité cellulaire et est essentielle pour la formation de la lumière des vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse.

3.1.1.3 La RhoGTPase RhoA

RhoA est une GTPase de la sous-famille Rho qui détient trois membres, RhoA, RhoB et RhoC. Leur séquence d'acides aminés est identique à 85% et la différence se retrouve principalement dans leur queue C-terminale. RhoA a en premier lieu été cloné dans une librairie d'aplysie en 1985, partageant 35% d'homologie avec Ras. Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse qu'il s'agissait d'une sous-famille Ras (Madaule & Axel, 1985) et ont pu identifier son homologue chez la levure (Madaule, Axel, & Myers, 1987). Une compréhension du rôle de RhoA sur le cytosquelette est devenue possible suite à la micro-injection de RhoA dans des cellules swiss 3T3 ce qui induit la formation de fibres de stress et la formation d'adhésions focales (Ridley & Hall, 1992). Ce remodelage d'actine après la stimulation des cellules avec différents facteurs de croissance tel que le PDGF est atténué à la suite de l'inhibition de RhoA (Ridley and hall Cell 1992) (Paterson et al., 1990). De plus, il a été démontré que la génération de fibres de stress à l'arrière de la cellule génère une force de rétraction lui permettant d'avancer. Malgré le fait que les trois membres puissent réguler la formation de fibres de stress, certaines différences sont aussi observables. RhoA est important pour la régulation de la contraction de l'actomyosine, alors que RhoB, principalement localisé dans les endosomes, est impliqué dans le trafic cellulaire de cytokines est important pour la survie cellulaire (Wheeler & Ridley, 2004). Quant à lui, RhoC sera plus important pour la motilité cellulaire (Wheeler & Ridley, 2004).

À la suite de leurs liaisons à différents effecteurs, les différents membres de la famille RhoA ont des rôles opposés sur la progression tumorale. RhoA et RhoC contribuent de façon positive à la progression tumorale, tandis que RhoB agit plutôt comme un suppresseur tumoral (Wheeler & Ridley, 2004). Ainsi, RhoA et RhoC sont impliqués à différents stades de la progression tumorale telle que la perte de polarité apico-basale dans la cellule. De plus, l'augmentation de l'expression et de l'activité de RhoA corrèle avec l'agressivité de certains cancers humains à la suite de la réorganisation de l'actine via son effecteur ROCK (Rho-associated protein kinase), ce qui induit une augmentation de la migration cellulaire et de l'adhésion. Aussi, en régulant la progression du cycle cellulaire RhoA peut, s'il est mal régulé, initier la formation d'un cancer (Wheeler & Ridley, 2004).

RhoA est aussi important dans les cellules endothéliales pour permettre la formation de fibres de stress et de cette façon pour médier l'angiogenèse (van Nieuw Amerongen, Koolwijk, Versteilen, &

van Hinsbergh, 2003). En réponse au VEGF, l'activation de HSP90 régule l'activation de la voie de signalisation RhoA-ROCK et l'activation de la kinase FAK responsable du renouvellement des adhésions focales (Le Boeuf et al., 2004). L'utilisation d'un inhibiteur de ROCK démontre l'importance de RhoA pour les mécanismes angiogéniques, puisqu'à la suite de son inhibition dans les cellules endothéliales il y a une diminution de la migration cellulaire et une diminution de la formation de capillaires *in vitro* (van Nieuw Amerongen et al., 2003). De plus, l'injection sous-cutanée du VEGF en présence de constructions de rétro-virus de RhoA actif ou inactif, démontre le rôle positif de RhoA pour induire l'angiogenèse *in vivo* chez la souris (Hoang et al., 2004).

3.2 Les mécanismes de la polymérisation d'actine

Les RhoGTPases sont essentielles à la réorganisation du cytosquelette d'actine, et mène chacune à la formation de structures d'actine précises, spécifiques et uniques telles que les lamellipodes, les filopodes et les fibres de Stress. La polymérisation de filaments d'actine permettra de générer ces différentes structures tel que mentionné à la figure 9. Plusieurs mécanismes sont impliqués dont 1) la croissance d'une branche sur le côté d'un filament existant, 2) le « severing » d'un filament d'actine et la création de deux nouvelles extrémités d'un filament d'actine, ou 3) l'initiation de la polymérisation d'un nouveau filament.

La nucléation de filaments d'actine à partir uniquement de monomères d'actine n'est pas favorable. Les oligomères d'actine sont assez instables et ont donc besoin de diverses protéines pour stabiliser le tout et nucléer un filament d'actine. Arp2/3 (Actin-Related Protein 2/3) est un nucléateur d'actine détenant sept sous-unités et est nécessaire à la polymérisation de filaments d'actine. Arp2/3 mime un dimère d'actine et ainsi facilite l'initiation de la polymérisation d'un filament d'actine. Ceux-ci présentent deux extrémités, soit une extrémité libre, positive située du côté de la membrane plasmique (« barbed-end ») et une extrémité négative située du côté cytoplasmique (« pointed-end »). De cette façon, le complexe Arp2/3 s'associe à l'extrémité « pointed-end » du filament fille et le relie au filament mère avec un angle de 70°. Au fur et à mesure que l'extrémité libre « Barbed-end » du filament fille s'éloigne du complexe et se dirige vers le front de migration cellulaire, il pousse la membrane plasmique et génère une force pour permettre la génération d'un lamellipode. Ainsi, dans les cellules en mouvement, Arp2/3 génère un réseau de filaments d'actine branchés. Ceux-ci s'enrichissent ou s'allongent toujours du même côté, soit à l'extrémité « Barbed-End » positive.

Arp2/3 ne peut agir seul puisque son activité basale assez faible. Il nécessite donc des activateurs pour lui permettre d'initier la polymérisation de filaments d'actine. Ce processus est fortement contrôlé et régulé et ne peut avoir lieu que dans certaines conditions. Des protéines de régulation, les promoteurs de la nucléation d'actine, NPF, conjugués avec des filaments d'actine et des monomères d'actine coopèrent ensemble pour stimuler l'activité intrinsèque du complexe Arp2/3 et ainsi induire la nucléation du filament fille. De telles protéines NPF sont entre autres WASp (Wiscott-Aldrich Sndrome Potein), N-WASp, Scar/WAVE et Cortactine.

Pour permettre la polymérisation de réseau de filament d'actine branché, un haut niveau de régulation est maintenu dans la cellule. Les signaux vont permettre l'activation de la polymérisation d'actine de façon temporelle et spatiale dans les cellules à la suite de l'activation des NPF. Les NPF sont maintenus dans la cellule sous leur conformation inactive (soit suite à l'auto-inhibition, soit suite à l'association de protéines accessoires) et seront activées par des RhoGTPases ou des domaines SH3 de d'autres protéines de signalisation, ou la liaison de phospholipides qui vont permettent l'adoption d'une nouvelle conformation et ainsi l'activation de la protéine. Par exemple, le domaine GBD des RhoGTPases pourra s'associer au domaine VCA de N-WASp. Cette liaison est favorisée lorsque la GTPase est liée au GTP, donc lorsque la GTPase est active. Cette association soulève l'auto-inhibition du NPF et permet la polymérisation d'actine. Les phospholipides peuvent aussi permettre cette activation de NPF à la suite de leur association. Aussi, l'association de Nck ou de Grb2 à N-WASp, via leurs domaines SH3, induit un changement conformationnel et permet l'activation de N-WASp. La Cortactine permet de faire le pont entre Arp3 et d'autres sous-unités du complexe Arp2/3. Cette association stabilise une conformation active de Arp2/3, et permet à l'extrémité positive d'accepter une première sous-unité d'actine sur le filament fille. La Cortactine et N-WASp fonctionnent de manière synergétique puisqu'ils peuvent tous deux lier Arp2/3 de concert. N-WASP est un meilleur NPF que la Cortactine, mais la Cortactine peut aussi stabiliser les branchements d'actine. La Cortactine peut s'associer à ces différentes protéines pour augmenter leur capacité à polymériser la F-actine à 70°.

Situé à l'autre extrémité du filament d'actine qui se retrouve plutôt à l'intérieur de la cellule, soit l'extrémité négative nommé « pointed-end », la protéine Cofiline permet de dépolymériser les filaments de F-actine en relâchant des monomères de G-actine à partir du filament d'actine. Ceux-ci deviendront donc disponibles pour retourner allonger le filament à l'extrémité positive Barbed-End à

la membrane plasmique. Le filament d'actine pourra s'allonger jusqu'à ce qu'une protéine de « capping » vienne s'y associer et ainsi empêcher la future élongation de ce filament tout en forçant Arp2/3 à générer un nouveau filament fille ailleurs afin d'induire une force plus compacte sur la membrane. Les formines quant à elles vont générer des filaments d'actine non-branchés en ajoutant des monomères d'actine l'un à la suite de l'autre, qui vont servir entre autres, à la formation de fibres de stress.

Suite à l'activation du VEGF, les phospholipides présents à la membrane et l'activation de certaines RhoGTPases permettront l'activation spatiale et temporelle de la polymérisation de l'actine. En premier lieu, elles permettront l'activation de NPFs tel que N-WASp, qui pourront activer le nucléateur d'actine Arp2/3 qui initiera la polymérisation d'un filament d'actine fille à 70° sur le filament mère, engendrant de cette façon une force sur la membrane plasmique au front de migration permettant la formation d'un lamellipode. La protéine ADF/Cofiline favorisera la dépolymérisation l'extrémité pointed-end située à l'intérieur de la cellule et produira des monomères d'actine disponibles pour le recyclage des filaments d'actine de l'arrière vers l'avant de la cellule. La profiline permettra l'échange du GDP au GTP sur ce monomère d'actine, ce qui le rendra disponible à reprendre le cycle à nouveau. (Pollard, 2007; Pollard & Beltzner, 2002; Pollard & Borisy, 2003; Pollard & Cooper, 2009) (Gross, 2013) (Chaki & Rivera, 2013).

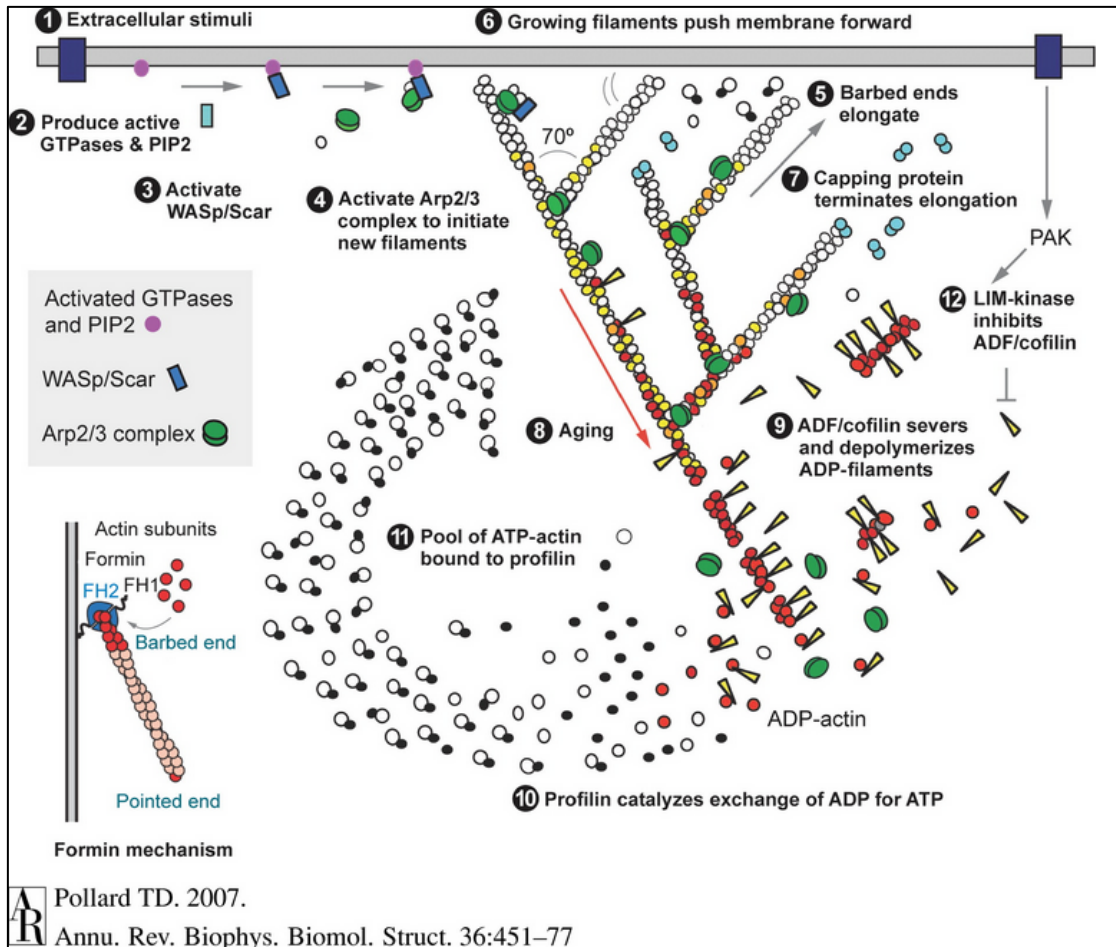


Figure 9 : Les mécanismes de polymérisation d'actine

Présentation schématisée des mécanismes régulés par Arp2/3 et les formines qui mènent à la polymérisation de l'actine. Hypothèse de la nucléation dendritique pour l'assemblage des filaments d'actine au front de migration des cellules motiles. Les facteurs promoteurs de nucléation (NPF) tel que WASp et Scar/WAVE permettent de rassembler le complexe Arp2/3 avec un monomère d'actine sur le côté d'un filament d'actine mère pour permettre la nucléation d'une nouvelle branche fille. L'extrémité positive libre « barbed-end » va pouvoir croître jusqu'à ce que des protéines de « capping » mettent fin à ce processus. Le coin inférieur gauche présente la nucléation de filaments d'actine non-branché par des formines.

Tiré de (Pollard, 2007)
Permission obtenue

3.2.1 Les effecteurs des RhoGTPases

Les RhoGTPases sont des médiateurs centraux pour induire le remodelage du cytosquelette d'actine suite à la nucléation et la polymérisation de l'actine et pour initier différentes activités biologiques suite à leurs liaisons à différentes protéines effectrices (Wennerberg & Der, 2004). Rac s'associe principalement avec Wasp pour activer Arp2/3 et ainsi permettre la génération d'actine branchée qui est responsable de la formation de lamellipodes (Miki, Suetsugu, & Takenawa, 1998) (Steffen et al., 2004) (Lebensohn & Kirschner, 2009). Il peut aussi s'associer aux kinases Pak qui pourra activer la voie LIMK-Cofiline pour permettre la polymérisation d'actine en enlevant les protéines de « capping » de l'extrémité des filaments (Kumar, Gururaj, & Barnes, 2006) (Vadlamudi et al., 2002; Vadlamudi, Li, Barnes, Bagheri-Yarmand, & Kumar, 2004), ou via l'activation de la Filamine et l'activation de la MLCK (Sanders, Matsumura, Bokoch, & de Lanerolle, 1999). De plus, Rac médie la polymérisation de l'actine via l'activation, la phosphorylation et la relocalisation de la Cortactine à la suite de son activation (voir détails section suivante).

Cdc42 quant à lui, peut aussi s'associer avec Wasp et activer Arp2/3 pour générer la formation de filopodes (Miki et al., 1998) (Steffen et al., 2004) (Lebensohn & Kirschner, 2009). Il peut activer les formines de la famille mDia et ainsi initier la nucléation d'actine non-branchée (Goh & Ahmed, 2012). Comme mentionné précédemment, Cdc42 peut s'associer à la protéine Par6 et réguler la polarisation cellulaire (Etienne-Manneville et al., 2005).

RhoA permet la contraction de l'acto-myosine et initie la migration cellulaire via l'activation des kinases ROCK (Julian & Olson, 2014). Il peut aussi permettre l'activation de la voie de la LIMK qui inhibe la Cofiline et donc diminue le « severing » d'actine, à la suite de l'activation des ROCKs. De plus, après la liaison de mDia, RhoA peut initier la nucléation de filaments d'actine non-branchée (O'Connor & Chen, 2013) (Narumiya, Tanji, & Ishizaki, 2009) (Thumkeo, Watanabe, & Narumiya, 2013).

3.2.1.1 La Cortactine

La Cortactine est une protéine d'échafaudage essentielle lors de la polymérisation de l'actine. Elle a en premier lieu été identifiée comme un substrat de Src (H. Wu, Reynolds, Kanner, Vines, & Parsons, 1991) et comme une protéine tyrosine phosphorylée en aval du EGF, du PDGF, du CSF1 et de la Thrombine (Downing & Reynolds, 1991) (Maa et al., 1992) (Wong, Reynolds, & Papkoff, 1992). Toutefois, c'est en 1993 que son association à l'actine filamenteuse et son enrichissement aux lamellipodes furent démontrés (H. Wu & Parsons, 1993). La Cortactine a pour structure une région acide en N-Terminale (NTA), elle compte aussi plusieurs (6) répétitions « Actine » qui lui permet de lier l'actine, un domaine riche en Proline et un domaine SH3 en C-Terminale. La structure de la Cortactine est schématisée à la figure 10.

La phosphorylation sur tyrosine de la Cortactine par Src sur les sites Y421, Y466 et Y482 induit son activation (Lua & Low, 2005) (Ayala et al., 2008). Cette phosphorylation permet le recrutement du domaine SH2 de la protéine Nck (Tehrani, Tomasevic, Weed, Sakowicz, & Cooper, 2007). De plus, N-WASP sera aussi recruté à la Cortactine de façon directe et via son association à Nck (Martinez-Quiles, Ho, Kirschner, Ramesh, & Geha, 2004) (Kowalski et al., 2005). La Cortactine permet aussi le recrutement de Arp2/3 (Weaver et al., 2002) (Weed et al., 2000), un nucléateur d'actine, et la Cortactine peut aussi lier un premier filament d'actine (H. Wu & Parsons, 1993). De cette façon la Cortactine est un important promoteur nucléateur d'actine. La Cortactine permet ainsi la formation de complexes protéiques à la membrane des cellules et initie donc la polymérisation de l'actine aux lamellipodes, ce qui la rend essentielle pour maintenir leur persistance (Bryce et al., 2005). Cet assemblage de l'actine branchée s'avère une étape cruciale pour toute une pléiade d'activité cellulaire telle que la migration et l'invasion cellulaire. Chez la drosophile, la perte d'expression de la Cortactine n'est pas létale, mais entraîne un défaut de migration des cellules de bordure suite à l'activation du récepteur PVR (PDGF/VEGF) (Somogyi & Rorth, 2004). La Cortactine est enrichie aux membranes des cellules. Cette localisation lui est primordiale pour médier ces fonctions telles que la formation de lamellipodes et la migration cellulaire. Son association directe à la p120 Caténine est cruciale pour cette localisation puisque la perte d'expression de la p120 Caténine, ou l'utilisation de constructions mutantes de la Cortactine, empêche cette relocalisation à la membrane (Boguslavsky et al., 2007).

3.2.1.1.1 L'implication de la Cortactine dans la formation d'invadopodes dans le cancer

La Cortactine est également un important régulateur de l'invasion cellulaire via la formation et l'activation d'invadopodes (Clark & Weaver, 2008) (Weaver, 2008) (Kirkbride, Sung, Sinha, & Weaver, 2011) (MacGrath & Koleske, 2012) (Bergman, Condeelis, & Gligorijevic, 2014). Les invadopodes sont des structures d'actine dynamiques qui ont pour fonction de promouvoir la dégradation de la matrice extra-cellulaire et l'invasion des cellules dans un nouvel environnement (Bergman et al., 2014). Pour ce faire, la Cortactine est enrichie à un point de contact avec la matrice extracellulaire et elle induit le recrutement de plusieurs protéines essentielles à la nucléation d'actine telles que Arp2/3, N-WASP et Nck et elle promeut la polymérisation d'actine en invadopodes. La phosphorylation sur tyrosine des résidus Y421 et Y466 est essentielle pour induire la liaison de Nck, induire la polymérisation d'actine et ainsi permettre la formation d'invadopodes (Oser et al., 2010). Les invadopodes sont des protrusions ventrales détenant un corps riche en actine et entourées par des molécules d'adhésions et d'échafaudage telles que la Cortactine, Tks4 et Tks5. Elles induisent la dégradation de la matrice extra-cellulaire suite à la séquestration et la sécrétion des Métallo-Protéases de la Matrice (MMPs) qui dégrade la matrice à ce point de contact. La Cortactine régule le trafic des protéases nécessaires à cette dégradation (Clark & Weaver, 2008). Les invadopodes sont donc observés dans de nombreux types cellulaires cancéreux agressifs et sont responsables de la dissémination de cellules tumorales dans l'organisme (Kirkbride et al., 2011).

En raison de son rôle dans la formation et l'activation de ces structures, la Cortactine est un acteur important dans l'agressivité de divers cancers. Le gène correspondant, CTTN (nommé précédemment EMS1) est situé sur le locus 11q13 qui est amplifié dans certains cancers humains tel que le cancer de la tête et du cou (HNSCC), le cancer du poumon, les gliosarcomes, le cancer du sein, le cancer colorectal et les mélanomes (Schuuring, Verhoeven, Mooi, & Michalides, 1992) (Schuuring, Verhoeven, Litvinov, & Michalides, 1993) (Bergman et al., 2014) (Murphy & Courtneidge, 2011) (MacGrath & Koleske, 2012; Weaver, 2008) (Kirkbride et al., 2011; G. Ren, Crampton, & Yap, 2009). De façon similaire, l'expression de la Cortactine dans des cellules épithéliales mammaires, entraîne un meilleur potentiel de motilité et d'invasion (van Rossum, Moolenaar, & Schuuring, 2006) (Hill et al., 2006) tout comme pour les cellules de cancer HNSCC (Rothschild et al., 2006).

3.2.1.1.2 La Cortactine et l'angiogénèse

Dans les cellules endothéliales, la Cortactine est enrichie aux membranes des cellules et est phosphorylée sur tyrosine en aval de Rac Actif (Vouret-Craviari, Bourcier, Boulter, & van Obberghen-Schilling, 2002) (Head et al., 2003). La phosphorylation de la Cortactine est essentielle à son activité et donc, l'expression de constructions mutantes non phosphorylés sur tyrosine empêche la migration des cellules endothéliales (C. Huang, Liu, Haudenschild, & Zhan, 1998). De plus, la stimulation au VEGF permet le recrutement de la Cortactine à la membrane des cellules endothéliales (Lee et al., 2006). La Cortactine est également impliquée dans l'angiogénèse. Ainsi, le bourgeonnement invasif de capillaires à partir de sphéroïdes de cellules endothéliales ainsi que la formation de capillaires sur Matrigel sont atténués suite à la déplétion de la Cortactine (Hashimoto et al., 2011). Aussi, la présence de morpholinos ciblant l'expression de la Cortactine diminue la formation de vaisseaux sanguins *in vivo* chez le poisson zèbre (Kaluza et al., 2011). Toutefois, dans un modèle murin, la perte d'expression de la Cortactine résulte en une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins (Schnoor et al., 2011). Ainsi, la Cortactine semble être une protéine importante pour une présence et une structure adéquate des vaisseaux sanguins à différents niveaux selon le modèle.

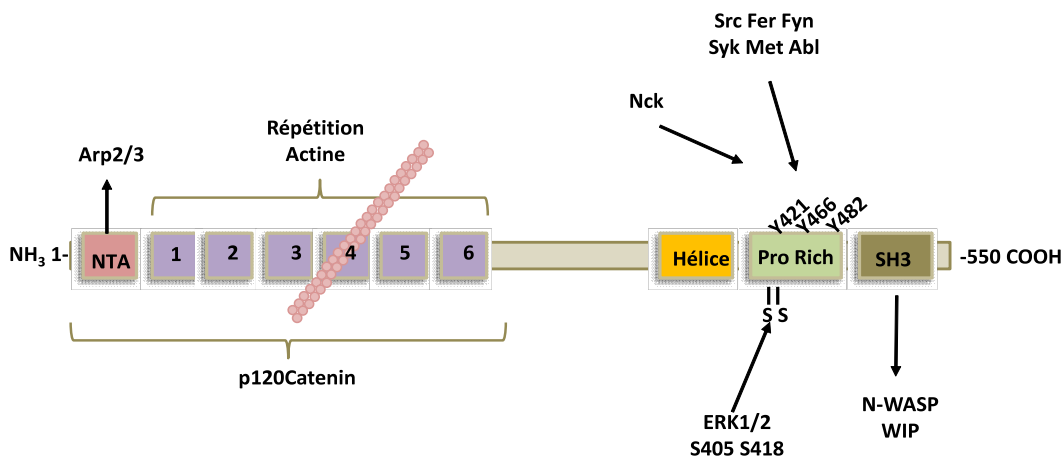


Figure 10. La structure de la Cortactine.

La Cortactine est une protéine d'échafaudage et une protéine NPF (Nucleator Promoting Factor) possédant plusieurs domaines et sites phosphorylés par la kinase Src. Sa structure comprend en N-terminal le domaine NTA qui permet l'association à Arp2/3. Six répétitions d'actine dont la quatrième permet sa liaison à l'actine. Un domaine hélice, suivi d'un domaine riche en proline et un domaine SH3.

Inspiré de (MacGrath & Koleske, 2012) (Kirkbride et al., 2011) (Ammer & Weed, 2008)

3.3 La régulation des RhoGTPases

La régulation des RhoGTPases doit être finement contrôlée et régulée pour permettre l'activation adéquate au moment et au lieu opportun. Il s'agit d'une étape cruciale, voire essentielle, pour de nombreux processus cellulaires. Ce contrôle s'effectue via la contribution de trois grandes familles de protéines incluant, les activateurs des RhoGTPases, les GEFs, et les inactivateurs, les GAPs et les GDIs. Il existe plus de 80 GEFs et 70 GAPs chez l'humain comparativement à seulement 20 RhoGTPases. Leur expression tissu-spécifique et leur capacité pour réguler des RhoGTPases en particulier peut en partie expliquer ce surnombre. Ceci permettrait donc une régulation fine et précise en temps et en lieu des diverses Rho GTPases via l'expression et l'activation de GEFs et de GAPs spécifique selon le contexte cellulaire (Cherfils & Zeghouf, 2013) (Kather & Kroll, 2013) (van Buul, Geerts, & Huveneers, 2014) (van der Meel et al., 2010).

3.3.1 Les GEFs

Les GEFs permettent une activation des GTPases grâce à leur implication dans la relâche du GDP sur la GTPase. Comme le GDP se relâche très lentement, la GEF permet la catalyse rapide de cette réaction. Ainsi, le domaine DH de la GEF interagit avec la RhoGTPase (« switch region »), ce qui entraîne la modification de la conformation et la relâche du GDP. Puisqu'il y a présence d'une quantité plus importante de GTP dans la cellule (le ratio GTP/GDP de la fraction cytosolique est plus élevé (10 :1)), celui-ci s'associe de façon instantanée et entraîne l'activation de la GTPase (Bourne, Sanders, & McCormick, 1990).

3.3.1.1 Les GEFs DH-PH

La plus grande famille de GEFs, aussi appelés les GEFs conventionnelles, est la famille DH-PH (DH : Dbl Homology (Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma))) qui détient plus de 70 membres. La première GEF à avoir été identifiée fut la GEF Dbl lors d'un criblage dans des NIH 3T3 (Eva, Vecchio, Rao, Tronick, & Aaronson, 1988) (Ron, Graziani, Aaronson, & Eva, 1989). Le domaine DH est responsable de l'activité GEF puisqu'il permet de stabiliser la GTPase dans une conformation qui permet la séparation du nucléotide (Eva & Aaronson, 1985) (Eva et al., 1988) (Hart, Eva, Evans, Aaronson, & Cerione, 1991) (Hart et al., 1994) (Ron et al., 1989). Le domaine PH, toujours situé en C-Terminale du domaine DH,

recrute la GEF à la membrane plasmique, à la suite de sa liaison aux phospholipides membranaires. Il permet aussi l'établissement de contacts directs entre celui-ci et la GTPase pour permettre son recrutement près du domaine DH et ainsi contribuer au relâchement du GDP ou aussi interagir avec d'autres protéines (Rossman et al., 2002).

Une grande partie des GEFs de la famille DH-PH possède aussi un domaine qui leur permet une auto-inhibition qui peut être relâchée soit suite à une phosphorylation ou suite à l'association à d'autres protéines. De cette façon, les GEFs dépendent aussi d'autres domaines en plus de leur domaine DH-PH pour initier une spécificité d'action (Rossman, Der, & Sondek, 2005).

3.3.1.1.1 La GEF VAV2

VAV2 appartient à la famille des GEFs conventionnelles DH-PH. Il existe trois membres de la sous-famille VAV, soit VAV1, exprimé exclusivement dans les tissus hématopoïétiques, VAV2 et VAV3 qui sont quant à eux exprimés de façon ubiquitaire (Hornstein, Alcover, & Katzav, 2004). VAV2 est une GEF pour Rac et Cdc42. L'onco-protéine VAV1 a été identifiée pour la première fois en 1989 (Katzav, Martin-Zanca, & Barbacid, 1989) tandis que l'onco-protéine VAV2 a quant à elle été identifiée en 1995 (van Slegtenhorst et al., 1995). Toutefois, l'activité GEF de VAV a été démontrée en 1998 et démontre aussi son implication dans des activités oncogéniques et transformantes et l'importance de la tyrosine phosphorylation pour ces activités (Crespo, Schuebel, Ostrom, Gutkind, & Bustelo, 1997) (Schuebel et al., 1996) (Schuebel, Movilla, Rosa, & Bustelo, 1998). Comme le présente la figure 11, les trois membres de cette famille possèdent une structure similaire incluant un domaine dbl homology (DH) qui permet l'activité GEF envers les GTPases, un domaine PH (pleckstrin homology) situé en C-terminal du domaine DH qui peut interagir avec les phospholipides à la membrane, un domaine SH2 et deux domaines SH3 situés en C-Terminal de la protéine qui médient différentes interactions protéines-protéines et finalement, une région riche en proline, un domaine riche en acide (Ac) et un domaine « Calponin-Homology » (CH).

VAV2 est une protéine à multi-domaines et elle nécessite un changement conformationnel pour initier son activation. Dans sa conformation fermée ou inactive, chaque domaine de VAV2 interagit avec plusieurs autres domaines, ce qui crée une conformation très compacte dans laquelle le domaine DH se retrouve non-disponible pour sa liaison avec Rac puisqu'il est obstrué par cette structure. Une étude par Résonance Magnétique Nucléaire a démontré la liaison de certains acides aminés de la région acide et du domaine DH à la tyrosine 174 de VAV1 (ou 172 pour VAV2), ce qui

induit une conformation repliée inactive (Aghazadeh, Lowry, Huang, & Rosen, 2000). La phosphorylation de la Y172 de VAV2 induit un déplacement de la région acide et abolit un premier niveau d'auto-inhibition. Le relâchement de la tyrosine de cette poche de liaison permet à la GTPase de lier le domaine DH de VAV2 maintenant accessible. Par la suite, le déplacement du domaine CH de VAV2 induit le potentiel d'association de VAV2 à la RhoGTPase (Aghazadeh et al., 2000). Cette phosphorylation sur tyrosine est induite suite à l'activation de kinase de la famille Src (Marignani & Carpenter, 2001) (Garrett, Van Buul, & Burridge, 2007). Il s'agit d'un des rares exemples de modulation d'activation des GEFs suite à une phosphorylation. Ainsi, les membres de la famille des GEFs VAV se différencient des autres GEFs grâce à l'importance de la phosphorylation sur la Y172 qui leur permet une activité GEF envers les GTPases (Hornstein et al., 2004) (Romero & Fischer, 1996).

En plus de devoir être phosphorylée sur la Y172, la GEF VAV2 doit être associée à la p120 Caténine pour moduler l'activité de Rac (Valls et al., 2012). L'association directe de VAV2 et Rac sur la p120 Caténine est essentielle pour activer la GTPase Rac, médier le remodelage du cytosquelette d'actine et mener à la migration cellulaire. Ces associations rapprochent la GEF de la GTPase à la membrane. De plus, la phosphatase PT-PEST (Protein-Tyrosine Phosphatase non-receptor type 12) régule de façon négative l'association de VAV2 à la p120 Caténine en déphosphorylant la Y335 de la p120 Caténine (Espejo et al., 2014). Aussi, cette phosphatase agit sur la régulation du cytosquelette d'actine, puisqu'elle peut déphosphoryler directement le résidu Y172 de VAV2 et inhibe aussi la phosphorylation de la GAP p190RhoGAP qui cible la GTPase RhoA (Sastry et al., 2006) (Noren, Liu, Burridge, & Kreft, 2000) (Valls et al., 2012) (Espejo et al., 2014).

Les RhoGTPases étant fortement impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire, leur dérégulation peut facilement et rapidement mener à plusieurs pathologies telles que la croissance tumorale et la formation de métastases. Ainsi, les protéines VAV sont impliquées dans le développement de leucémies, de mélanomes et de tumeurs pancréatiques. De plus, la GEF VAV2 est hautement exprimée dans les cellules endothéliales (van Buul et al., 2014) et représente la principale GEF utilisée pour permettre l'activation de Rac dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF (Garrett et al., 2007) (Gavard & Gutkind, 2006). Suite à l'inhibition de l'expression de VAV2 dans les cellules endothéliales, la stimulation au VEGF est incapable d'activer la GTPase Rac, contrairement à ce qui est observé suite à l'inhibition d'autres GEFs (Garrett et al., 2007) (Gavard & Gutkind, 2006). À la suite de la stimulation du VEGF dans les cellules endothéliales, l'activation de Src permet la

phosphorylation activatrice de la Y172 de VAV2 (Garcia-Mata et al., 2006). De plus, l'activation de la voie de VAV2-Rac induit l'activation de l'effecteur Pak (Gavard & Gutkind, 2006). Pak agit aux jonctions des cellules en phosphorylant la S665 de la VE-cadhérine provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire (Gavard & Gutkind, 2006). La force de cisaillement induite par le flux sanguin va aussi permettre l'activation de Rac dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. Chez la drosophile, en réponse au PVR (PDGF/VEGF-related receptor), la GEF VAV permet l'activation de Rac, la formation de lamellipodes et la migration cellulaire collective (Fernandez-Espartero et al., 2013).

Des expériences *in vitro* démontrent qu'en réponse à l'ÉphrineA1, les cellules endothéliales provenant de souris VAV2-VAV3 KO présentent des défauts dans la régulation du cytosquelette d'actine, de l'activation de Rac et de la migration cellulaire (Hunter et al., 2006). De plus, ces cellules sont incapables de former des capillaires *in vitro* sur Matrigel, alors que la sur-expression de VAV2 et VAV3 induit une plus grande capillarisation sur Matrigel (Hunter et al., 2006). Ces mêmes résultats peuvent être reproduits, suite à l'expression de constructions mutantes du récepteur EphA1 qui ne peut lier VAV2 et VAV3 (Fang, Brantley-Sieders, Hwang, Ham, & Chen, 2008). L'injection de cellules tumorales 4T1 de façon concomitante avec des cellules endothéliales délété pour EphA2 qui ont subit une réexpression du récepteur muté pour son association à VAV2 et VAV3 dans la souris produit de plus petites tumeurs et celles-ci sont moins bien vascularisées que celles où l'expression du récepteur est sauvage (Fang et al., 2008). De plus, l'injection de cellules tumorales du carcinome du poumon Lewis, ou du mélanome B16 dans des souris VAV2-VAV3 KO développent moins de tumeurs comparativement aux souris sauvages, et ces tumeurs présentent moins de micro-vaisseaux (Hunter et al., 2006). Ces résultats peuvent être expliqués par un défaut de migration, puisque la migration *in vitro* des cellules endothéliales provenant de ces souris est réduite comparativement à la migration des cellules provenant de souris sauvages. VAV2 et VAV3 ont un rôle important dans les cellules endothéliales puisque l'injection de cellules cancéreuses de façon concomitante à des cellules endothéliales de type sauvage ou VAV2-VAV3 KO produisent moins de tumeurs et sont moins bien vascularisés (Brantley-Sieders et al., 2009). Ces résultats *in vitro* et *in vivo* caractérisent bien l'implication importante de VAV2 et VAV3 dans l'angiogenèse et la tumorigenèse.

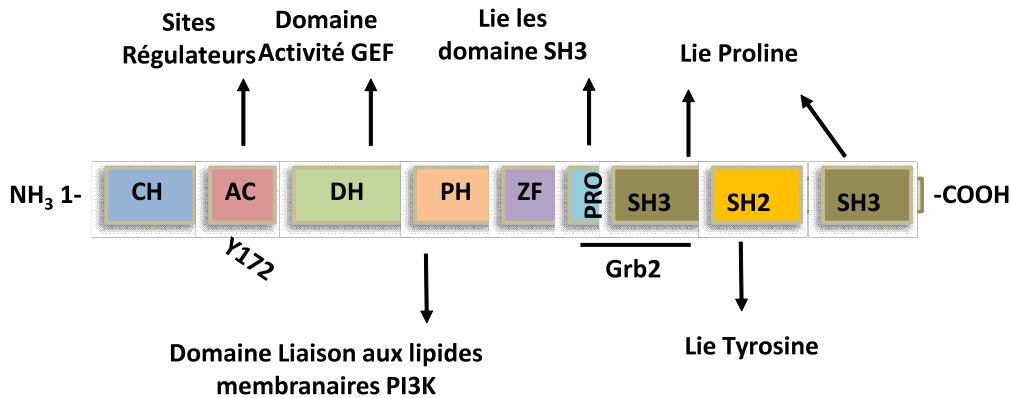


Figure 11. La GEF VAV2

La protéine VAV2 a la particularité de pouvoir agir comme une GEF et comme une protéine d'échafaudage. Il existe trois protéines VAV chez les mammifères ; VAV1, VAV2 et VAV3. Ici schématisée, VAV2, détient un domaine CH (Calponin-Homology), un motif Acidique (Ac) qui contient les trois tyrosines régulatrices, un domaine DH (Dbl-Homology), qui est une région conservée qui permet de promouvoir l'échange du GDP pour le GTP sur les RhoGTPases (tel que Rac), un domaine PH (Pleckstrin Homology) qui permet de lier les phospholipides générés par la PI3K à la membrane plasmique des cellules, une région riche en proline qui permet de s'associer à d'autres domaines SH3, un domaine SH3, qui peut s'associer avec des domaines riches en proline et deux domaines SH2 qui peuvent lier des tyrosines phosphorylés.

Inspiré de (Hornstein et al., 2004) (Turner & Billadeau, 2002)

3.3.1.1.2 La GEF β -PIX

β -PIX (PAK-Interactive Exchange Factor ; Cool1 (Cloned out of library 1) ARHGEF7) est une GEF de la famille Dbl. Elle a été identifiée suite à un criblage tentant d'identifier des protéines détenant un domaine SH3 (Oh et al., 1997). Par la suite, à la recherche de partenaire de Pak3, on identifia à nouveau cette même protéine et démontra la présence d'un domaine DH-PH (Bagrodia, Taylor, Jordon, Van Aelst, & Cerione, 1998). De façon concomitante, toujours à la recherche de partenaire pour Pak3, il a été démontré que β -PIX était essentielle pour le recrutement de Pak aux adhésions focales enrichies de Rac et Cdc42, en plus de démontré que β -PIX permettait d'induire des « ruffles » à la membrane suite à l'activation de Rac (Manser et al., 1998). La structure de β -PIX présente un domaine SH3 qui lie directement un domaine riche en proline de Pak, un domaine tandem pour DH-PH, une région riche en proline, un domaine de liaison à GIT-1; Cat et un domaine putatif leucine zipper en C-Terminal. β -PIX est une GEF qui peut agir sur Rac et/ou Cdc42. La phosphorylation sur la

Y442 de β -PIX par Src, est essentielle pour l'induction de son activité GEF et est importante pour induire la migration et l'invasion cellulaire (Q. Feng et al., 2006) (Q. Feng, Baird, Yoo, Antonyak, & Cerione, 2010). β -PIX est exprimée de façon ubiquitaire et hautement exprimée dans les cellules endothéliales (van Buul et al., 2014). Son expression augmente en condition hypoxique et stimule la formation d'invadopodes (Md Hashim et al., 2013). De plus, la formation du complexe β -PIX et GIT-1 sera important pour induire la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales (R. Stockton et al., 2007). β -PIX peut aussi s'associer avec la protéine Scrib et ainsi former un complexe avec la GTPase Cdc42 pour réguler la polarisation de la migration cellulaire (Etienne-Manneville, 2004).

3.3.1.2 Les GEFs DOCK

Une seconde famille de GEFs non-conventionnelles, les GEFs DOCK (180-kDa protéin Downstream of CrK) fut identifiée pour la première fois en 1996, à la suite d'expériences de « Far Western Blot » qui tentaient d'identifier des protéines associées au domaine SH3 de la protéine Crk. On identifia une protéine au poids de 180kDa comme étant le premier membre de cette famille DOCK180 ; DOCK1 (Hasegawa et al., 1996). C'est toutefois lors d'une seconde étude que son rôle dans l'activation de Rac fut identifié (Kiyokawa et al., 1998). DOCK180 s'associe avec la protéine adaptatrice phosphorylée ELMO1 (Engulfment-and-celL-Motility). DOCK180 nécessite cette association via la liaison de son domaine SH3 pour induire l'activation de Rac. Ainsi, l'identification de ce partenaire ELMO1, qui fait partie intégrante de la voie de signalisation Crk/DOCK180/Rac, et de son homologue Ced-12 chez *C. elegans* a démontré l'importance de cette protéine et de son association pour la migration cellulaire (X. Wu, Ramachandran, Lin, Cerione, & Erickson, 2011) (Zhou, Caron, Hartweg, Hall, & Horvitz, 2001) (Gumienny et al., 2001). C'est en 2002, qu'on réussit à démontrer que DOCK180 est en fait une GEF, et qu'il s'agit de la première GEF non-conventionnelle ne détenant pas les domaines standard DH-PH des autres GEFs et qu'elle nécessite l'association à la protéine ELMO1 pour pouvoir activer Rac (Brugnera et al., 2002). Ne détenant pas les domaines standards des GEFs, DH-PH, on identifia le domaine responsable de l'activation de la GTPase, le domaine DHR2 et les différents membres de cette famille de protéines (Cote & Vuori, 2002). Cette famille détient onze membres soit ; DOCK1 à DOCK 11 chez les mammifères. Parmi ceux-ci DOCK1; DOCK180, DOCK2, DOCK3 et DOCK7 sont spécifiques pour Rac, DOCK9 est spécifique pour Cdc42 et DOCK6 est sensible à Rac et à Cdc42. Aucune DOCK identifiée n'est apte à activer RhoA. Par sa liaison à DOCK-180, ELMO1 permet de

soulever l'auto-inhibition intra-moléculaire de la queue C-Terminale de DOCK-180 (Katoh & Negishi, 2003) (M. Lu et al., 2004) (M. Lu et al., 2005). L'activation de Rac par le complexe DOCK180-ELMO1 est responsable de la génération de lamellipodes et de la migration cellulaire (Grimsley et al., 2004) (Katoh, Hiramoto, & Negishi, 2006). De plus, le domaine responsable de la liaison à la membrane est plutôt un domaine DHR1, qu'un domaine PH. Ce domaine DHR1 de DOCK180 permet de lier les PIP3 présents à la membrane des cellules, cette liaison permet de localiser l'activation de Rac au front de migration de la cellule et permet une directionnalité du mouvement cellulaire (Cote, Motoyama, Bush, & Vuori, 2005).

Les GEFs DOCK semblent être impliquées dans la promotion tumorale. Entre autre, le niveau d'expression et l'activité de DOCK1 non-muté est augmenté et promouvoit la tumorigenèse de glioblastomes et du cancer du sein (Laurin & Cote, 2014). Ainsi, DOCK1 régule la croissance et le potentiel invasif des glioblastomes en présentant une haute expression de DOCK1 et de ELMO1 (Jarzynka 2007). De plus, l'inhibition de l'expression de DOCK1 diminue le potentiel migratoire (H. Feng et al., 2011) (H. Feng et al., 2012). Une corrélation existe entre de hauts niveaux d'ARNm de DOCK1 et un faible pronostique de survie pour les deux cancers du sein les plus invasifs (HER2 positif et Basal). L'ablation génique de DOCK1 dans les souris HER2 transgéniques de la glande mammaire diminue la formation de tumeurs et protègent ces animaux de la formation de métastases (Laurin et al., 2013).

Le complexe ELMO1/DOCK180 est essentiel pour l'angiogenèse chez le poisson zèbre et la souris. L'utilisation de morpholinos pour inhiber l'expression de ELMO1 chez le poisson zèbre provoque des défauts de développement vasculaire majeurs et des défauts d'angiogenèse en réponse à Netrin/Unc5B (Epting et al., 2010). La souris DOCK180 KO et la génération de souris détenant DOCK180 d/d muté pour son domaine de liaison à ELMO1 sont tous deux létale au niveau embryonnaire et présentent des défauts d'angiogenèse majeurs qui provoquent la mort des embryons. De plus, les cellules endothéliales provenant de ces animaux présentent des défauts de migration et la croissance d'explants cardiaques de ces animaux présente une diminution de la formation de bourgeonnements (Sanematsu et al., 2010). Vraisemblablement, ces effets sont causés par l'incapacité des cellules endothéliales à migrer et à bourgeonner pour former de nouveaux capillaires.

3.3.2 Les GAPs

Les RhoGAPs sont les inactivateurs des RhoGTPases et elles ont pour fonction d'augmenter leur réaction d'hydrolyse intrinsèque. Les RhoGTPases sont des enzymes peu efficaces et l'hydrolyse du GTP s'avère une réaction assez lente dans la cellule, ainsi souvent cette vitesse d'hydrolyse ne correspond pas avec les fonctions cellulaires qui sont requises. Toutefois, une inactivation de ces GTPases demeure cruciale à temps opportun. Les différentes RhoGAPs entraînent une réaction d'hydrolyse plus rapide du GTP au GDP et ainsi permettront le contrôle, la régulation de l'inactivation de la RhoGTPase. En fait, les GAPs permettront une augmentation de l'activité intrinsèque de l'hydrolyse du GTP et par la suite pourront stabiliser la région « GDP-bound switch » pour stabiliser la forme liée au GDP lorsque les conditions cellulaires le requièreront. Les RhoGAPs sont elles aussi beaucoup plus nombreuses que les RhoGTPases. On compte 77 GAPs chez l'humain (Lander et al., 2001). Ce surnombre vis-à-vis des RhoGTPases permet ici une fine régulation de façon spatio-temporelle et cellule-spécifique des différentes RhoGTPases. La régulation des RhoGAPs est possible puisqu'il s'agit de protéines à multi-domaines et ainsi différents mécanismes vont permettre l'activation ou l'inactivation de ces protéines.

3.3.2.1 La GAP CdGAP

CdGAP (Cdc42 GTPase-Activating Protein/ARHGAP31) est une GAP sensible pour Rac et Cdc42 (Tcherkezian, Danek, Jenna, Triki, & Lamarche-Vane, 2005) (Tcherkezian, Triki, Stenne, Danek, & Lamarche-Vane, 2006) (Lamarche-Vane & Hall, 1998) identifiée lors d'un crible double hybride chez la levure à la recherche de partenaire pour un mutant de Cdc42 ne pouvant se lier à Pak1, mais ayant conservé la capacité d'induire la formation de filopodes (Cdc42Q61LY40C) (Lamarche-Vane & Hall, 1998). Il est le premier membre d'une sous-famille incluant GRIT/ARHGAP32, Noma-GAP/ARHGAP33 et GC-GAP/ARHGAP30. Un domaine GAP est situé en N-terminal de la protéine CdGAP, suivi d'une région centrale riche en résidu basique (BR), d'un domaine riche en proline (PRD) et d'une queue en C-terminal ne possédant aucun domaine connu, tel que présenté à la figure 12. La protéine CdGAP est exprimée de façon ubiquitaire, mais avec une plus forte expression au niveau du cœur et des tissus musculaires chez le fœtus humain (Tcherkezian et al., 2005). Chez la souris, on note une expression plus forte au niveau du cœur, mais également des poumons et du cerveau (Lamarche-Vane & Hall, 1998) (Tcherkezian et al., 2006). Sa sur-expression entraîne une perte de structure de l'actine corticale, une perte des adhésions focales des cellules et un arrondissement de celles-ci (Tcherkezian

et al., 2006) (LaLonde, Grubinger, Lamarche-Vane, & Turner, 2006). Grâce à ces nombreux domaines, CdGAP peut également s'associer à plusieurs protéines et moduler leurs fonctions. Entre autres, CdGAP s'associe à l'Intersectine, une GEF pour Cdc42, via le domaine SH3D de l'Intersectine et un motif riche en bases chez CdGAP (K291 R292 K293). Des essais GAP ont démontré que le domaine SH3D de l'Intersectine inhibe l'activité GAP de CdGAP (Jenna et al., 2002) (Primeau, Ben Djoudi Ouadda, & Lamarche-Vane, 2011). De plus, CdGAP se localise aux adhésions focales et peut moduler leurs présences grâce à son association à la protéine Actopaxine (LaLonde et al., 2006). Elle peut aussi induire le potentiel migratoire des cellules, tel que démontré suite à l'inhibition de son expression dans les cellules mammaires en réponse à une stimulation de HER2. Ainsi, CdGAP interagit avec les voies du TGF β et Neu/ErbB2 pour induire le potentiel migratoire et invasif des cellules du cancer du sein (Y. He et al., 2011). De plus, CdGAP peut être phosphorylée sur la thréonine 776 par les kinases Erk1/2, RSK ou GSK3, entraînant l'augmentation de son activité GAP (Tcherkezian et al., 2005) (Danek, Tcherkezian, Triki, Meriane, & Lamarche-Vane, 2007). À l'inverse, son association aux phospholipides de la membrane via son domaine PBR en N-terminal est essentielle pour induire son activité GAP (Karimzadeh, Primeau, Mountassif, Rouiller, & Lamarche-Vane, 2012).

Le séquençage récent de l'exome de patients atteints du syndrome Adams-Oliver provenant de deux familles distinctes a permis d'identifier les premières mutations dans un gène associé à cette pathologie autosomale dominante (Southgate et al., 2011). Les mutations identifiées dans le gène ARHGAP31, encodant la protéine CdGAP, induit l'insertion d'un codon stop générant une forme tronquée de la protéine (Southgate et al., 2011). Cette protéine tronquée présente un gain-de-fonction de son activité GAP puisqu'il y a relâchement d'une conformation repliée inactive. Certaines évidences indiquent une conformation basale fermée et inactive de CdGAP impliquant la liaison de son extrémité N-terminal (1-221) à son extrémité C-terminal (1083-1425) (Southgate et al., 2011). Récemment, le séquençage de l'exome d'une famille atteints d'aplasie cutanée congénitale (ACC) et de défauts des membres transverses terminaux (TTLD), deux des composantes du syndrome Adams-Oliver, a permis d'identifier une nouvelle mutation dans le gène encodant CdGAP générant aussi une forme tronquée avec Gain-de-fonction (Isrie, Wuyts, Van Esch, & Devriendt, 2014). Ce syndrome est un désordre hérité hétérogène caractérisé par la présence de défauts tels qu'une absence congénitale et visible de certaines zones de la peau (ACC), des défauts aux extrémités des membres transverse (« terminal transverse limb defects » ; TTLD) et des défauts vasculaires (Whitley & Gorlin, 1991). La présence de cette GAP sur-activée (Southgate et al., 2011) (Isrie et al., 2014) et de

l'inhibition d'une GEF, suite à la présence d'une mutation encodant un codon stop chez la GEF DOCK6 (Shaheen et al., 2011), au sein de ce syndrome, laisse supposer l'importance de l'activation de Rac et Cdc42 dans cette maladie et nous permet d'identifier une base moléculaire responsable de ce syndrome. Le syndrome Adams-Oliver est entre autre caractérisé par des défauts vasculaires, qui pourraient expliquer en partie l'absence des extrémités des membres souvent observés. De plus, il est connu que CdGAP est hautement exprimé dans les cellules endothéliales (van Buul et al., 2014). De plus, le gène encodant CdGAP fait partie d'un locus ayant une grande susceptibilité d'être impliqué dans le développement de maladie d'artère coronarienne (L. Wang et al., 2007). Ces premiers résultats laissent croire à un rôle important de CdGAP dans les cellules endothéliales.

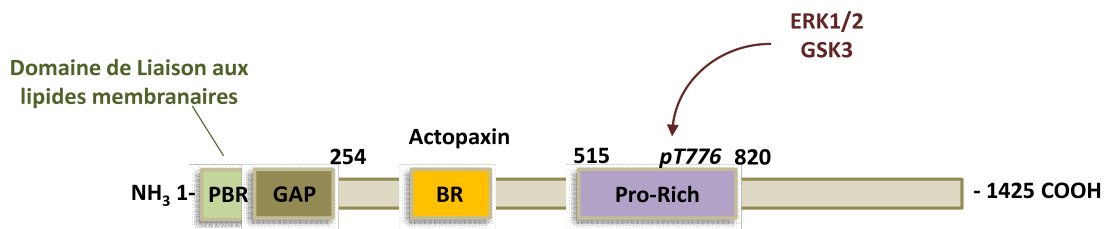


Figure 12. La GAP CdGAP

Schéma de la structure de la GAP CdGAP/ARHGAP31. Présence d'un domaine PBR en N-terminal qui permet son association aux lipides membranaires PIP3, ce qui induit l'activité GAP. Le domaine GAP inhibe l'activation de Rac et de Cdc42 *in vitro*. Un domaine riche en BR pouvant s'associer à l'Actopaxine. Un domaine riche en Proline. Erk1/2 et GSK3 peuvent s'associer à CdGAP dans cette région et phosphoryler la Thr776, ce qui induit une inhibition de son activité GAP.

3.3.3 Les GDIs

Les GDIs sont une famille de protéines détenant trois membres qui agissent comme inhibiteurs pour les RhoGTPases. Le membre le plus commun est GDI1 et il est exprimé de façon ubiquitaire. Il peut s'associer autant avec Rac1, Cdc42 ou RhoA. Quant à lui, GDI2 est exprimé essentiellement dans les cellules hématopoïétiques et les cellules cancéreuses et GDI3 est plus distant des autres et se situe principalement dans l'appareil de Golgi. Les RhoGTPases inactives sont extraites de la membrane plasmique et séquestrées au cytosol par les RhoGDIs pour prévenir leur activation inappropriée et pour les protéger d'un mauvais repliement ou d'une dégradation (Garcia-Mata, Boulter, & Burridge, 2011). La liaison du GDI à la RhoGTPase inactive induit une restriction de sa flexibilité spatiale et la

« bloque » dans une conformation inactive au cytosol, ce qui empêche l'échange du nucléotide. De plus, la queue C-Terminale isoprénylée des RhoGTPases se lie normalement à la membrane cellulaire. Toutefois lorsque la RhoGTPase se retrouve au cytosol, cette queue hydrophobique empêche un repliement adéquat. La liaison des RhoGDIs stabilise la RhoGTPase en protégeant cette queue. Les RhoGDIs sont modulés suite à leur phosphorylation sur Ser/Thr/Tyr ce qui promeut la relâche de RhoGTPases, selon la phosphorylation et cette relâche peut s'avérer spécifique à une GTPase ou à plusieurs (Garcia-Mata et al., 2011) (Dovas & Couchman, 2005) (DerMardirossian & Bokoch, 2005).

3.4 La régulation du cytosquelette d'actine par Gab1

La protéine d'échafaudage Gab1 semble avoir un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans la migration cellulaire (Laramee et al., 2007) (Kallin et al., 2004). Par exemple, suite à la liaison de Shp2, Gab1 peut réguler divers aspects du remodelage du cytosquelette d'actine dont la migration cellulaire. Ceci induit l'activation des MAPKs Erk1/2, une voie de signalisation essentielle pour la migration cellulaire (Gu et al., 1998) (Nishida et al., 1999) (Cunnick et al., 2000) (Itoh et al., 2000) (Y. Ren et al., 2004). De plus, les souris Gab1 Δ Sph2 KI, tout comme la souris Gab1 KO, présentent une migration des progéniteurs musculaires altérée (Schaeper et al., 2007) (Sachs et al., 2000). La liaison de la PI3K à Gab1 est elle aussi importante pour moduler la migration cellulaire (Laramee et al., 2007) (Dance et al., 2006).

De plus, Gab1 est un promoteur important de la réorganisation du cytosquelette d'actine et de la migration cellulaire (Laramee et al., 2007) (Kallin et al., 2004). Des études récentes démontrent que Gab1 peut se lier directement avec une GEF et une GAP. Sa liaison avec DOCK7 en réponse au HGF via MET induit l'activation de Rac et le potentiel invasif des cellules de glioblastomes (D. W. Murray et al., 2014). Aussi, Gab1 peut s'associer avec GC-GAP, une GAP présente au cerveau, et suggère ainsi que Gab1 peut relocaliser cette GAP à la membrane cellulaire pour inactiver Rac et Cdc42 (C. Zhao et al., 2003). De plus, Gab1 peut s'associer aux complexes des protéines Par et ainsi moduler la polarité cellulaire, un phénomène essentiel pour la migration cellulaire (Yang et al., 2012).

Récemment de nombreuses études ont démontré le lien direct entre Gab1 et différentes protéines impliquées dans les mécanismes de polymérisation d'actine. Ainsi, Gab1 permet l'activation et la localisation adéquate de ces différentes protéines et de cette manière permet de réguler différents processus tels que l'activation de Rac, la formation de lamellipodes, la migration cellulaire

et l'invasion cellulaire. Le domaine PH de Gab1 permet le recrutement de Pak4 à la membrane des cellules aux lamellipodes en réponse au HGF. La sur-expression combinée de Gab1 et de Pak4 accentue le potentiel migratoire des cellules (Paliouras, Naujokas, & Park, 2009). Le domaine riche en proline de Gab1 P4/P5 peut également se lier de façon directe avec le domaine SH3 de la Cortactine. Cette association démontre l'implication de Gab1 dans le potentiel invasif des cellules permettant la formation d'invadopodes (Rajadurai et al., 2012). Ainsi, en réponse à différents facteurs de croissance tel que HGF et EGF, Crk, un partenaire de Gab1, va contribuer, entre autre via Src, à induire la tyrosine phosphorylation de Gab1 ce qui permettra d'induire la motilité et l'invasion cellulaire (Lamorte et al., 2002) (Watanabe et al., 2006) (Watanabe et al., 2009). Aussi, Gab1 permet l'activation de Rac aux lamelles dorsales en réponse à différents facteurs tels que HGF, EGF et FGF. Pour agir de la sorte, Gab1 s'associe de façon constitutive avec le facteur nucléateur d'actine N-WASP, ainsi, suite à la phosphorylation sur tyrosine de Gab1, on détecte une association directe du domaine SH2 de Nck sur la Y407 de Gab1 phosphorylé qui permet un rapprochement de Nck à N-WASP et permet ainsi à Nck d'activer N-WASP. Cette activation de Rac permet une migration cellulaire. Donc, dans la cellule, l'association constitutive de Gab1 et N-WASP n'a pas de conséquence. Toutefois, suite à la phosphorylation de Gab1, le domaine PH de Gab1 lui permet un recrutement aux membranes et ainsi se produit l'association de Gab1 et Nck, ce qui rapproche Nck de N-WASP et permet l'activation de ce dernier (Abella et al., 2010). De plus, dans les cellules épithéliales, le recrutement de Gab1 à la membrane plasmique via son domaine PH permet l'activation de Rac (Maroun et al., 2003).

Ainsi, plusieurs évidences démontrent un lien entre Gab1 et l'activation de Rac et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Toutefois, malgré ces quelques premières indications de l'implication de Gab1 dans la régulation du cytosquelette d'actine, son implication dans les cellules endothéliales et les différents mécanismes moléculaires demeurent mal caractérisés dans les cellules endothéliales où Gab1 joue un rôle central dans l'angiogenèse qui est fortement régulée par la migration.

3.5 Le rôle de Gab1 dans l'angiogenèse *in vivo*

Le rôle essentiel de Gab1 dans la médiation de la signalisation du VEGF dans les cellules endothéliales a pu être démontré en premier lieu lors d'expériences *in vitro* qui ont démontré son rôle essentiel dans l'angiogenèse (Laramée et al., 2007) (Dance et al., 2006). Suite à nos travaux, trois études ont démontré l'importance de Gab1 sur l'angiogenèse *in vivo* (Shioyama et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011). L'utilisation d'un modèle murin, soit la génération d'une souris détenant la délétion spécifique de Gab1 dans les cellules endothéliales « Endothelium-specific Gab1 knockout mice » (Gab1 ECKO) révèle le rôle crucial de Gab1 dans l'angiogenèse. Ces animaux sont viables et ne présentent pas de défauts vasculaires majeurs ce qui laisse fortement suggérer que Gab1 ne soit pas impliqué dans le développement de la vasculogenèse. Plus précisément, ces trois groupes démontrent que Gab1 joue un rôle essentiel dans la régulation de l'angiogenèse post-natale *in vivo* en réponse à différents facteurs pro-angiogéniques tel que le HGF et le VEGF grâce à des expériences de revascularisation suite à une ischémie induite, des expériences d'angiogenèse dans des « plugs » de Matrigel injectées chez la souris et des expériences de bourgeonnement de capillaires *ex vivo* à partir d'aortes de souris (Y. Lu et al., 2011) (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011). Ainsi, il s'avère crucial de bien caractériser les différents mécanismes moléculaires régulés par Gab1 qui mènent aux différents phénomènes biologiques essentiels à l'angiogenèse pour ainsi mieux comprendre le rôle crucial de Gab1 à cet endroit. De cette façon, nous avons concentré nos efforts sur la caractérisation de l'implication de Gab1 dans les mécanismes moléculaires qui régulent les RhoGTPases dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF et donc, dans un contexte angiogénique.

Travaux précédents et objectifs de la thèse

Précédant l'initiation de mon projet de Doctorat, le laboratoire, et un second groupe, ont démontré en 2006-2007 l'implication de Gab1 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF (Dance et al., 2006) (Laramée et al., 2007). L'étude de cette protéine d'échafaudage démontrait une forte implication de Gab1 en aval de nombreux récepteurs à fonction tyrosine kinase, mais ces travaux représentaient les premières études en réponse à l'activation du récepteur à fonction tyrosine kinase, le VEGFR2. Ainsi, il a été démontré que Gab1 est phosphorylé sur tyrosine et s'associe avec plusieurs protéines de signalisation en réponse au VEGF. De plus, ces études démontraient que Gab1 semble être impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine, puisque Gab1 médie la migration cellulaire dépendante du VEGF et que Gab1 semble permettre une réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse au VEGF. Des analyses de formation de capillaires sur fibrine en réponse au VEGF démontraient aussi l'importance de Gab1 dans l'induction de l'angiogenèse *in vitro*.

Lors de cette étude, l'utilisation d'ARNis pour diminuer l'expression de Gab1 mène à une diminution de la signalisation, toutefois, certains signaux demeurent faibles quoique présents malgré cette diminution d'expression de Gab1, ce qui peut être expliqué, soit par une inhibition non-totale de l'expression de Gab1, soit par la signalisation du second membre de la famille présent dans les cellules endothéliales, Gab2. Lors de mes premiers travaux je me suis donc penchée sur l'étude du second membre de la famille, Gab2, dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Objectif 1

Article 1 : Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adaptors in VEGF-signaling, migration, and survival of endothelial cells.

Le but de la première étude était de :

- Évaluer le rôle de Gab2 dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF, déterminer sa phosphorylation sur résidus tyrosines en réponse au VEGF
- Caractériser les protéines associées et les complexes protéiques formées suite à la stimulation au VEGF
- Analyser sa contribution à la signalisation dépendante du VEGF et sa contribution aux activités biologiques induites par le VEGF telles que la survie et la migration cellulaire
- Comparer sa contribution à celle de Gab1

Ainsi, dans cette première étude nous avons démontré que, tout comme Gab1, Gab2 est tyrosine phosphorylé en réponse au VEGF, s'associe à plusieurs protéines de signalisation et est nécessaire pour induire la migration cellulaire dépendante du VEGF. Toutefois, Gab2 semble atténuer plusieurs voies de signalisations telles que Akt, Src, Erk1/2 dépendantes de Gab1. Gab1 semble être le médiateur important pour induire la survie cellulaire et ce probablement via l'activation de Akt grâce aux sites Y801/Y1214 du VEGFR2.

Ainsi, le laboratoire avait démontré en 2007 l'implication de Gab1 sur l'angiogenèse *in vitro*. Par la suite, trois groupes indépendants ont démontré le rôle crucial et essentiel de Gab1 sur l'angiogenèse *in vivo* grâce à l'utilisation d'un modèle murin Gab1 ECKO, où la délétion de Gab1 dans les cellules endothéliales de façon spécifique diminue l'angiogenèse post-natale. Ces études ont aussi démontré que Gab2 ne semble pas essentiel, pour médier l'angiogenèse *in vivo*. Nous avons poursuivi nos études pour mieux approfondir nos connaissances sur le rôle de Gab1 dans l'angiogenèse. Ainsi, comme le laboratoire avait démontré le rôle de Gab1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales en réponse au VEGF et ainsi permettre la génération de lamellipodes et induire la migration cellulaire tout en sachant que lors de l'angiogenèse, le remodelage d'actine et la migration cellulaire sont des phénomènes essentielles et que nous détenons peu de connaissances des différents mécanismes moléculaires régulés par le VEGF dans ce contexte, notre second objectif

était de caractériser le rôle de Gab1 dans la régulation des mécanismes moléculaires qui induit le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire.

Objectif 2

Article 2 : The scaffolding adapter Gab1 mediates the interaction of p120catenin with the VAV2 guanine nucleotide exchange factor and Cortactin to promote VEGF-induced Rac1 activation and endothelial cell invasion.

Le but de la deuxième étude était de :

- Évaluer le rôle de Gab1 sur l'activation des GTPases Rac et Cdc42 en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales.
- Évaluer le rôle de Gab1 sur les GEFs qui régulent l'activation de ces GTPases.
- Caractériser les mécanismes moléculaires qui mènent à ces activations.
- Évaluer le rôle de Gab1 dans les capacités invasives des cellules endothéliales.

Ainsi, nous avons démontré que Gab1 est important pour induire l'activation de la GTPase Rac1, via l'activation de la GEF VAV2. Alors que Gab1 semble atténuer l'activation de la GTPase Cdc42, via l'atténuation de l'activation de la GEF β -PIX, Gab1 médie la formation d'un complexe incluant la p120 Caténine, la GEF VAV2, la Cortactine. Gab1 permet la relocalisation de ce complexe protéique au front de migration des lamellipodes des cellules endothéliales en réponse au VEGF. De plus, via la régulation positive de la Cortactine, Gab1 est important pour médier l'invasion cellulaire. Le domaine PH de Gab1 permet la formation du complexe et l'induction du potentiel invasif, probablement du au recrutement de Gab1 aux phospholipides présents à la membrane des cellules.

Suite à ces travaux qui ont identifié le rôle de Gab1 sur des voies « activatrices » des RhoGTPases dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF, nous avons tenté d'identifier des modulateurs « négatifs » soit des GAPs, contrôlées soit par le VEGF dans les cellules endothéliales. Il a été démontré que Gab1 peut s'associer à la GAP GC-GAP, toutefois cette GAP n'est exprimée exclusivement dans les cellules neuronales du cerveau (C. Zhao et al., 2003). Elle fait partie d'une famille de quatre protéines GAPs à haute homologie incluant CdGAP, qui quant à lui est fortement exprimé dans les cellules endothéliales (van Buul et al., 2014). De plus, des mutations gain-de-fonction ont été identifiées dans le gène encodant CdGAP dans le syndrome Adams-Oliver,

caractérisé entre autre par des défauts vasculaires (Southgate et al., 2011). Pour mon troisième objectif, nous avons tenté de mieux caractériser le rôle non-connu de CdGAP dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Objectif 3

Article 3 : CdGAP Regulates Vascular Development and VEGF-Mediated Signaling in Angiogenesis.

Le but de la troisième étude était de :

- Caractériser le rôle de la GAP CdGAP dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.
- Évaluer le rôle de CdGAP sur les GTPases Rac et Cdc42.
- Investiguer l'implication de CdGAP sur les signalisations importantes du VEGF.
- Étudier le lien entre Gab1 et CdGAP.
- Évaluer l'impact de la perte d'expression de CdGAP dans les souris CdGAP $-/-$ sur le développement vasculaire et sur l'angiogenèse.

Nous avons démontré que la perte d'expression de CdGAP résulte en une moins forte activation des GTPases Rac et Cdc42, une moins grande signalisation du VEGF, et une moins bonne tyrosine phosphorylation de Gab1. Ces différents défauts de signalisation du VEGF, résultent en une diminution des capacités biologiques des cellules endothéliales telle qu'une diminution de la migration cellulaire, une diminution de l'angiogenèse *in vitro*, une diminution de bourgeonnements à partir de sphéroïdes de cellules endothéliales et une diminution de l'angiogenèse *ex vivo*, à partir d'aortes de souris CdGAP KO. De plus, les embryons de souris CdGAP KO ont de graves défauts au niveau de leur vasculature, présentant un manque de vaisseaux sanguins apparents, une vasculature trop largement ramifiée, des hémorragies et de l'œdème. Ces différents problèmes pourraient être la cause d'une mortalité d'environ 50% des souris CdGAP KO attendus selon un profil mendélien standard.

La thèse contient les trois articles suivants :

1. Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells.

Christine Caron, Kathleen Spring, Mélanie Laramée, Catherine Chabot, Monikca Cloutier, Haihua Gu, Isabelle Royal

Publié dans Cellular Signaling en 2009

2. The scaffolding adapter Gab1 mediates the interaction of p120catenin with the VAV2 guanine nucleotide exchange factor and Cortactin to promote VEGF-induced Rac1 activation and endothelial cell invasion.

Christine Caron, Patrick Fournier, Kathleen Spring, Sarita Sastry and Isabelle Royal

En préparation pour The Journal of Cell Science

3. CdGAP Regulates Vascular Development and VEGF-mediated signaling in angiogenesis.

Christine Caron, Jonathan Degeer, Patrick Fournier, Philippe Duquette, Vilayphone Luangrath, Fereshteh Karimzadeh, Nathalie Lamarche-Vane* and Isabelle Royal*

* Co-Corresponding authors

En préparation pour Nature Communications

Contribution personnelle à l'ouvrage :

Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells

Christine Caron^a, Kathleen Spring^a, Mélanie Laramée^a, Catherine Chabot^a, Monikca Cloutier^a, Haihua Gu^b, and Isabelle Royal^{a,c,*}

J'ai effectué dans cette publication plus de la moitié des figures. Les auteurs, K.S., M.L., C.C., M.C., ont chacun effectué une sous-figure (une lettre) H.G. a contribué en donnant le plasmide Gab2. I.R. a élaboré le projet et rédigé l'article avec C. Caron.

Caron C. a effectué les expériences de la figure 2B figure 4 figure 5 figure 6

K.S. a effectué figure 7B

M.L. a effectué les expériences de la figure 1, 2A 3

M. C. a effectué figure 7A

Chapitre 2 : Non-Redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells

Christine Caron^a, Kathleen Spring^a, Mélanie Laramée^a, Catherine Chabot^a, Monikca Cloutier^a,

Haihua Gu^b, and Isabelle Royal^{a,c,*}

Article publié dans Cellular Signaling, 2009

^aCRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal. ^bDepartment of Pathology, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado 80045, and ^cDépartement de médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1

*Corresponding author: Centre de recherche du CHUM, Hôpital Notre-Dame, Pavillon J.A. de Sève Y-4605, 1560 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1, Tel. + 1 514 890-8000, ext. 25497; Fax: + 1 514 412 7591.

Abstract

Gab1 was previously described as a positive modulator of Akt, Src, ERK1/2, endothelial cell migration, and capillary formation in response to vascular endothelial growth factor (VEGF). However, its involvement in endothelial cell survival, as well as the potential contribution of the other family member Gab2 to signalling and biological responses remained unknown. Here, we show that Gab2 is tyrosine phosphorylated in a Grb2-dependent manner downstream of activated VEGF receptor-2 (VEGFR2), and that it associates with signalling proteins including PI3K and SHP2, but apparently not with the receptor. Similarly to Gab1, over-expression of Gab2 induces endothelial cell migration in response to VEGF, whereas its depletion using siRNAs results in its reduction. Importantly, depletion of both Gab1 and Gab2 leads to an even greater inhibition of VEGF-induced cell migration. However, contrary to what has been reported for Gab1, the silencing of Gab2 results in increased Src, Akt and ERK1/2 activation, slightly reduced p38 phosphorylation, and up-regulation of Gab1 protein levels. Accordingly, re-expression of Gab2 in Gab2^{-/-} fibroblasts leads to opposite results, suggesting that the modulation of both Gab2 and Gab1 expression in these conditions might contribute to the impaired signalling observed. Consistent with their opposite roles on Akt, the depletion of Gab1, but not of Gab2, results in reduced FOXO1 phosphorylation and VEGF-mediated endothelial cell survival. Mutation of VEGFR2 Y801 and Y1214, which abrogates the phosphorylation of Gab1, also correlates with inhibition of Akt. Altogether, these results underscore the non-redundant and essential roles of Gab1 and Gab2 in endothelial cells, and suggest major contributions of these proteins during *in vivo* angiogenesis.

Keywords

Akt; Endothelial cells; Gab1; Gab2; Migration; Survival; VEGF

1. Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key regulator of vascular development and angiogenesis (Folkman, 1995) (Risau, 1997). However, deregulation of its expression during the course of several diseases including retinopathies, rheumatoid arthritis, and cancer greatly contributes to the progression of these pathologies (Carmeliet & Jain, 2000). Capillary formation in response to VEGF stimulation results from the concerted activation of several intracellular signalling pathways that will differentially promote endothelial cell proliferation, migration, permeability and survival (Ferrara, Hillan, Gerber, & Novotny, 2004). At the surface of endothelial cells, the VEGFR2 (KDR/Flk-1) receptor tyrosine kinase (RTK) has been identified as the major mediator of VEGF-dependent signalling and cellular activities (Li et al., 2000) (Gille et al., 2001) (Keyt et al., 1996) (Kanno et al., 2000) (Waltenberger, Claesson-Welsh, Siegbahn, Shibuya, & Heldin, 1994) (Rahimi et al., 2000) (Zeng et al., 2001). Among the numerous effectors identified, phospholipase γ (PLC γ) and downstream ERK1/2 mediate endothelial cell proliferation; Src, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), AKT, and eNOS are involved in providing cell migratory, survival, and permeability signals (Guo, Jia, Song, Warren, & Donner, 1995) (Xia et al., 1996) (Gerber, McMurtrey, et al., 1998) (Fujio & Walsh, 1999) (Eliceiri et al., 1999) (Munshi, Groopman, Gill, & Ganju, 2000) (H. He et al., 1999); the adapter Tsad/VRAP associates with Src and mediates endothelial cell migration and angiogenesis (L. W. Wu et al., 2000) (Matsumoto et al., 2005) and Nck, Fyn, Cdc42, and p38 have been shown to promote actin and focal adhesion reorganization and are essential for the ability of endothelial cells to move (Rousseau et al., 1997) (Lamallice et al., 2004) (Lamallice et al., 2006) (Stoletov, Ratcliffe, Spring, & Terman, 2001) (Kiosses, Daniels, Otey, Bokoch, & Schwartz, 1999) (Holmes et al., 2007).

With the aim of defining VEGFR2 proximal activators of VEGF-dependent signalling, we and others have identified the scaffolding adapter Gab1 as an essential mediator of the optimal activation of Akt, Src and ERK1/2 (Laramée et al., 2007) (Dance et al., 2006). Gab1 is part of a family of proteins, which also include Gab2 and Gab3 in mammals, DOS in drosophila, and Soc1 in *Caenorhabditis elegans* (Gu & Neel, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002). These proteins encompass a N-terminal PH domain, which mediates their interaction with specific membrane lipids, and contain a large number of tyrosine residues and proline-rich regions that allow their interaction with signalling proteins encompassing SH2 and SH3 domains, and consequently, the formation of multimolecular signalling

complexes. We demonstrated that tyrosine-phosphorylated Gab1 associates with several proteins including PI3K and SHP2, and that this is essential for VEGF-induced cell migration, while Gab1 expression is also required for capillary formation (Laramée et al., 2007). Gab1, but not Gab2, has been reported to directly interact with the Met receptor tyrosine kinase via a novel phosphotyrosine binding domain (Met binding domain) (Weidner et al., 1996). However, Gab1/Gab2 have also been shown to interact with Met and other receptor tyrosine kinases, cytokine receptors, and oncoproteins in an indirect manner via association of Gab1/Gab2 with Grb2 (Gu & Neel, 2003) (Rodrigues, Falasca, Zhang, Ong, & Schlessinger, 2000) (Schaeper et al., 2000) (Lock et al., 2000) (Lock et al., 2002) (Kallin et al., 2004). Consistent with this, Grb2 is crucial for the membrane translocation of Gab1 and its association with VEGFR2 complexes, its tyrosine phosphorylation, and activation of ERK1/2 and Akt in response to VEGF (Laramée et al., 2007) and (Dance et al., 2006). Gab1 and Gab2 are ubiquitously expressed and have been recognized as critical activators of the PI3K/Akt and/or the SHP2/ERK pathways in several cellular systems (Gu & Neel, 2003) and (Sarmay et al., 2006). Given the biological importance of these pathways, a number of experiments have revealed the contribution of Gab proteins to various biological processes including cell survival, migration, differentiation, proliferation, morphogenesis, transformation and cancer (Gu & Neel, 2003) (Schaeper et al., 2000) (Kallin et al., 2004) (Sarmay et al., 2006) (Yu, Hawley, Hawley, & Qu, 2002) (Yamasaki, Nishida, Sakuma, et al., 2003) (Bentires-Alj et al., 2006) (Bennett et al., 2008) (Mattoon, Lamothe, Lax, & Schlessinger, 2004) (Lamothe et al., 2004) (Mao & Lee, 2005) (Gu et al., 1998) (Maroun, Holgado-Madruga, et al., 1999) (Maroun et al., 2000) (Gual et al., 2000) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002) (Holgado-Madruga et al., 1996) (Korhonen, Said, Wong, & Kaplan, 1999) (Y. Zhang et al., 2007) (Y. Ren et al., 2004) (Sachs et al., 2000) (Ke et al., 2007).

Despite the important role for Gab1 in VEGF-stimulated endothelial cells, residual activation of Akt, Src and ERK1/2 is still observed in cells transfected with Gab1 siRNAs (Laramée et al., 2007). This could be due to remaining Gab1 expression in these cells, or to the expression of other proteins compensating for the loss of Gab1. Since Gab2 is also expressed in endothelial cells and that it can stimulate these pathways in other cellular systems (Gu & Neel, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002) (Sarmay et al., 2006), we postulated that Gab2 was redundantly involved in their activation in Gab1-silenced cells. In this paper, we show that although Gab2 binds to some of the same signalling proteins and mediates endothelial cell migration similarly to Gab1, its depletion instead increases VEGF-induced Akt, Src, and ERK1/2 activation, and correlates with augmented Gab1 expression levels.

Consequently, Gab1, but not Gab2, is the VEGF-mediator of endothelial cell survival. Overall, our work thus reveals the differential and essential roles of these two proteins in the angiogenic responses of endothelial cells to VEGF.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAECs; Clonetics/Cambrex; purchased from Cedarlane Laboratories Ltd.) were cultured (passages 3 to 10) in DMEM low-glucose (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) containing 10% calf serum (Invitrogen), 2 ng/ml FGF and 50 µg/ml gentamycin. Human microvascular endothelial cells (HMVECs) (passages 4 to 6; Clonetics/Cambrex) were maintained in EBM-2 supplemented with 5% FBS, EGF, VEGF, FGF, heparin, IGF-1, hydrocortisone and ascorbic acid (EGM-2-MV bullet kit; Clonetics/Cambrex), and grown on tissue culture dishes precoated with 0.2% gelatin (Sigma; 2 h at 37 °C). HEK 293 cells were grown in DMEM high-glucose (Invitrogen) containing 10% FBS (Invitrogen) and 50 µg/ml gentamycin. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were derived from E13 Gab2 knockout embryos, and the cell line was established according to the 3T3 protocol (Winnay, Bruning, Burks, & Kahn, 2000). Cells were maintained in DMEM high-glucose containing 15% FBS and 50 µg/ml gentamycin.

2.2. Antibodies and reagents

Antibodies against phosphotyrosine (PY99), VEGFR2 (clone A-3 for immunoblotting), Gab1 (clone H-198), SHP2 (SH-PTP2; clone B-1) and epitope HA (clone F-7), were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). A second anti-VEGFR2 antibody (rabbit antiserum) purchased from Upstate/Millipore (Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON, Canada) was used to immunoprecipitate VEGFR2. Antibodies against the p85 subunit of PI3-kinase, PLC α , Gab1 (C-terminus), Gab2, Src (clone GD11) and Grb2 (clone 3F2) were obtained from Upstate/Millipore. Phosphospecific antibodies against p^{Y783}PLC γ , and p^{Y418}Src were obtained from BioSource Inc. (Invitrogen). Antibodies against p^{S473}Akt, Akt, p^{T180/Y182}p38, p38, p^{S256}FOXO1, FOXO1, and Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or -rabbit IgG were purchased from Cell Signaling Technology Inc., New England Biolabs (Pickering, ON, Canada). The α -tubulin (E7) monoclonal antibody developed by Michael W. Klymkowsky was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of

Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA. VEGF, FGF, and CSF-1, were purchased from R&D Systems (distributed by Cedarlane Laboratories). Hoechst 33342 was obtained from Sigma.

2.3. Expression plasmids and site-directed mutagenesis

Constructs encoding HA-tagged mouse Gab2 (in pEBB), HA-tagged mouse Gab1 (in pCDNA 1.1) (provided by Albert Wong and Marina Holgado-Madruga, Stanford University, California), and the HA-Gab2ΔGrb2 mutant (provided by Morag Park, McGill University, Montreal, Canada), have been described elsewhere (Lock et al., 2002) (Gu et al., 1998) (Holgado-Madruga et al., 1996). The CSF-VEGFR2 chimeric receptor encodes the human CSF-1 receptor extracellular domain fused to the transmembrane and intracellular domain of human VEGFR2 (in the pShuttle-CMV adenoviral vector; Qbiogene/MP Biomedicals, Montreal, Qc, Canada). Details of its construction and mutagenesis have been described previously (Laramée et al., 2007) (Chabot et al., 2009). The pCDNA3-Grb2 construct was generously provided by Mounib Elchebly (Université de Montréal, Hôpital Sainte-Justine, Canada).

2.4. Transfection of siRNAs

HMVECs (passage 4–6) were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm² on gelatin-coated tissue culture dishes 21 h before transfection. A pool of four Gab1 siRNAs, (Gab1 siGENOME SMARTpool), non-targeting Control #2 siRNAs, the Gab1 siRNA duplex #1 (cat # D-003553-01; from Thermo Scientific/Dharmacon), Gab2 siRNA (Hs_GAB2_1_HP), and a non-targeting AllStars control siRNA (both from Qiagen) were transfected at a final concentration of 200 nM, unless stated otherwise, in DMEM high glucose using Targefect reagents, according to the manufacturer's recommendations (Targeting Systems Inc., Santee, CA). Similar results were obtained with the Control #2 or AllStars negative control siRNAs. After a 2 h-incubation, cells were rinsed twice in PBS and incubated in complete EBM-2 medium (supplemented with EGM-2-MV bullet kit) for an additional 48 h (32 h for the survival assay).

2.5. Transfection of cDNAs

HEK 293 cells (1×10^6 /100 mm-dish) were plated and transfected 24 h later with 10 μg of WT or mutant CSF-VEGFR2 cDNA plasmids, and 5 μg of either HA-tagged Gab1, Gab2 or Gab2ΔGrb2 cDNA plasmids using the calcium phosphate precipitation method (Wigler et al., 1979). For experiments

with Grb2, 5 μg of the cDNA construct were transfected. The medium was changed the next morning and the cells were serum-starved in DMEM (high-glucose) at night for another 16 h, before stimulation with CSF-1 (50 ng/ml). BAECs were plated (1.5×10^6 cells/100 mm-dish) and transfected 24 h later with 6 μg of empty pEBB vector or Gab2 plasmid DNA using lipofectin (6 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ of DNA) in serum-free DMEM low-glucose according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). The cells were washed the next day and fresh medium was added for another 24 h, at which time, the cells were trypsinized and used in a migration assay. Gab2^{-/-} MEFs (2×10^5 /60 mm-dish) were plated and transfected 24 h later with either 5 μg of HA-Gab2 cDNA construct or the corresponding pEBB empty vector using the calcium phosphate precipitation method. The medium was changed the next morning, and the cells were serum-starved in DMEM the following day for 16 h before cell lysis.

2.6. Cell stimulation, lysis, immunoprecipitation, and immunoblotting

Following starvation in EBM medium for 6 h, transfected HMVECs were stimulated with VEGF (50 ng/ml) at 37 °C, incubated in PBS containing 1 mM Na₃VO₄ for 30 min on ice, and lysed in a 50 mM HEPES pH 7.5 buffer containing 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Triton X-100, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 mM NaF, and 1 mM Na₃VO₄, as previously described (Laramee et al., 2007). For stimulation of untransfected HMVECs, 1×10^4 cells/cm² were seeded and allowed to grow for 5 days in EGM-2-MV medium. Following starvation in EBM for 6 h, cells were stimulated and lysed as described above. For BAECs, 5.4×10^5 cells/100 mm dishes were grown for 3 days and then serum-starved (DMEM + gentamycin) for 16 h. Stimulation was performed as for HMVECs. Serum-starved HEK 293 cells were stimulated with CSF-1 (50 ng/ml) for the indicated times, washed twice with PBS alone, and lysed in the 50 mM HEPES pH7.5 buffer. Gab2^{-/-} MEFs were lysed in the HEPES buffer described above. For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with antibodies for 2–4 h (or overnight for co-precipitations). Protein A- or Protein G-conjugated Sepharose beads (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, QC, Canada) were added to the immunoprecipitated proteins for an additional 3 h, and processed as described previously (Laramee et al., 2007). Immunoprecipitated proteins or total protein extracts (40–50 μg) were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-C Extra membranes. Western blotting and ECL detection (Amersham Biosciences) were then performed according to the manufacturer's recommendations, using HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Cell Signaling). The Visualizer reagent (Upstate/Millipore) was sometimes used for

detection of weak signals. Quantification of Western blot results was performed by densitometry using the Bio-Rad Quantity One analysis software. Unless stated otherwise, the relative phosphorylation intensity of proteins was determined and normalized according to the corresponding protein levels. Results from a minimum of 3 independent experiments were graphically represented, \pm SD.

2.7. Migration assay

Transfected BAECs or HMVECs, (1×10^5 cells in 200 μ l of serum-free low-glucose DMEM) were seeded on Transwell filters (polycarbonate membrane, 8 μ m pore-size, Corning Brand; Fisher Scientific, Nepean, ON, Canada) precoated with 0.2% gelatin and inserted in 24-well plates. After a 30 min incubation (for BAECs only), VEGF (10 ng/ml), was added to the lower chamber containing 800 μ l of the same medium for 6 h (BAECs), or 16 h (HMVECs). At the end of the assay, cells were fixed with phosphate-buffered formalin for 20 min and stained with crystal violet (0.1% in 20% methanol) for a minimum of 60 min. Cells remaining on the upper surface of the filter were wiped off and those which had migrated through the filter pores were visualized and counted (a minimum of 6 fields/insert at \times 40 magnification).

2.8. Cell death evaluation

Thirty-two hours after transfection of siRNAs, HMVECs were serum-starved in EBM with or without VEGF (80 ng/ml) for 16 h. Cells were then stained with Hoechst 33342 (0.1 mg/ml) for 10 min at 37 °C. Ten microscopic fields (encompassing from 50–100 cells each) were photographed for each condition with the use of a Leica DMIRB microscope and its application software. Nuclear condensation was quantified as the percentage of cells with condensed nuclei over the total number of cells /field.

2.9. Data analysis

Statistical significance was evaluated with the Student's *t* test or the Mann–Whitney rank sum test (for samples with unequal variance or distribution) using the SigmaStat software. *P*-values of less than 0.05 were considered to be significant.

3. Results

3.1. Gab2 is phosphorylated and associates with signalling proteins upon VEGF stimulation

Previous work revealed that Gab1 was required for the optimal activation of Akt, Src and ERK1/2 in response to VEGF (Laramee et al., 2007), but suggested that other signalling pathways contributing to their activation were involved as well. Since Gab2 is also expressed in endothelial cells, and that it has been reported to activate these pathways in other cellular systems (Gu & Neel, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002) (Sarmay et al., 2006), we postulated that the residual activity of Akt, Src and ERK1/2 in Gab1-depleted cells could be due to Gab2 expression. To test this hypothesis, we first investigated if Gab2 was tyrosine phosphorylated in response to VEGF stimulation, and if this resulted in the increased association of Gab2 with signalling proteins. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) or human microvascular endothelial cells (HMVECs) were stimulated with VEGF for the indicated times and Gab2 was immunoprecipitated (Fig. 1). Western blotting with the PY99 anti-phosphotyrosine antibody revealed that Gab2 was tyrosine phosphorylated in response to VEGF stimulation in both primary cell cultures (Fig. 1A, B). Gab2 also co-precipitated with the tyrosine phosphatase SHP2 and with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), but only the association with SHP2 was obviously induced by VEGF stimulation (Fig. 1C).

Gab family proteins associate with Grb2 and this has been shown to mediate their tyrosine phosphorylation, and in some instances, their association with growth factor receptors (Gu & Neel, 2003) (Rodrigues et al., 2000) (Schaeper et al., 2000), (Lock et al., 2000) (Lock et al., 2002) (Kallin et al., 2004). We have shown that the association of Gab1 with Grb2 is required for its tyrosine phosphorylation and for its association with VEGFR2 protein complexes (Laramee et al., 2007). In order to test if Gab2 tyrosine phosphorylation was dependent on the formation of similar protein complexes, we first compared the tyrosine phosphorylation of WT Gab2 with that of the Gab2 Δ Grb2 mutant following their co-expression with the CSF-VEGFR2 chimeric receptor and Grb2 in HEK 293 cells (Fig. 2). This chimeric receptor is activated by CSF-1 and behaves as full-length VEGFR2 (Laramee et al., 2007). Results show that the phosphorylation of the HA-tagged Gab2 Δ Grb2 mutant was abrogated in response to CSF-1 stimulation, compared to that of WT HA-Gab2 (Fig. 2A). This then suggested that the Grb2–Gab2 association was allowing the recruitment of Gab2 to tyrosine

phosphorylated protein complexes involved in its phosphorylation. To test if VEGFR2 could recruit Gab2 in response to VEGF stimulation, VEGFR2 was immunoprecipitated from HMVECs. Western blotting analysis showed that in contrast to Gab1, which was found to co-precipitate with VEGFR2 in the same experimental conditions, Gab2 did not associate with VEGFR2 protein complexes in VEGF-stimulated endothelial cells (Fig. 2B). Therefore, these results demonstrate that although Gab2 is tyrosine-phosphorylated in a Grb2-dependent fashion downstream of activated VEGFR2, and that it associates with PI3K and SHP2, this seemingly does not involve its stable association with VEGFR2.

3.2. Gab2 contributes to VEGF-induced endothelial cell migration

Gab1 was shown to promote VEGF-induced endothelial cell migration via its association with PI3K and SHP2 (Laramée et al., 2007) (Dance et al., 2006). To establish if Gab2, which also associates with these proteins, was involved in the promotion of cell migration in response to VEGF stimulation, the pEBB empty vector or the HA-tagged Gab2 cDNA construct were transfected in BAECs, and migration was evaluated in a modified Boyden chamber assay. Fig. 3A shows that over-expression of HA-Gab2 led to the enhancement of VEGF-induced cell migration, which was stimulated 3.2-fold over that of unstimulated control cells, versus a 1.8-fold induction for control cells transfected with empty vector. In the converse experiment, the RNAi-mediated silencing of Gab2 expression (average knock-down efficiency of 62%) resulted in the decreased migration of HMVECs, which was stimulated only 1.2-fold over that of control unstimulated cells, compared to the 2.6-fold induction seen in control cells stimulated by VEGF (Fig. 3B). Since both Gab1 and Gab2 were found to mediate endothelial cell migration, we next investigated the consequence of silencing the expression of both proteins. Fig. 3C shows that the silencing of Gab1 (average knock-down efficiency of 51%) is slightly more potent than that of Gab2 at inhibiting the migration of HMVECs in response to VEGF. However, simultaneous depletion of both Gab1 and Gab2, although with reduced siRNA concentrations to avoid cell toxicity, resulted in even greater inhibition when compared to cells transfected with an equivalent concentration of control siRNAs. Collectively, these results demonstrate the contribution of Gab2 to VEGF-mediated endothelial cell migration, and suggest that blocking the function of both proteins might be very potent at inhibiting angiogenesis, which depends on the ability of endothelial cells to move.

3.3. Depletion of Gab2 leads to the promotion of Gab1-dependent signalling pathways and to increased Gab1 protein levels

Since the depletion of Gab1 impairs VEGF-dependent activation of Akt, Src, and ERK1/2, without completely abrogating their activation, we postulated that the residual signalling could be due to either the incomplete silencing of Gab1, or to Gab2, which was still expressed in these cells. To test this hypothesis, we therefore investigated the contribution of Gab2 to VEGF-mediated signalling. HMVECs were transfected with control or Gab2 siRNAs, and the activation of signalling proteins in response to VEGF stimulation was determined by immunodetection of their activated, phosphorylated forms. Unexpectedly, the phosphorylation/activation of Akt, Src and to a lesser extent ERK1/2 was increased in Gab2-depleted cells, compared to control cells (Fig. 4A). The phosphorylation of PLC α was unchanged, while the phosphorylation of p38 was slightly decreased in these conditions. In parallel experiments, depletion of Gab1 instead led to a small increase in the phosphorylation of p38 (Fig. 4B). These results therefore demonstrated that the contribution of Gab2 to VEGF-dependent signalling was opposite to that of Gab1. The fact that regulation of all of these pathways was previously shown to be partly dependent on Gab1 led us to investigate the protein level of Gab1 in Gab2-depleted cells. Interestingly, we found that the level of detergent-soluble Gab1 was increased in Gab2-depleted cell lysates (Fig. 4C). This was shown to correlate with an increased amount of co-immunoprecipitating PI3K, and the consequent increased Akt activation upon VEGF stimulation of these cells (Fig. 4C). Importantly, normalization of the relative amounts of associated p85 to the levels of immunoprecipitated Gab1 revealed no difference between their ability to associate in Gab2-depleted cells and control cells (data not shown), suggesting that the greater PI3K-Gab1 association in Gab2-depleted cells was due to the increased amounts of Gab1. The reverse experiment was also performed in Gab2 $^{-/-}$ mouse embryonic fibroblasts transfected with either HA-Gab2 or the corresponding empty vector (Fig. 5). Re-expression of Gab2 resulted in the decreased activation status of all of the signalling molecules previously tested, as well as of the level of Gab1 expression, demonstrating that Gab2 expression was linked to the negative regulation of signalling in this cellular systems as well. Altogether, these results support the idea that Gab2 might act as an attenuator of Gab1-dependent signalling in VEGF-stimulated endothelial cells. This could partly depend on its regulation of soluble Gab1 protein levels in endothelial cells, although the possible contribution of other mechanisms of regulation are not excluded. However, since the stimulation of

Gab1-dependent signalling in Gab2-depleted cells does not result in increased cell migration, we conclude that Gab2 must also contribute essential migratory signals in response to VEGF stimulation.

3.4. Gab1, but not Gab2, is required for VEGF-induced endothelial cell survival

Akt activation is essential for VEGF-mediated endothelial cell survival (Gerber, McMurtrey, et al., 1998) (Fujio & Walsh, 1999) (Carmeliet et al., 1999). The impaired activation of Akt in Gab1-depleted cells suggests that VEGF will not be as efficient in protecting these cells from cell death under starvation conditions. In contrast, higher Akt activation in Gab2-depleted cells should allow their survival in these conditions. To test this, control, Gab1- or Gab2-depleted HMVECs were incubated in EBM medium alone, in the absence or presence of VEGF for 16 h. At the end of this incubation, cells were stained with Hoechst 33342 and the percentage of condensed nuclei determined for each condition. Results show that the silencing of Gab1 blocked VEGF-mediated survival, while Gab2 silencing had no effect. Indeed, VEGF was as potent on Gab2-depleted cells as on control cells, and reduced cell death by an average of 33% (Fig. 6A). In line with these findings, the depletion of Gab1, but not of Gab2, was shown to decrease the phosphorylation of the Akt substrate FOXO1 (Fig. 6B), which is involved in the promotion of cell death when not phosphorylated (Fu & Tindall, 2008). Altogether, these results demonstrate for the first time the essential role of Gab1 in VEGF-mediated survival, and also reveal the differential roles of Gab1 and Gab2 in the activation of this pathway.

3.5. Inhibition of Gab1 phosphorylation downstream of mutated VEGFR2 correlates with impaired Akt activation

Reduction of Gab1 expression results in the impaired activation of Akt in response to VEGF (Fig. 6B, and (Laramee et al., 2007)). To further demonstrate the correlation between Gab1 phosphorylation and Akt activation, we first identified the VEGFR2 tyrosine residues that were required for the tyrosine phosphorylation of Gab1. For this, HEK 293 cells were transfected with HA-tagged Gab1, Grb2, together with either empty vector, WT CSF-VEGFR2, or mutant CSF-VEGFR2 encompassing Y/F substitutions of major autophosphorylation sites. HA-Gab1 was immunoprecipitated from CSF-1-stimulated cells, and its phosphorylation determined by immunoblotting with the PY99 antibody (Fig. 7A). Mutations of Y801 or Y1214 impaired the ability of CSF-VEGFR2 to induce Gab1 phosphorylation, while it was not affected by the Y1175F, Y951F or

Y996F mutations. As expected, mutations of Y1054 and Y1059 in the kinase activation loop also led to the block of Gab1 phosphorylation. Importantly, results showed that the double Y801F/Y1214F mutations completely abrogated the phosphorylation of Gab1 (Fig. 7A). Akt phosphorylation/activation was thus investigated in CSF-1-stimulated HEK 293 cells co-expressing either WT or the Y801F/Y1214F CSF-VEGFR2 mutant with HA-Gab1 and Grb2. Fig. 7B shows that Akt Serine 473 phosphorylation was blocked upon stimulation of this receptor mutant. These results thus demonstrate that the inhibition of Gab1 phosphorylation downstream of the Y801F/Y1214F CSF-VEGFR2 mutant correlates with impaired Akt activation, and further support the critical role played by the Gab1 adapter in the mediation of this important angiogenic signalling pathway (Ackah et al., 2005) (J. F. Sun et al., 2005) (Phung et al., 2006) (Kitamura et al., 2008).

4. Discussion

We previously demonstrated that the scaffolding adapter Gab1 was an important mediator of VEGFR2-dependent signalling involved in the optimal activation of Akt, ERK1/2 and Src. However, residual activation of these pathways was still observed in endothelial cells that had been depleted of Gab1 using siRNAs, suggesting that low levels of remaining Gab1 protein were sufficient to partly activate these pathways, or that other proteins were contributing to their activation. Since another member from this family of adapters, Gab2, was also expressed in endothelial cells, and that several papers had documented its involvement in the promotion of similar signalling or biological activities in various cell types (Gu & Neel, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002) (Sarmay et al., 2006), we then hypothesized that Gab2 was redundantly contributing to the activation of Akt, ERK1/2 and Src downstream of VEGFR2. Our study shows that even though Gab2 is tyrosine phosphorylated, associates with signalling proteins including PI3K and SHP2, and promotes endothelial cell migration in response to VEGF similarly to Gab1, its depletion surprisingly leads to the upregulated activation of Akt, ERK1/2 and Src, and to slightly reduced p38 phosphorylation. Consistent with the fact that Gab1 is instead involved in the promotion of this signalling response in VEGF-stimulated endothelial cells (Fig. 4B and (Laramée et al., 2007)), we find that the Gab1 protein level and the amount of associated Gab1-PI3K are increased in Gab2-depleted cells, suggesting that this might partly be responsible for the VEGF-induced signalling observed in these cells. Moreover, as a result of this opposite contribution of Gab1 and Gab2 to signalling, in particular to the phosphorylation of Akt and FOXO1, we also show for the first time that Gab1, but not Gab2, is a major mediator of VEGF-dependent endothelial cell survival, presumably downstream of VEGFR2 Y801 and Y1214, two sites previously associated with PI3K/Akt and Fyn activation, respectively (Lamallice et al., 2006) (Blanes et al., 2007). Collectively, our results thus reveal that even though these two proteins share many biochemical and biological features in various cellular systems, they nonetheless exert non-redundant functions in VEGF-stimulated endothelial cells, and these are essential for the appropriate regulation of endothelial angiogenic responses.

The analysis of VEGF-induced signalling in Gab2-depleted cells has revealed that pathways normally activated or downregulated by Gab1 were inversely regulated, as if Gab2 was an attenuator of Gab1-dependent signalling. Accordingly, re-expression of Gab2 in Gab2^{-/-} MEFs also resulted in

the attenuated activation of enzymes (Fig. 5), further demonstrating the negative contribution of Gab2 to signalling. Consistent with these results, we found that Gab1 protein levels in detergent-soluble protein extracts were increased in Gab2-depleted endothelial cells, and decreased in Gab2-re-expressing MEFs, suggesting that these modulations of Gab1 expression might have contributed to the phenotypes observed. It is interesting to note that the depletion of Gab1 instead led to a 20% reduction of Gab2 expression in the same endothelial cells (data not shown), suggesting that the mutual regulation of Gab1 and Gab2 expression did not correspond to a compensation effect per se. In fact, considering that in contrast to Gab1, Gab2 has been reported to inhibit the activity of ELK-1 in response to Ras- or growth factors-derived signals (C. Zhao et al., 1999) (Q. Huang et al., 2002), one explanation for these results could be that Gab2 plays a negative role in the regulation of Gab1 expression itself, through the modulation of transcription factors involved in Gab1 expression. Through this mechanism, Gab2 would then be involved in the control of the intensity of VEGF-dependent signalling, via regulation of Gab1 protein levels. As an alternative but not necessarily mutually exclusive hypothesis, Gab2 could also be associated with the recruitment of negative regulators of signalling, similarly to what has been suggested downstream of T-cell receptor activation (Saito & Yamasaki, 2003) (Yamasaki et al., 2001) (Yamasaki, Nishida, Yoshida, et al., 2003) (Pratt et al., 2000) (Parry et al., 2006). Thus, in this case, depletion of Gab2 would release VEGF-dependent signalling from the influence of potential negative regulators. In that same line of thought, Akt has been reported to selectively interact with and phosphorylate Gab2, but not Gab1, and to lead to the inhibition of its phosphorylation as well as of cellular signaling and receptor activation in response to Heregulin stimulation (Lynch & Daly, 2002). Although VEGFR2 tyrosine phosphorylation is not increased in Gab2-depleted cells (data not shown), the silencing of Gab2 could impede the negative regulation of VEGF-dependent signaling via this pathway. Further work will therefore be required to determine the molecular mechanism underlying the negative contribution of Gab2 to VEGF-dependent signaling responses, and whether Gab1 expression/function are specifically targeted.

Gab1 tyrosine phosphorylation and recruitment to activated VEGFR2 signalling complexes has previously been shown to depend on its association with Grb2 (Laramee et al., 2007). Similarly, we found that tyrosine phosphorylation of Gab2 also relied on its Grb2-binding sequences (Fig. 2A). However, surprisingly, we have not been able to detect its association with VEGFR2 in VEGF-stimulated endothelial cells, while Gab1 association in the same conditions was observed (Fig. 2B).

This result thus demonstrated that the ability of Gab2 to associate with Grb2 was not sufficient for its recruitment to the receptor in endothelial cells, and suggested that other events might be involved in allowing or regulating their interaction. Indeed, the ERK1/2-dependent phosphorylation of Grb2's binding partner SOS was shown to alter the binding affinity of the SH2 domain of Grb2 for tyrosine phosphorylated Shc or EGF receptor (Rozakis-Adcock, van der Geer, Mbamalu, & Pawson, 1995) (Porfiri & McCormick, 1996). As Gab1 and Gab2 are highly modified by phosphorylation, some of which in a Gab1- or Gab2-specific manner, it is thus possible that the affinity of Grb2–Gab1 for the VEGFR2 complex is higher than that of the Grb2–Gab2 tandem, which would then be competed away from VEGFR2. In addition, a recent study reported that in response to growth factor stimulation, 14-3-3 proteins associate with Gab2, but not with Gab1, and lead to the dissociation of Gab2 from Grb2 (Brummer et al., 2008). Such a mechanism could thus also provide a possible explanation as to why no Gab2 detectably associates with VEGFR2 in our experimental conditions. However, whether or not a small amount of Gab2 might still associate and not be detected, our results clearly underscore the selective association of Gab1, but not of Gab2, to the receptor complexes in endothelial cells, in agreement with Gab1 being a positive modulator of critical signalling pathways required for VEGF-dependent angiogenesis (Eliceiri et al., 1999) (Holmes et al., 2007) (Ackah et al., 2005). As we postulate that Gab2 might be a negative regulator of Gab1-dependent signalling in VEGF-stimulated endothelial cells, such mechanisms that restrain Gab2 from associating with the VEGFR2 complex might be necessary to ensure a positive and proper signalling outcome in response to VEGF stimulation. Interestingly, different biological functions ascribed to Gab1 and Gab2 downstream of the Met receptor have also partly been shown to rely on the inability of Gab2 to stably interact with the receptor (Lock et al., 2002) (Frigault, Naujokas, & Park, 2008). Our results thus suggest that mechanisms involved in the regulation of the differential binding of Gab proteins to VEGFR2 might be critical for their specific signalling functions in endothelial cells.

This work also revealed that opposite signalling does not necessarily translate into opposite biological functions. Overexpression or depletion of Gab2 have demonstrated its positive role in the promotion of endothelial cell migration, similarly to what has been reported for Gab1 (Laramée et al., 2007). Considering that Gab1-dependent signalling is induced in Gab2-depleted cells, and that Gab1 promotes endothelial cell migration, the inhibition of endothelial cell migration resulting from Gab2 depletion is somewhat surprising. One consequence of the depletion of Gab2 is the slight reduction of p38 activation, which has been shown to be essential for endothelial cell migration in response to

VEGF (Rousseau et al., 1997). However, it is not clear if this is sufficient to negatively affect the migration of Gab2-depleted cells, or if the loss of other Gab2-associated proteins is also involved. Another possible explanation is that sustained signalling would be detrimental to the proper regulation of cell migration, which involves the concerted activation and appropriate kinetics of signalling pathways (Kholodenko, 2006). The simultaneous depletion of Gab1 and Gab2 was even more potent at blocking VEGF-mediated cell migration, demonstrating that both Gab1 and Gab2 contribute essential signals required for endothelial cell migration. In contrast, Gab1 but not Gab2 was shown to mediate endothelial cell survival induced by VEGF, consistent with its role in Akt and FOXO1 phosphorylation (Fig. 6). Importantly, the abrogation of Gab1 tyrosine phosphorylation downstream Y801 and Y1214 correlated with the inability of activated VEGFR2 to induce Akt phosphorylation, further supporting Gab1 as a key regulator of this pathway (Fig. 7). Since Y801 and Y1214 are seemingly not Grb2-binding sites that could potentially recruit Grb2–Gab1 (Lamallice et al., 2006) (Millauer et al., 1993) (Songyang et al., 1994), one explanation for their requirement in Gab1 phosphorylation is that proteins activated downstream of these residues mediate its phosphorylation. In response to VEGF, PI3K and Src family kinases have been shown to contribute to the phosphorylation of Gab1 (Dance et al., 2006). Since PI3K and Fyn have been reported to be activated downstream of Y801 and Y1214, respectively (Lamallice et al., 2006) (Blanes et al., 2007), this is thus consistent with these 2 sites being required for maximal Gab1 tyrosine phosphorylation, and consequently, Akt activation.

5. Conclusions

Overall, our work revealed the non-redundant and specific functions of Gab1 and Gab2 in VEGF-stimulated signalling, migration and survival of endothelial cells. We have shown that the depletion of Gab2 favors Gab1-dependent signalling and increases Gab1 soluble protein levels. This suggest that part of the phenotype observed may be linked to this up-regulation, but does not rule out the possible contribution of other Gab2-dependent events. Future work will thus be required to determine the molecular basis underlying the Gab2-mediated regulation of VEGF-dependent signalling, and of Akt in particular, as fine-tuning of its activation is clearly critical for proper angiogenesis (J. F. Sun et al., 2005) (Phung et al., 2006). A better understanding of the molecular mechanisms involved is thus warranted, as this may lead to the development of novel therapeutic tools to allow the control of angiogenesis in diseases like cancer.

Acknowledgements

We thank Nathalie Lamarche-Vane and Louise Larose for their helpful comments on the manuscript. We also thank Morag Park, Albert Wong, Marina Holgado-Madruga, and Mounib Elchebly for generously providing plasmids, and Marie-Josée Hébert for sharing her microscope. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-77612) to I.R. C.Caron and K. S. had support from the Montreal Cancer Institute. C. Chabot had studentships from Université de Montréal (Faculty of Graduate Studies) and the Montreal Cancer Institute.

Figure legends

Fig. 1. Gab2 is tyrosine phosphorylated and associates with PI3K and SHP2 in VEGF-stimulated endothelial cells. A. Serum-starved BAECs were stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. Gab2 was immunoprecipitated (IP) from cell lysates (500 μ g) and its phosphorylation status was revealed by Western blotting using the anti-phosphotyrosine antibody PY99 (PY). B. The same experiment was performed in serum-starved HMVECs (from 400 μ g of cell lysates). C. Gab2 was immunoprecipitated from lysates (1 mg) of BAECs stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. Gab2 tyrosine phosphorylation as well as its association with PI3K (p85 subunit) and SHP2 were detected by immunoblotting (IB) with the corresponding antibodies. Results are representative of at least 3 independent experiments.

Fig. 2. Grb2 binding sites mediate Gab2 tyrosine phosphorylation, but not via its stable association to VEGFR2 protein complexes. A. HEK 293 cells were transfected with CSFVEGFR2 and Grb2 cDNA constructs, together with either WT HA-tagged Gab2 or the HAGab2 Δ Grb2 mutant. Serum-starved cells were stimulated with CSF-1 (50 ng/ml) for the indicated times. Tyrosine phosphorylation of immunoprecipitated (IP) HA-Gab2 or the Δ Grb2 mutant (from 1mg of cell lysates) was determined by immunoblotting (IB) with the PY99 (PY) antibody. The CSF-VEGFR2, HA-Gab2 WT/ Δ Grb2, and Grb2 protein levels were determined by immunoblotting lysates (50 μ g) of transfected HEK 293 cells with the corresponding antibodies (lower panels). Results are representative of 3 independent experiments. B. Serum-starved HMVECs were stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. The association of endogenous Gab1 or Gab2 with immunoprecipitated VEGFR2 (from 500 μ g of cell lysates) was detected by immunoblotting with the Gab1 or Gab2 antibodies. The endogenous Gab1, Gab2, and VEGFR2 protein levels were determined by immunoblotting lysates (40 μ g) of HMVECs with the corresponding antibodies (lower panels). Results are representative of 4 independent experiments.

Fig. 3. Gab2 is involved in the promotion of VEGF-dependent cell migration. A. BAECs transfected with the pEBB empty vector or the HA-Gab2 cDNA construct were subjected to a migration assay in Transwell filters in the absence or presence of VEGF (10 ng/ml) for 6h. Results are

shown as the relative amount of cells that migrated through the filter pores in response to VEGF compared to the unstimulated control cells. Immunoblotting (IB) of total cell lysates (50 μ g) demonstrates the expression of HA-Gab2. Results are representative of 4 independent experiments. **, $P < 0.01$. B. HMVECs transfected with control (CTL) or Gab2 siRNAs at a final concentration of 200 nM were similarly subjected to a migration assay in Transwell filters in the absence or presence of VEGF (10 ng/ml) for 16h. Immunoblotting of total cell lysates (40 μ g) shows representative depletion of Gab2 and equal loading of proteins, as visualized with the Akt antibody. Results are representative of 3 independent experiments. *, $P < 0.05$. C. HMVECs transfected with control (CTL), Gab1 or Gab2 siRNAs at a final concentration of 200 nM, or with control siRNAs at a concentration of 300 nM (CTL 300), and with both Gab1 and Gab2 siRNAs at a final concentration of 150 nM each, were subjected to a migration assay in Transwell filters in the presence of VEGF (10 ng/ml) for 16h. Results are shown as the relative amount of cells that migrated through the filter pores compared to control cells. Immunoblotting of total cell lysates (40 μ g) shows a representative depletion of Gab1 and Gab2, and the equal loading of proteins, as visualized with the Akt antibody. Results are representative of 3 independent experiments. *, $P < 0.05$.

Fig. 4. The depletion of Gab2 promotes Gab1-dependent signalling and increases Gab1 protein levels. A. HMVECs were transfected with control (CTL) or Gab2 siRNAs (200 nM), serum-starved 48h later for 6h, and then stimulated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. Activation of Akt, Src, PLC γ , ERK1/2, and p38 was determined by immunoblotting (IB) cell lysates (40 μ g) with the corresponding phospho-specific antibodies. Results are representative of an average of 6 experiments. Note that the phospho-ERK1/2 and phospho-p38 blots shown were obtained from an independent experiment. *, $P < 0.05$ versus the corresponding time point in CTL cells. B. HMVECs were transfected as described above with CTL and Gab1 siRNAs. Activation of p38 was determined as in A. This result is representative of 10 independent experiments. C. HMVECs were transfected as described in A with CTL and Gab2 siRNAs. The level of detergent-soluble Gab2, Gab1 and activated Akt was detected by immunoblotting cell lysates (40 μ g) with the corresponding antibodies (upper panels). The relative levels of Gab1 in Gab2-depleted cell lysates were estimated from 7 independent experiments. The amount of PI3K co-precipitating with Gab1 (from 240 μ g of cell lysates) was detected by immunoblotting with an antibody recognizing the p85 subunit of PI3K (lower panels). This result is representative of 3 independent experiments. Note that the bar graph represents the

amount of p85 co-precipitated with Gab1 in these conditions, without correcting for equal Gab1 protein levels. *, $P < 0.05$ versus the corresponding time point in CTL cells.

Fig. 5. Re-expression of Gab2 in Gab2^{-/-} MEFs decreases activation of signalling proteins and Gab1 protein levels. Gab2^{-/-} MEFs were transfected with the pEBB empty vector or the HA-Gab2 cDNA construct, serum-starved 48h later for 16h, and lysed. The phosphorylation levels of Akt, ERK1/2, p38, and Src, as well as the amount of expressed Gab1, were determined by immunoblotting (IB) cell lysates (40 µg) with the corresponding antibodies. Results are representative of 3 independent experiments. The horizontal dotted line corresponds to the normalized level for each of the controls (pEBB-transfected cells). *, $P < 0.05$ versus pEBBtransfected cells.

Fig. 6. Gab1, but not Gab2, mediates endothelial cell survival in response to VEGF. A. HMVECs transfected with control (CTL), Gab1 or Gab2 siRNAs (200 nM) were incubated in EGM-2-MV medium for 32h, and then transferred in EBM medium with or without VEGF (80 ng/ml) for 16h. Cells were stained with Hoechst 33342 for 10 min and the percentage of cells with condensed nuclei was determined. Results are representative of 5 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. B. HMVECs transfected as above were incubated 48h in full medium, and then starved for 6h before stimulation with VEGF (50 ng/ml) for the indicated times. The activation of Akt and FOXO1 was determined by immunoblotting (IB) cell lysates (40 µg) with the corresponding phospho-specific antibodies. Results are representative of at least 3 independent experiments. Note that the phospho-FOXO1 levels were compared to Akt levels, which were more representative of equal loading. *, $P < 0.05$ versus the corresponding time point in CTL cells.

Fig. 7. Gab1 tyrosine phosphorylation downstream of VEGFR2 Y801 and Y1214 correlates with Akt activation. A. HEK 293 cells were transfected with plasmids encoding HA-tagged Gab1, Grb2, and either the pShuttle (-) empty vector, WT CSF-VEGFR2, or Y/F mutants. Serum-starved cells were stimulated with CSF-1 (50 ng/ml) for 2 min. Tyrosine phosphorylation of immunoprecipitated (IP) HA-Gab1 (from 1mg of cell lysates), levels of HA-Gab1 and associated Grb2 were determined by immunoblotting (IB) with the PY99 (PY), HA, and Grb2 antibodies, respectively. The CSF-VEGFR2 protein levels were determined by immunoblotting lysates of transfected HEK 293 cells (50 µg) with the VEGFR2 antibody. Results are representative of 4 independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

0.01 versus control cells transfected with empty vector (-). B. HEK 293 cells were treated as above and stimulated with CSF-1 for 15 min. Phosphorylation of Akt and protein levels were determined by immunoblotting cell lysates (50 μ g) with the corresponding antibodies. Results are representative of 4 independent experiments. *, $P < 0.05$.

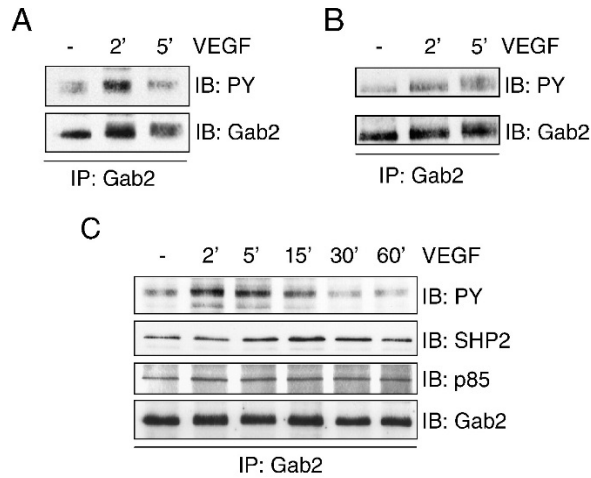


Figure 1 : Gab2 is tyrosine phosphorylated and associates with PI3K and SHP2 in VEGF-stimulated endothelial cells.

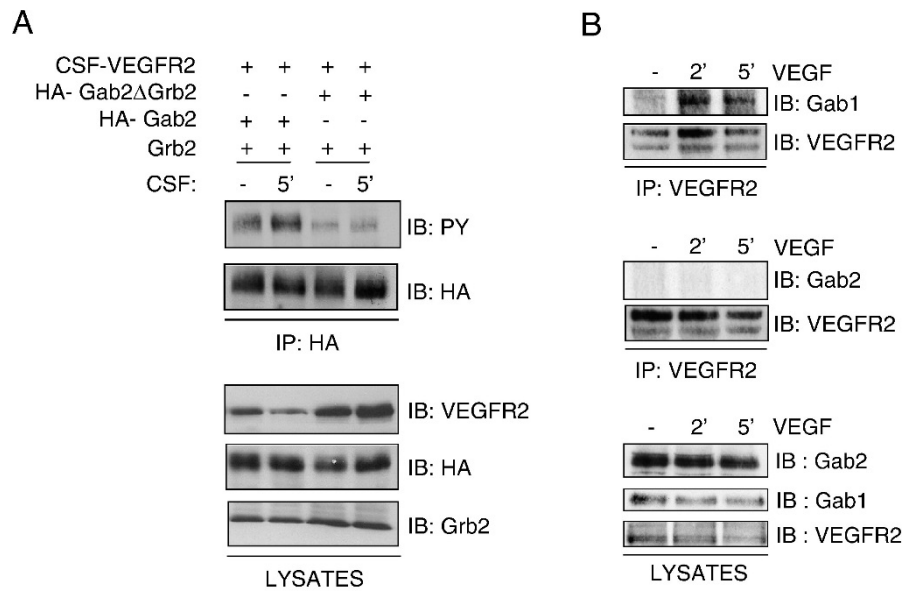


Figure 2 : Grb2 binding sites mediate Gab2 tyrosine phosphorylation, but not via its stable association to VEGFR2 protein complexes

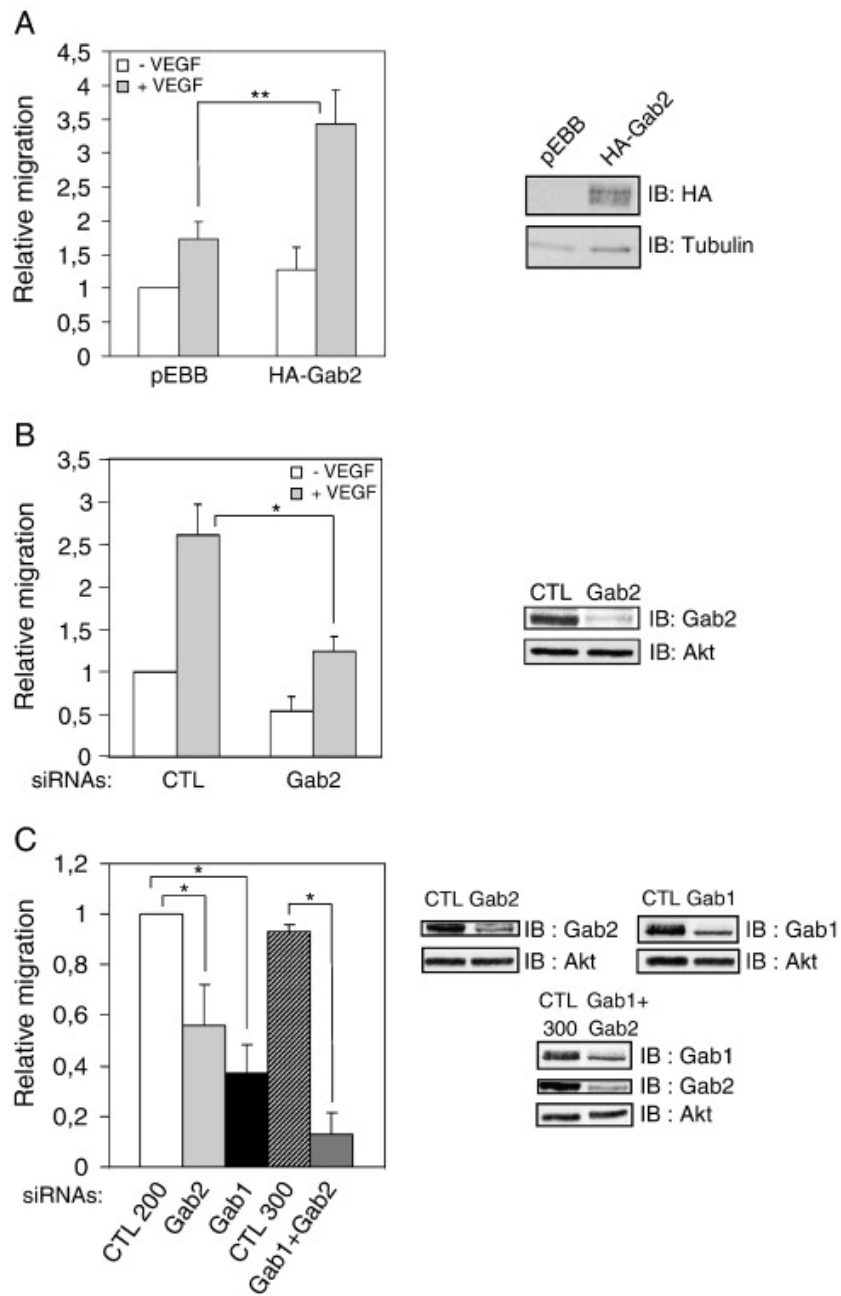


Figure 3 : Gab2 is involved in the promotion of VEGF-dependent cell migration.

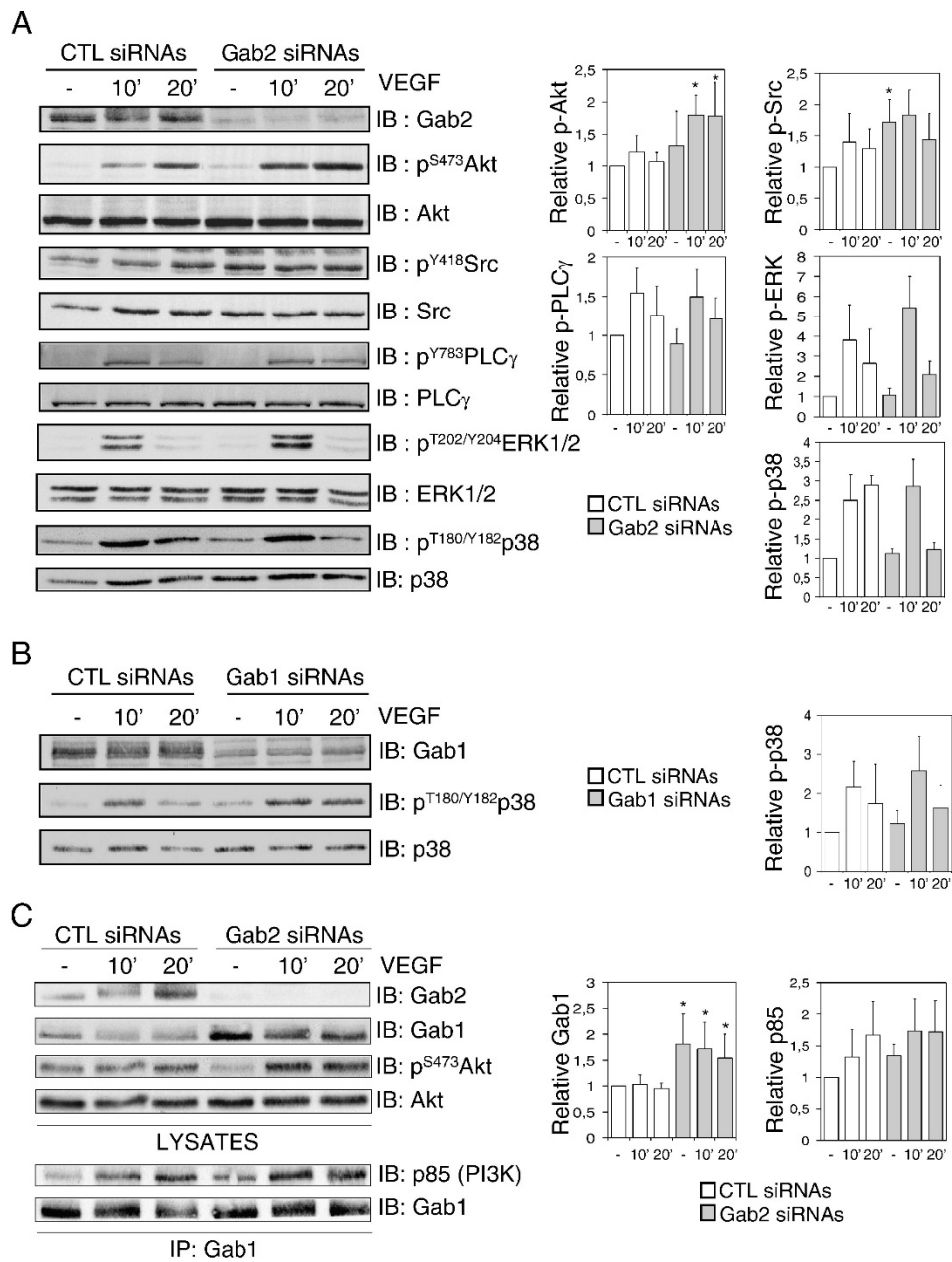


Figure 4 : The depletion of Gab2 promotes Gab1-dependent signalling and increases Gab1 protein levels.

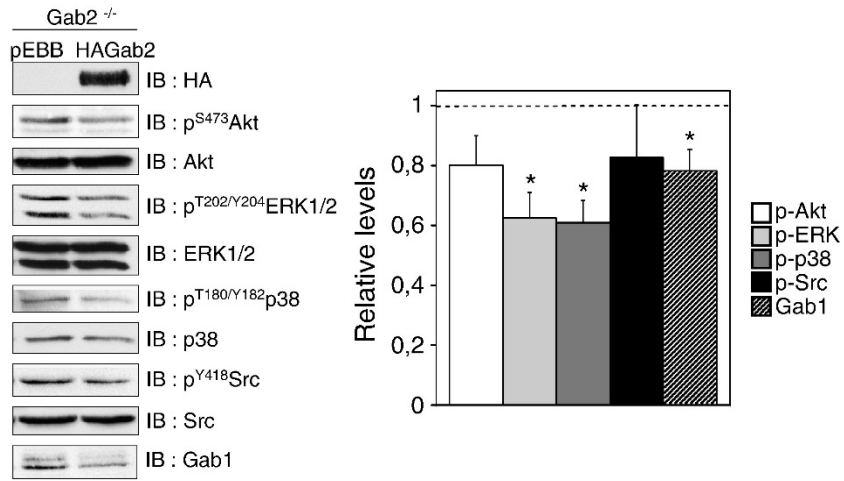


Figure 5 : Re-expression of Gab2 in Gab2^{-/-} MEFs decreases activation of signalling proteins and Gab1 protein levels.

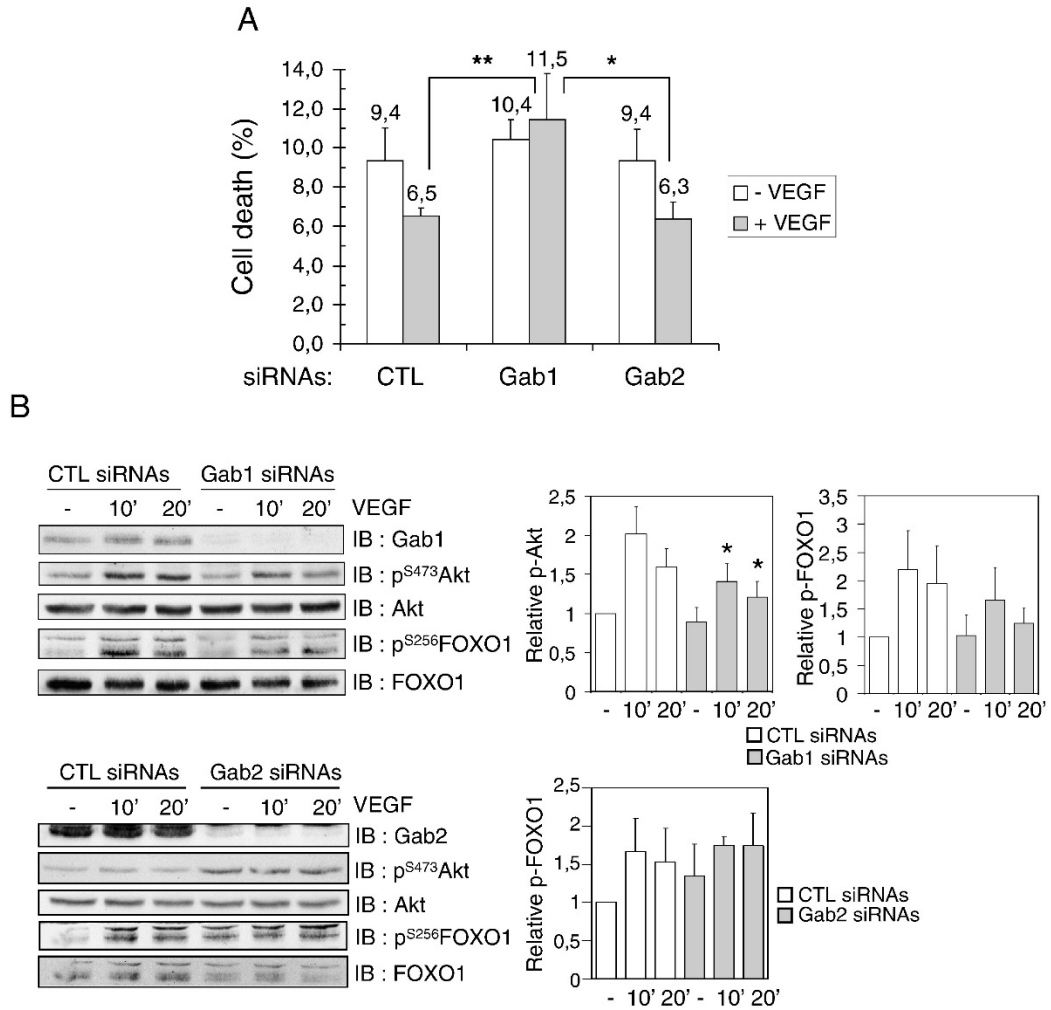


Figure 6 : Gab1, but not Gab2, mediates endothelial cell survival in response to VEGF.

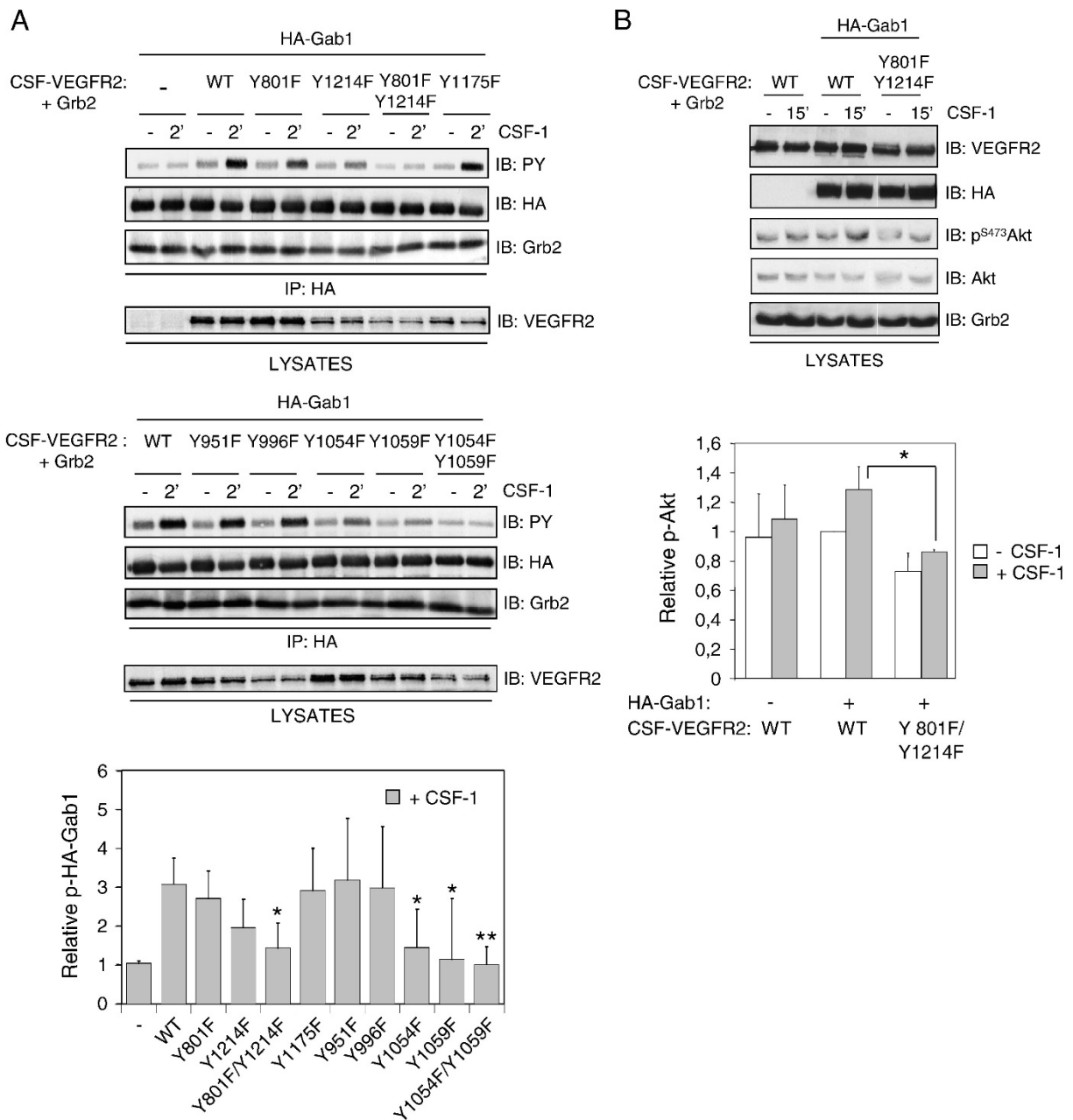


Figure 7 : Gab1 tyrosine phosphorylation downstream of VEGFR2 Y801 and Y1214 correlates with Akt activation.

Contribution personnelle à l'ouvrage :

The scaffolding adapter Gab1 mediates the interaction of p120catenin with the VAV2 guanine nucleotide exchange factor and Cortactin to promote VEGF-induced Rac1 activation and endothelial cell invasion.

Christine Caron¹, Patrick Fournier¹, Kathleen Spring¹, Sarita Sastry² and Isabelle Royal^{1,3}

J'ai effectué et/ou contribué à toutes les expériences qui ont menés aux figures de cet article (huit figures). P.F. a contribué aux expériences de sphéroïdes (soit une figure et demi). K.S. a effectué certaines expériences d'invasion (soit une demi-figure) S.S. a fourni l'anticorps VAV2 et I.R. a élaboré le projet et rédigé l'article avec C. Caron.

Caron C. a effectué les expériences de la figure : 1,2,3,4, 5e, 6, 7 et 8

Caron C. a analysé toutes les expériences

P.F. a contribué 5c,d,f,et a contribué figure 8

K.S. a effectué figure 5a

Chapitre 3 : The scaffolding adapter Gab1 mediates the interaction of p120catenin with the VAV2 guanine nucleotide exchange factor and Cortactin to promote VEGF-induced Rac1 activation and endothelial cell invasion.

Christine Caron¹, Patrick Fournier¹, Kathleen Spring¹, Sarita Sastry² and Isabelle Royal^{1,3}

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Institut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. ²Sealy Center for Cancer Biology and UTMB Comprehensive Cancer Center, University of Texas Medical Branch, USA. ³Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Running title :

Gab1 mediates Rac1 activation and endothelial cell invasion in response to VEGF

Corresponding author: Isabelle Royal, CRCHUM, 900 rue St-Denis, Montréal, QC, Canada, H2X 0A9.

Abstract

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from pre-existing vasculature, and VEGF is one of the most important factors regulating this process. Previous work demonstrated the essential role of the scaffolding adapter Gab1 in VEGF-dependent signaling and biological functions including cell survival, migration, and capillary formation *in vitro* and *in vivo*. We further demonstrated that Gab1 is required for the reorganization of the actin cytoskeleton and lamellipodia formation upon VEGF stimulation. However, the molecular mechanisms involved are not well defined. In this study, we show that the RNAi-mediated knockdown of Gab1 expression in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) results in the attenuation of Rac activation, but not that of Cdc42. We observed that depletion or overexpression of Gab1 modulates the tyrosine phosphorylation of VAV2, a guanine nucleotide exchange factor (GEF) previously identified as a Rac activator in VEGF-stimulated endothelial cells. In addition, the tyrosine phosphorylation of Cortactin, which leads to its increased actin polymerizing activity downstream of activated Rac, was also impaired in Gab1-depleted cells. Consistent with these results, the knockdown of Gab1 prevented the association of VAV2 and Cortactin with p120 Catenin, which promotes Rac activation in epithelial cells, as well as their localization at membrane protrusions of endothelial cells in response to VEGF stimulation. Interestingly, Gab1 was found to associate with all of these proteins, either in a constitutive or VEGF-dependent manner. Deletion of Gab1's PH domain, which blocks its ability to associate with PI3K-derived lipids in the cell membrane, or treatment with a PI3K inhibitor, abrogated the formation of the VAV2/p120 Catenin and VAV2/Gab1 protein complexes, and inhibited Rac activation in VEGF-stimulated endothelial cells. As Rac, Cortactin and p120 Catenin are critical for invasion, we further identified Gab1 and its PH domain as important mediators of VEGF-dependent endothelial cell invasion and sprout formation in 3D-cultures of endothelial cell spheroids. Overall, our data suggest that Gab1, via its PH domain, promotes the recruitment of VAV2, Cortactin, and p120 catenin to the cell membrane of VEGF-stimulated endothelial cells. This induces local Rac activation and actin polymerization necessary to generate the membrane protrusive activity required for endothelial cell invasion and sprout initiation during angiogenesis. Our work thus brings novel insights into the Gab1-dependent pathways mediating the biological responses of endothelial cells to VEGF, and shed light on the molecular mechanisms underlying the promotion of angiogenesis.

Key words : Angiogenesis, Gab1, Cortactin, VAV2, VEGF, endothelial cell, Rac1, p120 Catenin

1. Introduction

Angiogenesis is a complex process that involves endothelial cell proliferation, migration, and invasion (Potente, Gerhardt, & Carmeliet, 2011) (Welti, Loges, Dimmeler, & Carmeliet, 2013). Among the many growth factors implicated, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is one of the most critical mediators of normal and pathological angiogenesis (Potente et al., 2011) (Welti et al., 2013).

Gab1 (Grb2 adaptor binding protein 1) is a scaffolding adapter protein that binds several Receptor Tyrosine Kinase (RTK) including VEGF Receptor 2 (VEGFR2) (Lemarie & Lehoux, 2011) (Nishida & Hirano, 2003) (Y. Liu & Rohrschneider, 2002). It associates with several signaling proteins including the p85 subunit of PI3K, the SHP2 tyrosine phosphatase and Shc, and controls endothelial cell survival, migration and capillary formation in response to VEGF stimulation (Laramée et al., 2007) (Caron et al., 2009). In mouse, the specific deletion of *Gab1* in endothelial cells revealed its essential role during post-natal and pathological angiogenesis, where its expression was shown to be required for revascularization of ischemic limbs and for tumor-associated angiogenesis (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011).

The remodeling of actin cytoskeleton and the induction of cell migration are central to the capacity of endothelial cells to form and elongate new capillaries. Upon VEGF stimulation, Gab1 promotes the formation of lamellipodia and endothelial cell migration, which were shown to require the activation of the Rac1 GTPase (Tan et al., 2008). The specific deletion of Rac1 in endothelial cells in mice cell model also resulted in impaired angiogenesis, further pointing its critical contribution during this process (Tan et al., 2008). Among the many GTPase exchange factors (GEFs) known to be expressed in endothelial cells, VAV2 was reported to mediate Rac1 activation and the migration of human microvascular and umbilical vein endothelial cells (HMVECs and HUVECs) upon VEGF stimulation (Garrett et al., 2007) (Gavard & Gutkind, 2006). Gab1 also associates with the actin nucleation promoting factor, Cortactin, which binds F-Actin and induces its polymerization during lamellipodia formation (Rajadurai et al., 2012). In response to VEGF, Cortactin was found to be crucial for the invasive capacity of endothelial cells during sprouting and capillary formation *in vitro*, and was shown to be essential for the promotion of angiogenesis *in vivo* (zebrafish) (Kaluza et al., 2011). However, despite the crucial and central role played by Rac1 and Cortactin during VEGF-mediated

angiogenic responses, the molecular pathways regulating their functions in endothelial cells remain ill-defined.

Our study identifies a novel signaling pathway downstream of VEGF that regulates the activation of Rac1. We show here that the scaffolding protein Gab1, via its PH domain, promotes the VAV2-dependent activation of Rac1 GTPase to induce lamellipodia formation that is essential for cell invasion and sprouting capillary formation. Moreover, Rac1 activation controls Cortactin phosphorylation, association with p120 Catenin, and their localisation to membrane/lamellipodia, resulting in the promotion of the invasive and sprouting capacities of endothelial cells to allow angiogenesis.

2. Materials and Methods

2.1 Cell Culture

Bovine Aortic Endothelial Cells (BAECs; Lonza; purchased from Cedarlane Laboratories Ltd.) were cultured (passages 3 to 8) in DMEM high-glucose (Gibco, Invitrogen) containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, Invitrogen) and 50ug/mL gentamycin. Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVECs; Lonza) were cultured (passages 1 to 4) on 0,2% gelatin-coated tissue culture dishes and maintained in M200 with low serum growth supplement; LSGS (Life technologies) (FBS, 2%; hydrocortisone, 1ug/ml; human epidermal growth factor, 10 ng/ml; basic fibroblast growth factor, 3 ng/ml; and heparin, 10 ug/ml.) Human MicroVascular Endothelial Cells (HMVECs) (passages 4 to 6) (Lonza) were cultured on 0,2% gelatin-coated tissue culture dishes and maintained in EBM-2 supplemented with 5% FBS, EGF, VEGF, FGF, heparin, IGF-1, hydrocortisone and ascorbic acid (EGM-2-MV bullet kit; Lonza)

2.2 Antibodies and Reagents

Antibodies against phosphotyrosine (PY99), Gab1 (Clone H198), p^{TYR172} VAV2, HA and Actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Akt, Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or –rabbit IgG, PAK2 and VAV2 were purchased from Cell Signalling. Rac1, Cdc42, p120 Catenin antibodies and Matrigel were purchased from BD (Bioscience Pharmingen). Cortactin and β -PIX antibodies were obtained from Millipore, and pY421 Cortactin from Invitrogen. PLC γ was purchased from Upstate. Recombinant human VEGF-A was obtained from the Biological Resources Branch Preclinical Repository of the National Cancer Institute — Frederick Cancer Research and Development Center. The VAV2 antibody used was generated as described (Sastry et al., 2006).

2.3 Expression Plasmids

Constructs encoding HA-tagged Gab1 (in pCDNA1.1) was provided by Albert Wong and Marina Holgado-Madruga, Stanford University, California and has been described elsewhere (Holgado-Madruga, Moscatello, Emllet, Dieterich, & Wong, 1997). HA-Gab1 Δ PH construct was provided by Dr. Morag Park (Maroun, Moscatello, et al., 1999). Constructs encoding GFP-VAV2 was kindly provided by

Dr. Laslo Buday from Institute of Enzymology of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary.

2.4 Transfection of siRNAs

HMVECs or HUVECs (at passage 4) were seeded at a density of 3×10^4 cells/cm² on gelatine-coated tissue culture dishes 21h before transfection. Gab1 (No1 Dharmacon ; D-003553-01) and non-targeting Control No2 siRNAs (Dharmacon ; D-001206-14) were transfected at a final concentration of 200nM in M200 without serum or gentamycin using Dharmafect 4, according to the manufacturer's recommendations. After 16h incubation, medium was replaced with complete M200 medium for an additional 24h before serum-starvation and stimulation, immunofluorescence and IP or plated for invasion assays. Elsewhere between 5×10^5 and 5×10^6 HUVECs were nucleofected with the help of the VPB-1002 kit as recommended by the supplier (Lonza, Amaxa). Control (Non-Targeting No2) or VAV2-specific siRNAs oligos directed against the human sequence produced by Dharmacon were as described in (Garrett et al., 2007). Briefly, 20uL of Control (Non-Targeting No2) or VAV2-specific siRNAs were nucleofected at a concentration of 20nM in HUVECs using the U-1 program of Amaxa nucleofector. After 48h, cells were serum-starved for cell stimulation or trypsinized for invasion or spheroids experiments. For rescue experiments, 20uL of a 20nM concentration of siRNAs and 5ug of DNA were co-nucleofected in HUVECs, which were further incubated for 48h. After, cells were serum-starved for cell stimulation or trypsinized for invasion and spheroids experiments.

2.5 Transfection of cDNAs

BAECs were plated (8×10^5 cells/60mm-dish) and transfected 24h later with 5 ug of empty vector pCDNA1.1 or HA-Gab1, and with 2 ug of empty GFP vector or GFP-VAV2 using Lipofectamine2000 (2.5uL/ug DNA) in OPTI-MEM according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). The cells were washed the next day after 16h and fresh medium was added for 8h. Cells were serum-starved overnight in DMEM, and then stimulated or not with VEGF.

2.6 Cell Stimulation, Lysis, Immunoprecipitation, Immunoblotting

Following starvation in EBM (HMVECs) M200 (HUVECs) medium for 6h or DMEM (BAECs) for 16h, transfected cells were stimulated with VEGF (50ng/mL) at 37°C. When used, LY294002 (Cell Signaling), 50µM was added after 16h of starvation for 1h followed by a VEGF stimulation then incubated in PBS

containing 1mM Na₃VO₄ for 30min on ice, and lysed in a buffer (50mM HEPES pH7,5 buffer containing 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Triton X-100, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10ug/mL aprotinin, 10ug/mL leupeptin, 5mM NaF and 1mM Na₃VO₄) for BAECs, HUVECs and HMVECs. For stimulation of untransfected HUVECs, 1 X10⁴ cells/cm² were seeded and allowed to grow for 4 days in M200 medium. Following starvation, cells were stimulated and lysed as described above. For immunoprecipitations, cells lysates were incubated with antibodies for 2h (unless otherwise specified). Protein A- or Protein G-conjugated Sepharose beads (Amersham Biosciences) were added to the immunoprecipitated proteins for an additional 2h, and processed as described previously. Immunoprecipitated proteins and total protein extracts (40-50 ug) were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-C Extra membranes. Western blotting and ECL detection (Amersham Biosciences) were then performed according to the manufacturer's recommendations, using HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Cell Signaling). The visualizer reagent (Upstate/Millipore) was sometimes used for the detection of weak signals.

2.7 RhoGTPase Assays

GTPase activity of Rac1 was measured after stimulation as described (Royal, Lamarche-Vane, Lamorte, Kaibuchi, & Park, 2000). Briefly, equal amounts of protein lysates (120ug) from endothelial cells stimulated or not with VEGF were incubated with 15ug of GST fusion protein encompassing the Cdc42/Rac interacting binding (CRIB) domain of PAK (GST-PBD or GST-CRIB) for 1h at 4°C. This fusion protein was previously bound to glutathione-Sepharose beads for 30min at 4°C. Beads were washed 3 times with binding buffer 1% NP-40 and twice with binding buffer without NP-40. For stimulation of untransfected HUVECs, 1 X 10⁴ cells/cm² were seeded and allowed to grow for 4 days in M200 medium. Following starvation, cells were stimulated and lysed as described above. Rac1 Assays were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-C Extra membranes and revealed by Western blotting.

2.8 Invasion Assays

Transfected HUVECs and BAECs (5 X 10⁵ cells in 200uL of serum-free M200 or DMEM) were seeded on Transwell filters (poly-carbonate membrane, 8um pore-size, Corning Brand) pre-coated for 2h with 2mg/mL of Matrigel (BD, Bioscience Pharmingen) and inserted in 24-well plates with 500uL of serum-free M200 or DMEM with or without 50ng/mL of VEGF in the lower chamber. At the end of the

assay (24h), cells were fixed with phosphate-buffered formalin for 20 min and stained with crystal violet (0,1% in 20% methanol). Cells remaining on the upper surface of the filter were wiped off and those which had invaded through the Matrigel were visualized and counted (a minimum of 6 fields/insert at 10X magnification).

2.9 Immunofluorescence

For immunofluorescence, 5×10^4 Nucleofected CTL or Gab1 siRNAs HUVECs were plated on gelatine coated coverslips for 48 h, serum-starved 4h and stimulated or not with 10ng/ml for 20min with VEGF. Cells were fixed with phosphate buffer formalin for 20min, permeabilized with 0,2% triton-PBS for 10min, blocked with 8% FBS-PBS for 30min, stained for Cortactin (1:100) p120 Catenin and VAV2 (1:50) for 1h, secondary antibody 1:800 for 1h and actin was stained with phalloidin (Phalloidin Alexa Fluor 594 Molecular Probes Invitrogen) (1:150) for 1h. Coverslips were fixed and nuclei was stained with ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Molecular Probes Invitrogen). More than 100 cells were analysed for each condition.

2.10 Spheroids experiment

To generate spheroids, 1000 siRNA-treated cells were cultured in complete medium with 0.5% methyl cellulose as hanging drops of 15 μ L for 36h directly after nucleofection. Spheroids were collected and centrifuged (200 g, 3 min). Between 50 to 75 spheroids were resuspended in 500 μ L of complete medium with 0.5% methyl cellulose, added to pre-mixed collagen solution (250 μ L home-made rat tail collagen solution, 100 μ L NaOH 0.1N, 50 μ L PBS 10X, 100 μ L DMEM and 50ng of VEGF or PBS) and mix thoroughly on ice. The 1 mL solution was deposited in a pre-heated 24-well plate and collagen was allowed to solidify at 37°C for 10 min., and 30 μ L of medium was added to avoid gel drying. Spheroids were photographed after 6-8h. Number and total length of all sprouts were counted for at least ten spheroids per condition.

2.11 Data Analysis

Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric using Prism software (on GraphPad) and standard deviation were applied. Were considered significant the p-values of less than 0,05 (*p \leq 0,05 **p \leq 0,01 ***p \leq 0,001). Densitometry was measured on immunoblot with the

Quantity One software. Densitometry of activated Rac1 or phosphorylated proteins or associated proteins are reported on total respective protein levels.

3. Results

Gab1 mediates Rac1 activation in endothelial cells in response to VEGF, via the activation of the GEF VAV2. Gab1 has an important role in remodelling the actin cytoskeleton of endothelial cells in response to VEGF, since its depletion leads to a critical loss of VEGF-induced lamellipodia formation (Laramée et al., 2007). Since Rac1 is known to promote lamellipodia formation in response to VEGF in endothelial cells (Tan et al., 2008), we postulated that Gab1 may control this remodelling via the activation of Rac1. To test this hypothesis, we did a RhoGTPase assay, to purify the Rac1-GTP active fraction in endothelial cells stimulated with VEGF. A good induction of activated Rac1 could be seen after VEGF stimulation in CTL cells HMVECs (Fig. 1A) and HUVECs (Fig. 1B) but this induction was lower after 20 minutes of VEGF-stimulation in Gab1-depleted cells, which could explain the absence of lamellipodia.

GEFs are responsible for the activation of the RhoGTPases, so they can be active, linked with GTP and mediate their effects. In endothelial cells, in response to VEGF, the activation of Rac1 can be mediated by the GEF VAV2 (Garrett et al., 2007) (Gavard & Gutkind, 2006). We thus hypothesised that to activate Rac1 in endothelial cells, Gab1 may first activate this GEF. Since the level of Y172 phosphorylation reflects the level of activity of the GEF VAV2 (Schuebel et al., 1998), we performed Western blot analyses. Our results demonstrate that VEGF stimulates the phosphorylation of the GEF VAV2 in CTL cells, but that no induction of phosphorylation can be seen in response to VEGF in Gab1-depleted cells (Fig. 1C). To complement this result, we did a reverse experiment in another endothelial primary culture cell line, Bovine Aortic Endothelial Cells (BAECs). Instead of depleting Gab1 protein, we over-expressed WT (wild-type) Gab1 and detected a better phosphorylation status of VAV2 in comparison to the empty vector pCDNA1.1 (Fig. 1D). These results demonstrate that Gab1 promotes the activation and phosphorylation of the GEF VAV2, and that it can activate the RhoGTPase Rac1, responsible for the lamellipodia formation in endothelial cells in response to VEGF.

We further wanted to evaluate the implication of Gab1 on the activation of other RhoGTPases like Cdc42. Depletion of Gab1 in endothelial cells, HMVECs and HUVECs, leads to an increase in Cdc42 activation in response to VEGF, in contrast to the reduction in Rac1 (Fig. Sup. 1A-B).

Since Cdc42 was differentially controlled by Gab1, we investigated which other endothelial expressed GEF could be responsible for this activation. β -PIX is a GEF responsible for Rac1 and Cdc42 activation. It is highly expressed in endothelial cells (van Buul et al., 2014) (Kusuhara et al., 2012) but doesn't seem to modulate Rac1 activation in this context (Garrett et al., 2007). Tyrosine phosphorylation of β -PIX downstream of Src leads to an increase in GEF activity towards Cdc42 and to the induction of cell migration (Q. Feng et al., 2006) (Q. Feng et al., 2010). Gab1 depletion in endothelial cells leads to a better tyrosine phosphorylation of β -PIX, which suggests its implication in Cdc42 activation (Fig. Sup. 1C). To evaluate if β -PIX may be a Cdc42 GEF, we pursue a GST-PBD pull down experiment to evaluate Rac1 and Cdc42 activation after β -PIX depletion. The inhibition of β -PIX expression does not affect Rac1 activation but does lead to a strong decrease in Cdc42 activation (Fig. Sup. 1D). This strongly suggests that in endothelial cells in response to VEGF, β -PIX would be a GEF specific to Cdc42 and not implicated in Rac1 activation. These results validated that Gab1 act in a specific way to activate Rac1 via VAV2 and Cdc42 via β -PIX.

The association of VAV2 to p120 Catenin, in part responsible for Rac1 activation, is modulated by Gab1 via its implication in the formation of this complex. The association of VAV2 to p120 Catenin is important for Rac1 activation (Noren et al., 2000) (Valls et al., 2012) (Espejo et al., 2014). As a scaffold protein, we postulated that Gab1 may mediate its effect on Rac1 activation, via the formation of this protein complex. Immunoprecipitation of endogenous VAV2 demonstrates that VEGF stimulation induces its association to p120 Catenin but that this association is less induced and less persistent in Gab1-depleted cells. This induced association correlates with the activation of Rac1 and lamellipodia formation (Fig. 2A).

We also performed the opposite experiment, where instead of depleting Gab1 expression we over-expressed GFP-VAV2 with a construct of HA-Gab1 or its empty vector. After the immunoprecipitation of endogenous p120 Catenin, we detected an induction of the association of VAV2 to p120 Catenin in response of VEGF in a stronger way in the over-expressing HA-Gab1 cells than in empty vector transfected cells (Fig. 2B). These results thus demonstrate that Gab1 can modulate VAV2-p120 Catenin complex formation, which could be in part responsible for the activation of Rac1 and for lamellipodia formation.

As Gab1 modulates the association of VAV2 to p120 Catenin, and since it is a scaffold protein interacting with many other signaling protein, we performed co-immunoprecipitation experiments to

identify if Gab1 could be associated with these proteins. As a first step, in non-transfected endothelial cells, we immunoprecipitated endogenous Gab1 and we detected an association of p120 Catenin induced by VEGF stimulation (Fig. 2C). We also performed co-immunoprecipitation studies in endothelial cells in response of VEGF in an over-expression system, and detected an induced association of VAV2 to Gab1 (Fig. 2D). These results thus demonstrate the importance of Gab1 for the association of VAV2 to p120 Catenin. It also reveals that Gab1 is associated to both proteins.

Gab1 modulates Cortactin association to p120 Catenin and its phosphorylation. Cortactin is an important Nucleator Promoting Factor (NPF) for the polymerisation of branched actin network that produces forces needed for lamellipodia formation (MacGrath & Koleske, 2012) (Kirkbride et al., 2011). Tyrosine phosphorylation of Cortactin downstream of Src Family Kinases (SFKs) is required for its activation (Lua & Low, 2005) (Ayala et al., 2008). p120 Catenin binds Cortactin and localizes it to lamellipodia, which permits lamellipodia persistence (Boguslavsky et al., 2007). As previously shown, Gab1 can modulate the remodelling of the actin cytoskeleton and can directly interact with Cortactin (Rajadurai et al., 2012). We validated this constitutive association in our cell model after VEGF stimulation (Fig. Sup. 2). We hypothesised that Gab1 can also act on the actin cytoskeleton via the modulation of the association of Cortactin to p120 Catenin. To test this, we first performed an immunoprecipitation of p120 Catenin and demonstrated, for the first time, that VEGF stimulation induces the association of both proteins in endothelial cells. In Gab1-depleted cells only the basal level of association is maintained (Fig. 3A). This is the first demonstration implicating Gab1 in Cortactin activation. Cortactin phosphorylation of Tyr421 is required for endothelial cell migration (C. Huang et al., 1998) and is known to be phosphorylated downstream of activated Rac1 (Head et al., 2003). To further evaluate the role of Gab1 in the activation of Cortactin, we used a phosphospecific antibody for Tyr421 phosphorylation. In CTL cells, we detected the induction of Cortactin phosphorylation in response to VEGF. In contrast, in Gab1-depleted cells no induction of Cortactin phosphorylation can be observed (Fig. 3B). These results demonstrate the importance of Gab1 in the activation of different proteins crucial for the remodelling of the actin cytoskeleton. Knowing the important role of Gab1 for endothelial cell migration (Laramee et al., 2007), these results characterised the importance of Gab1 in some molecular mechanisms controlling this phenomenon.

Membrane localisation after VEGF stimulation of Cortactin, p120 Catenin and VAV2 is controlled by Gab1. To pursue actin polymerisation and lamellipodia formation, Cortactin localises to

membrane protrusions. VEGF stimulation increases the fraction of Cortactin to the membrane of endothelial cells (Lee et al., 2006), activates Rac1, and its GEF VAV2, (Vouret-Craviari et al., 2002) (Weed et al., 2000) and induces Cortactin tyrosine phosphorylation downstream of Src (Illes et al., 2006), (J. Liu, Huang, & Zhan, 1999). p120 Catenin will also localize with Cortactin to lamellipodia to maintain their persistence (Boguslavsky et al., 2007). Gab1 is known to be recruited to the membrane in response to VEGF (Dance et al., 2006), and our membrane fractionation experiment validate this result (Fig. Sup. 3). We hypothesise that, as a regulator of the formation of this protein complex, Gab1 could be required for the membrane enrichment of these proteins in response to VEGF. Visualisation of Cortactin, VAV2 and p120 Catenin localisation by immunofluorescence in endothelial cells in response to VEGF shows an increase of these different actors to membrane protrusions in response to VEGF. This is in contrast to Gab1-depleted cells where no enrichment is seen post-VEGF stimulation (Fig. 4). These results reveal that in addition to its role in the formation of the complex of proteins which seems essential for actin polymerisation, Gab1 is also important for their membrane localisation after VEGF stimulation.

Gab1 is important for endothelial cell invasion and sprouting angiogenesis *in vitro* in response to VEGF. During the angiogenesis process, the invasive capacity of endothelial cells is implicated in crucial steps of sprouting. As Gab1 is important for the activation of signaling pathways converging to the phosphorylation of Cortactin, and that Cortactin is known to be an essential modulator for cell invasion in different contexts including *in vitro* sprouting angiogenesis (Kaluza et al., 2011), we studied the role of Gab1 in invasion of endothelial cells. Also, Gab1 has recently been demonstrated to be important to induce the invasive capacity of epithelial cells downstream of HGF/MET, via Cortactin association to Gab1 (Rajadurai et al., 2012) and via Pak4 association (Paliouras et al., 2009). Gab1 association to Pak4 is essential for Pak4 membrane recruitment and induction of migration/invasion of epithelial cells in response to HGF. We validated the importance of Gab1 for Pak4 phosphorylation in endothelial cells in response to VEGF, since Gab1 depletion leads to a lower phosphorylation of Pak4 (Fig. Sup. 4). We also performed an invasion assay with Matrigel-coated Boyden chamber. CTL endothelial cells, strongly invaded across the Matrigel layer in response to VEGF, but Gab1 depleted cells weren't able to induce the degradation of this matrix in response to VEGF, demonstrating an important role for Gab1 in the invasive capacity of endothelial cells (Fig. 5A-B).

Sprouting angiogenesis is composed of the induction of new capillaries by tip cells in the very first step of angiogenesis. A three-dimensional (3D) assay of angiogenic sprouting of endothelial cells spheroids in collagen gel can represent this process. This assay was performed to pursue our analysis of the capacity of Gab1 to stimulate invasion in response to VEGF. The formation of angiogenic sprouts from spheroid composed of endothelial CTL cells was induced by VEGF stimulation in contrast to a much lower number and much smaller length of sprouts in the spheroid composed of Gab1-depleted cells (Fig. 5C). This 3D model experiment validates the implication of Gab1 in the invasive, angiogenic pathway of VEGF. Gab1 regulates the adequate activation of Cortactin, which mediates the invasive capacity of endothelial cells in response to VEGF, an essential step for capillary formation, sprouting, and the angiogenic process.

Gab1 downstream effects seems dependent on VAV2 signaling pathway. VAV2-Rac1 are important for the tyrosine phosphorylation of Cortactin (Head et al., 2003) and for the membrane recruitment of Cortactin (Weed, Du, & Parsons, 1998) (Illes et al., 2006) in endothelial cells (Vouret-Craviari et al., 2002). To demonstrate that Gab1 mediates these different effects via the VAV2 signaling pathway converging to Rac1 activation, we first transfected siRNAs targeting VAV2 to down-regulate its expression. Diminution of VAV2 expression abrogates the phosphorylation of Cortactin compare to CTL cells (Fig. 6A). However, VAV2 overexpression results in a better phosphorylation status of Cortactin. (Fig. 6B). The downregulation of VAV2 also diminished the invasive capacity of endothelial cells in responses to VEGF (Fig. 6C). We postulate that after VEGF stimulation, Gab1 can activate VAV2 and by this signaling pathway could modulate the phosphorylation of Cortactin and the downstream activation of invasion.

Gab1 PH domain is important for protein complex formation, Rac1 activation and sprouting angiogenesis. The Gab1 PH domain is responsible for its membrane recruitment to phospholipids in response to VEGF in endothelial cells (Dance et al., 2006). As we demonstrated an enrichment of Cortactin, VAV2 and p120 Catenin to the membrane of endothelial in response to VEGF in a Gab1-dependent way, we postulated that its PH domain would be implicated in the formation of this protein complex.

We first evaluated the level of association between VAV2 and p120 Catenin after an immunoprecipitation of p120 Catenin in cells over-expressing VAV2 construct and either WT HA-Gab1 or the HA-Gab1 PH domain mutant construct (HA-Gab1 Δ PH). As previously demonstrated (Fig. 2B)

the over-expression of Gab1 induced the association of VAV2 to p120 Catenin, but its association in cells expressing HA-Gab1 Δ PH only maintains an association at the background level seen with the control vector (Fig. 7A). We also detected a loss of the association of VAV2 to Gab1 with the HA-Gab1 Δ PH construct after Gab1 immunoprecipitation as compared to the WT Gab1 construct (Fig. 7B).

Gab1 PH domain is recruited to PI3K products, the Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate phospholipids (PIP3) at the membrane. The inhibition of the activity of PI3K, with the use of LY294002, restrained Gab1 recruitment to membrane of endothelial cells in response to VEGF (Dance et al., 2006). The pre-treatment of cells with this inhibitor leads to a similar inhibition of VAV2 association to p120 Catenin and VAV2 to Gab1 as seen with the HA-Gab1 Δ PH construct (Fig. 7C). Since the formation of this complex is important to induce Rac1 activation, which leads to cell migration, we performed RhoGTPase pull-down experiments. These results demonstrate that in comparison to WT Gab1, the Gab1 Δ PH could not activate Rac1 in response to VEGF (Fig. 7D). Also, pre-treatment with LY294002 on WT Gab1 expressing cells also perturbed the activation of Rac1 (Fig. 7D), which has already been demonstrated in EGF-stimulated epithelial cells (Dise, Frey, Whitehead, & Polk, 2008). We also performed an invasion assays to evaluate the implication of the PH domain of Gab1 in invasive capacity. The over-expression of WT Gab1 did increase invasive capacity of endothelial cells in response to VEGF, which correlated with the decreased invasion after Gab1 depletion (Fig. 5B), but the use of the HA-Gab1 Δ PH construct was not able to increase invasion (Fig. 7E).

To further validate the importance of the PH domain of Gab1 and its importance in protein complex formation in endothelial cells in response to VEGF, we performed rescue experiments of sprouting angiogenesis in the endothelial cells spheroids context. As expected, spheroids formed with Gab1-depleted cells could repeat our previous results with a decrease of approximately 70% in the number and length of sprouts from spheroids compared to CTL ones. Spheroids formed with Gab1-depleted cells rescued with the WT Gab1 construct did restore more than 60% of the number and length compare to its non-rescued counterpart but only 30% of rescue was observed in Gab1-depleted cells re-expressing the HA-Gab1 Δ PH (Fig. 8). This demonstrates the importance of the PH domain of Gab1 in the formation of protein complexes, in Rac1 activation, in invasive capacity and sprouting angiogenesis.

4. Discussion

It has been demonstrated that Gab1 controls actin rearrangement in response to numerous growth factors (Rajadurai et al., 2012) (Abella et al., 2010) (Paliouras et al., 2009) (Kallin et al., 2004) and we have demonstrated that in response to VEGF in endothelial cells, Gab1 controls lamellipodia formation and restrict stress fibers formation (Laramée et al., 2007). Despite these observations, the molecular mechanisms controlled by Gab1 in responses to VEGF to rearrange actin cytoskeleton remains not well characterised. Since the crucial role of Gab1 in angiogenesis has been demonstrated *in vivo* (J. Zhao et al., 2011) (Shioyama et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) and since the motility of endothelial cells is a crucial step in angiogenesis, our main goal was to elucidate the molecular mechanisms controlled by Gab1 that reorganize the actin cytoskeleton of endothelial cells in response to VEGF and to gain a better understanding of this molecular pathways controlling angiogenesis.

Our work here reveals a molecular pathway that may be in part responsible for angiogenesis. By acquiring invasive and sprouting capacity, endothelial cells stimulated by VEGF will form new capillaries. We demonstrate that Gab1, in part via its PH domain, can create a signaling protein complex including p120 Catenin, the nucleator promoting protein Cortactin and the GEF of Rac1 GTPase VAV2. After formation of this complex and its localisation to membrane protrusions at the leading edge of the cell, activation of Rac1 induces the invasive capacity of the cell and lamellipodia formation. To our knowledge, this is the first study to characterise this signaling pathway which elucidate the importance of Gab1 in the invasive capacity of endothelial cells.

We validated the specific role of Gab1 to activate Rac1 GTPases by looking at other RhoGTPases, such as Cdc42. Despite the down-regulation of Rac1 activity in Gab1-depleted cells, we could demonstrate an increase in Cdc42 activation in these cells, suggesting that Gab1 normally restricts Cdc42 activity. This is in line with the increase of stress fibers that are observed in Gab1-depleted endothelial cells (Laramée et al., 2007) and correlates with the observation that Cdc42 may control stress fibers formation in endothelial cells (Lamallice et al., 2004). Stress fibers in endothelial cells are controlled by the MAPK p38 downstream of Cdc42 (Lamallice et al., 2004) (Lamallice et al., 2006). We previously demonstrated the increase in p38 activation in Gab1 depleted cells in response to VEGF.

These results thus enhance the importance of Gab1 in cytoskeletal reorganisation, since Gab1 modulate positively Rac1 to mediate lamellipodia and attenuate Cdc42 and p38 to restrict stress fibers formation. These two phenomenons are both essential for cell migration. As Gab1 differentially controls Rac1 and Cdc42 GTPases, we also tried to identify which GEF could be responsible for Cdc42 activation in this context. β -PIX is highly expressed in endothelial cells and is known to be a GEF that can activate Rac1 or Cdc42 GTPases depending on the cell type (van Buul et al., 2014) (Kusuhara et al., 2012). As endothelial cells in response to VEGF, it has been demonstrate that VAV2 will activate Rac1, not Cdc42, and that β -PIX does not seems to induce Rac1 activation (Garrett et al., 2007). Thus, we postulate that β -PIX could be responsible for Cdc42 activation. Phosphorylation of the Y442 residue of β -PIX, in a Src-dependent manner, is known to be essential for the induction of GEF activity towards Cdc42 in an exclusive way (Q. Feng et al., 2006) and responsible for the induction of cell migration (Q. Feng et al., 2010). Higher levels of tyrosine phosphorylation on β -PIX could be observed in Gab1-depleted cells which correlates with higher Cdc42 activation. The β -PIX depletion does not affect Rac1GTPase activation but do completely abrogate Cdc42 activation. To our knowledge, this is the first study to identify a GEF responsible for Cdc42 activation in endothelial cells in response to VEGF, and clearly demonstrate the specific activation and inactivation of specific RhoGTPases controlled by Gab1.

Gab1 controls Rac1 activation via the tyrosine phosphorylation and activation of the GEF VAV2. One possible molecular mechanisms could be via the activation of Shp2 and Src, since tyrosine phosphorylation of VAV2 is known to be downstream of SFKs (Marignani & Carpenter, 2001) (Garrett et al., 2007). In our previous work, we demonstrated that Gab1 is important for the activation of Src downstream of VEGFR2 (Laramée et al., 2007) and that Gab1 could be associated with Src in response to VEGF (Chabot et al., 2009). Gab1 could activate Src via the association of the phosphatase Shp2, as a Gab1 Δ Shp2 is unable to activate Src. This mutant is also unable to induce cell migration (Laramée et al., 2007) (Shioyama et al., 2011) and capillary formation in response to VEGF (Y. Lu et al., 2011). Studies have also shown that the Gab2 scaffold protein plays a role in cell migration in response to VEGF (Caron et al., 2009), and that the association of Gab2 to Shp2 is important for cell motility (X. Zhang et al., 2013), and for VAV2 tyrosine phosphorylation and cell motility (Herrera Abreu et al., 2011). Even though some discrepancies are observed between Gab1 and Gab2, some parallel could still be present particularly in cell motility.

Our work also presents some indirect evidence on the important contribution of Gab1 on SFKs (Src Family Kinases) activation. We and others have already shown that Gab1 depletion leads to a lower induction of Src activation in endothelial cells (Laramee et al., 2007) (Y. Lu et al., 2011). In this work we demonstrate that Gab1 is important for VAV2 and Cortactin tyrosine phosphorylation, which are all phosphorylations controlled downstream of SFKs (Marignani & Carpenter, 2001) (Q. Feng et al., 2006; Garrett et al., 2007) (H. Wu & Parsons, 1993). Also, p120 Catenin was first identified as a Src substrates (Reynolds et al., 1994), and VAV2 binding to p120 Catenin will result in Rac1 activation (Noren et al., 2000) (Valls et al., 2012) (Espejo et al., 2014). Recently Tyr335 phosphorylation on p120 Catenin was shown to be crucial for VAV2 association, Rac1 activation and cell migration (Espejo et al., 2014). Furthermore, it has been shown that SFKs are essential modulators of *in vivo* angiogenesis in mice in response to VEGF (Eliceiri et al., 1999) and that Src activation is crucial for the activation of numerous pathways converging to invasion (Eilken & Adams, 2010) (Bjorge, Jakymiw, & Fujita, 2000). Here, we clearly demonstrate that Gab1 scaffold protein regulates tyrosine phosphorylation of many proteins which are all regulated by SFKs, leading us to postulate that Gab1 is a crucial activator of SFKs, which leads to increased invasive capacity and angiogenesis.

Our study clearly establishes an important role for Gab1 in mediating the invasive capacity of endothelial cells, with Gab1-depleted cells unable to invade Matrigel Matrix and displaying a strong defect in sprouting angiogenesis from endothelial spheroids. Although this is the first demonstration for the importance of Gab1 in invasive capacity of endothelial cells in response to VEGF, previous studies have demonstrated its implication in different context. In response to HGF, Gab1 will bind to Cortactin and induce invadopodia formation (Rajadurai et al., 2012) and also, Gab1 could bind to the GEF DOCK7 which leads to Rac1 activation and invasion (D. W. Murray et al., 2014). These results thus enhance the importance of ours in the context where invasive capacity of endothelial cells is a crucial determinant of angiogenesis. Signaling proteins we have shown to be activated downstream of Gab1 in endothelial cells in response to VEGF, such as VAV2 and Cortactin, have already been demonstrated as important regulators of invasion in endothelial cells and of angiogenesis (Bartolome et al., 2006) (Brantley-Sieders et al., 2009) (Hashimoto et al., 2011) (Kaluza et al., 2011). Also, Rac1 activation is an essential step for the induction of sprouting angiogenesis, including invasive characteristics. Rac1 ECKO mice are embryonic lethal and despite the presence of the dorsal aorta, the absence of micro-vessels is suggesting a role for Rac1 in angiogenesis (Tan et al., 2008). Rac1 is essential for sprouting angiogenesis in response to VEGF, as a defect in migration, invasion and

capillary formation are observed *in vitro* after its deletion or depletion in endothelial cells (Tan et al., 2008) (Vader et al., 2011). Also, aortas from Rac1 EC^{+/-} mice have a strong defect in sprouting angiogenesis *ex vivo* (Sawada et al., 2008) and in vascularisation of a Matrigel Plug injected in a mice with Rac1 siRNAs present strong defects (Vader et al., 2011). It is thus not surprising that this pathway (Gab1-VAV2-Rac-Cortactin) is important to regulate invasive capacity of endothelial cells leading to angiogenesis, as each member has been demonstrated separately for being implicated in invasion and angiogenesis. Our results thus demonstrate a high implication of Gab1 in controlling this molecular pathway leading to invasion of endothelial cells in angiogenic process.

Our work demonstrates that Gab1 has an important role for the localisation to the membrane of the proteins it is associated to. It has been demonstrated that the PH domain of Gab1 is crucial for its membrane recruitment in endothelial cells in response to VEGF (Dance et al., 2006). As a scaffold protein, the recruitment of Gab1 to membrane is essential for the localisation of other proteins associated to Gab1. As such, it has been demonstrated in MDCK cells stimulated with HGF that Pak4, a protein associated to Gab1, is localised to membrane only if Gab1 still maintain its PH domain or is forced to localised to membrane with a Myr-Tag (Paliouras et al., 2009). Also, in response to EGF, Gab1 PH domain is essential for Gab1 recruitment to cell membrane and is essential for membrane recruitment of mTOR, Raptor and Rictor, three associated proteins to Gab1 (Chang et al., 2015). These membrane localisation are dependent on the presence of phospholipids at the membrane since this relocalisation is lost with the use of LY294002 (Chang et al., 2015). It is important to note that, despite the absence of PH domain, Gab1 seems to be similarly phosphorylated as its WT counterpart (Maroun, Holgado-Madruga, et al., 1999) (Fig. Sup. 5). Also, our experiments with the PI3K inhibitor, showed similar results to the expression of Gab1 Δ PH and thus support our hypothesis of the importance of Gab1 PH domain for its membrane recruitment. The PH domain of Gab1 is important for the complex formation of p120 Catenin/VAV2/Cortactin, and appears important for their adequate localisation to membrane protrusions in response to VEGF. VAV2 also has a PH domain that is important to induce its membrane recruitment to phospholipids at the membrane and for its GEF activity towards Rac1 (Tamas et al., 2003) (Booden, Campbell, & Der, 2002). This seems a plausible explanation for VAV2 and Rac1 downstream signaling of Gab1 as its signaling will emphasis phospholipids generation to the membrane and thus enhances VAV2 activation leading to Rac1 activation.

In our work we identify a novel molecular mechanism controlling the invasive capacity of endothelial cells that could contribute to angiogenesis. This process is controlled by many other biological activities such as permeability. One of the pathways stimulated by VEGF that controls permeability is the Ser665 phosphorylation of VE-cadherin downstream of Src-VAV2-Rac1-PAK pathway (Gavard & Gutkind, 2006). Phosphorylation of Ser665 on VE-cadherin will induce its association to β -Arrestin2 which will promote endocytosis of VE-cadherin, disrupt endothelial cell barrier and lead to vascular permeability. Since in our cell model, we also show that in response to VEGF, Gab1 control the VAV2-Rac1 pathway, we postulated that Gab1 could be an important mediator of vascular permeability. In combination with other observations which support this hypothesis as the demonstration that Gab1, via Shp2, is critical for eNOS phosphorylation, another important pathway for permeability (Y. Lu et al., 2011). Our study indeed put emphasis on the possible implication of Gab1 in the control of vascular permeability, which is a crucial process in angiogenesis.

5. Conclusion

We have clearly established a critical signaling pathway downstream of VEGF stimulation in endothelial cells that activates the GEF VAV2 via its phosphorylation and its association to p120 Catenin, and localises it to lamellipodia protrusions. These signaling pathways mediate Rac1 and Cortactin activation with its phosphorylation, its association with p120 Catenin and its localisation to membrane that may facilitate actin polymerisation, lamellipodia formation, migration, invasion, capillary formation and sprouting angiogenesis. All of these effects seem to be mediated by Gab1 association and the formation of the VAV2/p120 Catenin/Cortactin protein complex and appears to be dependent of the recruitment of the complex to phospholipids at the membrane via its PH domain.

This study not only identify a strong signaling pathway for angiogenesis in endothelial cells, but also demonstrates new ways of activation for actin polymerisation that can be used in other cell types or conditions. It now would be of great interest to pursue our study on the different actin rearrangements such as stress fibers and filopodias, that are probably also controlled by Gab1. This would lead to a better knowledge of the molecular mechanisms controlled by Gab1 that are essentials in Gab1 implication of *in vivo* angiogenesis.

Acknowledgements

We thank Laslo Buday for generously providing GFP-VAV2 plasmids and Sarita Sastry for VAV2 antibody. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-77612) to I.R. C.C, K. S and P.F had support from the Montreal Cancer Institute. C.C and K.S had studentships from Université de Montréal (Faculty of Graduate Studies). P.F has a studentship from FRQS (25988) and CIHR (292353). We also thank Centre de Recherche du CHUM for its financial support.

Figure Legends

Fig. 1. Gab1 mediates the activation of Rac1 and the phosphorylation of the GEF VAV2 in VEGF-stimulated endothelial cells. (A) HMVECs and (B) HUVECs were transfected with control (CTL) or Gab1 siRNAs, and stimulated with VEGF for the indicated times. GST-PBD pull-down assays were performed on total cell lysates (TCL), and Rac1-GTP levels were revealed by immunoblotting (IB). Equivalent protein levels were detected with the corresponding antibodies. (C) CTL and Gab1-depleted HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. Phosphorylation of VAV2 was determined by IB TCL with the phosphospecific p^{Y172}VAV2 antibody. (D) BAECs were transfected with the GFP-VAV2 cDNA construct, together with empty vector (pCDNA1.1) or the HA-Gab1-encoding vector. Cells were stimulated with VEGF, and phosphorylation of VAV2 was detected as described above. n=5.

Fig. 2. Gab1 associates with p120 Catenin and VAV2 and promotes their association in response to VEGF stimulation. (A) Serum-starved CTL and Gab1-depleted HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. VAV2 was immunoprecipitated (IP) from TCL, and p120 Catenin association was detected by IB. (B) BAECs were transfected with the GFP-VAV2 cDNA, together with empty vector (pCDNA1.1) or the HA-Gab1-encoding vector, and stimulated with VEGF. Association of GFP-VAV2 to IP p120 Catenin was detected by IB with a VAV2 antibody. (C) Serum-starved HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. Endogenous Gab1 was IP from TCL and association of p120 Catenin was detected by IB. (D) BAECs were co-transfected with the GFP-VAV2 cDNA, together with empty vector (pCDNA1.1) or the HA-Gab1-encoding vector, and stimulated with VEGF for the indicated times. The association between VAV2 and HA-Gab1 was detected by CO-IP interaction. n=5

Fig. 3. Gab1 mediates the association of Cortactin to p120Catenin, and is essential for Cortactin phosphorylation. (A) Serum-starved CTL and Gab1-depleted HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. p120 Catenin was IP from TCL, and its association to Cortactin was detected by IB with the corresponding antibody. (B) Phosphorylation of Cortactin was detected in CTL and Gab1-depleted cells with the phosphospecific p^{Y421}Cortactin antibody. n=4

Fig. 4. Gab1 is important for the localization of Cortactin, VAV2, and p120 Catenin in VEGF-induced membrane protrusions. CTL and Gab1-depleted HUVECs were plated after nucleofection on gelatin-coated coverslips for 48h, and then stimulated or not with VEGF (10ng/mL) for 20min. Representative immunofluorescence stainings of (A) Cortactin (green) and actin (red), (B) VAV2, and (C) p120 Catenin, are shown. For quantification of the number of cells with localization of these proteins in membrane protrusions, at least 100 cells were analysed for each condition. Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric and the p-values of less or equal than 0.05 were considered significant (* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$) and standard deviation (SD) was calculated. n=3.

Fig. 5. Gab1 is important for invasion and sprouting in response to VEGF. (A) Control (CTL) or Gab1-depleted HUVECs were plated on Transwell filter inserts previously coated with 50 μ L of Matrigel (2 mg/mL). Cells were allowed to invade for 24h in the presence of VEGF (50 ng/mL). (B) Quantification of the number of cells that were able to invade the Matrigel. (C) Spheroids were made with CTL or Gab1-depleted HUVECs, and embedded in a collagen gel containing either VEGF (50ng/mL) or PBS. Six hours after, spheroids were photographed. Immunoblot analysis shows the depletion of Gab1. (D) Number and (E) total length of sprouts were calculated per spheroids (at least 10 spheroids per condition per experiment). Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric and the p-values of less or equal than 0.05 were considered significant (* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$) and standard deviation (SD) was calculated. n=4.

Fig. 6. The VEGF-induced phosphorylation of Cortactin and endothelial cell invasion are dependent on VAV2. (A) HUVECs were transfected with CTL or VAV2 specific siRNAs, serum starved, and stimulated with VEGF for the indicated times. The level of VAV2 depletion was detected with the VAV2 specific antibody, and the phosphorylation status of Cortactin was determined by IB with the p^{Y421}Cortactin antibody. (B) BAECs transfected with GFP-VAV2 WT or GFP control vectors were stimulated with VEGF, and the level of p^{Y421}Cortactin was determined on TCL by IB. (C) CTL or VAV2-depleted HUVECs were plated on Transwell filter inserts pre-coated with 50 μ L of Matrigel (2 mg/mL). Cells were allowed to invade for 24 hours in the presence or not of VEGF (50 ng/mL) Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric and the p-values of less or equal than 0.05 were considered significant (** $p \leq 0.01$) and standard deviation (SD) was calculated n=3.

Fig. 7. The Gab1 PH domain is important for the association of VAV2 with Gab1 and p120 Catenin, and promotes Rac1 activation and invasion induced by VEGF. (A) BAECs were transfected with GFP-VAV2, together with either empty vector (pCDNA1.1), WT HA-Gab1, or the HA-Gab1 Δ PH mutant. Cells were stimulated with VEGF for the indicated times, and p120 Catenin was immunoprecipitated from TCL. Associated GFP-VAV2 was detected by IB with the VAV2 antibody. (B) HA-Gab1 was immunoprecipitated from transfected BAECs, and VAV2 association was detected by IB. (C) BAECs were transfected as in A), and incubated with DMSO or LY294002 (50 μ M) for 1h before cell stimulation with VEGF. HA-Gab1 and p120 Catenin were immunoprecipitated, and the presence of GFP-VAV2 was determined by IB. (D) BAECs were transfected as in (B), and incubated with DMSO or LY294002. Rac1 activation was evaluated by a GST-PBD pull-down assay. (E) BAECs transfected with empty vector, WT HA-Gab1, and the HA-Gab1 Δ PH mutant were subjected to an invasion assay, as described in legend to Fig. 5A. Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric and the p-values of less or equal than 0.05 were considered significant (*p \leq 0.05 ***p \leq 0.001) and standard deviation (SD) was calculated n=3.

Fig. 8. WT Gab1, but not the Δ PH mutant, rescues the formation of capillary sprouts. Spheroids made with HUVECs co-nucleofected with control siRNAs (CTL) and empty vector (pCDNA1.1), or co-nucleofected with Gab1 siRNAs and either empty vector, WT HA-Gab1, or the HA-Gab1 Δ PH mutant, were embedded in collagen gels containing VEGF (50 ng/mL) and incubated for 6h. (A) The length or (B) number of sprouts formed were calculated per spheroids (at least 10 spheroids per condition per experiment). (C) Protein levels of endogenous Gab1 and overexpressed HA-Gab1 were determined on TCL of nucleofected cells by IB. Immunoblot analysis shows the depletion of Gab1. (D) Representative pictures of the spheroids. Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric and the p-values of less or equal than 0.05 were considered significant (*p \leq 0.05 **p \leq 0.01 ***p \leq 0.001) and standard deviation (SD) was calculated n=4.

Fig. Sup. 1. Gab1 negatively regulates the GEF β -PIX and Cdc42 in response to VEGF in endothelial cells. (A) HMVECs and (B) HUVECs were transfected with control (CTL) or Gab1 siRNAs, and stimulated with VEGF for the indicated times. GST-PBD pull-downs were performed on total cell lysates (TCL), and Cdc42GTP levels were revealed by immunoblotting (IB). Equivalent protein expression levels were detected with the corresponding antibodies. (C) Control (CTL) and Gab1-depleted HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. Tyrosine phosphorylation of

immunoprecipitated β -PIX was determined by immunoblotting. (D) HUVECs were transfected with control (CTL) or β -PIX siRNAs, and stimulated with VEGF for the indicated times. GST-PBD pull-down were performed on total cell lysates (TCL), and Rac1 and Cdc42 activation levels were revealed by immunoblotting (IB) n=3.

Fig. Sup. 2. Gab1 and Cortactin are associated in endothelial cells. (A) Serum-starved HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. Gab1 was immunoprecipitated (IP) from total cell lysates (TCL), and Cortactin association was detected by immunoblotting. (B) Control IgG immunoprecipitation was done to evaluate background level. n=3

Fig. Sup. 3. Gab1 membrane localisation is enhanced in response to VEGF. Serum-starved HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. Cell fractionation was performed to separate membrane fraction from cytosolic fraction. H-Ras was immunoblotted to validate our cell fractionation. (A) Total cell lysates (TCL) were immunoblotted with the indicated antibodies. (B) Densitometry analysis reveals an enhanced ratio of membrane Gab1 on Gab1 cytosolic protein. n=4

Fig. Sup. 4. Depletion of Gab1 results in a lower induction of the phosphorylation of Pak4 in endothelial cells in response to VEGF. Serum-starved HUVECs were stimulated with VEGF for the indicated times. Total cell lysates (TCL) were immunoblotted with a p-Pak4 antibody. n=3

Fig. Sup. 5. Gab1 WT and Gab1 Δ PH are both tyrosine phosphorylated in response to VEGF in endothelial cells. Gab1 has been immunoprecipitated from BAECs stimulated for 5 minutes with VEGF and tyrosine phosphorylation was immunoblotted. Ratio of densitometry of Gab1 Δ PH tyrosine phosphorylation over WT Gab1 tyrosine phosphorylation was put on graph. Statistical significance was evaluated with the Paired t-test Parametric and the p-values of less or equal than 0.05 were considered significant (*p \leq 0.05 **p \leq 0.01 ***p \leq 0.001) and standard deviation (SD) was calculated n=3

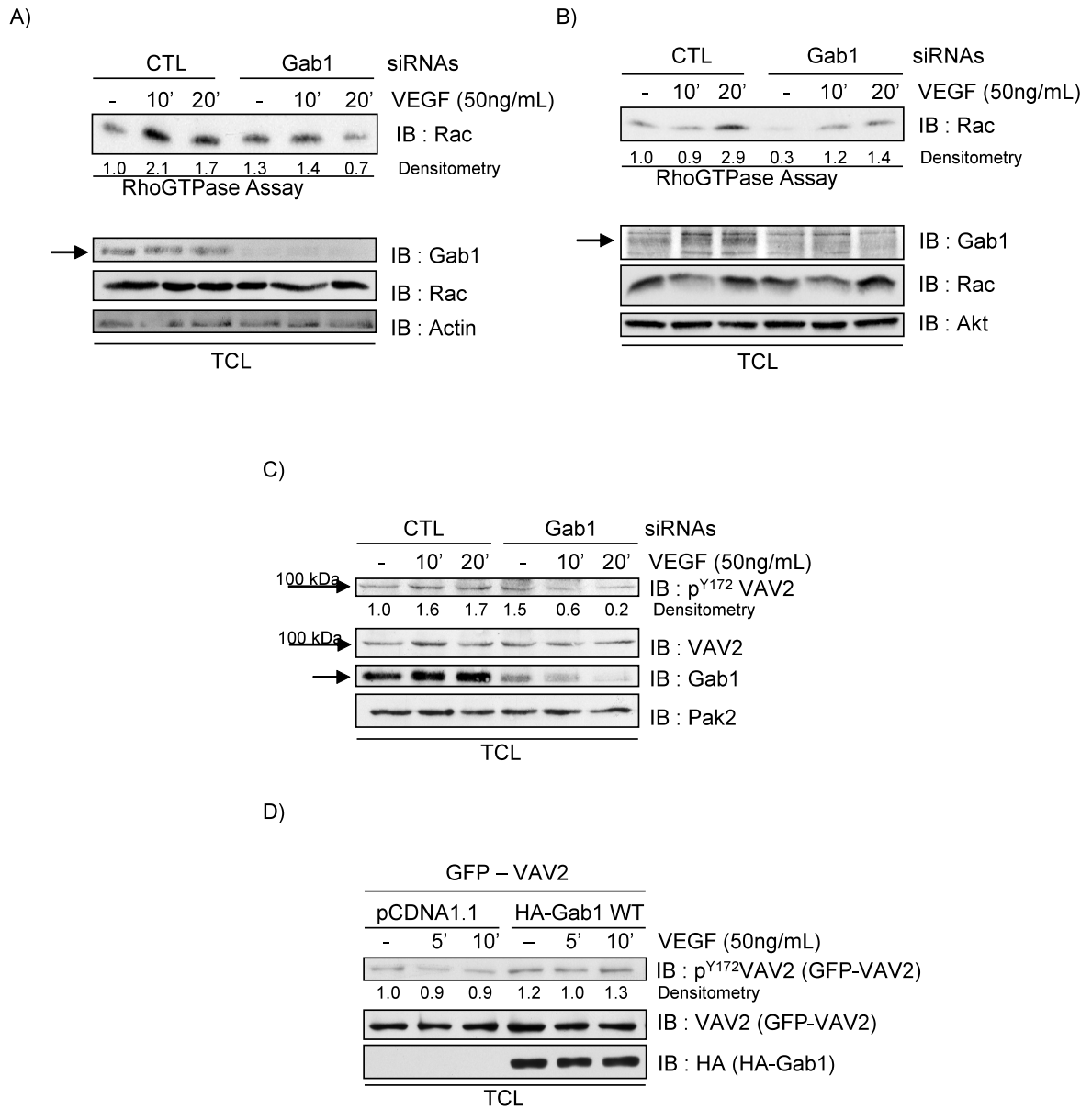


Figure 1 : Gab1 mediates the activation of Rac1 and the phosphorylation of the GEF VAV2 in VEGF-stimulated endothelial cells.

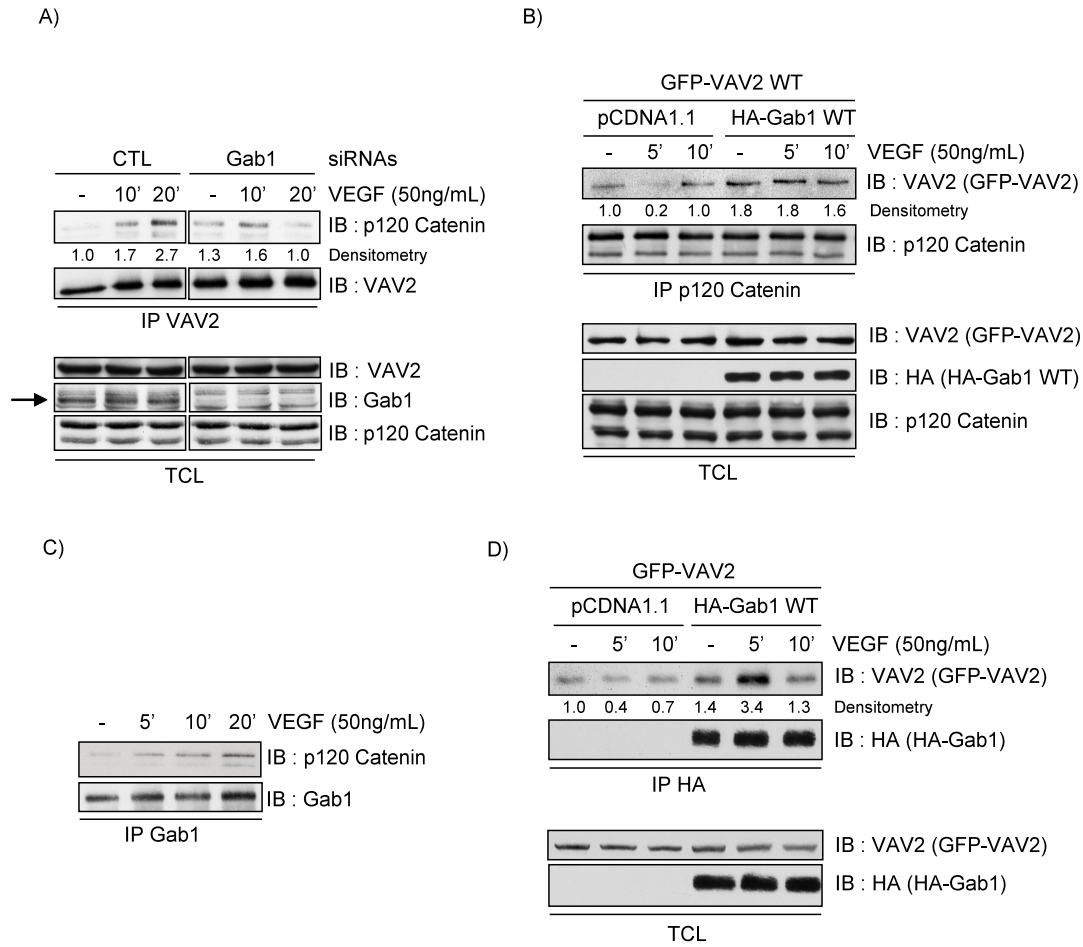


Figure 2 : Gab1 associates with p120 Catenin and VAV2 and promotes their association in response to VEGF stimulation.

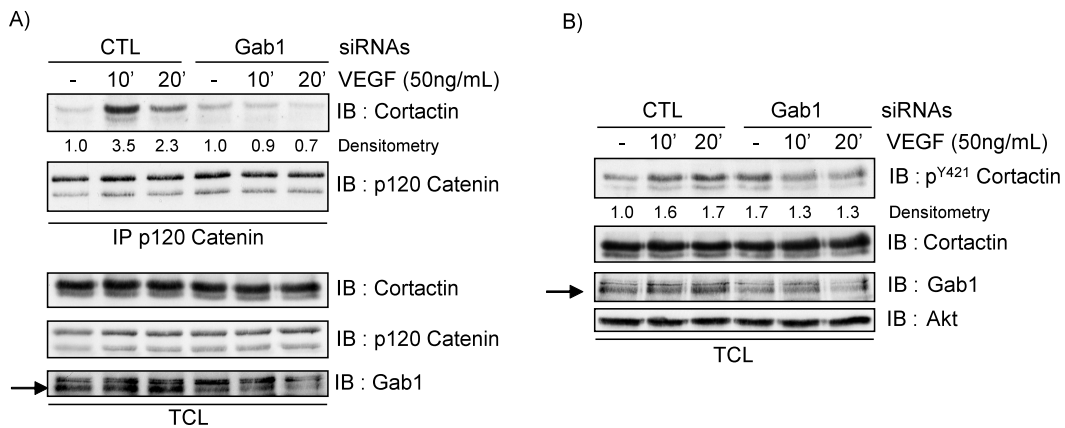


Figure 3 : Gab1 mediates the association of Cortactin to p120Catenin, and is essential for Cortactin phosphorylation.

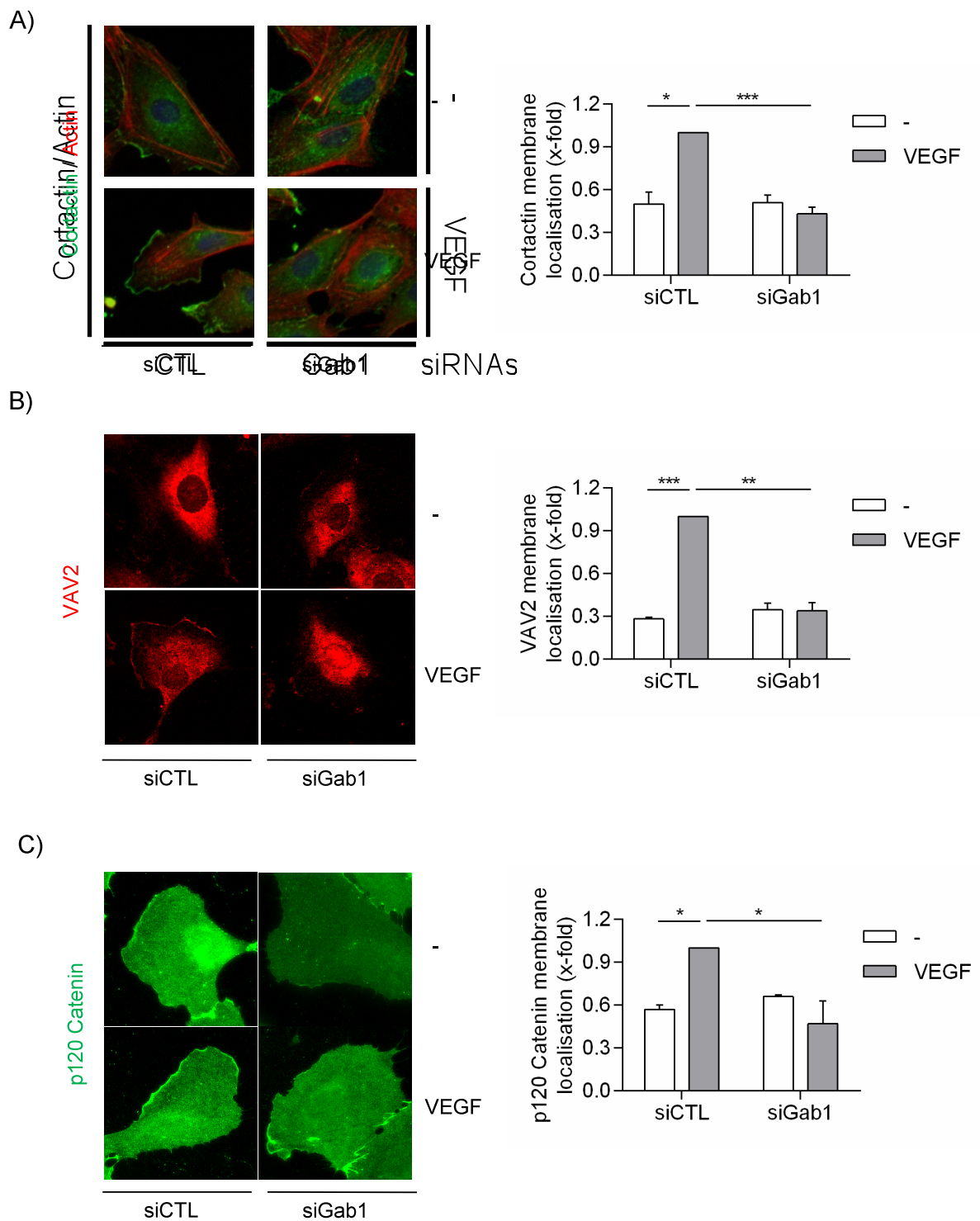


Figure 4 : Gab1 is important for the localization of Cortactin, VAV2, and p120 Catenin in VEGF-induced membrane protrusions.

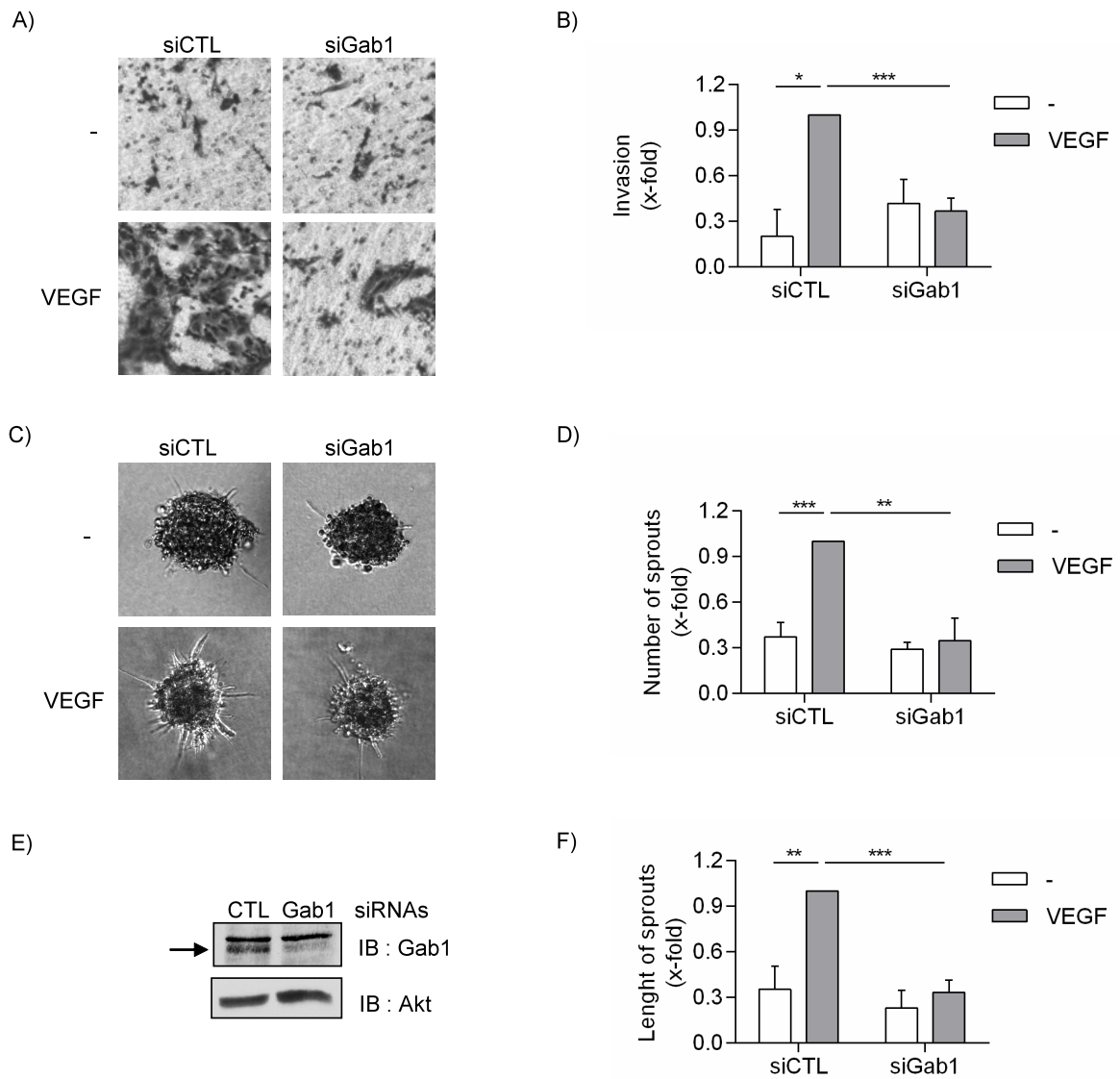


Figure 5 : Gab1 is important for invasion and sprouting in response to VEGF.

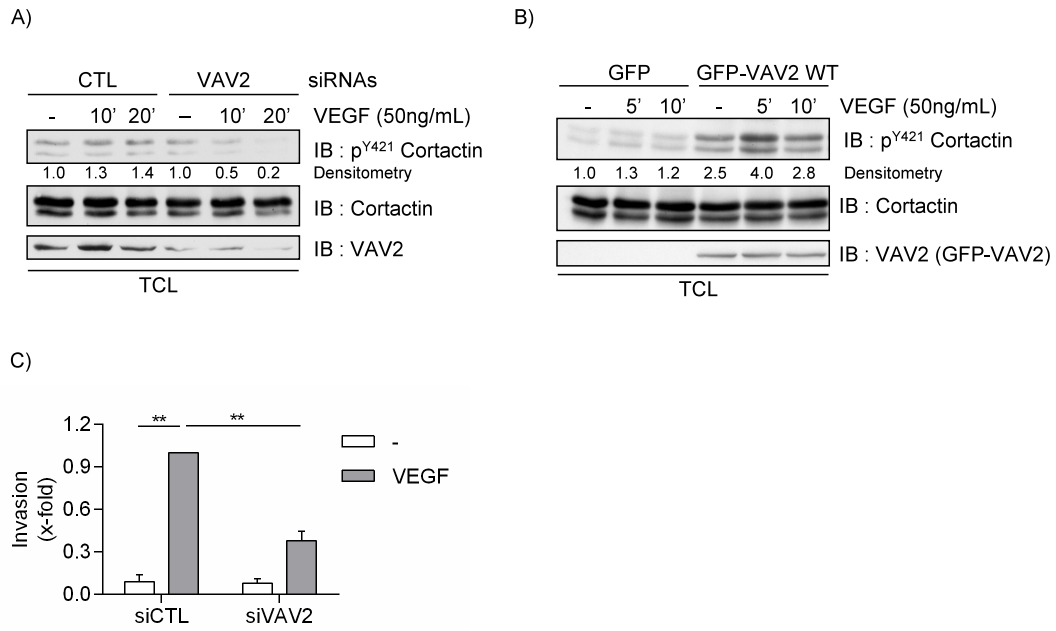


Figure 6 : The VEGF-induced phosphorylation of Cortactin and endothelial cell invasion are dependent on VAV2.

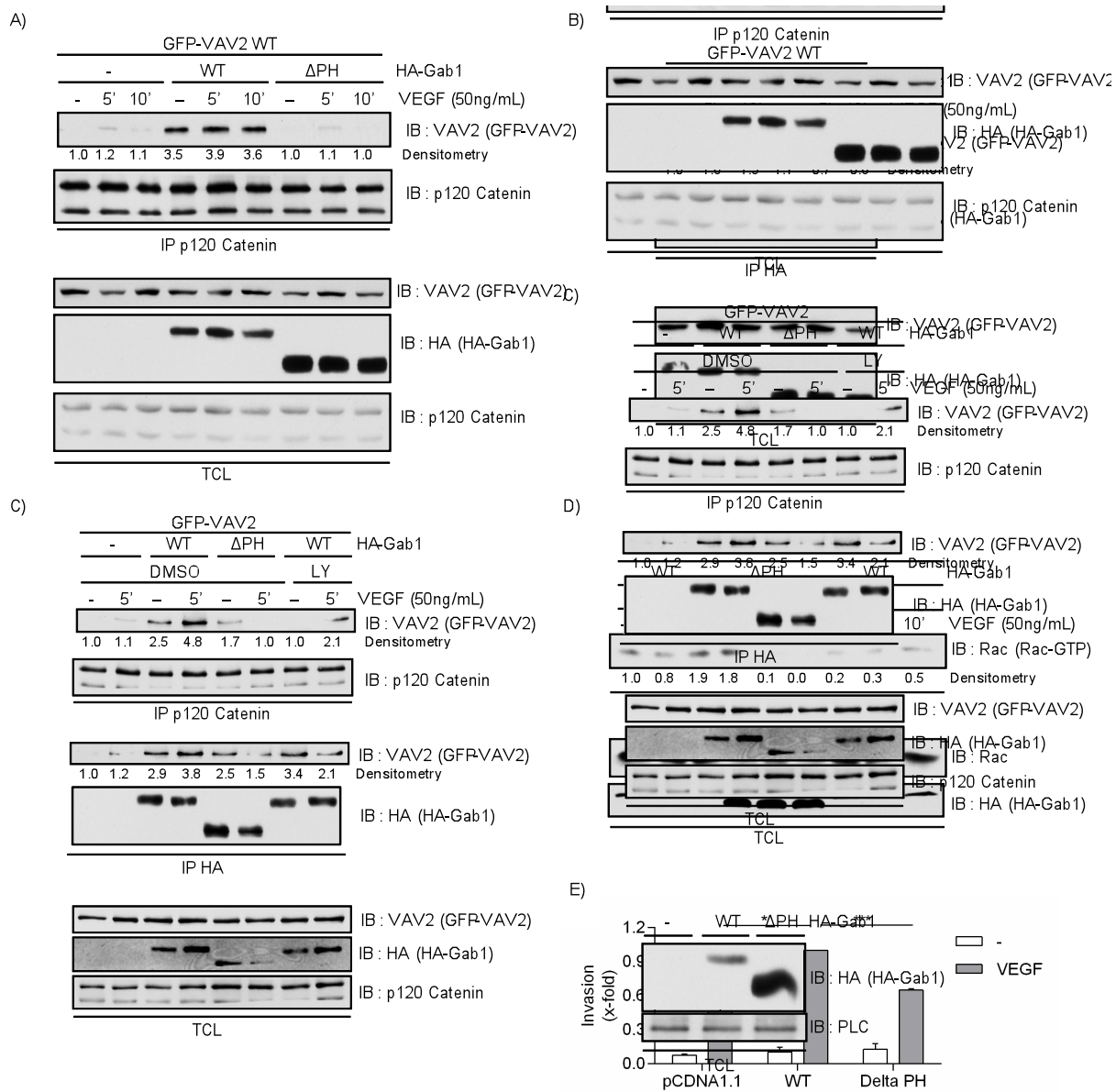


Figure 7 : The Gab1 PH domain is important for the association of VAV2 with Gab1 and p120 Catenin, and promotes Rac1 activation and invasion induced by VEGF.

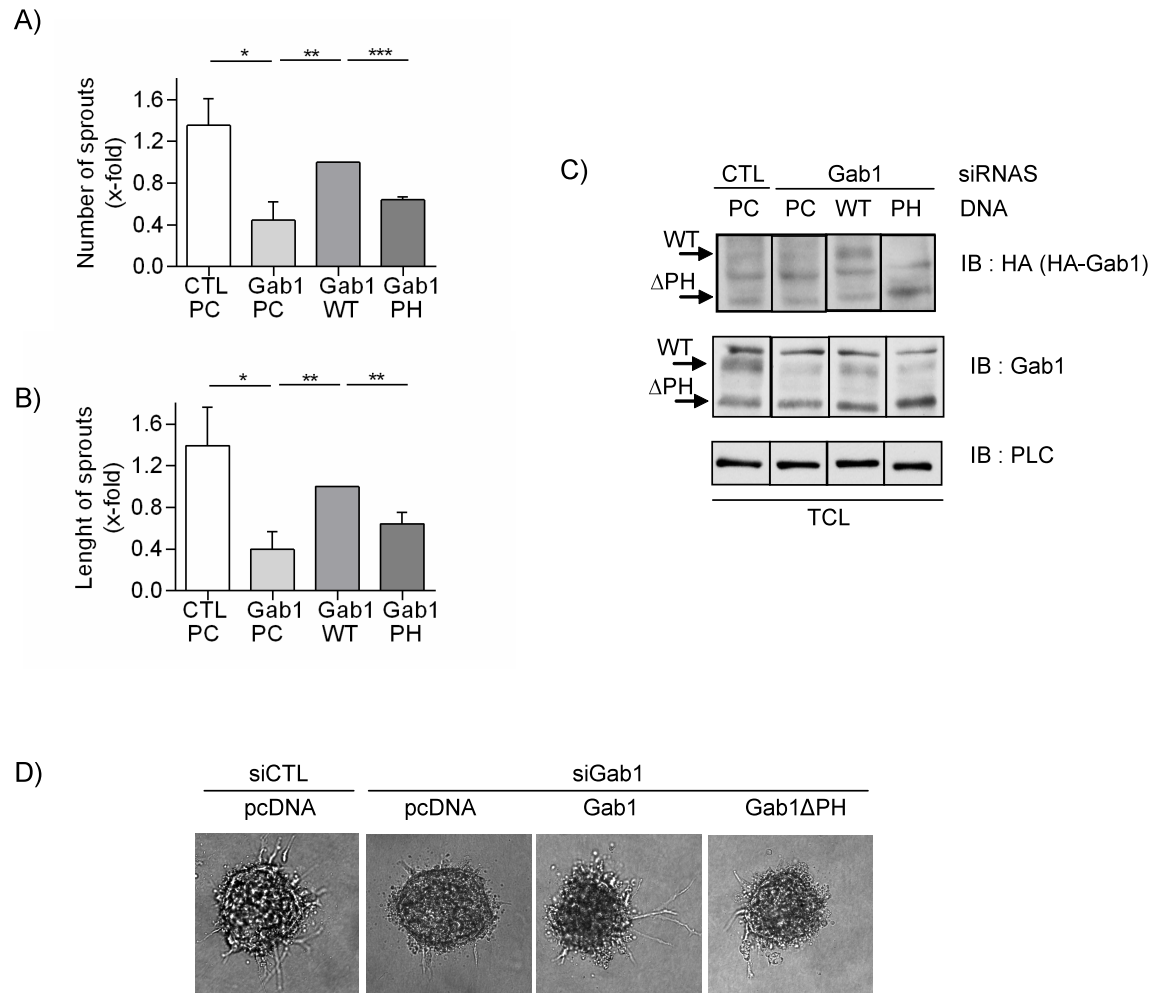
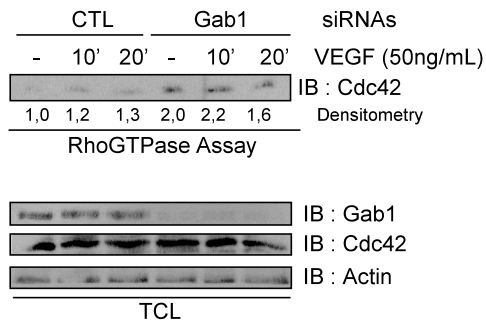
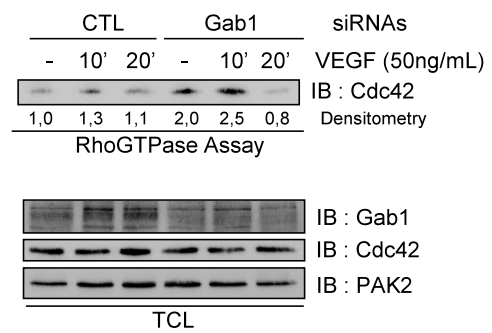


Figure 8 : WT Gab1, but not the Δ PH mutant, rescues the formation of capillary sprouts.

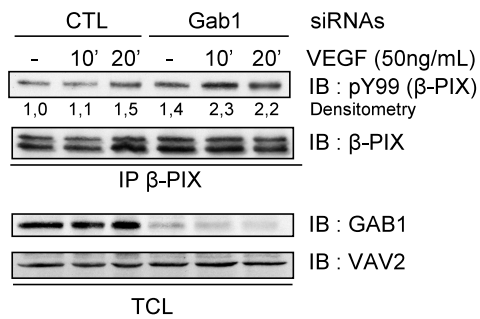
A)



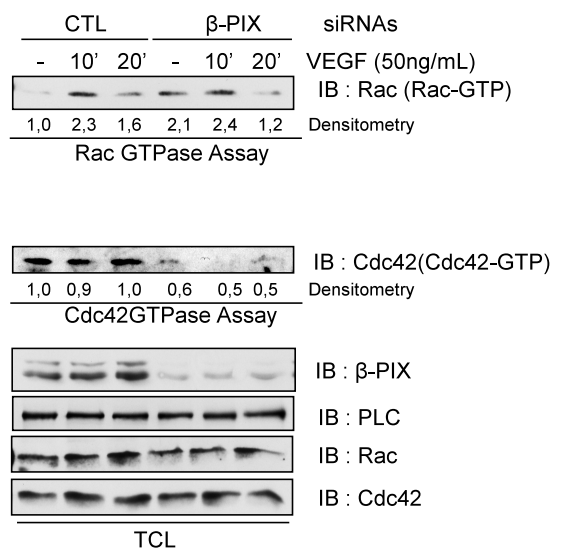
B)



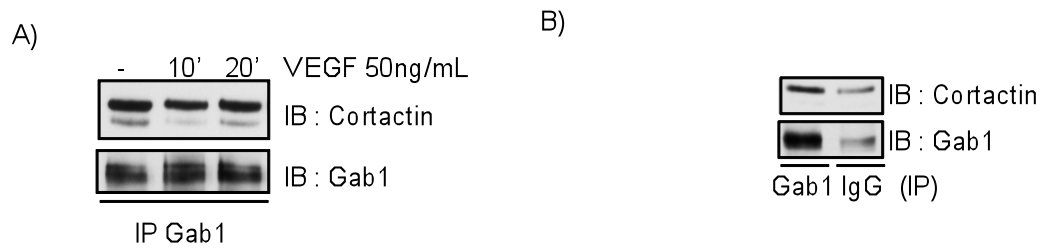
C)



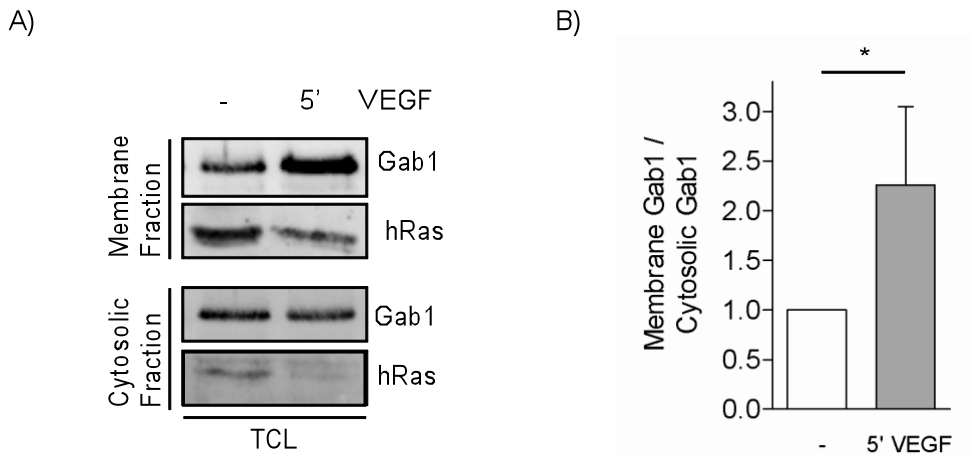
D)



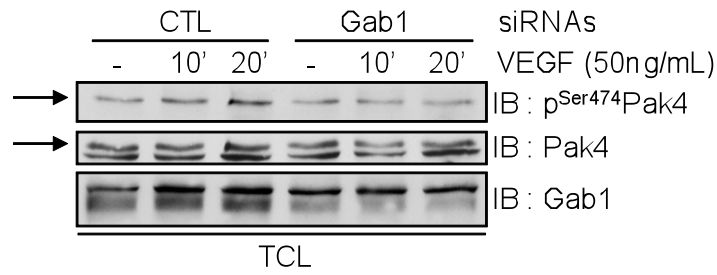
Supplementary Figure 1 : Gab1 negatively regulates the GEF β-PIX and Cdc42 in response to VEGF in endothelial cells



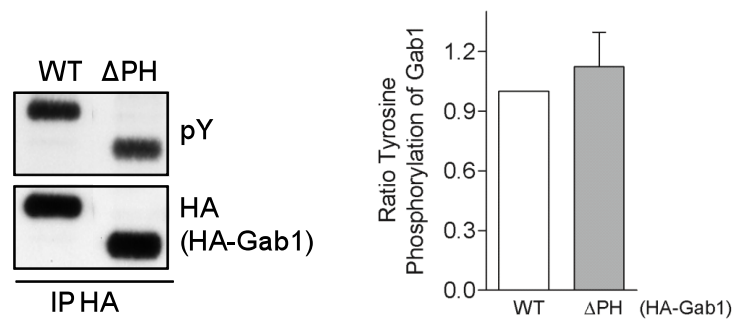
Supplementary Figure 2 : Gab1 and Cortactin are associated in endothelial cells.



Supplementary Figure 3 : Gab1 membrane localisation is enhanced in response to VEGF.



Supplementary Figure 4 : Depletion of Gab1 results in a lower induction of the phosphorylation of Pak4 in endothelial cells in response to VEGF.



Supplementary Figure 5 : Gab1 WT and Gab1ΔPH are both tyrosine phosphorylated in response to VEGF in endothelial cells.

Contribution personnelle à l'ouvrage :

CdGAP Regulates Vascular Development and VEGF-Mediated Signaling in Angiogenesis.

Christine Caron¹, Jonathan DeGeer², Patrick Fournier¹, Philippe Duquette² Vilayphone Luangrath²,
Fereshteh Karimzadeh², *Nathalie Lamarche-Vane² and *Isabelle Royal^{1,3}

J'ai effectué toutes les expériences *in vitro* de l'article, soit plus de la moitié de l'article Fig 3, 5, 6, 7. J'ai aussi contribué à la mise en place et l'analyse des expériences 2 et 4. Les étudiants et employés du laboratoire du Dr Nathalie Lamarche-Vane ont quant à eux maintenus la colonie de souris CdGAP KO, ont effectués les expériences *in vivo* sur les souris et les embryons de souris.

Caron C. a effectué toutes les expériences *in vitro* de l'article, soit les figures 3, 5, 6 et 7.

Caron C. a aussi contribué à la mise en place et à l'analyse des figures 2 et 4.

J.D. a effectué les analyses d'embryon de souris, soit la figure 1E et 1G.

P.F. a effectué les expériences de sphéroïdes et d'aortes, soit les figures 2 et 4.

P.D. a effectué les analyses des souris CdGAPKO, soit la figure 1F.

V.L. s'est occupé de la colonie de souris et du génotypage des souris, soit la figure 1A, B, C, D.

F. K. a contribué à l'initiation du projet et l'initiation des expériences de migration, soit la figure 3B.

N. LV. et I.R. ont élaboré le projet et rédigé l'article avec Caron C.

Chapitre 4 : CdGAP Regulates Vascular Development and VEGF-Mediated Signaling in Angiogenesis

Christine Caron¹, Jonathan DeGeer², Patrick Fournier¹, Philippe Duquette² Vilayphone Luangrath²,
Fereshteh Karimzadeh², *Nathalie Lamarche-Vane² and *Isabelle Royal^{1,3}

*Co-Corresponding Authors

¹Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and Institut du cancer de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, ²Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, ³Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Running title : Role of CdGAP in angiogenesis

Abstract

Angiogenesis is the process of new blood vessels from pre-existing ones, it is crucial for many physiological steps, but angiogenesis is also implicated in the development of pathologies such as cancer. VEGF signaling through VEGFR2 induces many biological activities that are tightly controlled and lead to angiogenesis, including actin reorganisation, cell migration and cell invasion. Central regulators of the reorganisation of the actin cytoskeleton are the RhoGTPases, which are tightly controlled by their GEFs and GAPs (activators and inactivators, respectively). Despite its high expression in endothelial cells, CdGAP has not been studied yet in vascular development and angiogenesis. Here we provide further information about this role. We show that vascular development is impaired in CdGAP $-/-$ mice. Hemorrhaging and severe oedema were observed in the E15,5 CdGAP $-/-$ embryo, there is less well and it shows a 44% embryonic lethality. *Ex vivo* angiogenic assays from aortic cultures on Matrigel demonstrate the importance of CdGAP for sprouting angiogenesis. CdGAP is also important in biological activities controlled by VEGF which are crucial to angiogenesis such as cell migration, capillary formation and endothelial sprouting from spheroids. Surprisingly, results from siRNAs depletion of CdGAP in endothelial cells, demonstrate the down-regulation of Rac1 and Cdc42 activation in response to VEGF as well as a reduction of the VEGF cell signaling under the control of the Gab1 scaffolding protein. Our study is the first to identify the implication of CdGAP in endothelial cells to control vascular development and angiogenesis in response to VEGF.

Key words : CdGAP, Gab1, Angiogenesis, GTPase Activating Protein (GAP), VEGF, endothelial cells

1. Introduction

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from pre-existing ones. It is crucial for normal development but can also be associated with pathologies such as cancer. It is mainly controlled by the activation of Vascular-Endothelial Growth Factor-2 (VEGFR2) Receptor Tyrosine Kinase (RTK), which is activated by VEGF, one of the main pro-angiogenic factors. The Gab1 (Grb2-Associated Binding Protein 1) scaffolding adapter protein is tyrosine phosphorylated downstream of many RTKs, including VEGFR2. It has been shown to be essential to mediate angiogenesis *in vitro* (Laramee et al., 2007) (Caron et al., 2009) and *in vivo* (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (Shioyama et al., 2011), in part through the activation of a pro-survival pathway involving the association of PI3K (Caron et al., 2009) and via actin reorganisation (Laramee et al., 2007).

Many aspects of the regulation and the control of angiogenesis are regulated by RhoGTPases. They regulate migration of endothelial cells to form new capillaries, induce the invasive capacity for sprouting and cause rearrangements that promote lumen formation of the vessel and initiate blood flow. Downstream of VEGF, Rac1GTPase is activated and essential to generate protrusions in the leading edge of endothelial tip cells that guide newly formed sprouts during angiogenesis (Tan et al., 2008) (Vader et al., 2011) (Soga, Connolly, Chellaiah, Kawamura, & Hruska, 2001) (Connolly et al., 2002). Rac1GTPases are crucial to mediate angiogenesis, as Rac1 KO mice have severe defect in angiogenesis (Tan et al., 2008) (Sawada et al., 2008) and Cdc42 is known to participate in lumen formation (Koh et al., 2008). Such steps are crucial and are tightly controlled by different regulators of RhoGTPases (De Smet et al., 2009). RhoGTPases are proteins that cycle between an active conformation, bound with GTP and an inactive conformation, when bound with GDP. This cycle is tightly controlled by activators, such as Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs), and inactivators such as GTPase Activating Proteins (GAPs) (Vega & Ridley, 2008) (Ridley, 2011). Despite our knowledge about the crucial role and importance of these phenomenons, the molecular mechanisms that control it are still ill-defined.

More than 70 human genes are predicted to encode for potential RhoGAP proteins, which is roughly four times the number of Rho GTPases (20) (Cherfils & Zeghouf, 2013) (Jaffe & Hall, 2005). Some RhoGAPs proteins may be tissue specific and there is a crucial control in a context-dependent

manner for their activity which is highly regulated in both spatial and temporal ways (Jaffe & Hall, 2005) (Cherfils & Zeghouf, 2013). This suggests, with the high number of RhoGAPs, a high specificity of action of RhoGAPs on RhoGTPases. The GAP activity is highly regulated by many ways such as, at protein level by a variety of mechanisms to mediate their effects on actin cytoskeleton ranging from protein-protein interactions, phosphorylation, lipid interactions, and proteolytic degradation. Despite the predicted importance, few studies have evaluated the implication of GAP proteins in angiogenesis and yet there is currently limited knowledge on the implication of RhoGAPs in angiogenesis (van Buul et al., 2014).

CdGAP (Cdc42 GTP-Activating Protein; ARHGAP31) is a RhoGAP protein ubiquitously expressed but which has a higher expression in heart, lung and brain tissue of the mouse (Lamarche-Vane & Hall, 1998) (Tcherkezian et al., 2005) and heart and muscle of human foetus (Tcherkezian et al., 2006). It is known to be a Rac1 and Cdc42 GAP *in vitro* and *in vivo* (Lamarche-Vane & Hall, 1998) (Tcherkezian et al., 2006). CdGAP is the first member of a subgroup of GAP proteins including GRIT, Noma-GAP, and ARHGAP30. The CdGAP structure consists of an N-Terminal GAP domain, a basic-rich central region, and a proline-rich domain with an extended C-terminal region with no identified functions yet. Negative regulation of GAP activity may be controlled by its phosphorylation on Thr776 by Erk1/2 and GSK-3 or via its association to the GEF and vesicular trafficking protein Intersectin (Tcherkezian et al., 2005) (Tcherkezian et al., 2006) (Danek et al., 2007) (Jenna et al., 2002) (Primeau et al., 2011). In contrast, its association to PIP3 phospholipids to the membrane with its PBR domain is essential for its GAP activity (Karimzadeh et al., 2012). It is localised to focal adhesions through its association with Actopaxin (LaLonde et al., 2006). CdGAP expression is induced in response to serum (Danek et al., 2007) and is required for normal cell spreading, for the formation of polarized lamellipodia and to induce cell migration (LaLonde et al., 2006) (Y. He et al., 2011). Different studies characterise CdGAP regulation and implication but none has been done yet for its role in endothelial cells.

CdGAP is highly expressed in endothelial cells (van Buul et al., 2014) (Kusuhara et al., 2012). Even though no experimental data is yet available for CdGAP in endothelial cells, the Arhgap31 gene shows a genetic association with an increased risk for coronary artery disease (L. Wang et al., 2007). Also, a Gain-of-Function mutation has been identified in the Arhgap31 gene in the Adams-Oliver Syndrome (AOS). This Syndrome is an inherited heterogeneous disorder where patients present

aplasia cutis congenital (ACC), terminal transverse limb defects (TTLD), vascular defects, cutis marmorata and other malformations (Whitley & Gorlin, 1991). The Gain-of-Function mutation identified in these patients is proposed to induce the truncation of CdGAP, which could release an auto-inhibition fragment leading to a constitutively active GAP towards Rac1 and Cdc42 (Southgate et al., 2011). CdGAP was also recently identified to be mutated in patient only having limb truncation but no other AOS phenotypes (Isrie et al., 2014). Vascular impairment during embryogenesis has been proposed to lead to terminal limb defects in AOS by various studies (Algaze et al., 2013) (Swartz, Sanatani, Sandor, & Schreiber, 1999) (Maniscalco et al., 2005) (Piazza, Blackston, & Sola, 2004) (Zapata, Sletten, & Pierpont, 1995) (A. E. Lin, Westgate, van der Velde, Lacro, & Holmes, 1998) (Peralta-Calvo, Pastora, Casa-Ventura, Hernandez-Serrano, & Abelairas, 2012).

Our results here reveal, for the first time, the importance of CdGAP in vasculature, since CdGAP *-/-* embryos present hemorrhages, oedema and vascular defects at embryonic E15,5 which may underlie the 44% embryonic lethality observed. We also demonstrate the importance of CdGAP in angiogenesis with an *ex vivo* assay of aortic ring in response to VEGF, as well as sprouting angiogenesis in spheroids, capillary formation on Matrigel and endothelial cell motility. Surprisingly, CdGAP does not seem to act as a GAP towards Rac1 and Cdc42 in this context but seems to be crucial for some important biological activities regulated by VEGF. These results may be explained by downregulated signaling activities, and reduced Gab1 tyrosine phosphorylation controlled by VEGF in endothelial cells observed in CdGAP depleted cells. Our results are thus the first to demonstrate *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* the crucial role of CdGAP in mediating vascular development and angiogenesis in response to VEGF.

2. Materials and Methods

2.1 Cell Culture

Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVECs; from Cascade Biologics/Invitrogen) were cultured (passages 1 to 4) on 0,2% gelatin-coated tissue culture dishes (Corning) and maintained in M200 medium (Invitrogen) supplemented with low serum growth supplement ; LSGS : fetal bovine serum, 2%; hydrocortisone, 1ug/ml; human epidermal growth factor, 10 ng/ml; basic fibroblast growth factor, 3 ng/ml; and heparin, 10 ug/ml (Gibco; Cascades Biologics; Invitrogen) and gentamycin (50µg/mL, Wisent).

2.2 Antibodies and Reagents

Antibodies against phosphotyrosine (PY99), Gab1 (Clone H198), PECAM (sc-1506) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies against p^{S473}Akt, Akt, p^{Y783}PLCγ, PLCγ, p^{T202/Y204}ERK1/2, ERK1/2, p^{Y1175}VEGFR2, p^{Y951}VEGFR2, Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or –rabbit IgG, were purchased from Cell Signalling. Antibodies against Rac1, Cdc42 and Matrigel were purchased from Becton Dickinson. CdGAP antibody was purchased from Sigma. VEGFR2 and p85 antibody were purchased from Upstate. Gelatin type B was from Fisher Scientific. Recombinant human VEGF-A was obtained from the Biological Resources Branch Preclinical Repository of the National Cancer Institute — Frederick Cancer Research and Development Center. Transwell filters (poly-carbonate membrane, 8um pore-size) were from Corning.

2.3 Transfection of siRNAs

Between 5X10⁵ and 5X10⁶ HUVECs at passage 4 were nucleofected with the kit (VPB-1002 from Lonza, Amaxa) as described by suppliers with 20uL of 20nM of siRNAs of Non-Targeting No2 Dharmacon or 20uL of CdGAP siRNAs from Ambion (GGAGUCACCUCAAACAUACTt sense GUAUGUUUGAGGUGACUCctg anti-sense) with the use of program U-1 of Nucleofector (Amaxa). Cells were serum-starved or trypsinized 48h later to pursue different experiments.

2.4 Cell stimulation, lysis, immunoprecipitation, immunoblotting and RhoGTPase assays

Following starvation in M200 (HUVECs) medium for 6h, nucleofected cells were stimulated or not with VEGF (50ng/mL) at 37°C, then incubated in PBS containing 1mM Na₃VO₄ for 30min on ice, and lysed in a 50mM HEPES pH7,5 buffer containing 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Triton X-100, 10% glycerol, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 10ug/mL aprotinin, 10ug/mL leupeptin, 5mM NaF and 1mM Na₃VO₄ for 20 minutes.

GTPase activity of Rac1 and Cdc42 were measured after stimulation as described (Royal et al., 2000). Briefly, equal amounts of protein lysates (120ug for Rac1 and 200ug for Cdc42) from endothelial cells stimulated or not with VEGF were incubated for 1h at 4°C with 15ug of GST fusion protein encompassing the Cdc42/Rac1 interacting binding (CRIB) domain of PAK (GST-PBD or GST-CRIB) which were previously bound to glutathione-Sepharose beads for 30min at 4°C. Beads were washed 3 times with binding buffer 1% NP-40 and twice with binding buffer without NP-40. For stimulation of untransfected HUVECs, 1 X10⁴ cells/cm² were seeded and allowed to grow for 4 days in M200 medium. Following starvation, cells were stimulated and lysed as described above. Rac1 Assays were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-C Extra membranes and revealed by western blotting.

Gab1 was immunoprecipitated from HUVECs cell lysates (300 µg) O/N at 4 °C with 10µl of anti-Gab1 rabbit antibody (clone H198, Santa Cruz) and further incubated for 3h with 30µl of a 50% suspension of Protein A-coupled Sepharose beads (Amersham Biosciences/GE Healthcare). Immunoprecipitated proteins, Rac1 and Cdc42 GST-PBD pull-down or total protein extracts (50µg) were subjected to SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 µm) (Bio-Rad). Western blotting and antibody detection was carried out using appropriate HRP-conjugated secondary antibodies and chemiluminescence-based detection systems according to the manufacturer's recommendations (ECL from Amersham, or Visualizer kit from Millipore).

2.5 Migration Assay

Nucleofected HUVECs (1 X 10⁵ cells in 200uL of serum-free M200) were seeded on Transwell filters (poly-carbonate membrane, 8um pore-size, Corning Brand) pre-coated for 2h with 0,2% Gelatin and inserted in 24-well plates with 500uL of serum-free M200 with or without 10ng/mL of VEGF in the lower chamber. At the end of the assay (6h), cells were fixed with phosphate-buffered formalin for 20 min and stained with crystal violet (0,1% in 20% methanol). Cells remaining on the upper

surface of the filter were wiped off and those which had migrated through the filter were visualized and counted (a minimum of 6 fields/insert at 10X magnification).

2.6 Spheroid experiments

To generate spheroids, 1000 siRNA-nucleofected cells were cultured in complete medium with 0.5% methyl cellulose as hanging drops of 15 μ L for 36h directly after nucleofection. Spheroids were collected and centrifuged (200 g, 3 min). About 50 - 75 spheroids were resuspended in 500 μ L of complete medium with 0.5% methyl cellulose, added to a pre-mixed collagen solution (250 μ L home-made rat tail collagen solution, 100 μ L NaOH 0.1N, 50 μ L PBS 10X, 100 μ L DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) and 50ng of VEGF or PBS) and mix thoroughly on ice. The 1 mL solution was deposited in a pre-heated 24-well plate and collagen was allowed to solidify at 37°C for ten minutes. Then, 30 μ L of medium was added to avoid drying the gel. Spheroids were photographed after 6-8h. The number and total length of all sprouts were counted for at least ten spheroids per condition with Metamorph software (Molecular Devices).

2.7 Mouse aorta ring assay

Mouse aorta ring were prepared following the method presented here (Baker et al., 2012). Briefly, thoracic aorta of 6-week old WT and CdGAP $-/-$ mice were dissected and 0,5 mm rings were prepared and serum-starved overnight in OptiMEM (Gibco Life Technologies). Rings were then embedded in Matrigel and cultured in OptiMEM 2.5% FBS and PBS or VEGF (50ng/mL). Medium was changed on day 4. At day 7, rings were photographed using a microscope. Area covered by sprouts was evaluated with the help of Metamorph Software (Moleculaar Devices).

2. 8 Capillary-like formation on Matrigel

Ice-cold Matrigel (BD Biosciences; 50uL/wells) was added to flat-bottom 96-well plates and allowed to solidify 1h at 37°C. HUVECs (2X10⁴ cells/wells) were seeded in duplicates on Matrigel and incubated for 4-6h at 37°C in non-supplemented M200 with 10ng/mL of VEGF. Pictures were taken using microscope at 40X magnification and length and number of sprouts were analysed using Metamorph Software.

2.9 Generation of CdGAP fl/fl and CdGAP $-/-$ mice and Genotyping

For targeting CdGAP, a single loxP site, containing an engineered EcoRV site, was inserted 177bp 5' of exon 1 and a loxP/FRT flanked Neo cassette, containing an engineered Spe1, was inserted 270bp 3' of exon 1. CdGAP fl/fl mice were in a mixed 129/SvEv X C57BL/6 hybrid genetic background. CdGAP ^{-/-} mice were generated by first crossing CdGAP fl/fl mice with mice expressing Cre recombinase under the Meox2 promoter (a gift from N. Saidah, IRCM), which is active as early as embryonic day 5 in epiblast-derived tissues. Meox2-Cre⁻; CdGAP^{fl/-} were intercrossed to generate Meox2-Cre⁻; CdGAP^{-/-} used in the study. Meox2-Cre⁻; CdGAP^{fl/fl} were used as controls. For genotyping, mice tail samples were lysed overnight at 55°C in direct tail lysis buffer (Viagen) supplemented with 60ug of proteinase K. Samples were then heated to 85°C for 2 minutes to inactivate the proteinase K, and crude lysates were cleared by centrifugation. These samples were subject to PCR analysis for genotyping. Deletion of exon 1 was assessed by PCR in PCR buffer (Zmtech) supplemented with 0.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 1uM primers flanking exon 1, and 0.04% DMSO; 1.56 units of Taq polymerase (Gentech) was used per reaction. Presence of the 5'LoxP site confirming floxed gene was determined by PCR in similar to the previous conditions with the addition of 0.5mM MgCl₂ to the reaction.

2.10 Immunohistochemistry and Immunofluorescence

E15.5 embryos were dissected and briefly visualized under dissection microscope (Zeiss Stemi 2000-C) while pictures were taken using a Zeiss Axiocam MRc camera. Embryos were then fixed in 4% PFA in PBS overnight at 4°C. The next day embryos were washed 3 times with PBS and either cryoprotected in 30% sucrose at 4°C for 3 days or paraffin-embedded and sectioned. Cryoprotected embryos were then embedded in OCT compound and snap frozen in 2-methyl butane at -30°C and stored at -80°C until sectioned. Sections were then either processed following standard hematoxylin Eosin (H&E) and Immunohistochemistry (IHC) protocols. Briefly, sections were put in xylene solution, followed by rehydration using solutions containing decreasing concentration of alcohol (100%, 95%, and 70%) and finally incubated in distilled water. Antigen retrieval for paraffin-embedded sections was done with Antigen Retriever (Vector labs; #H-3300). Antigen retrieval for cryosections was done by incubating slides in 10mM citrate (0.05%-Tween-20), pH 6.0 at 90°C for 20 minutes. Endogenous peroxidase was quenched when necessary on paraffin-embedded sections using methanol containing 3% hydrogen peroxide. Sections were washed 3 times with PBS followed by blocking in 5% horse serum for 1 hour. PECAM antibody was incubated overnight at 4°C. The next day, after 3 washes

with PBS-tween20 (0.05%), secondary antibodies conjugated to fluorophores were incubated for 1 hour at room temperature for immunofluorescence followed by 3 PBS washes. For IHC, biotinylated secondary antibodies were incubated for an hour at room temperature followed by signal amplification using the ABC kit (Vector, #PK-6100) and incubated with DAB Impact kit (Vector, #SK-00) for 5 min. Slides were mounted with per mount. Paraffin-embedded embryos were sectioned at 5 μm /section while cryosections were 14 μm . Sections were visualized using a Zeiss Imager M2 upright microscope and images obtained with a Zeiss AxioCam ICc5 camera.

2.11 Data Analysis

Statistical significance was evaluated with the Mann–Whitney *U*-test using Prism software (on GraphPad). The *p*-values of less than 0,05 were considered to be significant (* $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$) and standard deviation (SD) was calculated. Densitometric analyses were performed with the Quantity One 4.6.3 software (Bio-Rad). Densitometry of activated Rac1, Cdc42, phosphorylated proteins or associated proteins are reported on total respective protein. Graphs represent the mean densitometry done on at least 3 experiments.

3. Results

3.1 CdGAP $-/-$ mice exhibit incompletely penetrant embryonic lethality, edema, and vascular defects. To further understand the role and importance of the CdGAP protein, we generated CdGAP $-/-$ mice (Fig. 1A). We validated the complete loss of expression of CdGAP in mice by PCR (Fig. 1B) and Western Blot analyses of different organs such as lung, brain and heart (Fig. 1C). These analyses confirm the successful generation of CdGAP $-/-$ mice. Analysis of these complete CdGAP-depleted mice revealed that the CdGAP $-/-$ mice were not born at the expected Mendelian ratio, and that CdGAP $-/-$ embryos showed 44% embryonic/perinatal lethality (Fig. 1D). Whereas the Mendelian Ratio for embryos analysed at E15,5 was normal (Fig. 1D). Analysis of embryos at E15,5 demonstrated severe vascular defects (black arrows), multifocal progressive hemorrhaging of varying severity (white *) from ruptured blood vessels (white arrows) observed in CdGAP $-/-$ embryos which could lead to prominent subcutaneous oedema (black *) all observed in 70-90% of CdGAP $-/-$ embryos compared to none of these phenotypes observed in the fl/fl embryos counterparts (Fig. 1E, 1G). H&E analysis confirmed the severe oedema (Fig. 1F). The vascular defect phenotype of the CdGAP $-/-$ mice prompted us to pursue our analyses of CdGAP in this context.

3.2 CdGAP is important for angiogenesis in response to VEGF. Since CdGAP seems to have an important role in vascularisation, we evaluated the implication of CdGAP in the angiogenesis process. First, we examined angiogenic sprouting *ex vivo* in cultured aortic rings extracted from CdGAP fl/fl and $-/-$ littermates. These small sections of aorta were put on Matrigel in the presence or presence of VEGF. VEGF-induced growth of capillary sprouts from explants of mouse aortic rings isolated from CdGAP $-/-$ mice at 8 weeks of age was strongly impaired compared to CdGAP fl/fl mice. In all CdGAP fl/fl aortas (n=5 mice) a large number of sprouts were formed on the edge of each ring in response to VEGF (Fig. 2A,B), as opposed to rings from CdGAP $-/-$ mice, where less sprouts, and shorter ones extended from the edges of the mutant rings (Fig. 2A,B). Sprouting protrusions of endothelial cells from the aorta were measured and the VEGF-induced protrusions were completely inhibited in the CdGAP $-/-$ aortas (Fig. 2A,B). This experiment clearly demonstrates that CdGAP is a crucial protein to induce protrusions and to perform endothelial capillary formation in response to VEGF and thus prompted us to further explore the implication of CdGAP in the molecular mechanisms of angiogenesis, in particular, in VEGF signaling pathways.

3.3 CdGAP has an important role in migration and capillary formation of endothelial cells in response to VEGF. Vascular defects observed in CdGAP $-/-$ mice and loss of angiogenic sprouting from their aortas clearly suggest an important role of CdGAP protein in endothelial cells in response to VEGF. To better understand and further explore in which way CdGAP may controls different cellular mechanisms, and to explain the phenotypic observations resulting from its loss, we performed several *in vitro* experiments in cultured endothelial cells. Since, CdGAP is already known to be implicated in cellular motility in different contexts (LaLonde et al., 2006) (Y. He et al., 2011) (Southgate et al., 2011) and is known to modulate RhoGTPases, this suggests an impact on migration of endothelial cells which is a crucial step during angiogenesis. Therefore we examined whether CdGAP is implicated in the motility of endothelial cells in response to VEGF. Transfection of siRNAs targeted to CdGAP in endothelial cells (HUVECs), resulted in approximately 80% depletion of CdGAP expression (Fig. 3A, 3F and 5B). We evaluated CdGAP implication in the migration of endothelial cells in response to VEGF in a modified Boyden Chamber where we evaluated migration of endothelial cells in response to VEGF. A strong induction can be seen in CTL cells after VEGF stimulation, but CdGAP depleted cells had impaired migration, displaying almost 50% reduction (Fig. 3B and 3C

3.4 CdGAP depletion leads to defective sprouting angiogenesis of endothelial cells in response to VEGF.). As migration is a critical step to angiogenesis, we also evaluated the implication of CdGAP in angiogenesis *in vitro*, with capillary formation on Matrigel in response to VEGF. HUVECs cells grown on Matrigel will forms capillaries in response to VEGF, but CdGAP depleted cells showed a 50% reduced ability to sprout and form new capillaries compared to CTL cells (Fig 3D,E). Our results clearly demonstrate that CdGAP is important for endothelial cell migration and for capillary formation in response to VEGF. The initiation of an invasive tip cells through the existing environment forming a new capillary is one of the starting point of angiogenesis. Spheroids experiments reproduce the steps characterising angiogenesis including invasion, degradation of the matrix, and migration of the tip cells to protrude into the collagen environment and to form new sprouts. To validate the important implication of CdGAP in these endothelial cell processes in response to VEGF and its importance in invasive capacity, we evaluated sprouting angiogenesis from endothelial cell spheroids. A 3D organised structure of endothelial cells, was embedded in a collagen gel, and sprouting of capillaries from the spheroids were evaluated. In spheroids made from CTL endothelial cells, long protrusions emerge out of the spheroids in high numbers, in response to VEGF. Almost no induction in length or in number of sprouts can be seen in spheroids formed with CdGAP depleted cells (Fig. 4). These

results demonstrate the crucial implication of CdGAP to mediate many biological activities crucial to angiogenesis downstream of VEGF in a 3D environment.

3.5 VEGF activation of Rac1 and Cdc42 are not up-regulated in the absence of CdGAP. As our *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* experiments demonstrate a high implication of CdGAP in endothelial cells regulation in response to VEGF, we wanted to evaluate the molecular mechanisms controlled by CdGAP in this context. Endothelial cell motility in response to VEGF is controlled by RhoGTPases such as Rac1 and Cdc42 (Soga, Connolly, et al., 2001) (Soga, Namba, et al., 2001), which are both activated after VEGF stimulation in endothelial cells (Garrett et al., 2007). Rac1 is essential to induce sprouting angiogenesis *in vivo* (Connolly et al., 2002) (Soga, Connolly, et al., 2001) (Tan et al., 2008) (Sawada et al., 2008) (Vader et al., 2011). As a GAP protein, CdGAP is known to modulate the activation of Rac1 and Cdc42 (Lamarche-Vane & Hall, 1998) (Tcherkezian et al., 2005) (Tcherkezian et al., 2006), we initially evaluated their activation in endothelial cells after VEGF stimulation in CTL or CdGAP depleted cells. Endothelial cells transfected with CTL or CdGAP siRNAs (Fig. 5C) were submitted to GST-PBD pull down experiments to evaluate the fraction of active, GTP-bound Rac1 and Cdc42 GTPases in cells. However, in marked contrast to the reported function of CdGAP as a negative regulator of Cdc42 and Rac1 activities *in vitro*, we did not observed an increase of Rac1 and Cdc42 in CdGAP-silenced endothelial cells upon VEGF stimulation. VEGF could stimulate Rac1 and Cdc42 activation in HUVECs cells, as previously shown, but CdGAP depletion did not lead to an increase of Rac1 or Cdc42 activation (Fig. 5A,5B). We further noticed a small decrease of both Rac1 and Cdc42 activation in CdGAP depleted cells. CdGAP did not seem to have a major GAP activity towards Rac1 and Cdc42 in HUVECs cells in response to VEGF which suggest that CdGAP may regulate other signaling pathways downstream of phosphorylation or protein-protein interaction and not always signaling through its GAP domain. It is not clear yet what mechanism is involved here, but this may reflect the endothelial cell-specific regulation of CdGAP activity and/or function and thus prompted us to evaluate important VEGF signaling pathways to evaluate the importance of CdGAP in endothelial cells in response to VEGF.

3.6 CdGAP associates to VEGFR2 but doesn't control its tyrosine phosphorylation. Angiogenesis is mostly controlled under VEGF stimulation through the VEGFR2 receptor. As our results demonstrate the implication of CdGAP in the control of multiple biological activities in endothelial cells responsible for angiogenesis, we hypothesised that CdGAP could interact with VEGFR2. We

immunoprecipitated VEGFR2 in endothelial cells and could detect CdGAP associated with VEGFR2, which may explain, in part, the role played by CdGAP in endothelial cells (Fig. 6A). This association is also observed in 293 cells over-expressing VEGFR2 and CdGAP (Fig. 6B). Therefore we investigated the activation of VEGFR2 to evaluate if CdGAP could influence the activity of this receptor. Despite the loss of expression of CdGAP after siRNAs transfection, no reduction in phosphorylation is detected both on Y951 or Y1175 (Fig. 6C, 6D). So despite interacting with VEGFR2, CdGAP does not seem to directly act on its activation.

3.7 CdGAP is important for VEGF signaling and for tyrosine phosphorylation of the Gab1 scaffold protein. Our previous results revealed the implication of CdGAP in VEGF control of endothelial biology. To further investigate its implication in cellular signaling we evaluated the role of CdGAP in some of the important VEGF cell signaling seen in endothelial cells, such as Erk1/2, PLC γ , Akt, Shp2 and Pak4. With phosphospecific antibodies for each of these signaling proteins we demonstrated a clear and strong induction of all of these important downstream effectors in response to VEGF, but CdGAP depletion clearly affected negatively those signaling pathways. Some modest inhibition of phosphorylation of Erk1/2, PLC γ , Shp2 and Pak4 is observed and a near complete inhibition of Akt activation was detected (Fig 7A,B). All of these signaling pathways are known to be controlled by Gab1 tyrosine phosphorylated protein downstream of VEGF signaling (Dance et al., 2006) (Laramée et al., 2007) (Caron et al., 2009) (Caron et al., to be submitted 2014), and Gab1 is also known to be essential for *in vivo* angiogenesis (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (Shioyama et al., 2011). We hypothesised that tyrosine phosphorylation of Gab1 scaffold protein could be affected by the loss of CdGAP expression and thus explain in part the downregulated signaling. Immunoprecipitation of Gab1 revealed a high tyrosine phosphorylation induction in response to VEGF in CTL cells, in contrast to CdGAP depleted cells where Gab1 tyrosine phosphorylation was less induced (Fig. 7C). We also evaluated the association of p85 subunit of PI3K to Gab1, which is known to be regulated by Akt activation. The decrease of this association seen in CdGAP depleted cells also correlates with the important Akt inhibition observed in CdGAP depleted cells. Depletion of CdGAP expression with another siRNA also repeated this result validating the specificity of our CdGAP inhibition (Data not shown).

Our results thus clearly established the implication of CdGAP in Gab1 tyrosine phosphorylation that is required for complete VEGF signaling and since tyrosine phosphorylation of VEGFR2 doesn't

seem to be affected after CdGAP depletion (Fig. 6A, 6B) we could rule out the possibility that CdGAP is affecting VEGFR2 activation upstream of Gab1. These results thus clarify that Gab1 loss of tyrosine phosphorylation in CdGAP depleted cells isn't due to VEGFR2 lack of signaling. This validation implies that CdGAP acts upstream of Gab1 phosphorylation, but downstream of VEGFR2. Our results thus demonstrate that CdGAP is a novel regulator of VEGF-dependent signaling by promoting the tyrosine phosphorylation of Gab1, as well as the activation of several downstream pathways. Since these signaling pathways are essential mediators of VEGF-dependent survival and angiogenesis, (Caron et al., 2009) (Dance et al., 2006) (Laramée et al., 2007) (Y. Lu et al., 2011) (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) with our results that demonstrate that CdGAP is a novel regulator of VEGF-dependent signaling and angiogenic functions such as cell motility, cell invasion and sprouting capillaries, our data strongly suggests that CdGAP represents a crucial regulator of angiogenesis

4. Discussion

Although CdGAP is highly expressed in endothelial cells (van Buul et al., 2014) (Kusuhara et al., 2012) and that some link might have related CdGAP to important implication in endothelial cells such as vascular defects and coronary artery disease (Southgate et al., 2011) (Isrie et al., 2014) (L. Wang et al., 2007), the role of CdGAP has not yet been studied in this context. Here, we demonstrate, for the first time, the implication of CdGAP in vascular development, angiogenesis and endothelial cell signaling in response to VEGF. CdGAP $-/-$ mice present vascular defects such as hemorrhaging that leads to oedema and may be in part responsible for the partial embryonic lethality observed in CdGAP $-/-$ mice. CdGAP is crucial for sprouting angiogenesis from aortic explants, for sprouting of spheroids of endothelial cells, for *in vitro* capillary formation and for endothelial cell migration in response to VEGF. Surprisingly, depletion of CdGAP does not lead to an increase in Rac1 or Cdc42 RhoGTPases. We may explain these results by the loss of VEGF signaling in CdGAP depleted cells occurring downstream of Gab1 tyrosine phosphorylation. Overall the current study describes the essential *in vivo* regulation of angiogenesis by CdGAP as evidenced by impaired sprouting angiogenesis and attenuated *in vitro* regulation of endothelial cell motility in response to VEGF.

In this study, though we did not identify the exact cause of embryonic lethality in CdGAP $-/-$ mice, we believe that the vascular development defect, the systemic oedema and the hemorrhaging probably contributes to this early death. Hemorrhages observed in CdGAP $-/-$ mice may be explained with some of our *in vitro* observations in endothelial cells. A diminution in the activation of Rac1 is observed in CdGAP depleted cells and it has previously been demonstrated that a diminution in Rac1 activation in endothelial cells could lead to a loss of cell-cell junction leading to an increased vascular permeability (Wojciak-Stothard, Potempa, Eichholtz, & Ridley, 2001). This increase permeability could lead to hemorrhages in weakened blood vessels. This diminution in cell density could also explain the diminution of Gab1 tyrosine phosphorylation, since it has been demonstrated that cell density correlates positively with Gab1 tyrosine phosphorylation (Shinohara et al., 2001). The important phenotypes observed in CdGAP $-/-$ mice led us to investigate the uncharacterised role of CdGAP in endothelial cells. Our work revealed the contribution of CdGAP in the activation of Gab1 and its downstream signaling in endothelial cells in response to VEGF. Many similarities between CdGAP $-/-$

mice and Gab1 knock-out mice may explain our *in vitro* findings such as hemorrhages that occurs in both KO embryos (Itoh et al., 2000). Also, Gab1 and CdGAP mRNA presents similar pattern of expression in the developing embryo, as Gab1 is exclusively expressed in the heart from E10,5 to E13,5 (Itoh et al., 2000) and a high expression of CdGAP is also observed in the heart at E9,5 to E11,5 (Southgate et al., 2011). Gab1 KO mice are embryonic lethal at E13,5-E18,5 due to development defects of the heart, placenta, skin and skeletal muscles demonstrating Gab1 essential roles (Itoh et al., 2000) (Sachs et al., 2000).

AOS patients present some similarity with CdGAP $-/-$ mice. The highly branched and dilated blood vessels in the dorsal skin of the CdGAP $-/-$ embryo is reminiscent of the cutis marmorata telangiectasia phenotype observed in AOS patients. This syndrome could also correlate with some Gab1 KO mice phenotypes. AOS is characterised in part by skin defect which could correlate with Gab1 KO mice who present reduced epidermal thickness and Gab1 Δ PI3K KI mice who also presents reduced keratinocytes motility (Sachs et al., 2000) (Itoh et al., 2000) (Schaeper et al., 2007). Gab1 KO mice present many embryonic defects including heart and vascular abnormalities which are in part responsible for the death of the embryo (Sachs et al., 2000) (Itoh et al., 2000). Also, conditional specific loss of both Gab1 and Gab2 in cardiomyocytes present loss of post-natal cardiac function and present vascular inflammation and atherosclerosis (Nakaoka et al., 2007) (Higuchi et al., 2012). AOS patients also present vascular and cardiac abnormalities which may result in pulmonary hypertension.

AOS patients do also present terminal transverse limb defects (TTLD) which have been associated with CdGAP mutations (Southgate et al., 2011) (Isrie et al., 2014). CdGAP and Gab1 are both enriched at terminal limbs at around E11,5 to E13,5 (Southgate et al., 2011) (Itoh et al., 2000). Also, Gab1 loss of expression in CXCR4 KO mice accentuated impaired migration and survival of muscle progenitor in lower forelimbs at E10,75 (Vasyutina et al., 2005). Vascular impairment during embryogenesis has been proposed to lead to terminal limb defects in AOS patients by multiple studies (Algaze et al., 2013) (Swartz et al., 1999) (Maniscalco et al., 2005) (Piazza et al., 2004) (Zapata et al., 1995) (A. E. Lin et al., 1998) (Peralta-Calvo et al., 2012). This high similarity of protein enrichment and the similar defects observed in both KO embryos coincide with our link with these two proteins in VEGF signaling in endothelial cells and could contribute to a better understanding of this pathology.

In our evaluation, we shed light on some VEGF signaling pathways. As such, our results demonstrate the importance of CdGAP for Gab1 tyrosine phosphorylation and dependent signaling downstream of VEGF in endothelial cells. This loss in tyrosine phosphorylation could explain the implication of CdGAP in endothelial cell migration and capillary formation since the over-expression of Gab1 non-phosphorylated constructs in endothelial cells did abrogated endothelial cell migration (Laramee et al., 2007) and capillary formation (Y. Lu et al., 2011). In our analysis of downstream cell signaling of VEGF, some of the observed signaling inhibition is stronger than others. Akt phosphorylation presents a strong inhibition of phosphorylation after CdGAP depletion which could be explained by the loss of association of PI3K to Gab1. The stronger inhibition of phosphorylation of PLC γ than Erk1/2 may be explained by the reduction of PI3K activity. This diminution reduces PIP3 products on the membrane that are needed for the complete activation of PLC γ since it presents a PH domain able to bind to these PI3K products

Our analysis also revealed defects in Shp2 activation after CdGAP depletion. A Shp2 phosphatase defective mutation, T468M, is responsible for LEOPARD syndrome which presents craniofacial abnormalities and cardiac defects (Miura et al., 2013). Zebrafishes expressing this construct of Shp2 also present heart defect and cardiac oedema (Miura et al., 2013). Results thus indicate the importance of Y542 and Y580 non-phosphorylation for the cardiac abnormality and suggest the implication of Gab1 (Miura et al., 2013) (Cunnick et al., 2000) (Cunnick et al., 2002) (Cai, Nishida, Hirano, & Khavari, 2002). CdGAP depletion results in a loss of Gab1 tyrosine phosphorylation and a decrease of phosphorylation on Shp2 at Y542. Similar abnormalities are observed both in LEOPARD syndrome and CdGAP $-/-$ mice which could validate the importance of this Gab1-Shp2 signaling in vascular development impairment in CdGAP $-/-$ mice embryos. Also, the inhibition of Shp2 in mice, with the help of NSC87877, a Shp2 inhibitor, results in enhanced endothelial barrier and enhanced oedema in the lung, which is also observed in CdGAP $-/-$ mice (Grinnell, Casserly, & Harrington, 2010). A comprehensive study of affected signaling after CdGAP depletion is crucial to better understand its role in endothelial cell signaling.

Our results reveal a surprising positive role of CdGAP on Rac1 and Cdc42 activation in response to VEGF in endothelial cells, despite the earlier demonstrations in different contexts that CdGAP perform GAP activity towards these RhoGTPases (Lamarche-Vane & Hall, 1998) (Tcherkezian et al., 2006) (Y. He et al., 2011) (Southgate et al., 2011). It is becoming clearer that RhoGAP proteins do

present a lot more activity than only GTPase Activating Protein roles. Being a large protein, CdGAP presents many different domains that may interact with other proteins and perform many downstream signaling events via their interactions with other proteins such as Intersectin or Actopaxin (van Buul et al., 2014) (Tcherkezian & Lamarche-Vane, 2007) (LaLonde et al., 2006) (Jenna et al., 2002) (Primeau et al., 2011). Despite these results, we cannot clearly declare that CdGAP is important only for their activation and will not act as a GTPase Activating Protein. GST-PBD pull down assay do evaluate global changes in Rac1 and Cdc42 activation in cells and is not able to evaluate a punctuated localised modulation of RhoGTPases that may be present. One hypothesis could be that CdGAP still maintain a GAP activity properties in endothelial cells but in a precise small localisation in the cell which is a pool too small of Rac1 and Cdc42 RhoGTPases to be detected with our global techniques. Our results thus reveals an important contribution of CdGAP in VEGF signaling and reveal that CdGAP may have more implication than expected and may also regulates some signaling pathway downstream of its phosphorylation or its association with other proteins.

Despite some knowledge on few molecular pathways that control migration in endothelial cells, few GAP proteins have been studied in the endothelial cell context and in the control of angiogenesis although crucial understanding is much needed. It is known that some GAPs such as, ARHGAP24/p73RhoGAP, ARHGAP22/p68RacGAP, (which are the only two known GAPs specific to endothelial cells) and ARHGAP18/Senex are important to induce capillary formation and that mRNA expression of p73RhoGAP correlates with angiogenic conditions (Su et al., 2004) (Coleman et al., 2010) (Aitsebaomo et al., 2004). Despite some knowledge on GAP in angiogenesis, it seems clear that a lot of questions still remain since only a small portion of GAP proteins have been studied in this context. Our work thus brings novel insights in the implication of GAP proteins in angiogenesis context (van Buul et al., 2014). From the several studies performed in the analyses of GAP proteins in endothelial context all present a similarity in which their expression inversely correlates with the potential of capillary formation (p68RacGAP, Senex, CDC42GAP) or vessel density in Matrigel Plug implanted in mice (p73RhoGAP, DLC2) (Su et al., 2004) (Aitsebaomo et al., 2004) (Coleman et al., 2010) (Y. Lin et al., 2010) (Engelse, Laurens, Verloop, Koolwijk, & van Hinsbergh, 2008). They seems to all act in a negative way compared to our study which is thus the first one to validate the importance of a RhoGAP protein implicated in a positive way in the control of angiogenesis (Y. Lin et al., 2010) (Engelse et al., 2008) (Guegan et al., 2008) (Gambardella et al., 2010) (Su et al., 2004) (Coleman et al., 2010) (Aitsebaomo et al., 2004) (van Buul et al., 2014).

5. Conclusion

Our study presents the first results to demonstrate the role of CdGAP protein in endothelial cells. Analysis revealed that the CdGAP $-/-$ mice embryos present severe vascularization defects and prominent subcutaneous edema observed by E15.5. In addition, we demonstrated the essential role of CdGAP in the VEGF-dependent sprouting of capillaries. However, despite the fact that CdGAP is a negative regulator of Cdc42 and Rac1 *in vitro*, we unexpectedly found that activation of both proteins was reduced in CdGAP-depleted endothelial cells. We identified CdGAP as a novel regulator of VEGF-dependent signaling and angiogenic functions, promoting the tyrosine phosphorylation of Gab1, as well as the activation of several downstream pathways. Interestingly, CdGAP was identified as the first inherited factor associated with the Adams-Oliver syndrome, characterized by several deficiencies including limb defects and vascular anomalies. Under VEGF stimulation, CdGAP is important to activate some signaling pathways and to perform important biological activities like cell migration and cell invasion, to protrude new sprouts and to form new capillaries, to mediate angiogenesis. We demonstrate that CdGAP has new implication in endothelial cells, is an essential mediator of angiogenesis, and is crucial for adequate embryonic development including vascular development.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-77612) to I.R. C.C and P.F had support from the Institut du cancer de Montreal. C.C had studentships from Université de Montréal (Faculty of Graduate Studies). P.F has a studentship from FRQS (25988) and CIHR (292353). And we greatly acknowledge the support of the CRCHUM.

Figure legends

Fig. 1. CdGAP $-/-$ mice exhibit partially penetrant embryonic lethality, edema, and vascular defects. (A) Schematic drawing of the targeting strategy for the production of *CdGAP* conditional floxed (fl) mice. Primers (F1 and R1) for PCR assessment of *CdGAP* exon1 deletion (Δ exon1). (B) *CdGAP* $-/-$ mice were generated by crossing *CdGAP* fl/fl mice with mice expressing Cre recombinase under the *Meox2* promoter, which is active as early as embryonic day 5 in epiblast-derived tissues. Samples for PCR were prepared from *CdGAP* fl/fl, *CdGAP* fl/ $-$ and *CdGAP* $-/-$ mouse tails. Conditional allele-specific (1328 bp) and Δ exon1 allele-specific (321 bp) bands were detected. (C) Western blot analysis of *CdGAP* expression was performed using lung, brain and heart tissue lysates from *CdGAP* fl/fl and *CdGAP* $-/-$ mice. Tubulin was used as a protein loading control. *CdGAP* expression was absent in all tissues tested. (D) Breeding table from heterozygous intercrosses show that *CdGAP* $-/-$ were not born at the expected Mendelian ratio, and *CdGAP* $-/-$ embryos exhibited 44% embryonic/perinatal lethality. Numbers in parenthesis indicate the numbers of embryos (E.15.5) or born mice (P21). (E) At E.15.5, *CdGAP* $-/-$ whole embryos and brains displayed vascular defects with subcutaneous edema (*) and various degrees of subcutaneous hemorrhage (white asterisks). Arrows point to surface blood vessels in the fl/fl embryo, absent in *CdGAP* $-/-$ embryo. (F) H&E stainings of coronal sections of E15.5 *CdGAP* fl/fl and $-/-$ embryos. Note the extensive subcutaneous edema (*) and the reduced size of the lungs in *CdGAP* $-/-$ embryos. L, lung; H, heart. (G) Percentage of *CdGAP* embryos showing vascular defects, edema, and subcutaneous hemorrhage at E15.5.

Fig. 2. CdGAP promotes sprouting angiogenesis from mouse aortic rings. Capillary formation from mouse aorta rings are blocked in *CdGAP* $-/-$ mice in response to VEGF. Aortas from fl/fl and *CdGAP* $-/-$ mice were harvested, cleaned, sliced and serum-starved overnight. Aorta rings were embedded in Matrigel and cultured in medium containing either VEGF (50ng/mL) or PBS. A) At day 6, aorta rings were photographed. B) The sprouts-covered area surrounding aortas were calculated and results are presented graphically. Statistical significance was evaluated with the Mann-Whitney *U*-test and the p-values of less than 0,05 or equal were considered significant (***) $p \leq 0.001$ and standard deviation (SD) was calculated (n=5 ; five mice were used per condition, on different days).

Fig. 3. VEGF-induced migration and capillary formation is decreased by CdGAP depletion in HUVECs. A) Lysates of transfected cells were analysed by Western blot to evaluate CdGAP protein levels. B) Control or CdGAP-depleted HUVEC cells plated on gelatin-coated filters were subjected to a Boyden Chamber migration assay in the presence of VEGF (10ng/mL) for 6h. Representative images of filters after 6h of migration. C) Ratios of fold-induced migration of 4 experiments. D) HUVECs nucleofected with control and CdGAP siRNAs were trypsinized and plated on 50uL of solid Matrigel (in 96wells) for 6h. Photographs representative of CTL and CdGAP capillaries. E) Average length of capillaries formed by CTL or CdGAP depleted cells. F) Lysates of nucleofected cells were analysed by Western blot to evaluate CdGAP protein levels. Statistical significance was evaluated with the Mann-Whitney *U*-test and the p-values of less than 0.05 or equal were considered significant (* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$) and standard deviation (SD) was calculated (Three experiments were done in triplicates, and at least 3 pictures were taken/condition).

Fig. 4. VEGF-induced sprouting from endothelial spheroids is decreased by CdGAP depletion. HUVEC spheroids were formed and embedded in a collagen gel containing either VEGF or PBS. A) Representative photographs of spheroids 6h after embedding. B) Western blot analysis of CdGAP protein levels in siRNA nucleofected cells were evaluated. C) Total length of sprouts were calculated per spheroids and results are presented graphically D) as for the number of sprouts and results are presented graphically. Statistical significance was evaluated with the Mann-Whitney *U*-test and the p-values of less than 0.05 or equal were considered significant (** $p \leq 0.01$) and standard deviation (SD) was calculated (At least 10 spheroids/condition of 4 experiments).

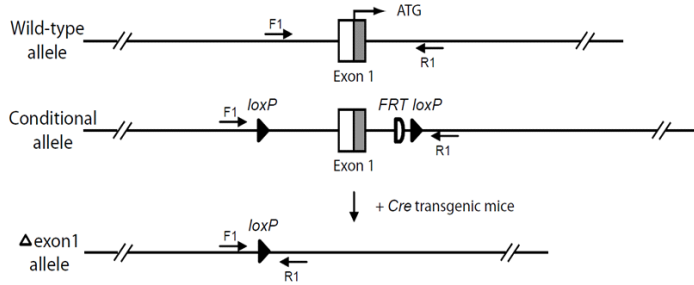
Fig. 5. VEGF induced Rac1 and Cdc42 activation is attenuated after CdGAP depletion in endothelial cells. HUVECs cell lysates were subjected to a Rac1 Assay by GST-pull down to specifically purify the active Rac1 and Cdc42 fraction in cells. A) Western Blot and graphical representation of densitometry analyses of GTPase pull-down showing the average level \pm SD of active Rac and B) active Cdc42 C) Total cell lysates showing efficient CdGAP depletion Statistical significance was evaluated with the Mann-Whitney *U*-test and the p-values of less than 0.05 or equal were considered significant (* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$) and standard deviation (SD) was calculated (n=5).

Fig. 6. CdGAP is associated to VEGFR2 and CdGAP depletion doesn't affect VEGFR2 phosphorylation. A) VEGFR2 immunoprecipitation reveals an association with CdGAP in endothelial cells. B) HEK293 cell lysates transfected with VEGFR2 and CdGAP shows association of both protein.

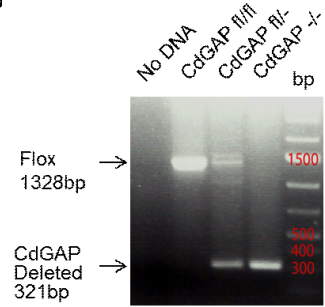
C) CdGAP depletion does not affect VEGFR2 tyrosine phosphorylation. Western blot of total cell lysates of CdGAP depleted cells were analysed for pVEGFR2. D) Graphical representations showing densitometry analyses of 3 or more experiments and standard deviation (SD) was calculated.

Fig. 7. VEGF-induced signaling and Gab1 Tyrosine phosphorylation is inhibited by CdGAP depletion. HUVECs cells were serum starved and stimulated for the indicated times with VEGF (50ng/mL). A) Western blot analyses of total cell lysates of nucleofected cells studied showing an inhibition in the activation of certain pathways such as Akt, PLC γ , ERK1/2, Shp2 and Pak4. B) Graphical representations showing densitometry analyses of 5 or more experiments. C) HUVECs cell lysates were subjected to Gab1 immunoprecipitation, followed by phosphorylation and p85 association revealed by Western blot. Statistical significance was evaluated with the Mann-Whitney *U*-test and the p-values of less than 0.05 or equal were considered significant ($*p \leq 0.05$) and standard deviation (SD) was calculated. Graphical representations showing densitometry analyses of 4 or more experiments.

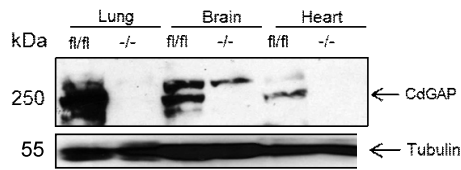
A



B



C

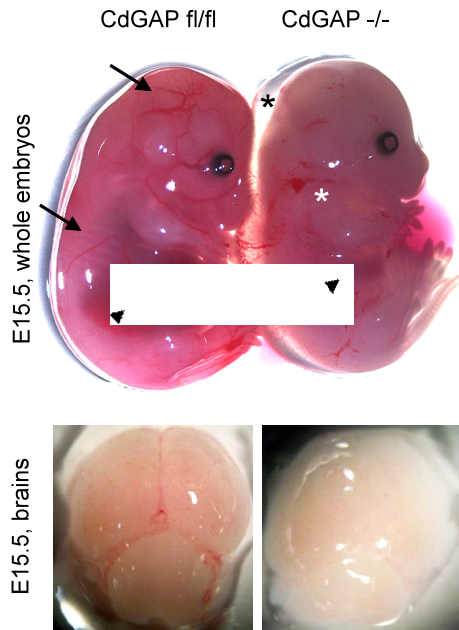


D

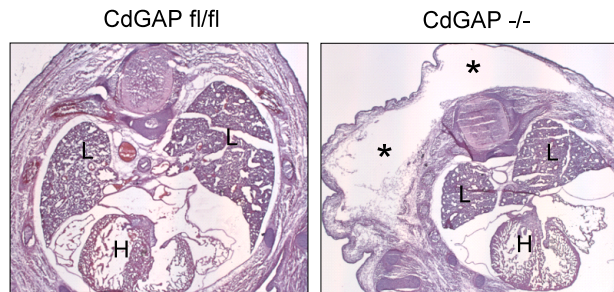
Genotypes of offsprings from CdGAP +/- intercrosses

Age	CdGAPfl/fl	CdGAPfl/-	CdGAP-/-
E15.5	24% (23)	54% (52)	22% (21)
P21	27% (98)	59% (214)	14% (51)

E



F



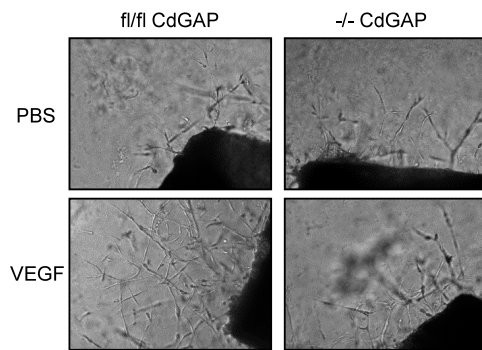
G

Phenotypes of CdGAP -/- embryos (E15.5)

	CdGAPfl/fl	CdGAPfl/-	CdGAP-/-
Vascular Defects	0%	20%	89%
Edema	0%	0%	77%
Superficial Bleeding	0%	3%	73%
Number of embryos analyzed	17	30	26

Figure 1: CdGAP $-/-$ mice exhibit partially penetrant embryonic lethality, edema, and vascular defects.

A



B

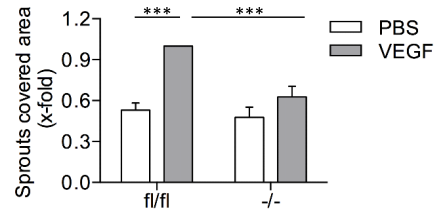


Figure 2 : CdGAP promotes sprouting angiogenesis from mouse aortic rings.

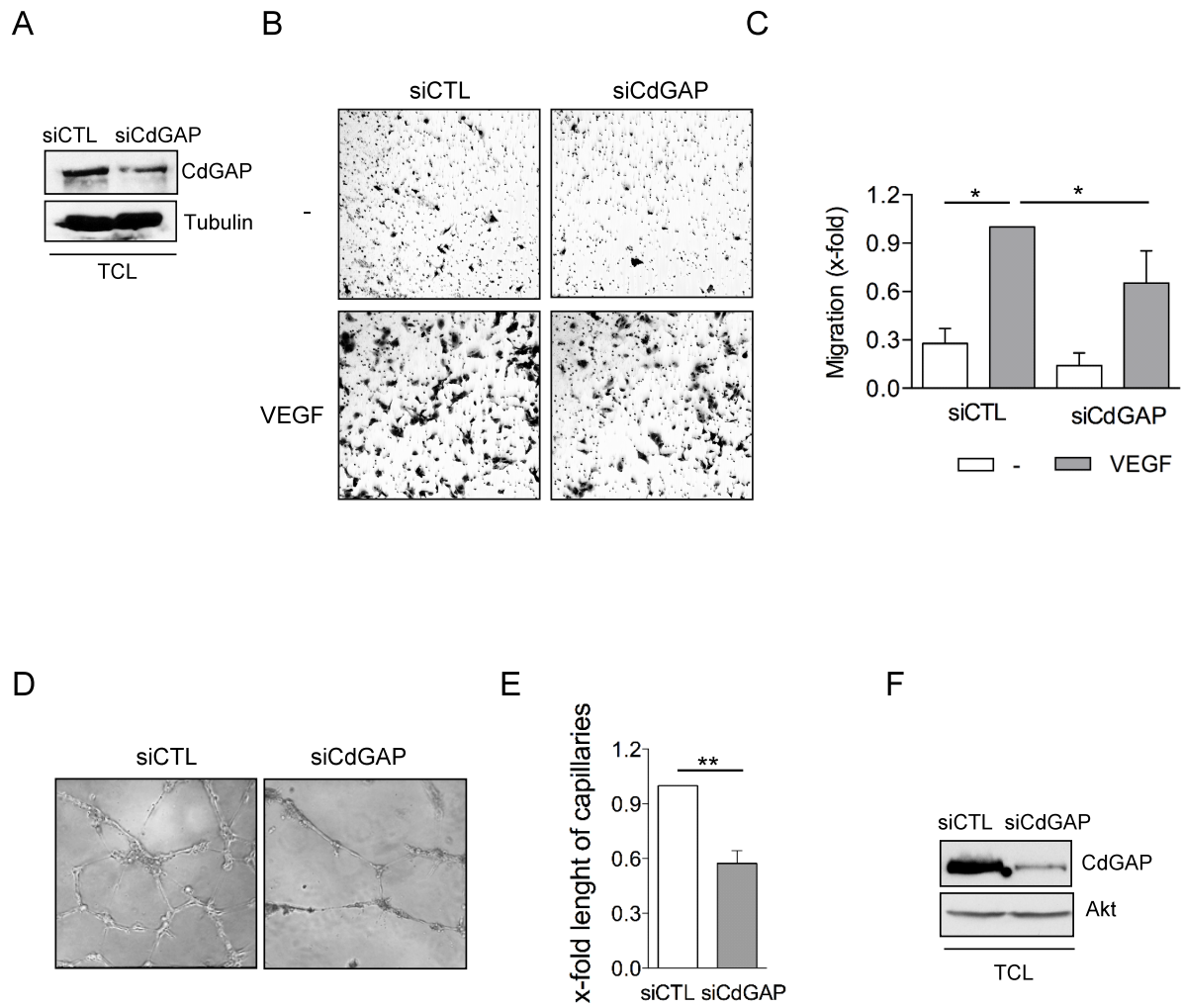


Figure 3 : VEGF-induced migration and capillary formation is decreased by CdGAP depletion in HUVECs.

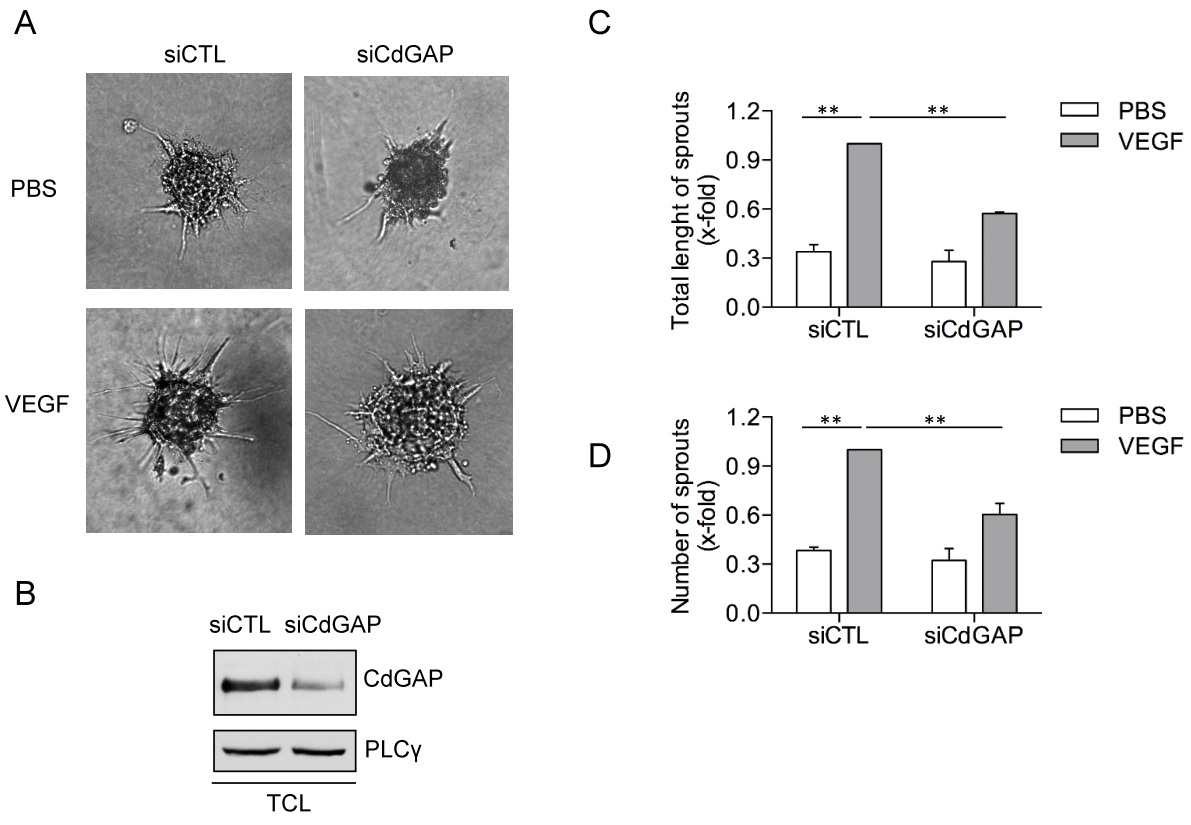


Figure 4 : VEGF-induced sprouting from endothelial spheroids is decreased by CdGAP depletion

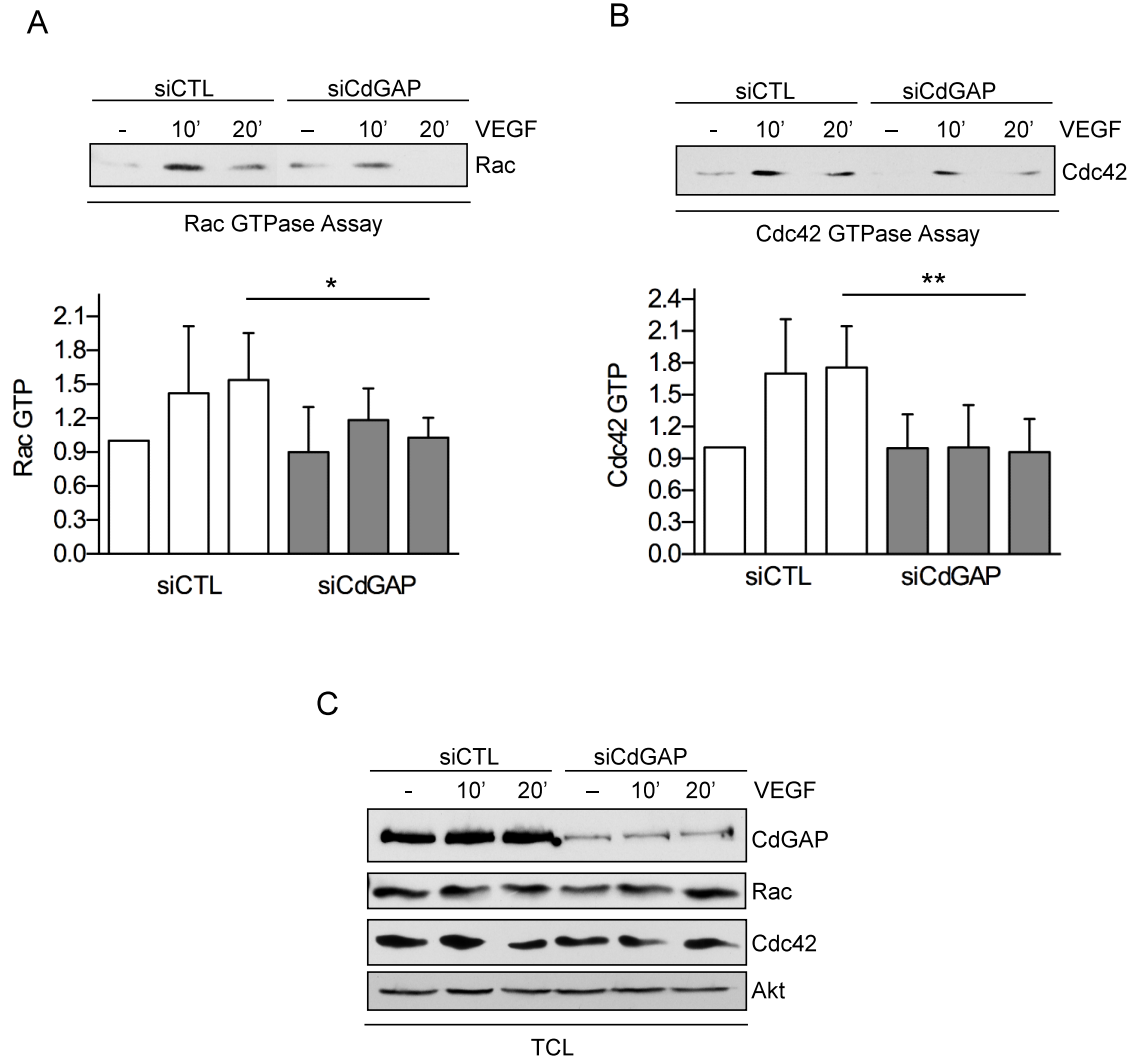


Figure 5 : VEGF-induced Rac1 and Cdc42 activation is attenuated after CdGAP depletion in endothelial cells.

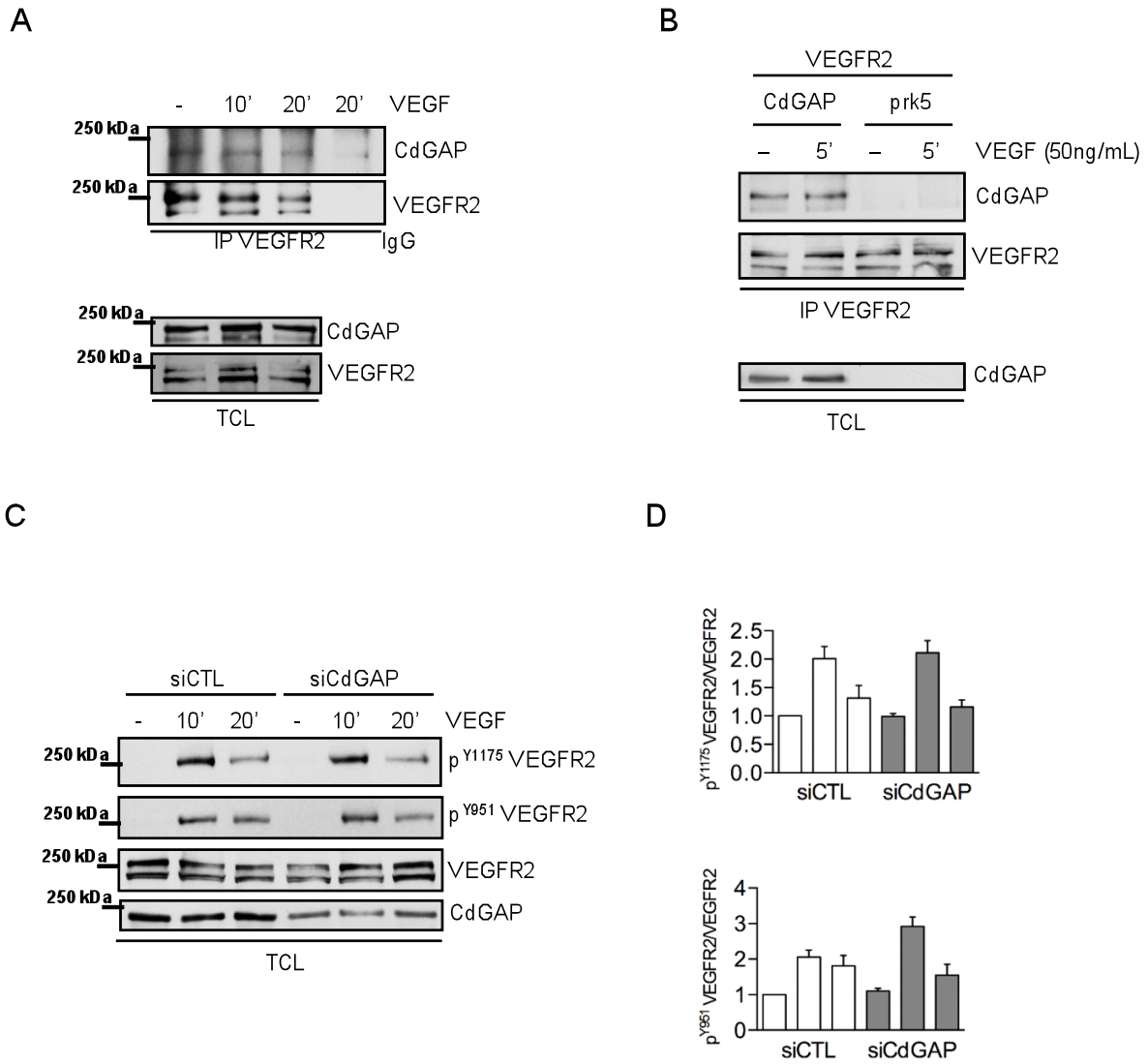


Figure 6 : CdGAP is associated to VEGFR2 and its depletion doesn't perturb its phosphorylation.

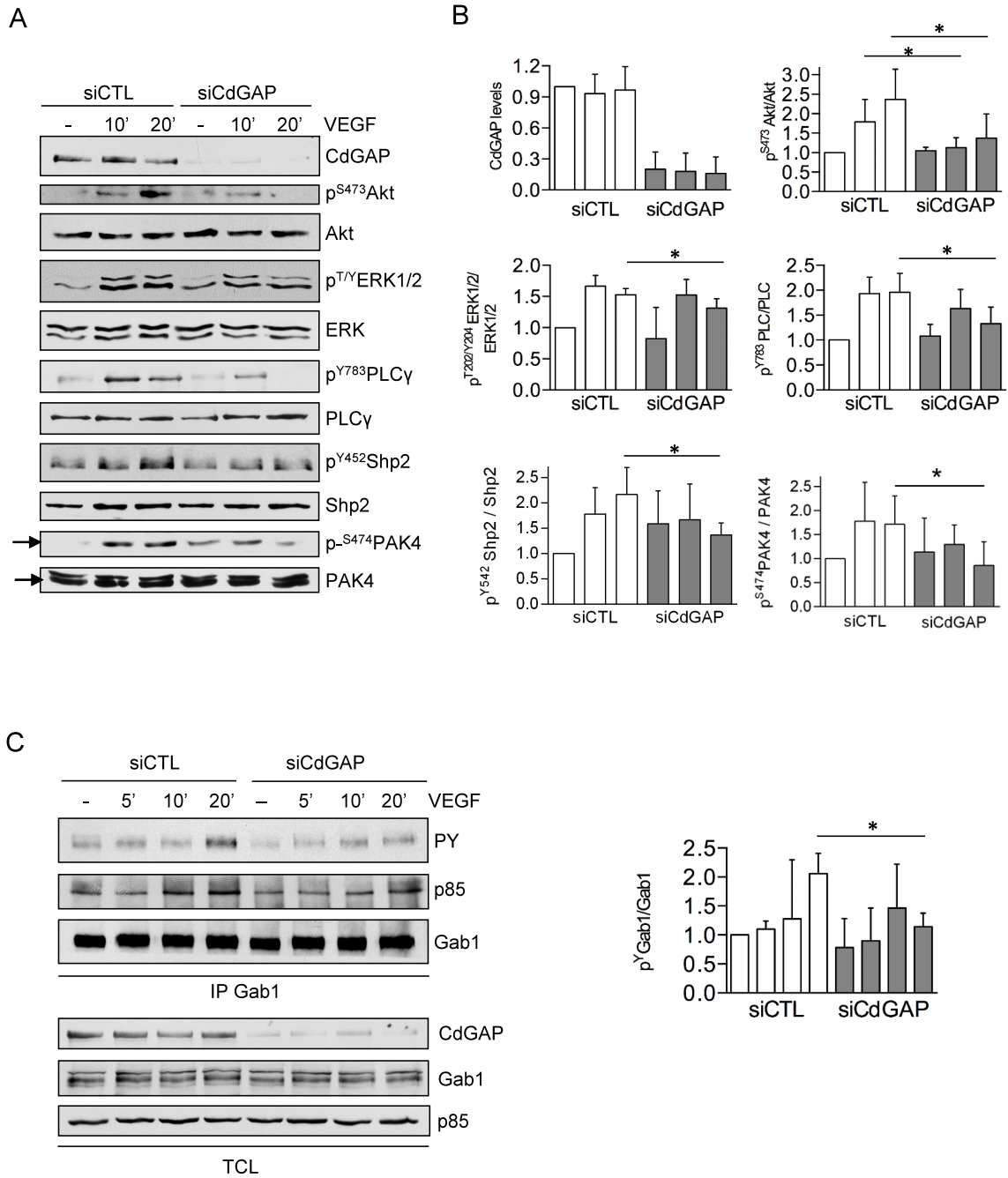


Figure 7 : VEGF-induced signaling and Gab1 tyrosine phosphorylation is inhibited by CdGAP depletion.

Chapitre 5 : Discussion

Le but de cette thèse était de mieux définir et d'approfondir les différents mécanismes moléculaires régulés en aval du VEGF dans les cellules endothéliales qui participent à l'angiogenèse. Nos efforts se sont concentrés sur l'étude et l'analyse de la famille des protéines d'échafaudage Gab, et sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui induisent l'activation des RhoGTPases et la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces différentes réorganisations d'actine permettent l'initiation de processus physiologiques essentiels à l'angiogenèse tels que la migration et l'invasion cellulaire.

Caractérisation du rôle de Gab2 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Nos connaissances initiales, lorsque j'ai débuté mon projet de doctorat, pouvaient laisser présager l'implication du second membre de la famille Gab, soit la protéine d'échafaudage Gab2, dans la signalisation du VEGF et dans l'angiogenèse. Il avait été démontré que Gab1 était impliqué dans la signalisation du VEGF et pouvait promouvoir l'angiogenèse *in vitro* (Laramee et al., 2007) (Dance et al., 2006). Nous avons démontré l'importance de Gab1 pour médier l'activation de voies de signalisation importantes pour l'angiogenèse telles que PLC γ , Src, Erk1/2, et Akt. Toutefois, l'inhibition partielle de ces voies de signalisations dépendantes du VEGF en absence de Gab1, suggérait l'implication potentielle de Gab2 dans ces différentes signalisations. Cependant nos travaux révélèrent que Gab2 agit de façon non-redondante à Gab1 dans la signalisation du VEGF, puisque l'inhibition de son expression résulte en une augmentation de ces différentes voies de signalisation, malgré le fait qu'il soit lui aussi impliqué dans l'induction de la migration VEGF-dépendante des cellules endothéliales. Aussi, nous avons démontré le rôle unique de Gab1 pour médier la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Nos résultats suggèrent donc que Gab2 est présent dans la cellule pour permettre une atténuation de la signalisation de Gab1 requise pour une cinétique adéquate de plusieurs voies de signalisation.

Nos résultats corrélerent avec certaines autres démonstrations puisque des résultats similaires ont aussi été obtenus dans les cellules endothéliales en réponse au HGF (Shiroyama et al., 2011). Suite à l'inhibition de l'expression de Gab2, on observe également une augmentation de la signalisation de Erk1/2 et de Akt en réponse au HGF, qui corréle avec une légère augmentation de l'expression de Gab1 (Shiroyama et al., 2011). L'étude de la signalisation dépendante de Gab2 dans les cellules

endothéliales en réponse au HGF *in vitro*, révèle des signalisations très similaires à celles contrôlées par le VEGF via Gab2 dans les cellules endothéliales (Shiroyama et al., 2011) (Caron et al., 2009). Ainsi, ces auteurs suggèrent eux aussi que Gab2 pourrait exercer un rôle inhibiteur de la signalisation Gab1 dépendante dans les cellules endothéliales, en réponse au HGF. En plus d'observer des résultats similaires au sein des cellules endothéliales en réponse à différents facteurs de croissances pro-angiogéniques (soit le VEGF et le HGF), un phénomène similaire est aussi observé à partir de lysats de cardiomyocytes (Nakaoka et al., 2007). Des lysats provenant de cœur de souris Gab2 KO présentent une plus grande phosphorylation sur tyrosine de Gab1 en réponse au facteur Neuréguline-1 (NRG-1 β) (Nakaoka et al., 2007). Ainsi, l'atténuation de Gab1 par Gab2 pourrait s'avérer être une signalisation nécessaire à une angiogenèse physiologique adéquate. Ces observations corrént avec le potentiel de Gab2 pour inhiber l'activité du facteur de transcription ELK-1, ainsi Gab2 pourrait réguler négativement des facteurs de transcription impliqués dans l'expression de Gab1 (C. Zhao et al., 1999). Une autre hypothèse est tout simplement que Gab2 pourrait favoriser le recrutement de certains régulateurs négatifs de la signalisation et qui en son absence une augmentation de la signalisation dépendante de Gab1 puisse donc être observée.

Malgré leurs rôles opposés sur plusieurs signalisations, les protéines Gab1 et Gab2 sont toutes deux importantes pour l'induction du potentiel migratoire des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Ceci peut s'expliquer par la modulation opposée de certaines voies de signalisation toutes deux impliquées dans la motilité cellulaire, tel que Erk1/2 et p38 (Rousseau et al., 1997). De plus, une signalisation soutenue n'est pas idéale pour une régulation adéquate de la migration cellulaire, elle nécessite une cinétique adéquate (Kholodenko, 2006). De cette façon, nos résultats démontrent un rôle essentiel pour Gab2 dans la migration cellulaire et ainsi, dû à l'importance de la migration des cellules endothéliales pour l'angiogenèse, nos résultats laissent croire à un rôle important de Gab2 dans l'angiogenèse. En ce sens, des expériences non-publiés de notre laboratoire, révèlent une angiogenèse défectueuse en absence de Gab2, tel que présenté à la figure 13. Ainsi, nos travaux suggèrent un rôle important de Gab2 dans l'angiogenèse. Toutefois, des expériences d'ischémie induite d'un membre postérieure suite à la ligature de l'artère fémorale dans la souris Gab2 KO ne laissent pas présager cette implication dans la régulation de l'angiogenèse post-natale, puisqu'aucun défaut de revascularisation ou aucune nécrose n'est observée (Shiroyama et al., 2011). Ils démontrent que la patte où la ligature a eu lieu, ne présente pas de nécrose et récupère aussi rapidement que la patte de la souris sauvage. Ils expliquent ce phénomène, entre autre, puisque la perte d'expression

de Gab2 en aval d'une stimulation au HGF ne modifie pas de la même façon les voies de signalisation modulées que suite à la perte d'expression de Gab1 (Shioyama et al., 2011). Malgré l'importance de leur démonstration, il est connu que l'angiogenèse nécessaire à cette revascularisation est médiée par plusieurs facteurs de croissance tel que le VEGF et aussi le HGF. Il a été démontré que Gab2 médie peu la signalisation du HGF (Lock et al., 2002). Ainsi, à la lumière de nos résultats, nous suggérons que Gab2, pourrait tout de même être impliqué dans l'angiogenèse physiologique, médiée par le VEGF et l'angiogenèse pathologique. Alors que nous avons démontré l'importance de Gab2 pour médier la migration cellulaire en réponse au VEGF, et qu'il est clairement démontré que la migration cellulaire est une des étapes clés de l'angiogenèse et qu'en plus nous démontrons son importance pour la formation de capillaires *in vitro*, nous trouvons ardu de dire que Gab2 ne soit pas impliqué dans les mécanismes angiogéniques. Nos résultats laissent croire à une implication possible de Gab2 pour la médiation de l'angiogenèse en réponse au VEGF. Des analyses supplémentaires telles que l'injection de « plug » de Matrigel chez la souris et la quantification du potentiel angiogénique suite à l'injection d'une tumeur et l'implication de Gab2 sur la perméabilité vasculaire nous permettrait d'avoir une meilleure vision et de clarifier son implication dans l'angiogenèse. Ainsi, avec nos connaissances actuelles il est difficile de conclure et de déterminer clairement le potentiel de Gab2 dans l'angiogenèse.

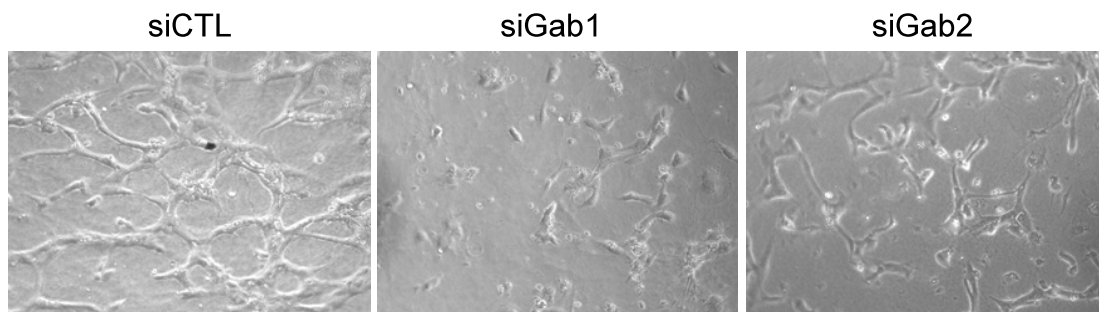


Figure 13 : La perte d'expression de Gab1 ou Gab2 diminue le potentiel de formation de capillaires sur Fibrine

(expérience effectuée par Mélanie Laramée)

Nous démontrons que Gab1 est essentiel pour médier la survie cellulaire en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales suite à l'activation des voies de signalisation d'Akt et du facteur de transcription FOXO. L'induction des voies de signalisations responsables de la survie des cellules

endothéliales est essentielle lors de la formation d'un nouveau capillaire sanguin. Nos résultats corrént avec des observations similaires en réponse à d'autres facteurs de croissances dans d'autres modèles cellulaires. (Holgado-Madruga et al., 1997) (Fan et al., 2001) (Le Goff et al., 2012) (Lamothe et al., 2004) (Mattoon et al., 2004) (Kiyatkin et al., 2006) (Fukumoto et al., 2009). Notre démonstration de l'importance de Gab1 pour induire la signalisation de Akt dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF, qui permet de médier la survie cellulaire est aussi appuyée par des résultats *in vivo*. Les cellules endothéliales provenant de la souris Gab1 ECKO, ou la diminution d'expression de Gab1 suite à la transfection d'ARNis, présentent une diminution de l'activation de Akt en réponse au HGF (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) et en une diminution de la survie cellulaire et une augmentation de la présence de caspase3 clivée en réponse au VEGF (Y. Lu et al., 2011). L'activation de Akt, et la survie cellulaire sont des processus essentiels à l'angiogenèse. Ainsi, des résultats similaires dans un modèle d'angiogenèse lors d'expériences d'ischémie chez la souris sont obtenus avec l'utilisation de modèle murin suite à la délétion de Gab1 au niveau des cellules endothéliales ou suite à la délétion de Akt (Ackah et al., 2005) (Y. Lu et al., 2011) (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011).

Ainsi, ces premiers travaux démontrent que, malgré que ces deux protéines d'échafaudage de la même famille partagent de nombreux rôles biologiques et permettent l'activation de mêmes voies de signalisation en réponse à certains facteurs de croissance, en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales Gab1 et Gab2 semblent détenir des fonctions non-redondantes ce qui s'avère essentiel pour la régulation de la réponse angiogénique. Ainsi, Gab2 semble être un atténuateur crucial de la signalisation Gab1 dépendante du VEGF.

La régulation des RhoGTPases en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales par la protéine d'échafaudage Gab1

Le laboratoire a démontré l'implication de Gab1 dans le remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de lamellipodes et la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Laramee et al., 2007). Lors de l'angiogenèse, ces événements sont essentiels à la formation d'un nouveau capillaire sanguin. Toutefois, malgré quelques connaissances sur le sujet, aucune étude d'envergure ne s'était penchée sur l'implication de Gab1 dans les différents mécanismes moléculaires régulés par le VEGF menant à l'activation des RhoGTPases qui permettront la réorganisation de l'actine. Le deuxième objectif de ma thèse était donc de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliquant Gab1 dans la régulation des RhoGTPases.

Nos travaux ont démontré l'importance de Gab1 pour l'induction de la phosphorylation activatrice de la GEF VAV2 en réponse au VEGF, qui mène donc à l'activation de la GTPase Rac, importante pour la formation de lamellipodes. Il s'agit d'une activation spécifique, puisque Gab1 semble à l'inverse atténuer la phosphorylation sur tyrosine de β -PIX et ainsi atténuer l'activation subséquente de Cdc42. Gab1 forme et localise à la membrane un complexe protéique avec la GEF VAV2, la Cortactine et la p120 Caténine qui s'avère essentiel à l'induction de la migration et l'invasion cellulaire grâce à son domaine PH. Ainsi, Gab1 est essentiel pour le potentiel invasif des cellules endothéliales et le bourgeonnement de protrusions à partir de sphéroïdes de cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Lors de cette étude, nous avons démontré en premier lieu l'importance de Gab1 pour activer la RhoGTPase Rac, en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales. Cette activation est médiée par la GEF VAV2 (Gavard & Gutkind, 2006) (Garrett et al., 2007). Nous démontrons que Gab1 est important pour induire la phosphorylation sur tyrosine activatrice de VAV2, que Gab1 est associé à VAV2 et qu'il induit une meilleure association de la p120 Caténine à VAV2 en plus de permettre leur localisation adéquate à la membrane. Il s'agit d'une des premières démonstrations de l'association de Gab1 à une GEF, ce qui démontre l'importance de Gab1 dans la régulation des RhoGTPases. Récemment une autre étude a pu caractériser l'association de Gab1 à une autre GEF, soit la GEF atypique DOCK7 (D. W. Murray et al., 2014). Tout comme nous, dans cette étude, l'association de Gab1 à la GEF (soit DOCK7, soit VAV2) permet d'induire le potentiel invasif des cellules. De plus, il a

aussi été démontré que Gab2 pouvait induire la phosphorylation sur tyrosine de VAV2, l'activation de Rac et la migration cellulaire (Herrera Abreu et al., 2011). Ainsi, l'association de Gab1 à une GEF semble être un mécanisme important pour l'activation de RhoGTPases et pour l'induction du potentiel invasif. Nos résultats amènent donc une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires empruntés par Gab1 pour induire l'activation de RhoGTPases. Nos résultats suggèrent aussi qu'il pourrait peut-être s'agir d'un mécanisme moléculaire utilisé par Gab1 pour médier l'activation des RhoGTPases et ainsi dans différents contextes Gab1 pourrait s'associer à différentes GEFs.

Nos travaux sont les premiers qui démontrent le rôle positif de Gab1 pour induire l'activation de la RhoGTPase Rac1 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. Toutefois, ce rôle pour Gab1 était déjà connu dans d'autres systèmes, tel que dans les cellules épithéliales en réponse au HGF (Abella et al., 2010) et en réponse à la thrombine dans les cellules vasculaires musculaires lisses (D. Wang et al., 2009). De plus, plusieurs évidences démontraient le rôle essentiel de Gab1 pour le remodelage de l'actine dans différents contextes qui permettent la génération de « dorsal ruffles », d'invadopodes et de lamellipodes (Paliouras et al., 2009) (Rajadurai et al., 2012) (Kallin et al., 2004) (Watanabe et al., 2006) (Watanabe et al., 2009) (Laramée et al., 2007). La diminution d'expression de Gab1, qui résulte en une diminution de l'activation de Rac, nous laisse présager un rôle central et crucial de Gab1 pour l'angiogenèse puisque plusieurs évidences *in vivo* démontrent le rôle essentiel de Rac1 pour l'angiogenèse chez la souris.

L'activation de Rac est un processus essentiel à l'angiogenèse. Lors de l'angiogenèse, l'invasion et la migration des cellules endothéliales s'avèrent des étapes cruciales à la formation du nouveau capillaire. La réorganisation du cytosquelette d'actine permettra ces différentes étapes. La délétion de Rac1 dans les cellules endothéliales chez la souris démontre l'importance de Rac1 pour l'angiogenèse en réponse au VEGF. (Tan et al., 2008) (Vader et al., 2011) (Connolly et al., 2002) (Bayless & Davis, 2002) (Cascone et al., 2003) (Davis & Bayless, 2003) (Davis et al., 2002) (Hoang et al., 2004) (Koh et al., 2008) (Sawada et al., 2008) (D'Amico et al., 2009) (D'Amico et al., 2010) (Bid, Roberts, Manchanda, & Houghton, 2013) Rac est donc essentiel au processus invasif du bourgeonnement lors de l'angiogenèse et Gab1, grâce à l'activation de Rac dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF, contribue grandement à ce phénotype.

Nos travaux révèlent l'importance de Gab1 et de sa signalisation en aval pour le potentiel invasif des cellules endothéliales en réponse au VEGF qui s'avère essentiel pour l'angiogenèse. Il s'agit d'une première démonstration du rôle important de Gab1 pour le potentiel invasif des cellules endothéliales qui, puisqu'il s'agit d'un phénomène essentiel à l'angiogenèse, corrèle avec l'importance de Gab1 dans l'angiogenèse *in vivo* (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) et nous permet de mieux comprendre certains mécanismes. L'importance de cette signalisation corrèle avec diverses publications qui révèlent le rôle individuel de ces protéines pour le potentiel invasif et pour l'angiogenèse telle que la Cortactine (Rajadurai et al., 2012) (Bryce et al., 2005) (Kirkbride et al., 2011) (Kaluzka et al., 2011), Pak4 (Paliouras et al., 2009) (Tian, Lei, Cammarano, Nekrasova, & Minden, 2009), VAV2 (Brantley-Sieders et al., 2009), et Rac1 (Tan et al., 2008). De plus, plusieurs signalisations régulées de façon positive par Gab1 en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales sont connues pour réguler positivement l'activation de la Cortactine et son implication dans l'induction du potentiel migratoire et invasif des cellules, tel que la phosphorylation de la Cortactine par la PI3K/Akt, par Src, par Erk1/2 et par Rac/Pak, ce qui corrèle avec le rôle important de Gab1 pour son potentiel invasif (MacGrath & Koleske, 2012) (X. Wu et al., 2014) (Martinez-Quiles et al., 2004).

En plus de démontrer le rôle important de Gab1 pour l'induction du potentiel invasif des cellules endothéliales en réponse au VEGF, nos travaux démontrent plus précisément l'importance du domaine PH de Gab1 pour la formation du complexe protéique avec VAV2 et la p120 Caténine et pour l'activation de Rac. Nos résultats corrèlent avec la démonstration de l'importance du domaine PH de Gab1 pour la localisation de Pak4 à la membrane cellulaire (Paliouras et al., 2009). De plus, en absence de son domaine PH, Gab1 est tout aussi bien phosphorylé sur tyrosine (Maroun, Moscatello, et al., 1999) (Chapitre 3) ce qui laisse présager l'importance de sa localisation pour l'induction de la signalisation en aval. De plus, la démonstration qu'une construction de Gab1 constitutivement associée à la membrane augmente l'activation de Rac (Maroun et al., 2003) corrèle aussi avec nos résultats. Ainsi, via son domaine PH, Gab1 est important pour médier l'activation de Rac1 qui mène à l'invasion, un processus essentiel à l'angiogenèse.

Malgré que nos études révèlent l'importance de Gab1 dans plusieurs phénomènes biologiques tels que la survie, la migration et l'invasion cellulaire, plusieurs de nos observations nous suggèrent que Gab1 pourrait aussi être impliqué dans plusieurs autres phénomènes biologiques

importants. Nos travaux ont permis de soulever certaines évidences qui laissent suggérer et anticiper que Gab1 puisse aussi être impliqué dans différentes signalisations et mécanismes moléculaires responsables de la formation de la lumière des vaisseaux sanguins ou de l'induction de la perméabilité vasculaire.

Nos travaux révèlent que Gab1 est spécifique dans son action sur les RhoGTPases puisqu'il agit différemment sur Cdc42 que sur Rac. Il s'agit d'une première démonstration du rôle de Gab1 sur l'atténuation de l'activation de Cdc42. De plus, malgré que plusieurs études démontrent clairement le rôle de la GEF VAV2 sur l'activation de la RhoGTPase Rac, peu d'études ont évalués le rôle de GEFs pour l'activation de Cdc42 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF, outre l'implication de ARHGEF15 (Kusuhara et al., 2012). Ainsi, nous démontrons pour une première fois l'importance de β -PIX pour l'activation spécifique de Cdc42 dans ce contexte. En plus de démontrer que Gab1 est important pour induire la phosphorylation de Pak4 en réponse au VEGF. Nos différents résultats suggèrent donc que Gab1 pourrait être fortement impliqué dans la polarisation cellulaire menant à la formation de la lumière des capillaires, puisque Cdc42 est crucial à ce phénomène (Tzima, Kiosses, del Pozo, & Schwartz, 2003) tout comme la kinase Pak4. D'autant plus probable, puisqu'il a été démontré que Gab1 peut s'associer aux protéines de polarité Par et qu'il semble donc être un régulateur de la polarité cellulaire épithéliale (Yang et al., 2012).

La polarisation cellulaire est contrôlée par le complexe de protéines de polarité Par/aPKC ζ qui peut être activé suite à l'association de Cdc42 actif (Etienne-Manneville, 2004, 2008; Etienne-Manneville & Hall, 2002, 2003a, 2003b; Etienne-Manneville et al., 2005; Peglion, Lense, & Etienne-Manneville, 2014). Ainsi, la GTPase Cdc42, est une protéine centrale pour la régulation de la polarité cellulaire et le contrôle de la migration polarisée suite à son activation au front de migration. De cette façon, Cdc42 est une GTPase essentielle pour la formation de la lumière des capillaires puisque son inhibition résulte en un défaut de formation de la lumière des vaisseaux (Koh et al., 2008).

Lors de la migration cellulaire, les cellules doivent acquérir une polarisation pour permettre une migration dirigée dans une direction précise. Il a été démontré que le complexe protéique PKC ζ / β -Caténine et le complexe des protéines de polarité Par, sont essentiels pour acquérir et maintenir cette polarité adéquate. La formation de ce complexe stabilise plusieurs liens cellules-cellules et induit une polarisation cellulaire. De plus, ces protéines pourront lier le MTOC, le centrosome et l'appareil de Golgi et ainsi réorienter les microtubules et donc permettre à la cellule de

se polariser dans le sens du front de migration. L'étude de la polarité cellulaire et de la migration polarisée des cellules endothéliales a démontré que la PKC ζ est importante pour médier l'activation de Rac et ainsi permettre la migration cellulaire via le complexe Par3/PKC ζ . La polarisation de la cellule meneuse est l'une des premières étapes franchies lors de l'initiation de l'angiogenèse. Le bourgeonnement initial de la cellule meneuse lors de la formation d'un nouveau capillaire *in vivo*, est ainsi perdu suite à l'inhibition de l'expression de PKC ζ , suite à l'injection de morpholinos chez le poisson zèbre (Oubaha et al., 2012). Ces différentes protéines, régulant la polarité cellulaire et sont aussi essentielles pour l'angiogenèse.

Lors de l'angiogenèse, différents processus sont essentiels pour mener à bien la formation du nouveau capillaire. Entre autre, une des étapes essentielles est la formation de la lumière du vaisseau. Lors de la formation du bourgeonnement, les cellules meneuses et les cellules de la tige vont permettre la formation d'un nouveau capillaire, la formation de la lumière doit se produire rapidement après les événements initiaux de ramification du réseau et seront pris en charge par les cellules de la tige. La formation de la lumière requiert entre autre la polarisation des cellules qui y participent. La lumière des capillaires se forment suite à une polarisation des cellules et de leurs jonctions cellulaires qui induit la formation de trous entre les cellules, l'initiation du flot sanguin va par la suite induire une pression sur les cellules endothéliales tapissant le nouveau capillaire et augmenter le diamètre de cette lumière (Davis et al., 2007) (Lizama & Zovein, 2013) (Iruela-Arispe & Davis, 2009) (Sacharidou et al., 2012) (Davis et al., 2011) (Schuermann et al., 2014).

Plusieurs protéines sont importantes pour activer les diverses voies de signalisation responsables de la formation de la lumière du vaisseau. Les protéines de polarité Par y joueront un rôle (discuté ci-haut) ainsi que la protéine Ser/Thr Kinase Pak4. Plusieurs études démontrent que Pak4 est essentielle à la formation de la lumière. Suite à son inhibition d'expression, l'établissement de la lumière du vaisseau est grandement diminuée (Koh et al., 2009) (Koh et al., 2008) (Davis et al., 2007). De nombreuses publications corrélerent avec son implication dans la formation de la lumière, puisqu'elles démontrent le rôle essentiel de Pak4 dans l'endothélium vasculaire particulièrement important lors de la vasculature et de l'angiogenèse. Par exemple, la délétion de Pak4 chez la souris et le poisson zèbre résulte en de nombreux défauts vasculaires. Chez la souris, la perte d'expression de Pak4 est létale au jour embryonnaire E11,5 à cause de défauts cardiaques majeurs (Qu et al., 2003) (Tian et al., 2009). De plus, il a été démontré que le micro ARN-24, qui cible et diminue l'expression de

Pak4, provoque des défauts vasculaires, et provoque l'apoptose endothéliale et diminue l'angiogenèse chez le poisson zèbre (Fiedler et al., 2011) (Law & Sargent, 2013).

Ces différentes associations aux protéines de polarité Par, à la phosphorylation de la kinase Pak4 et à l'inhibition de l'activation de la GTPase Cdc42, nous laissent donc présager que Gab1 pourrait être impliqué dans les mécanismes de formation de la lumière endothéliale puisqu'il est associé à différentes protéines qui sont elles-mêmes fortement impliquées dans ces mécanismes. De cette façon, Gab1 pourrait réguler une des étapes clés de l'angiogenèse ce qui permettrait ici encore d'expliquer son rôle essentiel dans l'angiogenèse *in vivo* (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011). Puisque Gab1 semble réguler de façon positive Pak4, alors qu'il semble plutôt réguler de façon négative Cdc42, de plus amples études sont nécessaires pour bien comprendre l'implication de Gab1 au niveau de la polarisation et de la formation de la lumière des capillaires.

En plus d'anticiper un rôle de Gab1 dans la formation de la lumière des capillaires, nous croyons que Gab1 puisse aussi être impliqué dans l'induction de la perméabilité vasculaire. Premièrement, nous avons démontré le rôle de Gab1 dans l'activation de la voie de signalisation VEGF-VAV2-Rac. Il a été démontré que la phosphorylation de la VE-cadhérine par la kinase Pak en aval de la voie de signalisation VEGF-Src-VAV2-Rac induit son internalisation et permet de cette façon la relâche des liens cellules-cellules qui initient l'induction de la perméabilité vasculaire (Gavard & Gutkind, 2006). Ainsi, en régulant cette voie de signalisation, en plus de réguler la migration cellulaire, Gab1 pourrait moduler la perméabilité vasculaire.

Deuxièmement, le remodelage et le relâchement des adhésions inter-cellulaires, suite à la stimulation du VEGF, sont requises pour induire la migration et l'invasion de la cellule meneuse lors de l'angiogenèse par bourgeonnement suite à la promotion de la perméabilité vasculaire (Eilken & Adams, 2010). Celle-ci est modulée suite à la phosphorylation par Src des différentes protéines formant ces jonctions, telle que la phosphorylation sur tyrosine des VE-cadhérines et des protéines des jonctions cellulaires associées comme la p120 Caténine et la β -Caténine (Esser, Lampugnani, Corada, Dejana, & Risau, 1998) (Potter, Barbero, & Cheresch, 2005) (Dejana et al., 2008) (Eliceiri et al., 1999) (Lampugnani, Orsenigo, Gagliani, Tacchetti, & Dejana, 2006). Gab1 s'associe à plusieurs de ces protéines comme la VE-cadhérine, la β -Caténine, la p120 Caténine en plus d'être aussi en complexe avec Src et le VEGFR2 et d'induire l'activation de Src en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales (Chabot et al., 2009) (Laramée et al., 2007) (Chapitre 3). Ainsi, la présence de Gab1 au

sein de ce complexe et son implication dans la régulation de l'activation de Src pourraient permettre de réguler la perméabilité vasculaire modulée par ces protéines aux jonctions cellules-cellules.

Troisièmement, la perte d'expression de Gab1 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF résulte en une diminution de la phosphorylation sur tyrosine de la Cortactine, connue pour être modulée en aval de Rac (Zebda et al., 2013) ce qui perturbe sa localisation. La perméabilité vasculaire peut aussi être modulée en réponse au HGF dans les cellules endothéliales HPAECs (Human Pulmonary Aortic Endothelial Cells) suite au recrutement et à la phosphorylation sur tyrosine de la Cortactine aux membranes des cellules ce qui module la barrière endothéliale suite à son association à la protéine IQGAP1 (Tian et al., 2014). De plus, l'étude de la souris Cortactin KO présente une augmentation de la perméabilité vasculaire comparativement aux souris sauvages ainsi, que l'étude *in vitro* de l'induction de la perméabilité vasculaire suite à la perte d'expression de la Cortactine (Schnoor et al., 2011). Ainsi, en modulant la phosphorylation et la localisation de la Cortactine, Gab1 pourrait être impliqué dans la perméabilité vasculaire à ce niveau.

Quatrièmement, nous avons démontré l'implication positive de Gab1 pour l'activation de Rac et de Pak. Rac est important pour l'induction de la perméabilité puisque la diminution d'expression de Rac1 dans les cellules endothéliales de la souris (Rac1 EC+/-) présentent moins d'activité de eNOS, ce qui résulte en une atténuation du bourgeonnement des aortes de souris et en une moins bonne revascularisation d'une patte ischémique (Sawada et al., 2008). De plus, l'utilisation *in vitro* de cellules endothéliales provenant de souris Rac1 ECKO présentent des défauts de perméabilité en réponse au VEGF (Tan et al., 2008). La génération de ROS, qui induit la phosphorylation sur tyrosine des VE-cadhérines en réponse au VEGF, est médiée par Rac, ce qui induit la perméabilité vasculaire (Monaghan-Benson & Burridge, 2009). Pak module lui aussi les jonctions cellules-cellules qui sont responsables de la perméabilité vasculaire. (R. A. Stockton, Schaefer, & Schwartz, 2004). Ainsi, en modulant l'activation de Rac en réponse au VEGF, Gab1 pourrait aussi moduler des voies de signalisations subséquentes qui sont importantes pour l'induction de la perméabilité vasculaire.

Cinquièmement, en réponse au VEGF et en réponse au stress induit par les forces de cisaillement, Gab1 permet l'activation d'une voie de signalisation de façon dépendante de Shp2 pour l'induction de Akt et PKA, pour médier l'activation de la protéine kinase eNOS responsable de la libération d'oxyde nitrique essentielle pour l'induction de la perméabilité vasculaire (Jin et al., 2005) (Dixit et al., 2005) (Y. Lu et al., 2011). Dans ces trois études, la perte d'expression de Gab1 mène à une

diminution de la signalisation de Akt et de eNOS, de plus, la capacité de Gab1 à former des capillaires est en partie médiée par l'activation de cette voie, puisque le sauvetage des cellules endothéliales provenant de souris Gab1 ECKO par une forme constitutivement active de eNOS permet de retrouver la génération de capillaires (Y. Lu et al., 2011). La protéine eNOS étant fortement impliquée dans l'induction de la perméabilité vasculaire et essentielle à l'angiogenèse (Fukumura et al., 2001), la démonstration qu'en réponse au VEGF, Gab1 module l'activation de cette kinase nous pousse à croire en l'implication de Gab1 dans ce phénomène. Nos différentes observations laissent donc entrevoir la possibilité de Gab1 dans la médiation de la perméabilité vasculaire de multiples façons.

Nous avons démontré l'implication de Gab1 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF dans l'activation de Rac, la migration cellulaire et l'invasion cellulaire, qui mène à la formation de capillaires. Gab1, en formant un complexe protéique avec la p120 Caténine, VAV2, la Cortactine, active ces protéines ce qui mène à l'activation de Rac et résulte en l'induction de la migration cellulaire et l'invasion cellulaire. Le domaine PH de Gab1 joue un rôle important dans la formation de ce complexe, dans l'activation de Rac, dans l'invasion cellulaire et le bourgeonnement de capillaires grâce à sa localisation à la membrane. Connaissant le rôle essentiel de Gab1 dans l'angiogenèse *in vivo* (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011), il est crucial de mieux caractériser et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires régulés par Gab1 dans les cellules endothéliales.

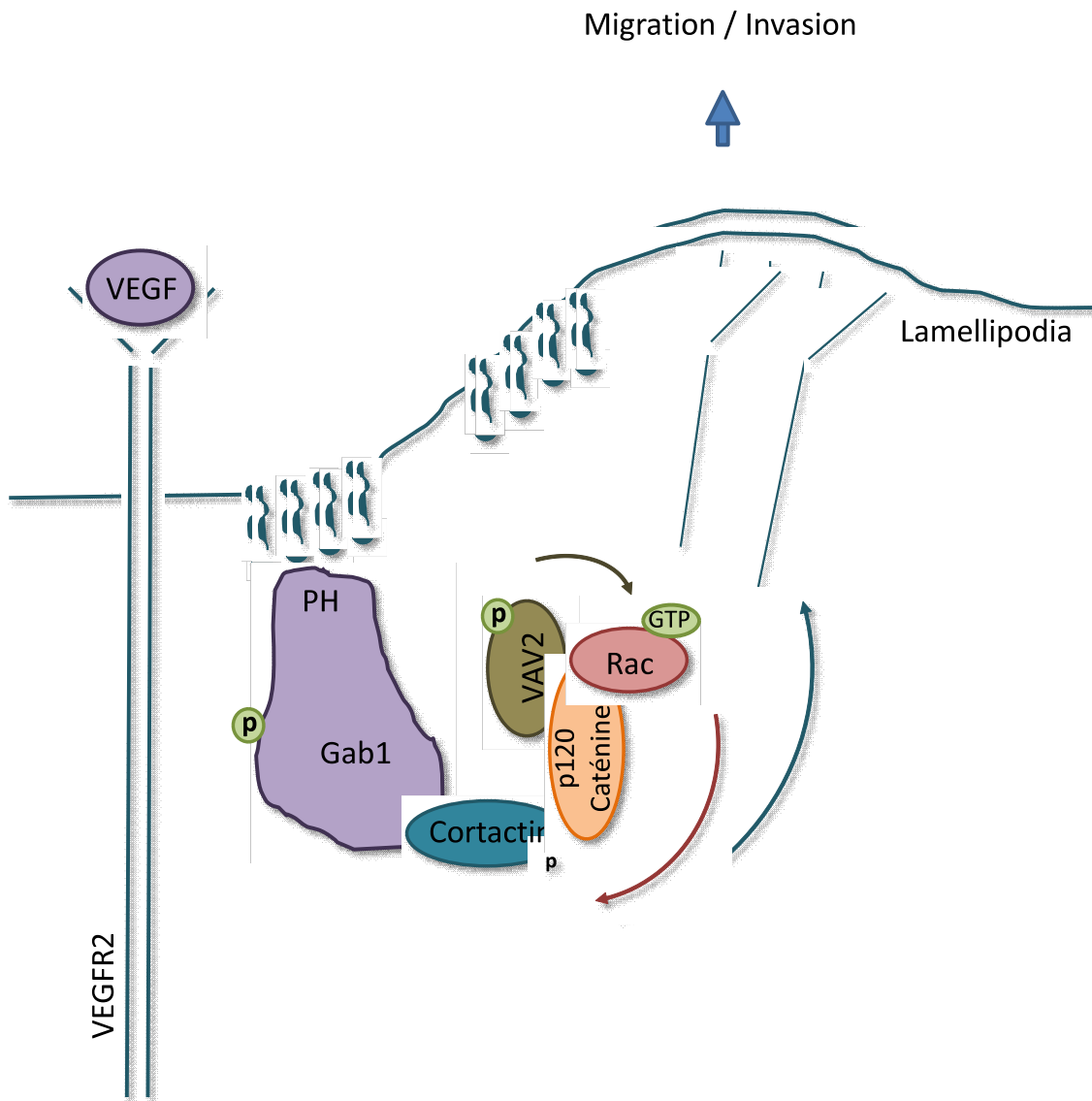


Figure 14 : Modèle

En réponse au VEGF, dans les cellules endothéliales, la protéine d'échafaudage Gab1 recrute un complexe de protéines à la membrane grâce à son domaine PH. Cette formation permet l'activation de la RhoGTPase Rac, la formation de lamellipodes, la migration et l'invasion cellulaire essentielle aux bourgeonnements de capillaires et à l'angiogenèse.

Implication de CdGAP dans le développement vasculaire et l'angiogenèse induite par le VEGF

Les GEFs et les GAPs sont impliquées dans le contrôle de l'activation des RhoGTPases qui régulent la réorganisation du cytosquelette d'actine et la morphogenèse. Nous avons précédemment démontré le rôle de Gab1 sur la GEF VAV2 et l'activation de la RhoGTPase Rac. Plusieurs faits nous ont portés à croire que Gab1 puisse être impliqué dans la signalisation de CdGAP dans les cellules endothéliales. Premièrement, Gab1 peut s'associer avec la GAP GC-GAP, de la famille CdGAP (C. Zhao et al., 2003). CdGAP est hautement exprimée dans les cellules endothéliales (van Buul et al., 2014). L'expression du gène encodant CdGAP corrèle avec une susceptibilité accrue de risque de maladies coronariennes (L. Wang et al., 2007). Des mutations gains de fonction du gène encodant CdGAP ont pu être identifiées dans le syndrome Adams-Oliver (Southgate et al., 2011) qui est entre autres caractérisé par des défauts vasculaires. Nous avons ainsi évalué pour la première fois, le rôle de CdGAP dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Notre étude sur la GAP CdGAP révèle que les embryons de souris CdGAP^{-/-} présentent des hémorragies, de l'œdème et des défauts vasculaires au jour embryonnaire E15,5. Ces défauts vasculaires semblent être responsable de la mort de souris CdGAP KO, puisque malgré un profil mendélien normal au jour E15,5, seulement 44% des souris CdGAP KO attendues vont naître. Nous avons identifié, que de façon surprenante, CdGAP est importante pour l'activation des GTPases Rac et Cdc42. De plus, en réponse au VEGF, CdGAP régule positivement la phosphorylation de Gab1 sur tyrosine et la signalisation cellulaire qui en découle, tel que Akt, Erk1/2 et PLC γ , sans affecter la phosphorylation sur tyrosine du VEGFR2. Ainsi, CdGAP semble être un régulateur important de la signalisation du VEGF dans les cellules endothéliales. Cette régulation corrèle avec l'importance de l'expression de CdGAP pour la promotion de diverses activités biologiques des cellules endothéliales telles que, la migration cellulaire induite par le VEGF, la formation de bourgeonnements à partir de cellules endothéliales formant de sphéroïdes, la formation de capillaires *in vitro* et la formation de capillaires *ex vivo* à partir d'aortes provenant de souris. Notre étude est donc la première étude à démontré l'importance de CdGAP pour l'angiogenèse.

Nos travaux démontrent que, contrairement au rôle de GAP déjà connu de CdGAP dans d'autres modèles cellulaires (Lamarche-Vane & Hall, 1998) (Tcherkezian et al., 2005) (Tcherkezian et al., 2006), dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF CdGAP n'agirait pas fortement comme une GAP.

Ce résultat pourrait être expliqué par l'importance que joue CdGAP sur la phosphorylation sur tyrosine de Gab1 et sur la signalisation qui en découle. Ainsi, nos résultats révèlent l'importance de CdGAP dans la régulation de la signalisation du VEGF. La signalisation altérée en absence de CdGAP en réponse au VEGF, peut suggérer plusieurs défauts biologiques qui pourraient entre autre être responsable du phénotype observé chez la souris CdGAP KO. La signalisation la plus atténuée en absence de CdGAP semble être celle de Akt, ce qui pourrait laisser présager un défaut de survie des cellules endothéliales, alors que l'atténuation de la voie Erk1/2-PLC γ pourrait laisser entrevoir un défaut de prolifération, qui a déjà été démontré dans un autre contexte cellulaire pour CdGAP (Y. He et al., 2011). Ces différentes analyses demeurent à être effectuées dans notre contexte pour en évaluer l'importance. De plus, malgré nos analyses effectuées dans les cellules endothéliales, rien n'exclut aussi l'implication de CdGAP dans d'autres contextes cellulaires qui pourraient aussi contribuer aux défauts vasculaires observés chez les souris CdGAP KO. Ainsi, la présence d'œdème visible chez les embryons de souris CdGAP KO pourrait aussi être expliquée par des défauts au niveau du système lymphatique (D'Amico et al., 2010).

Le syndrome Adams-Oliver est un désordre génétique rare avec une très faible prévalence. Les patients atteints de ce syndrome présentent de nombreux défauts entre autres, une aplasie cutanée circonscrite du cuir chevelu (ACC), des défauts des extrémités des membres (« Terminal Transverse Limb Defects » (TTLD)), des défauts vasculaires et du Cutis Marmorata Telangiectica Congenita. Des mutations dans le gène encodant CdGAP ont été identifiées chez des patients atteints de ce syndrome (Southgate et al., 2011) ainsi que chez des patients présentant les symptômes ACC et TTLD (Isrie et al., 2014). Ce syndrome est entre autre caractérisé par des défauts vasculaires, ainsi nos travaux sur l'implication du rôle de CdGAP dans les cellules endothéliales laissent fortement suggérer un rôle pour CdGAP dans le syndrome Adams-Oliver et ainsi nous permet d'expliquer une partie du phénotype observé.

En plus des mutations identifiées chez CdGAP, des études subséquentes pour le syndrome Adams Oliver ont aussi permis d'identifier des mutations dans le gène encodant la protéine RBPJ (Hassed et al., 2012). Il s'agit d'une protéine impliquée dans la voie de signalisation de Notch. Suite à sa liaison à son ligand Dll4, NOTCH subi plusieurs modifications menant au clivage de son domaine intracellulaire NICD « Notch intracellular domain » ceci entraîne sa translocation au noyau où il forme un complexe transcriptionnel actif suite à son association à la protéine de signalisation à l'ADN, RBPJ

(Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin J-kappa region) (High & Epstein, 2008). En plus des mutations identifiées dans le gène encodant RBPJ, l'analyse de dix familles atteintes du syndrome Adams Oliver, mais ne détenant toutefois aucune des mutations connues à ce jour, révèle que cinq d'entre elles présentent des mutations dans le gène Notch1 (Stittrich et al., 2014). La présence de mutations dans deux membres de cette voie de signalisation suggère une forte implication de cette voie dans ce syndrome. La voie de signalisation Notch1 est cruciale pour le développement, ce qui pourrait expliquer la troncation des membres et les défauts cardiaques présents chez les patients atteints du syndrome Adams Oliver. De plus, Notch1 est aussi crucial lors de l'angiogenèse par bourgeonnement et la perte de signalisation Notch1 résulte en une augmentation du bourgeonnement suite à une augmentation du nombre de cellules menseuses. Ainsi ce phénotype pourrait ressembler au cutis marmorata présent dans 20% des cas des patients atteints du syndrome Adams Oliver. Des résultats non-publiés obtenus par le laboratoire du Dr Nathalie Lamarche-Vane à McGill pourraient nous permettre de relier l'importance de CdGAP et de la voie Notch dans le syndrome Adams Oliver. Ces résultats révèlent que la perte d'expression de CdGAP résulte en une diminution au niveau ARN et protéique de Snail qui se retrouve dans la même voie de signalisation en amont de Dll4 et Notch1 (Z. Q. Wu et al., 2014). De plus, dans le contexte du rôle de Akt dans la régulation de Notch et de la contribution importante de CdGAP pour l'activation de Akt en réponse au VEGF, il est aisé d'émettre l'hypothèse de l'importance de CdGAP dans la voie de signalisation de Notch1 (Z. Q. Wu et al., 2014).

Ainsi, ces différentes évidences nous portent à postuler une implication importante de CdGAP dans la régulation de la voie Notch1, au sein du syndrome Adams Oliver et au sein des cellules endothéliales et de l'angiogenèse pourrait avoir lieu. Une meilleure caractérisation de ces mécanismes moléculaires apporterait de multiples explications dans ces deux contextes. Les souris CdGAP KO présentent certains défauts qui pourraient être très similaires à certains des défauts présents lors du syndrome Adams-Oliver et qui peuvent être reliés à la voie Notch1. Les embryons de souris CdGAP KO présentent des hémorragies, de l'œdème et un réseau vasculaire mal développé présentant une haute ramification de micro-vaisseaux sanguins qui pourrait ressembler au cutis marmorata telangiectica congenita et à une surproduction de cellules menseuses suite à l'inhibition de Notch1. De plus, l'inhibition de l'expression de CdGAP dans les cellules endothéliales résulte en une diminution de l'activation de Akt. Ainsi, des mutations dans le gène encodant CdGAP ont été identifiées chez des patients atteints du syndrome Adams Oliver. Toutefois, il n'avait pas été

démontré si CdGAP muté était responsable de certains des phénotypes caractérisant ce syndrome, dont la présence de divers défauts vasculaires. Ainsi, nos travaux démontrent l'implication importante de CdGAP dans les cellules endothéliales à différents niveaux et suggèrent que CdGAP pourrait être responsable d'une partie du phénotype observé chez les patients atteints de ce syndrome.

Thérapies anti-angiogéniques et cibles potentielles

Des thérapies anti-VEGF sont utilisées depuis un certain nombre d'années dans le traitement de certaines pathologies telles que de nombreux cancers et la dégénérescence maculaire (Ferrara, 2010) (Ferrara & Kerbel, 2005) (Welti et al., 2013) (R. K. Jain & Carmeliet, 2012) (De Bock, Cauwenberghs, & Carmeliet, 2011) (De Bock, Mazzone, & Carmeliet, 2011) (Potente et al., 2011) (Carmeliet & Jain, 2011b) (Carmeliet & Jain, 2011a). Pour mieux comprendre le rôle du VEGF *in vivo*, des anticorps neutralisants le VEGF ont été développés. De cette façon, en 1993 l'administration de ces anticorps au sein de souris immunodéficientes ont pu largement diminuer la taille de plusieurs tumeurs suite à l'injection de différentes lignées cellulaires tumorales démontrant ainsi l'importance de l'angiogenèse pour la croissance tumorale (K. J. Kim et al., 1993). Ce qui a aussi été confirmé par la suite avec plusieurs autres modèles tumoraux avec différents inhibiteurs du VEGF (Ferrara, 2002). En plus de pouvoir être utilisé dans le contexte du cancer, des thérapies ciblant l'angiogenèse pourraient aussi être utilisées dans le cadre d'autres pathologies tels que des rétinopathies (Aiello et al., 1994). Ainsi, un anticorps monoclonal humanisé contre le VEGF, le Bevacizumab a pu être développé (L. G. Presta et al., 1997) et depuis plusieurs démonstrations ont pu mettre l'accent sur l'importance du VEGF comme régulateur de l'angiogenèse. Le Bevacizumab a donc été le premier inhibiteur du VEGF à être approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) en 2004 suite à des résultats positifs obtenus chez des patients atteints de carcinomes colorectaux métastatiques (Hurwitz et al., 2004) (Ferrara, 2009). Dans un certain nombre de cas, l'utilisation de ces traitements va permettre de prolonger la vie des patients de l'ordre de quelques semaines à quelques mois et pourra aussi augmenter la vision des patients atteints de dégénérescence maculaire (Potente et al., 2011). L'utilisation de ce type de thérapies est présentement utilisé entre autres, lors de cancers du col utérin métastatiques, cancers colorectaux métastatiques et carcinomes rénaux métastatiques en combinaison avec de la chimiothérapie (Bevacizumab) et tumeurs pancréatiques, cancers du rein et tumeurs stromales gastrointestinales (Sunitinib) et cancer de la thyroïde, cancer du foie et cancer du rein (Sorafenib). L'utilisation de traitements anti-VEGF présente des bénéfices thérapeutiques dans de nombreuses situations. Toutefois, dans certains cas, ces bénéfices peuvent être transitoires et ainsi, la croissance et la progression tumorale reprendra après un certain laps de temps (Bergers & Hanahan, 2008). Ainsi, dans certains cas, l'inhibition du VEGF, malgré une réduction de la taille tumorale de façon

initiale, va par la suite promouvoir le potentiel invasif et métastatique de celle-ci (Ebos et al., 2009) (Ebos & Kerbel, 2011) (Paez-Ribes et al., 2009). Toutefois, ces divergences peuvent s'expliquer de plusieurs façons.

Les résultats positifs peuvent être expliqués puisque ces traitements inhibent l'expansion des vaisseaux tumoraux en bloquant le branchement vasculaire. De plus, ils peuvent induire la régression de vaisseaux tumoraux pré-existants. Ils peuvent aussi sensibiliser les cellules endothéliales à la chimiothérapie ou à la radiothérapie, puisque ces dernières ne sont plus aptes à induire les signalisations pro-survie qui sont habituellement modulées par le VEGF (De Bock, Cauwenberghs, et al., 2011; De Bock, Mazzone, et al., 2011). De plus, les vaisseaux tumoraux sont de nature anormales sur tous leurs aspects autant structurels que fonctionnels et présentent une forte hétérogénéité, une tortuosité, un branchement chaotique et une lumière des vaisseaux inégale. Ainsi, les vaisseaux tumoraux anormaux sont un facteur limitant pour l'apport des agents anti-tumoraux au sein de la tumeur. De cette façon, les traitements anti-VEGF pourraient de façon transitoire normaliser la vasculature tumorale et de cette façon permettre une meilleure présence de la drogue à la tumeur (R. K. Jain, 2005b) (R. K. Jain, 2005a) (R. K. Jain, 2005b). De plus, certaines cellules tumorales peuvent exprimer elles-mêmes à leurs surfaces des récepteurs pour le VEGF, elles pourraient donc être également des cibles de ces traitements anti-VEGF.

À l'inverse, les résultats négatifs peuvent quant à eux être expliqués comme suit. Les vaisseaux sanguins qui permettent l'irrigation de certaines tumeurs, même initialement, répondent déjà à d'autres facteurs que le VEGF. Dans ces cas, l'utilisation de traitements anti-VEGF ne donnera pas les résultats escomptés puisque ces cellules ne seront pas aptes à répondre à ces traitements. Dans d'autres situations, les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur vont plutôt acquérir une résistance avec le temps, et vont poursuivre leur croissance angiogénique en répondant à d'autres facteurs de croissance plutôt que le VEGF. De plus, l'utilisation de ces traitements, crée un environnement hypoxique, qui peut créer un environnement pro-inflammatoire non désirable (Ebos & Kerbel, 2011) (Ebos & Kerbel, 2011) (Welti et al., 2013) (De Bock, Cauwenberghs, et al., 2011; De Bock, Mazzone, et al., 2011) (Carmeliet & Jain, 2011a, 2011b) (R. K. Jain & Carmeliet, 2012). Aussi, des facteurs de croissance peuvent être générés entre autre par les cellules tumorales (Leite de Oliveira, Hamm, & Mazzone, 2011). Par exemple, le traitement de souris avec un anticorps anti-VEGFR2 résulte en premier lieu à une diminution initiale de la vascularité

entourant la tumeur, mais est suivi d'un rebond vasculaire et d'une sur-expression du facteur de croissance FGF plutôt que le VEGF (Casanovas, Hicklin, Bergers, & Hanahan, 2005). Un plus grand niveau d'expression de FGF est aussi observé suite à un traitement à l'inhibiteur du VEGFR2, AZD2171 (Batchelor et al., 2007). Le facteur PlGF est quant à lui aussi augmenté dans la circulation suite à un traitement au Sunitinib (Rini et al., 2008) (Claesson-Welsh, 2012) (Claesson-Welsh & Welsh, 2013) (Tugues, Koch, Gualandi, Li, & Claesson-Welsh, 2011). Les cellules endothéliales peuvent donc acquérir certaines capacités leur permettant de répondre à d'autres mécanismes compensatoires tel que d'autres facteurs de croissance comme le FGF, SDF1, Ephrin, Angiopoïétin ou PDGFB (Crawford et al., 2009) (Casanovas et al., 2005) (Orimo et al., 2005). De cette façon, une évaison peut avoir lieu et une progression tumorale peut reprendre après un certain temps malgré l'utilisation de traitements anti-VEGF.

L'angiogenèse peut être ciblée dans différents contextes pathologiques. Dans le cas du cancer, diminuer la vascularisation de la tumeur en contrant l'angiogenèse pourrait nuire à la croissance tumorale en plus de diminuer l'évasion de métastases. Alors qu'au contraire, l'augmentation de l'angiogenèse ou la revascularisation dans le cas de maladies cardiaques pourrait s'avérer bénéfique pour les patients atteints de ces pathologies. Les traitements anti-VEGF ont à la base été développés pour sevrer les tumeurs en empêchant le recrutement de vaisseaux sanguins. Par conséquent, nous devons repenser une meilleure stratégie. Ainsi, une approche anti-angiogénique nous permettrait plutôt que de cibler un seul facteur de croissance, tel que le VEGF, qui peut générer une résistance via l'utilisation d'autres facteurs de croissance pro-angiogéniques, de cibler une même protéine qui agit en aval de plusieurs récepteurs pro-angiogéniques pour ainsi tenter de diminuer la résistance souvent développée dans ces traitements. Cette stratégie pourrait être envisagée comme une avenue plus prometteuse en diminuant la résistance.

La migration et l'invasion des cellules endothéliales induites suite à l'activation des RhoGTPases à un fort potentiel pro-angiogénique. Dans le génôme humain on dénombre vingt RhoGTPases, plus de 80 GEFs et plus de 70 GAPs identifiées à ce jour. Il s'agit d'un très grand nombre de composantes de la famille « Rho ». Les GEFs et les GAPs sont souvent spécifiques à un type cellulaire précis, à une RhoGTPase en particulier ou elles répondent uniquement en réponse à certains facteurs de croissance. Ainsi, ce vaste éventail de protéines démontre de façon éloquentes les différentes interactions possibles qui mènent à un grand nombre de phénomènes bien précis. Les RhoGTPases

sont essentielles à bon nombre de phénomènes physiologiques. Ainsi, dans le contexte d'une réponse physiologique définie, l'inhibition totale d'une RhoGTPase pourrait mener à beaucoup d'effets indésirables. Toutefois, s'il était possible de cibler une RhoGTPase à un endroit et à un temps précis, il serait plus aisé d'éviter ces effets indésirables. De cette façon, l'utilisation de GEFs ou de GAPs, en tant que cibles thérapeutiques, nous permettrait de cibler de façon plus précise notre action. La possibilité d'inhiber de façon spécifique une de ces voies de signalisation pourrait être grandement bénéfique. D'où l'intérêt de mieux connaître les différents mécanismes moléculaires qui les régulent et l'importance de cibler les GEFs, et les GAPs qui agissent de façon spécifique en temps et en lieu plutôt que d'inhiber, ou de cibler directement les RhoGTPases qui agissent parfois de façon plus générale.

Lors de notre étude des mécanismes moléculaires régulés par Gab1 pour mener au remodelage de l'actine (Chapitre 3), nous démontrons la spécificité d'action des GEFs. En réponse au VEGF, la GEF VAV2 agit de façon spécifique sur la RhoGTPase Rac, tandis que la GEF β -PIX agit, elle aussi de façon spécifique, sur la RhoGTPase Cdc42, malgré que ces deux GEFs soient connues pour agir autant sur Rac que Cdc42 dans d'autres contextes. Tout comme les RhoGTPases, les GEFs nécessitent à leur tour une activation. Ces protéines à multi-domaines sont donc elles aussi activées de multiples façons par exemple, grâce à des interactions protéine-protéine ou suite à certaines phosphorylations qui permettent l'ouverture de leurs conformations repliées inactives. Les GEFs pourraient s'avérer être de bonnes cibles grâce à leurs actions spécifiques sur une RhoGTPase, dans un type cellulaire précis, en réponse à un stimuli ou évènement unique. Ainsi, en ciblant un de ces mécanismes on pourrait inhiber une RhoGTPase de façon unique et précise. Il est donc primordial de bien connaître les différents mécanismes qui mènent à leur activation et aussi la spécificité d'action de chacune de ces GEFs pour pouvoir cibler les plus cruciales d'entre elles, par exemple lors de la progression tumorale ou lors de l'angiogenèse tumorale

VAV2 semble être impliquée de différentes façons dans la modulation de l'angiogenèse *in vivo* soit en réponse au VEGFR2 mais aussi en réponse au EphA2 en plus d'être modulée par la protéine d'échafaudage Gab1, qui s'avère essentielle elle aussi à l'angiogenèse *in vivo* en réponse à de nombreux facteurs de croissances (Garrett et al., 2007) (Gavard & Gutkind, 2006) (Fang et al., 2008) (Brantley-Sieders et al., 2009) (Hunter et al., 2006) (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011). Comme son activation est fortement contrôlée par de nombreux processus, tel que sa

phosphorylation sur tyrosine ou son association à la p120 Caténine, cibler un de ces mécanismes pourrait apporter une spécificité d'action désirable. De plus, son implication en aval de différents récepteurs responsables de l'induction de l'angiogenèse pourrait peut-être contrer certains effets de résistance non-souhaitable. Nos travaux démontrent l'implication de la GAP CdGAP au sein des cellules endothéliales et des répercussions importantes suite à sa délétion dans un modèle murin. Ainsi, cibler certaines GAPs pourrait aussi être envisagé dans certaines pathologies vasculaires. Toutefois, ici, plutôt que de cibler son activité GAP, une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire qui relie CdGAP à la phosphorylation sur tyrosine de Gab1 et la signalisation cellulaire subséquente nous permettrait d'envisager de cibler d'une certaine façon cette signalisation pour tenter de diminuer l'angiogenèse.

Malgré que pour l'instant peu d'inhibiteurs de GEFs aient été développés, la première découverte qu'un antibiotique naturel, le BrefeldinA, puisse cibler la formation du complexe Arf/GEF et ainsi inhiber l'activation de cette Arf a permis d'initier la recherche d'inhibiteurs de GEFs pour tenter de contrer l'angiogenèse pathologique (Mossessova, Corpina, & Goldberg, 2003) (Renault, Guibert, & Cherfils, 2003) (Vigil, Cherfils, Rossman, & Der, 2010). Récemment, un inhibiteur de GEFs a été identifié, soit l'ITX3. Celui-ci semble inhiber de façon assez spécifique un des deux domaines GEFs de Trio, ce qui diminue l'activation de façon spécifique pour RhoG et Rac et ne semble pas moduler l'activation de Rac par VAV2 ou Tiam. De plus, l'utilisation d'un peptide dérivé d'aptamère permet d'inhiber l'activité GEF de la GEF Tgat (dérivé de Trio). L'utilisation du peptide permet de diminuer l'activité transformante *in vitro* et *in vivo*, et diminue la formation tumorale dans la souris. Ces inhibiteurs ouvrent la voie à l'identification d'autres inhibiteurs de GEFs plutôt que d'effecteurs et pourraient être intéressants puisque la GEF Trio a été démontrée pour être impliquée dans le potentiel invasif des glioblastomes et du cancer du sein (Bouquier, Vignal, et al., 2009) (Bouquier, Fromont, et al., 2009). Toutefois, pour l'instant peu d'inhibiteurs de GEFs ont été développés et on retrouve plus souvent des inhibiteurs des effecteurs des RhoGTPases plutôt que des GEFs.

Certains inhibiteurs permettent aussi d'inhiber les GTPases tel que l'inhibiteur EHT 1864. Ce dernier détient une haute affinité pour lier Rac et cette association promouvoit la perte de liaison de nucléotide à la RhoGTPase ce qui permet d'inhiber à la fois, l'association du nucléotide et d'inhiber l'activité de la GEF Tiam1 sur Rac. Ainsi, EHT 1864 interfère avec les GEFs sur Rac (Shutes et al., 2007). Sans être parfait, l'inhibiteur NSC 23766, permet lui aussi d'inhiber l'activation de Rac par certaines

GEFs tel que Trio et Tiam1, mais n'empêche pas l'activation par d'autres GEFs telles que VAV, Lbc et Intersectine, ni n'empêche l'activité d'un variant tronqué constitutivement actif de Rac, Rac1b, présent dans certains cancers. Malgré tout, son utilisation permet de diminuer le potentiel invasif de cellules du cancer de la prostate, de diminuer la croissance tumorale, de diminuer la prolifération des cellules endothéliales et de diminuer la formation de capillaires à partir de cellules endothéliales sur Matrigel en réponse au VEGF (Gao, Dickerson, Guo, Zheng, & Zheng, 2004) (Sulpice et al., 2009). Toutefois, il ne s'avère pas assez efficace pour être utilisé en clinique et de plus amples études sont donc nécessaires pour tenter d'identifier un meilleur inhibiteur.

Malgré le fait que peu d'inhibiteurs spécifiques de GEFs existent, on retrouve un certains nombres d'inhibiteurs d'effecteurs des RhoGTPases. Toutefois, ces inhibiteurs ne ciblent qu'une partie de l'activation médiée par les GTPases et peuvent inhiber un même effecteur activé par plusieurs GTPases dans différents contextes (D. Sun, Xu, & Zhang, 2006). Par exemple, on connaît deux inhibiteurs des ROCKs, soit Y27632 et le Fasudil, le second présentement utilisé en clinique et approuvé depuis 1995 (Dong et al., 2010). Le Fasudil inhibe la migration des cellules endothéliales, leur viabilité et les deux inhibiteurs permettent de diminuer la formation de capillaires *in vivo* en réponse au VEGF (Olson, 2008) (Bryan & D'Amore, 2007) (Uehata et al., 1997). De plus, un inhibiteur de Pak4, un autre effecteur des RhoGTPases, permet aussi d'inhiber la croissance tumorale. Dans le contexte du rôle de Pak4 comme un modulateur important de la formation de la lumière des vaisseaux lors de l'angiogenèse, cet inhibiteur pourrait aussi s'avérer utile dans le contexte angiogénique (Koh et al., 2008) (B. W. Murray et al., 2010). Nos travaux ont apportés de plus grandes connaissances sur l'implication de plusieurs GEFs et GAPs dans les cellules endothéliales qui résultent en des processus angiogéniques. La poursuite de connaissances en ce sens pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques plus adéquates et de mieux comprendre de quelle façon nous pourrions les inhiber pour éviter le plus d'effets indésirables.

Dans le même ordre d'idée, ayant en tête d'identifier de meilleures cibles pour contrer l'angiogenèse, la protéine d'échafaudage Gab1 pourrait s'avérer une cible potentielle. Nous avons démontré l'implication de Gab1 dans les diverses voies de signalisation régulées par le VEGF qui mènent à l'angiogenèse *in vitro* (Laramée et al., 2007) (Caron et al., 2009). De plus, les études effectuées *in vivo*, grâce à l'utilisation du modèle murin Gab1 ECKO, ont démontré le rôle essentiel de Gab1 dans l'angiogenèse *in vivo* en aval du VEGF (Y. Lu et al., 2011) et du HGF (J. Zhao et al., 2011)

(Shiroyama et al., 2011). Ces études démontrent clairement que cette protéine d'échafaudage est essentielle à l'angiogenèse normale et pathologique régulée par différents facteurs de croissance. En ce sens, l'utilisation de traitements ciblant Gab1, permettrait de contrer les effets indésirables provoqués par l'inhibition unique de la voie du VEGF. La résistance qui entraîne l'activation de d'autres récepteurs et facteurs pro-angiogéniques seraient moins probables puisque Gab1 agit en aval de plusieurs de ceux-ci. De cette façon, l'inhibition de la signalisation contrôlée par la protéine d'échafaudage Gab1 qui permet l'amplification de différents RTKs responsables de la modulation de l'angiogenèse *in vivo* pourrait être une alternative. De plus, le rôle de Gab1 ne s'arrête toutefois pas dans la médiation de l'angiogenèse physiologique puisqu'il s'avère que Gab1 est aussi important pour contrôler l'angiogenèse pathologique. La formation de tumeurs dans le modèle murin Gab1 ECKO, suite à l'injection de cellules de mélanomes, démontrent le rôle positif de Gab1 dans l'angiogenèse tumorale. Les souris Gab1 ECKO présentent de plus petites tumeurs moins bien vascularisées que les souris sauvages. La diminution de la croissance tumorale et la diminution de l'angiogenèse tumorale obtenue dans l'étude de Zhao J. et al., ATVB 2011 révèle l'importance de Gab1 dans l'angiogenèse pathologique. Ce résultat s'avère fort stimulant et justifie la poursuite de nos recherches sur l'implication de Gab1 dans les différents mécanismes moléculaires qui régulent l'angiogenèse. Aussi, tel que discuté plus tôt, diverses signalisations contrôlées par Gab1 en réponse au VEGF nous pousse à croire que Gab1 pourrait être un médiateur de la perméabilité vasculaire. Comme il s'agit d'une des étapes initiales et essentielles pour la génération d'un nouveau capillaire en plus de faciliter la dissémination des métastases, l'approfondissement de nos connaissances dans ce sens pourrait aussi révéler de nouvelles pistes thérapeutiques potentielles.

Comme il s'agit d'une protéine d'échafaudage, et donc qu'elle médie sa signalisation suite à son association à d'autres protéines de signalisation, l'utilisation de peptides pouvant inhiber ces différentes associations de façons spécifiques pourraient s'avérer utiles et moins dommageable puisqu'ainsi Gab1 pourrait toujours émettre une certaine fraction de sa signalisation tel que discuté (Verma, Vaughan, & Bunting, 2012). Une difficulté potentielle de l'utilisation de peptides s'avère être la compensation par un autre membre de la famille Gab. Toutefois, une grande partie des sites d'associations à différentes protéines de signalisation, telle que Grb2, PI3K et Crk, s'avèrent conservées entre Gab1 et Gab2. Ainsi, cette situation ne devrait pas compliquer notre cas. De plus, l'utilisation ou l'inhibition de microARNs pourraient être une autre avenue envisageable. Une publication récente démontre que le « cluster » mir212/132 cible Gab1 dans les cellules

endothéliales. De cette façon, des souris Mir212/132 KO présentent une plus grande vascularisation et une plus grande ramification de leurs vaisseaux sanguins au niveau de leurs rétines à jour p5 dû à une plus grande angiogenèse causée par la non-inhibition de Gab1 (Kumarswamy et al., 2014). Cette étude démontre la capacité anti-angiogénique du mir-212 suite à la régulation, entre autre, du gène cible *GAB1*. Les microARNs sont de plus en plus étudiés, et sont même présentement en essais cliniques de phase I et II ce qui nous laisse entrevoir cette possibilité dans le cadre de différentes pathologies.

Gab1 est toutefois une protéine essentielle dans une myriade d'activités autres que l'angiogenèse. Il est donc important de pouvoir cibler Gab1 au sein des cellules endothéliales. Il s'agit d'un des défis courants à relever dans le cadre de plusieurs thérapies. Malgré tout, Gab1 pourrait être une bonne cible, puisqu'il est essentiel pour médier l'angiogenèse post-natale *in vivo* en réponse au HGF et au VEGF (Shioyama et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) en plus d'être un important médiateur de l'angiogenèse pathologique tumorale. Aussi, nous avons démontré qu'il médiait la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF, HGF, EGF et FGF (Laramée et al., 2007) et est phosphorylé sur tyrosine en réponse à ces facteurs. De cette façon, comme il agit en aval de plusieurs facteurs de croissances pro-angiogéniques, cibler Gab1 pourrait diminuer la résistance qui est souvent observé suite à l'utilisation des thérapies courantes. L'étude de Gab1 nous permet ainsi de postuler que cibler cette protéine d'échafaudage pourrait ainsi remédier à ce problème de résistance en étant une alternative thérapeutique envisageable.

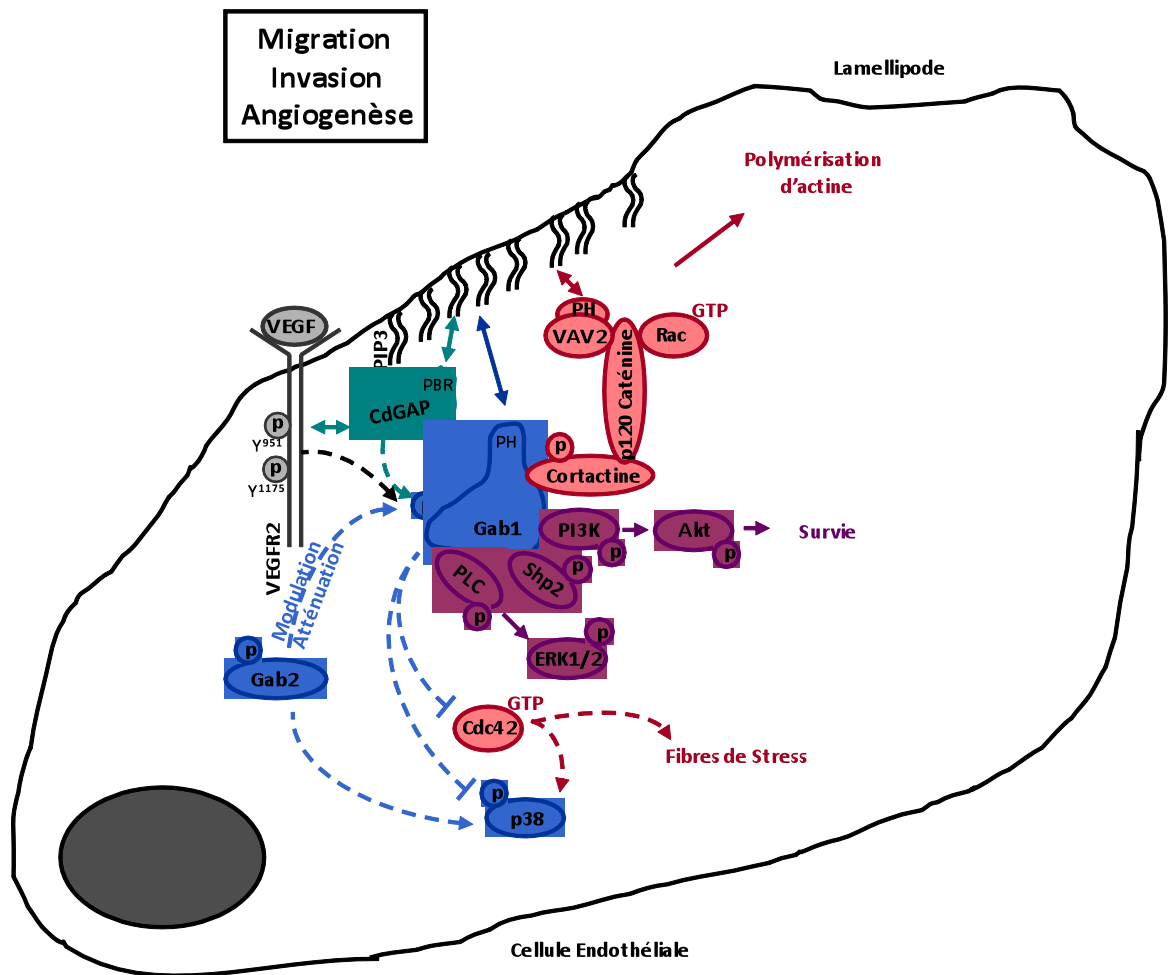


Figure 15 : Signalisation du VEGF dans la cellule endothéliale.

Le remodelage du cytosquelette d'actine en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales permet d'initier la migration et l'invasion cellulaire, deux processus essentiels à la formation de nouveaux capillaires. La protéine d'échafaudage Gab1 permet l'amplification de plusieurs voies de signalisations et ainsi s'avère essentielle à plusieurs activités biologiques telles que la migration, l'invasion, la formation de capillaires et la survie cellulaire. Gab1 module la formation de différents complexes protéiques grâce entre autre à son domaine PH qui lui permet un recrutement de ce complexe à la membrane. De cette façon, Gab1 et son signalosome permet une régulation positive de la GTPase Rac et la formation de lamellipodes, alors qu'il atténue l'activation de la GTPase Cdc42, la MAPK p38 et ainsi atténue la formation de fibres de stress dans la cellule. Ces différents remodelages d'actine mènent à la migration et l'invasion cellulaire. La modulation précise de ce signalosome s'avère crucial. Ainsi, Gab2 atténue la signalisation de Gab1 tandis que de son côté CdGAP, par un mécanisme qui reste à définir module positivement la phosphorylation de Gab1 et

plusieurs des signalisations qui en découlent..

La migration et l'invasion cellulaire sont des processus cruciaux lors de l'angiogenèse. Le remodelage du cytosquelette d'actine va moduler ces actions. Toutefois, relativement peu d'études se sont concentrées sur le remodelage du cytosquelette d'actine dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. Mes travaux apportent maintenant une importante contribution à ce champ de connaissances (Voir modèle en figure 15). En réponse au VEGF, la signalisation cellulaire de la cellule endothéliale va médier la survie cellulaire, la migration cellulaire et l'invasion cellulaire pour ainsi permettre le développement vasculaire et l'angiogenèse. Diverses études ont pu démontrés le rôle essentiel de la protéine d'échafaudage Gab1 dans l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Laramee et al., 2007) (Shioyama et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011). Les différents remodelages du cytosquelette d'actine sont essentiels pour la migration cellulaire. La cellule doit entre autre former un lamellipode à l'avant de la cellule pour initier son déplacement et doit aussi diminuer la quantité de fibres de stress qui lui permet de rétracter l'arrière de la cellule. Il est aussi crucial que chacune de ces étapes soient modulées au bon moment pendant la bonne durée et donc une bonne coordination de ces différents remodelages est essentielle. Mes travaux démontrent que grâce à la formation de différents signalosomes, Gab1 permet la régulation de différentes voies de signalisations spécifiques. Ainsi, Gab1 permet l'activation de la GTPase Rac et la formation de lamellipodes, alors qu'il atténue l'activation de Cdc42 et de la MAPK p38 pour ainsi restreindre la formation de fibres de stress. Étant donné l'importance de Gab1 dans l'angiogenèse, nos travaux apportent une meilleure connaissance des évènements moléculaires qui pourraient être altérés afin de réguler la signalisation pro-angiogénique amplifiée par Gab1 en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales. Cette régulation doit être fine et pointue. La protéine Gab2 semble donc restreindre à un certain niveau les voies de signalisation médiées par Gab1. De cette façon, Gab2 semble agir comme un modulateur important de l'intensité de plusieurs voies de signalisations cruciales pour la cellule endothéliale. De plus, la formation de complexes protéiques associés à Gab1 doit être adéquatement localisée, et c'est via le domaine PH de Gab1 que les protéines peuvent être recrutées aux phospholipides présents à la membrane des cellules endothéliales et ainsi aptes à remodeler le cytosquelette d'actine. La protéine CdGAP semble aussi fortement impliquée dans la médiation du remodelage du cytosquelette d'actine au sein des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Il semble moduler certains de ces aspects grâce à son implication pour l'induction de la phosphorylation sur tyrosine de Gab1 et ainsi module les signalisations cellulaires qui sont contrôlées. Gab2 et CdGAP module à leur manière les voies de signalisations médiées par Gab1. Suite à leur implication sur la modulation de Gab1, autant Gab2 et

CdGAP sont d'importants médiateurs de la migration cellulaire en réponse au VEGF. Connaissant le rôle crucial pour Gab1 dans l'angiogenèse (Shioyama et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011) l'élargissement de nos connaissances sur sa régulation par diverses protéines nous apportent une meilleure compréhension du remodelage du cytosquelette d'actine et ainsi une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent l'angiogenèse. Ces études nous laissent donc entrevoir de nouvelles avenues prometteuses pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anti-angiogénique.

Conclusions et perspectives

Cette thèse apporte une meilleure compréhension de l'implication des protéines d'échafaudage Gab dans la signalisation médiée par le VEGF dans les cellules endothéliales et nous permet d'approfondir nos connaissances sur les différents mécanismes moléculaires nécessaires à l'angiogenèse.

Nous avons démontré le rôle de Gab1 dans l'angiogenèse *in vitro* (Laramee et al., 2007) et il a été démontré que Gab1 est essentiel pour médier l'angiogenèse *in vivo* (Shioyama et al., 2011) (Y. Lu et al., 2011) (J. Zhao et al., 2011). De plus, des travaux ont aussi démontré son importance dans l'angiogenèse tumorale et sur la croissance tumorale (J. Zhao et al., 2011). Ces résultats s'avèrent très intéressants et démontrent l'implication potentielle de Gab1 dans l'angiogenèse pathologique.

Nos premiers travaux révèlent le rôle non-redondant de Gab1 et Gab2 dans la signalisation du VEGF au sein des cellules endothéliales, malgré leurs rôles communs positifs sur l'induction du potentiel de motilité en réponse au VEGF. Ainsi, suite à un meilleur recrutement au VEGFR2 et à l'activation de la kinase Akt, Gab1 s'avère être une protéine essentielle pour la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF, contrairement à Gab2.

Notre étude subséquente a mis à jour une voie de signalisation contrôlée par Gab1 en réponse au VEGF qui s'avère essentielle pour induire la migration et l'invasion cellulaire, soit l'activation de VAV2/Rac. De plus, nos résultats démontrent la spécificité d'action de Gab1 envers l'activation des RhoGTPases puisqu'à l'inverse Gab1 semble atténuer l'activation de la GEF β -PIX qui régule Cdc42 dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF et nous montrons par le fait même pour une première fois le contrôle de Cdc42 par β -PIX dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. Cette meilleure compréhension nous offre plusieurs opportunités pour développer de nouvelles thérapies anti-angiogéniques.

Nous démontrons aussi pour la première fois l'importance de CdGAP dans les cellules endothéliales et son rôle crucial lors du développement. Bien que nous ayons caractérisé une signalisation qui en découle, il s'avère crucial de bien comprendre tous les détails de cette signalisation afin de définir de quelle façon elle est activée et régulée. De plus, nos travaux démontrent aussi l'implication de la GAP CdGAP sur l'activation de Gab1 et des voies de signalisation

qui en découlent. Le rôle important de CdGAP au sein des cellules endothéliales et lors du développement de la souris nécessitera une étude de grande envergure pour nous permettre de mieux comprendre de quelle façon son activation est régulée et de quelle façon elle peut mener à la régulation de Gab1, de la signalisation qui en découle, et de l'activation de Akt. Une meilleure compréhension de ces processus pourrait nous permettre d'élaborer de meilleures stratégies potentielles pour cibler son inhibition.

En mettant à jour l'implication de Gab1 dans l'activation de VAV2/Rac, l'atténuation de β -PIX/Cdc42 et sa phosphorylation en aval de CdGAP en réponse au VEGF, nous démontrons de façon éloquent le rôle important de Gab1 au sein des RhoGTPases et de leurs régulateurs dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. L'identification de ces différentes voies de signalisation nous offre de nouvelles opportunités pour le développement de nouvelles thérapies anti-angiogéniques. Ainsi, nous pourrions tenter de cibler l'association de VAV2 aux complexes protéiques formés par Gab1, nous pourrions tenter de cibler le domaine PH de Gab1 qui permet cet assemblage et l'activation de Rac ou nous pourrions cibler CdGAP et son rôle sur la phosphorylation sur tyrosine de Gab1. Toutefois, malgré toutes ces nouvelles informations acquises, de nombreux efforts seront encore nécessaires afin d'établir les meilleures stratégies anti-angiogéniques. Ainsi, la poursuite de nos recherches sur le contrôle de Gab1 et la signalisation dépendante du VEGF s'avère une avenue prometteuse et enrichissante.

Chapitre 6 : Références

- Abella, J. V., Vaillancourt, R., Frigault, M. M., Ponzo, M. G., Zuo, D., Sangwan, V., . . . Park, M. (2010). The Gab1 scaffold regulates RTK-dependent dorsal ruffle formation through the adaptor Nck. *J Cell Sci*, 123(Pt 8), 1306-1319. doi: 10.1242/jcs.062570
- Ackah, E., Yu, J., Zoellner, S., Iwakiri, Y., Skurk, C., Shibata, R., . . . Sessa, W. C. (2005). Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest*, 115(8), 2119-2127. doi: 10.1172/jci24726
- Adams, S. J., Aydin, I. T., & Celebi, J. T. (2012). GAB2--a scaffolding protein in cancer. *Mol Cancer Res*, 10(10), 1265-1270. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-12-0352
- Aghazadeh, B., Lowry, W. E., Huang, X. Y., & Rosen, M. K. (2000). Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell*, 102(5), 625-633.
- Ahluwalia, A., & Tarnawski, A. S. (2012). Critical role of hypoxia sensor--HIF-1alpha in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr Med Chem*, 19(1), 90-97.
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., . . . et al. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, 331(22), 1480-1487. doi: 10.1056/nejm199412013312203
- Aitsebaomo, J., Wennerberg, K., Der, C. J., Zhang, C., Kedar, V., Moser, M., . . . Patterson, C. (2004). p68RacGAP is a novel GTPase-activating protein that interacts with vascular endothelial zinc finger-1 and modulates endothelial cell capillary formation. *J Biol Chem*, 279(17), 17963-17972. doi: 10.1074/jbc.M311721200
- Alexa, A., Varga, J., & Remenyi, A. (2010). Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. *Febs j*, 277(21), 4376-4382. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07867.x
- Algaze, C., Esplin, E. D., Lowenthal, A., Hudgins, L., Tacy, T. A., & Selamet Tierney, E. S. (2013). Expanding the phenotype of cardiovascular malformations in Adams-Oliver syndrome. *Am J Med Genet A*, 161a(6), 1386-1389. doi: 10.1002/ajmg.a.35864
- Amin, D. N., Hida, K., Bielenberg, D. R., & Klagsbrun, M. (2006). Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res*, 66(4), 2173-2180. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3387
- Ammer, A. G., & Weed, S. A. (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton*, 65(9), 687-707. doi: 10.1002/cm.20296
- Ayala, I., Baldassarre, M., Giacchetti, G., Caldieri, G., Tete, S., Luini, A., & Buccione, R. (2008). Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *J Cell Sci*, 121(Pt 3), 369-378. doi: 10.1242/jcs.008037
- Bagrodia, S., Taylor, S. J., Jordon, K. A., Van Aelst, L., & Cerione, R. A. (1998). A novel regulator of p21-activated kinases. *J Biol Chem*, 273(37), 23633-23636.
- Baker, M., Robinson, S. D., Lechertier, T., Barber, P. R., Tavora, B., D'Amico, G., . . . Hodivala-Dilke, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat Protoc*, 7(1), 89-104. doi: 10.1038/nprot.2011.435
- Bartolome, R. A., Molina-Ortiz, I., Samaniego, R., Sanchez-Mateos, P., Bustelo, X. R., & Teixido, J. (2006). Activation of Vav/Rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. *Cancer Res*, 66(1), 248-258. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-2489

- Batchelor, T. T., Sorensen, A. G., di Tomaso, E., Zhang, W. T., Duda, D. G., Cohen, K. S., . . . Jain, R. K. (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell*, *11*(1), 83-95. doi: 10.1016/j.ccr.2006.11.021
- Bates, D. O., Hillman, N. J., Williams, B., Neal, C. R., & Pocock, T. M. (2002). Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*, *200*(6), 581-597.
- Bausenwein, B. S., Schmidt, M., Mielke, B., & Raabe, T. (2000). In vivo functional analysis of the daughter of sevenless protein in receptor tyrosine kinase signaling. *Mech Dev*, *90*(2), 205-215.
- Bayless, K. J., & Davis, G. E. (2002). The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. *J Cell Sci*, *115*(Pt 6), 1123-1136.
- Bennett, H. L., Brummer, T., Jeanes, A., Yap, A. S., & Daly, R. J. (2008). Gab2 and Src co-operate in human mammary epithelial cells to promote growth factor independence and disruption of acinar morphogenesis. *Oncogene*, *27*(19), 2693-2704. doi: 10.1038/sj.onc.1210928
- Bentires-Alj, M., Gil, S. G., Chan, R., Wang, Z. C., Wang, Y., Imanaka, N., . . . Gu, H. (2006). A role for the scaffolding adapter GAB2 in breast cancer. *Nat Med*, *12*(1), 114-121. doi: 10.1038/nm1341
- Bergers, G., & Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*, *8*(8), 592-603. doi: 10.1038/nrc2442
- Bergman, A., Condeelis, J. S., & Gligorijevic, B. (2014). Invadopodia in context. *Cell Adh Migr*, *8*(3).
- Bid, H. K., Roberts, R. D., Manchanda, P. K., & Houghton, P. J. (2013). RAC1: an emerging therapeutic option for targeting cancer angiogenesis and metastasis. *Mol Cancer Ther*, *12*(10), 1925-1934. doi: 10.1158/1535-7163.mct-13-0164
- Bjorge, J. D., Jakymiw, A., & Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*, *19*(49), 5620-5635.
- Blanes, M. G., Oubaha, M., Rautureau, Y., & 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. *J Biol Chem*, *282*(14), 10660-10669. doi: 10.1074/jbc.M609048200
- Bocanegra, M., Bergamaschi, A., Kim, Y. H., Miller, M. A., Rajput, A. B., Kao, J., . . . Pollack, J. R. (2010). Focal amplification and oncogene dependency of GAB2 in breast cancer. *Oncogene*, *29*(5), 774-779. doi: 10.1038/onc.2009.364
- Boguslavsky, S., Grosheva, I., Landau, E., Shtutman, M., Cohen, M., Arnold, K., . . . Bershadsky, A. (2007). p120 catenin regulates lamellipodial dynamics and cell adhesion in cooperation with cortactin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(26), 10882-10887. doi: 10.1073/pnas.0702731104
- Booden, M. A., Campbell, S. L., & Der, C. J. (2002). Critical but distinct roles for the pleckstrin homology and cysteine-rich domains as positive modulators of Vav2 signaling and transformation. *Mol Cell Biol*, *22*(8), 2487-2497.
- Bouquier, N., Fromont, S., Zeeh, J. C., Auziol, C., Larrousse, P., Robert, B., . . . Schmidt, S. (2009). Aptamer-derived peptides as potent inhibitors of the oncogenic RhoGEF Tgat. *Chem Biol*, *16*(4), 391-400. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.02.006
- Bouquier, N., Vignal, E., Charrasse, S., Weill, M., Schmidt, S., Leonetti, J. P., . . . Fort, P. (2009). A cell active chemical GEF inhibitor selectively targets the Trio/RhoG/Rac1 signaling pathway. *Chem Biol*, *16*(6), 657-666. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.04.012
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*, *348*(6297), 125-132. doi: 10.1038/348125a0
- Brantley-Sieders, D. M., Zhuang, G., Vaught, D., Freeman, T., Hwang, Y., Hicks, D., & Chen, J. (2009). Host deficiency in Vav2/3 guanine nucleotide exchange factors impairs tumor growth,

- survival, and angiogenesis in vivo. *Mol Cancer Res*, 7(5), 615-623. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-08-0401
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S. F., Tosello-Trampont, A. C., . . . Ravichandran, K. S. (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol*, 4(8), 574-582. doi: 10.1038/ncb824
- Brummer, T., Larance, M., Herrera Abreu, M. T., Lyons, R. J., Timpson, P., Emmerich, C. H., . . . Daly, R. J. (2008). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 terminates signalling by the Gab2 docking protein. *Embo j*, 27(17), 2305-2316.
- Brummer, T., Schramek, D., Hayes, V. M., Bennett, H. L., Caldon, C. E., Musgrove, E. A., & Daly, R. J. (2006). Increased proliferation and altered growth factor dependence of human mammary epithelial cells overexpressing the Gab2 docking protein. *J Biol Chem*, 281(1), 626-637. doi: 10.1074/jbc.M509567200
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., . . . Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857-868.
- Bryan, B. A., & D'Amore, P. A. (2007). What tangled webs they weave: Rho-GTPase control of angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 64(16), 2053-2065. doi: 10.1007/s00018-007-7008-z
- Bryce, N. S., Clark, E. S., Leysath, J. L., Currie, J. D., Webb, D. J., & Weaver, A. M. (2005). Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol*, 15(14), 1276-1285. doi: 10.1016/j.cub.2005.06.043
- Buday, L., & Tompa, P. (2010a). Accessory proteins in signal transduction: scaffold proteins and beyond. *Febs j*, 277(21), 4347.
- Buday, L., & Tompa, P. (2010b). Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *Febs j*, 277(21), 4348-4355. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07864.x
- Burridge, K., & Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell*, 116(2), 167-179.
- Cai, T., Nishida, K., Hirano, T., & Khavari, P. A. (2002). Gab1 and SHP-2 promote Ras/MAPK regulation of epidermal growth and differentiation. *J Cell Biol*, 159(1), 103-112. doi: 10.1083/jcb.200205017
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-1657. doi: 10.1126/science.296.5573.1655
- Carlberg, K., & Rohrschneider, L. R. (1997). Characterization of a novel tyrosine phosphorylated 100-kDa protein that binds to SHP-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in myeloid cells. *J Biol Chem*, 272(25), 15943-15950.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9(6), 653-660. doi: 10.1038/nm0603-653
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932-936. doi: 10.1038/nature04478
- Carmeliet, P., De Smet, F., Loges, S., & Mazzone, M. (2009). Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol*, 6(6), 315-326. doi: 10.1038/nrclinonc.2009.64
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., . . . Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435-439. doi: 10.1038/380435a0
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257. doi: 10.1038/35025220
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011a). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307. doi: 10.1038/nature10144

- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011b). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(6), 417-427. doi: 10.1038/nrd3455
- Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., . . . Shima, D. T. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, *5*(5), 495-502. doi: 10.1038/8379
- Caron, C., Spring, K., Laramée, M., Chabot, C., Cloutier, M., Gu, H., & Royal, I. (2009). Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells. *Cell Signal*, *21*(6), 943-953. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.02.004
- Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G., & Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell*, *8*(4), 299-309. doi: 10.1016/j.ccr.2005.09.005
- Cascone, I., Giraudo, E., Caccavari, F., Napione, L., Bertotti, E., Collard, J. G., . . . Bussolino, F. (2003). Temporal and spatial modulation of Rho GTPases during in vitro formation of capillary vascular network. Adherens junctions and myosin light chain as targets of Rac1 and RhoA. *J Biol Chem*, *278*(50), 50702-50713. doi: 10.1074/jbc.M307234200
- Chabot, C., Spring, K., Gratton, J. P., Elchebly, M., & Royal, I. (2009). New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Mol Cell Biol*, *29*(1), 241-253. doi: 10.1128/mcb.01374-08
- Chaki, S. P., & Rivera, G. M. (2013). Integration of signaling and cytoskeletal remodeling by Nck in directional cell migration. *Bioarchitecture*, *3*(3), 57-63. doi: 10.4161/bioa.25744
- Chang, C. H., Chan, P. C., Li, J. R., Chen, C. J., Shieh, J. J., Fu, Y. C., . . . Wu, M. J. (2015). Gab1 is essential for membrane translocation, activity and integrity of mTORCs after EGF stimulation in urothelial cell carcinoma. *Oncotarget*.
- Chappell, J. C., Taylor, S. M., Ferrara, N., & Bautch, V. L. (2009). Local guidance of emerging vessel sprouts requires soluble Flt-1. *Dev Cell*, *17*(3), 377-386. doi: 10.1016/j.devcel.2009.07.011
- Chapuis, J., Hannequin, D., Pasquier, F., Benthani, P., Brice, A., Leber, I., . . . Lambert, J. C. (2008). Association study of the GAB2 gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, *30*(1), 103-106. doi: 10.1016/j.nbd.2007.12.006
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., . . . Alt, F. W. (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol*, *10*(13), 758-765.
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, *93*(1), 269-309. doi: 10.1152/physrev.00003.2012
- Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D. M., & Elion, E. A. (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell*, *78*(3), 499-512.
- Chung, A. S., & Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *27*, 563-584. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154002
- Claesson-Welsh, L. (2012). Blood vessels as targets in tumor therapy. *Ups J Med Sci*, *117*(2), 178-186. doi: 10.3109/03009734.2012.660550
- Claesson-Welsh, L., & Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med*, *273*(2), 114-127. doi: 10.1111/joim.12019
- Clark, E. S., & Weaver, A. M. (2008). A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *Eur J Cell Biol*, *87*(8-9), 581-590. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.01.008
- Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., & Risau, W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications

- for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*, 271(30), 17629-17634.
- Coleman, P. R., Hahn, C. N., Grimshaw, M., Lu, Y., Li, X., Brautigan, P. J., . . . Gamble, J. R. (2010). Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood*, 116(19), 4016-4024. doi: 10.1182/blood-2009-11-252700
- Compagni, A., Wilgenbus, P., Impagnatiello, M. A., Cotten, M., & Christofori, G. (2000). Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 60(24), 7163-7169.
- Connolly, J. O., Simpson, N., Hewlett, L., & Hall, A. (2002). Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol Biol Cell*, 13(7), 2474-2485. doi: 10.1091/mbc.E02-01-0006
- Cote, J. F., Motoyama, A. B., Bush, J. A., & Vuori, K. (2005). A novel and evolutionarily conserved PtdIns(3,4,5)P3-binding domain is necessary for DOCK180 signalling. *Nat Cell Biol*, 7(8), 797-807. doi: 10.1038/ncb1280
- Cote, J. F., & Vuori, K. (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*, 115(Pt 24), 4901-4913.
- Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., . . . Ferrara, N. (2009). PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*, 15(1), 21-34. doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.004
- Crespo, P., Schuebel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., & Bustelo, X. R. (1997). Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature*, 385(6612), 169-172. doi: 10.1038/385169a0
- Cross, M. J., & Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*, 22(4), 201-207.
- Cunnick, J. M., Dorsey, J. F., Munoz-Antonia, T., Mei, L., & Wu, J. (2000). Requirement of SHP2 binding to Grb2-associated binder-1 for mitogen-activated protein kinase activation in response to lysophosphatidic acid and epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 275(18), 13842-13848.
- Cunnick, J. M., Meng, S., Ren, Y., Desponts, C., Wang, H. G., Djeu, J. Y., & Wu, J. (2002). Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. *J Biol Chem*, 277(11), 9498-9504. doi: 10.1074/jbc.M110547200
- Cunningham, S. A., Arrate, M. P., Brock, T. A., & Waxham, M. N. (1997). Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochem Biophys Res Commun*, 240(3), 635-639. doi: 10.1006/bbrc.1997.7719
- D'Amico, G., Jones, D. T., Nye, E., Sapienza, K., Ramjuan, A. R., Reynolds, L. E., . . . Hodivala-Dilke, K. M. (2009). Regulation of lymphatic-blood vessel separation by endothelial Rac1. *Development*, 136(23), 4043-4053. doi: 10.1242/dev.035014
- D'Amico, G., Robinson, S. D., Germain, M., Reynolds, L. E., Thomas, G. J., Elia, G., . . . Hodivala-Dilke, K. M. (2010). Endothelial-Rac1 is not required for tumor angiogenesis unless alphavbeta3-integrin is absent. *PLoS One*, 5(3), e9766. doi: 10.1371/journal.pone.0009766
- Daly, R. J., Gu, H., Parmar, J., Malaney, S., Lyons, R. J., Kairouz, R., . . . Sutherland, R. L. (2002). The docking protein Gab2 is overexpressed and estrogen regulated in human breast cancer. *Oncogene*, 21(33), 5175-5181. doi: 10.1038/sj.onc.1205522
- Dance, M., Montagner, A., Yart, A., Masri, B., Audigier, Y., Perret, B., . . . Raynal, P. (2006). The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 281(32), 23285-23295. doi: 10.1074/jbc.M600987200

- Danek, E. I., Tcherkezian, J., Triki, I., Meriane, M., & Lamarche-Vane, N. (2007). Glycogen synthase kinase-3 phosphorylates CdGAP at a consensus ERK 1 regulatory site. *J Biol Chem*, *282*(6), 3624-3631. doi: 10.1074/jbc.M610073200
- Davis, G. E., & Bayless, K. J. (2003). An integrin and Rho GTPase-dependent pinocytic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. *Microcirculation*, *10*(1), 27-44. doi: 10.1038/sj.mn.7800175
- Davis, G. E., Bayless, K. J., & Mavila, A. (2002). Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *Anat Rec*, *268*(3), 252-275. doi: 10.1002/ar.10159
- Davis, G. E., Koh, W., & Stratman, A. N. (2007). Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res C Embryo Today*, *81*(4), 270-285. doi: 10.1002/bdrc.20107
- Davis, G. E., Stratman, A. N., Sacharidou, A., & Koh, W. (2011). Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. *Int Rev Cell Mol Biol*, *288*, 101-165. doi: 10.1016/b978-0-12-386041-5.00003-0
- De Bock, K., Cauwenberghs, S., & Carmeliet, P. (2011). Vessel abnormalization: another hallmark of cancer? Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr Opin Genet Dev*, *21*(1), 73-79. doi: 10.1016/j.gde.2010.10.008
- De Bock, K., Mazzone, M., & Carmeliet, P. (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol*, *8*(7), 393-404. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.83
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J., & Carmeliet, P. (2009). Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(5), 639-649. doi: 10.1161/atvbaha.109.185165
- Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, *121*(Pt 13), 2115-2122. doi: 10.1242/jcs.017897
- DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, *15*(7), 356-363. doi: 10.1016/j.tcb.2005.05.001
- Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., & Snyderman, R. (1989). rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*, *264*(28), 16378-16382.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*(6736), 601-605. doi: 10.1038/21224
- Dise, R. S., Frey, M. R., Whitehead, R. H., & Polk, D. B. (2008). Epidermal growth factor stimulates Rac activation through Src and phosphatidylinositol 3-kinase to promote colonic epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *294*(1), G276-285. doi: 10.1152/ajpgi.00340.2007
- Dixit, M., Loot, A. E., Mohamed, A., Fisslthaler, B., Boulanger, C. M., Ceacareanu, B., . . . Fleming, I. (2005). Gab1, SHP2, and protein kinase A are crucial for the activation of the endothelial NO synthase by fluid shear stress. *Circ Res*, *97*(12), 1236-1244. doi: 10.1161/01.RES.0000195611.59811.ab
- Dong, M., Yan, B. P., Liao, J. K., Lam, Y. Y., Yip, G. W., & Yu, C. M. (2010). Rho-kinase inhibition: a novel therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases. *Drug Discov Today*, *15*(15-16), 622-629. doi: 10.1016/j.drudis.2010.06.011
- Dovas, A., & Couchman, J. R. (2005). RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J*, *390*(Pt 1), 1-9. doi: 10.1042/bj20050104
- Downing, J. R., & Reynolds, A. B. (1991). PDGF, CSF-1, and EGF induce tyrosine phosphorylation of p120, a pp60src transformation-associated substrate. *Oncogene*, *6*(4), 607-613.

- Drubin, D. G. (1991). Development of cell polarity in budding yeast. *Cell*, 65(7), 1093-1096.
- Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., . . . Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 282(5390), 946-949.
- Duval, M., Le Boeuf, F., Huot, J., & Gratton, J. P. (2007). Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase. *Mol Biol Cell*, 18(11), 4659-4668. doi: 10.1091/mbc.E07-05-0467
- Ebos, J. M., & Kerbel, R. S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(4), 210-221. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.21
- Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., & Kerbel, R. S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 15(3), 232-239. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.021
- Eilken, H. M., & Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 22(5), 617-625. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.010
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., & Cheresh, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, 4(6), 915-924.
- Engelse, M. A., Laurens, N., Verloop, R. E., Koolwijk, P., & van Hinsbergh, V. W. (2008). Differential gene expression analysis of tubule forming and non-tubule forming endothelial cells: CDC42GAP as a counter-regulator in tubule formation. *Angiogenesis*, 11(2), 153-167. doi: 10.1007/s10456-007-9086-9
- Epting, D., Wendik, B., Bennewitz, K., Dietz, C. T., Driever, W., & Kroll, J. (2010). The Rac1 regulator ELMO1 controls vascular morphogenesis in zebrafish. *Circ Res*, 107(1), 45-55. doi: 10.1161/circresaha.109.213983
- Espejo, R., Jeng, Y., Paulucci-Holthausen, A., Rengifo-Cam, W., Honkus, K., Anastasiadis, P. Z., & Sastry, S. K. (2014). PTP-PEST targets a novel tyrosine site in p120 catenin to control epithelial cell motility and Rho GTPase activity. *J Cell Sci*, 127(Pt 3), 497-508. doi: 10.1242/jcs.120154
- Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., & Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 13), 1853-1865.
- Estrach, S., Legg, J., & Watt, F. M. (2007). Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. *J Cell Sci*, 120(Pt 16), 2944-2952. doi: 10.1242/jcs.016253
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*, 117(Pt 8), 1291-1300. doi: 10.1242/jcs.01115
- Etienne-Manneville, S. (2008). Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene*, 27(55), 6970-6980. doi: 10.1038/onc.2008.347
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420(6916), 629-635. doi: 10.1038/nature01148
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2003a). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*, 421(6924), 753-756. doi: 10.1038/nature01423
- Etienne-Manneville, S., & Hall, A. (2003b). Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol*, 15(1), 67-72.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J. B., Nicholls, S., Ferenczi, M. A., & Hall, A. (2005). Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol*, 170(6), 895-901. doi: 10.1083/jcb.200412172

- Eva, A., & Aaronson, S. A. (1985). Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature*, *316*(6025), 273-275.
- Eva, A., Vecchio, G., Rao, C. D., Tronick, S. R., & Aaronson, S. A. (1988). The predicted DBL oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(7), 2061-2065.
- Fan, S., Ma, Y. X., Gao, M., Yuan, R. Q., Meng, Q., Goldberg, I. D., & Rosen, E. M. (2001). The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for cell survival and DNA repair. *Mol Cell Biol*, *21*(15), 4968-4984. doi: 10.1128/mcb.21.15.4968-4984.2001
- Fang, W. B., Brantley-Sieders, D. M., Hwang, Y., Ham, A. J., & Chen, J. (2008). Identification and functional analysis of phosphorylated tyrosine residues within EphA2 receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, *283*(23), 16017-16026. doi: 10.1074/jbc.M709934200
- Feng, H., Hu, B., Jarzynka, M. J., Li, Y., Keezer, S., Johns, T. G., . . . Cheng, S. Y. (2012). Phosphorylation of dedicator of cytokinesis 1 (Dock180) at tyrosine residue Y722 by Src family kinases mediates EGFRvIII-driven glioblastoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(8), 3018-3023. doi: 10.1073/pnas.1121457109
- Feng, H., Hu, B., Liu, K. W., Li, Y., Lu, X., Cheng, T., . . . Cheng, S. Y. (2011). Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRalpha-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. *J Clin Invest*, *121*(12), 4670-4684. doi: 10.1172/jci58559
- Feng, Q., Baird, D., Peng, X., Wang, J., Ly, T., Guan, J. L., & Cerione, R. A. (2006). Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat Cell Biol*, *8*(9), 945-956. doi: 10.1038/ncb1453
- Feng, Q., Baird, D., Yoo, S., Antonyak, M., & Cerione, R. A. (2010). Phosphorylation of the cool-1/beta-Pix protein serves as a regulatory signal for the migration and invasive activity of Src-transformed cells. *J Biol Chem*, *285*(24), 18806-18816. doi: 10.1074/jbc.M109.098079
- Fernandez-Espartero, C. H., Ramel, D., Farago, M., Malartre, M., Luque, C. M., Limanovich, S., . . . Martin-Bermudo, M. D. (2013). GTP exchange factor Vav regulates guided cell migration by coupling guidance receptor signalling to local Rac activation. *J Cell Sci*, *126*(Pt 10), 2285-2293. doi: 10.1242/jcs.124438
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, *2*(10), 795-803. doi: 10.1038/nrc909
- Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *29*(6), 789-791. doi: 10.1161/atvbaha.108.179663
- Ferrara, N. (2010). Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy. *Nat Med*, *16*(10), 1107-1111. doi: 10.1038/nm1010-1107
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., . . . Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, *380*(6573), 439-442. doi: 10.1038/380439a0
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, *9*(6), 669-676. doi: 10.1038/nm0603-669
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., & Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *3*(5), 391-400. doi: 10.1038/nrd1381
- Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, *438*(7070), 967-974. doi: 10.1038/nature04483

- Fiedler, J., Jazbutyte, V., Kirchmaier, B. C., Gupta, S. K., Lorenzen, J., Hartmann, D., . . . Thum, T. (2011). MicroRNA-24 regulates vascularity after myocardial infarction. *Circulation*, *124*(6), 720-730. doi: 10.1161/circulationaha.111.039008
- Flamme, I., Breier, G., & Risau, W. (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol*, *169*(2), 699-712. doi: 10.1006/dbio.1995.1180
- Flamme, I., von Reutern, M., Drexler, H. C., Syed-Ali, S., & Risau, W. (1995). Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation. *Dev Biol*, *171*(2), 399-414. doi: 10.1006/dbio.1995.1291
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, *1*(1), 27-31.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., & Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, *133*(2), 275-288.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., & Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, *376*(6535), 66-70. doi: 10.1038/376066a0
- Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., & Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, *126*(13), 3015-3025.
- Frigault, M. M., Naujokas, M. A., & Park, M. (2008). Gab2 requires membrane targeting and the Met binding motif to promote lamellipodia, cell scatter, and epithelial morphogenesis downstream from the Met receptor. *J Cell Physiol*, *214*(3), 694-705. doi: 10.1002/jcp.21264
- Fu, Z., & Tindall, D. J. (2008). FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene*, *27*(16), 2312-2319. doi: 10.1038/onc.2008.24
- Fujio, Y., & Walsh, K. (1999). Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem*, *274*(23), 16349-16354.
- Fukumoto, T., Kubota, Y., Kitanaka, A., Yamaoka, G., Ohara-Waki, F., Imataki, O., . . . Tanaka, T. (2009). Gab1 transduces PI3K-mediated erythropoietin signals to the Erk pathway and regulates erythropoietin-dependent proliferation and survival of erythroid cells. *Cell Signal*, *21*(12), 1775-1783. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.07.013
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., . . . Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(5), 2604-2609. doi: 10.1073/pnas.041359198
- Gambardella, L., Hemberger, M., Hughes, B., Zudaire, E., Andrews, S., & Vermeren, S. (2010). PI3K signaling through the dual GTPase-activating protein ARAP3 is essential for developmental angiogenesis. *Sci Signal*, *3*(145), ra76. doi: 10.1126/scisignal.2001026
- Gao, Y., Dickerson, J. B., Guo, F., Zheng, J., & Zheng, Y. (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(20), 7618-7623. doi: 10.1073/pnas.0307512101
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., & Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(8), 493-504. doi: 10.1038/nrm3153
- Garcia-Mata, R., Wennerberg, K., Arthur, W. T., Noren, N. K., Ellerbroek, S. M., & Burridge, K. (2006). Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol*, *406*, 425-437. doi: 10.1016/s0076-6879(06)06031-9

- Garrett, T. A., Van Buul, J. D., & Burrige, K. (2007). VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res*, *313*(15), 3285-3297. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.05.027
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, *8*(11), 1223-1234. doi: 10.1038/ncb1486
- Gerber, H. P., Dixit, V., & Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, *273*(21), 13313-13316.
- Gerber, H. P., McMurtry, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., & 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. *J Biol Chem*, *273*(46), 30336-30343.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., . . . Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, *161*(6), 1163-1177. doi: 10.1083/jcb.200302047
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., . . . Ferrara, N. (2001). Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*, *276*(5), 3222-3230. doi: 10.1074/jbc.M002016200
- Gillgrass, A., Cardiff, R. D., Sharan, N., Kannan, S., & Muller, W. J. (2003). Epidermal growth factor receptor-dependent activation of Gab1 is involved in ErbB-2-mediated mammary tumor progression. *Oncogene*, *22*(57), 9151-9155. doi: 10.1038/sj.onc.1206983
- Giubellino, A., Burke, T. R., Jr., & Bottaro, D. P. (2008). Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, *12*(8), 1021-1033. doi: 10.1517/14728222.12.8.1021
- Goh, W. I., & Ahmed, S. (2012). mDia1-3 in mammalian filopodia. *Commun Integr Biol*, *5*(4), 340-344. doi: 10.4161/cib.20214
- Grimsley, C. M., Kinchen, J. M., Tosello-Tramont, A. C., Brugnera, E., Haney, L. B., Lu, M., . . . Ravichandran, K. S. (2004). Dock180 and ELMO1 proteins cooperate to promote evolutionarily conserved Rac-dependent cell migration. *J Biol Chem*, *279*(7), 6087-6097. doi: 10.1074/jbc.M307087200
- Grinnell, K. L., Casserly, B., & Harrington, E. O. (2010). Role of protein tyrosine phosphatase SHP2 in barrier function of pulmonary endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *298*(3), L361-370. doi: 10.1152/ajplung.00374.2009
- Gross, S. R. (2013). Actin binding proteins: their ups and downs in metastatic life. *Cell Adh Migr*, *7*(2), 199-213. doi: 10.4161/cam.23176
- Gu, H., & Neel, B. G. (2003). The "Gab" in signal transduction. *Trends Cell Biol*, *13*(3), 122-130.
- Gu, H., Pratt, J. C., Burakoff, S. J., & Neel, B. G. (1998). Cloning of p97/Gab2, the major SHP2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation. *Mol Cell*, *2*(6), 729-740.
- Gu, H., Saito, K., Klamann, L. D., Shen, J., Fleming, T., Wang, Y., . . . Neel, B. G. (2001). Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature*, *412*(6843), 186-190. doi: 10.1038/35084076
- Gual, P., Giordano, S., Williams, T. A., Rocchi, S., Van Obberghen, E., & Comoglio, P. M. (2000). Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene*, *19*(12), 1509-1518. doi: 10.1038/sj.onc.1203514

- Guegan, F., Tatin, F., Leste-Lasserre, T., Drutel, G., Genot, E., & Moreau, V. (2008). p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J Cell Sci*, *121*(Pt 12), 2054-2061. doi: 10.1242/jcs.025817
- Gumienny, T. L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A. C., Kinchen, J. M., Haney, L. B., Nishiwaki, K., . . . Ravichandran, K. S. (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell*, *107*(1), 27-41.
- Guo, D., Jia, Q., Song, H. Y., Warren, R. S., & Donner, D. B. (1995). Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, *270*(12), 6729-6733.
- Ha, C. H., Bennett, A. M., & Jin, Z. G. (2008). A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, *283*(11), 7261-7270. doi: 10.1074/jbc.M702881200
- Hall, A. (1998a). G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. *Science*, *280*(5372), 2074-2075.
- Hall, A. (1998b). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, *279*(5350), 509-514.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, *28*(1-2), 5-14. doi: 10.1007/s10555-008-9166-3
- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans*, *40*(6), 1378-1382. doi: 10.1042/bst20120103
- Hart, M. J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S. A., & Cerione, R. A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature*, *354*(6351), 311-314. doi: 10.1038/354311a0
- Hart, M. J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S. A., Evans, T., Cerione, R. A., & Zheng, Y. (1994). Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem*, *269*(1), 62-65.
- Hartwell, L. H. (1973). Synchronization of haploid yeast cell cycles, a prelude to conjugation. *Exp Cell Res*, *76*(1), 111-117.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., . . . Matsuda, M. (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol*, *16*(4), 1770-1776.
- Hashimoto, A., Hashimoto, S., Ando, R., Noda, K., Ogawa, E., Kotani, H., . . . Sabe, H. (2011). GEP100-Arf6-AMAP1-cortactin pathway frequently used in cancer invasion is activated by VEGFR2 to promote angiogenesis. *PLoS One*, *6*(8), e23359. doi: 10.1371/journal.pone.0023359
- Hassed, S. J., Wiley, G. B., Wang, S., Lee, J. Y., Li, S., Xu, W., . . . Gaffney, P. M. (2012). RBPJ mutations identified in two families affected by Adams-Oliver syndrome. *Am J Hum Genet*, *91*(2), 391-395. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.07.005
- He, H., Venema, V. J., Gu, X., Venema, R. C., Marrero, M. B., & Caldwell, R. B. (1999). Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem*, *274*(35), 25130-25135.
- He, Y., Northey, J. J., Primeau, M., Machado, R. D., Trembath, R., Siegel, P. M., & Lamarche-Vane, N. (2011). CdGAP is required for transforming growth factor beta- and Neu/ErbB-2-induced breast cancer cell motility and invasion. *Oncogene*, *30*(9), 1032-1045. doi: 10.1038/onc.2010.477
- Head, J. A., Jiang, D., Li, M., Zorn, L. J., Schaefer, E. M., Parsons, J. T., & Weed, S. A. (2003). Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, *14*(8), 3216-3229. doi: 10.1091/mbc.E02-11-0753
- Hellstrom, M., Phng, L. K., & Gerhardt, H. (2007). VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr*, *1*(3), 133-136.

- Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., . . . Betsholtz, C. (2007). DLL4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, *445*(7129), 776-780. doi: 10.1038/nature05571
- Herbst, R., Carroll, P. M., Allard, J. D., Schilling, J., Raabe, T., & Simon, M. A. (1996). Daughter of sevenless is a substrate of the phosphotyrosine phosphatase Corkscrew and functions during sevenless signaling. *Cell*, *85*(6), 899-909.
- Herrera Abreu, M. T., Hughes, W. E., Mele, K., Lyons, R. J., Rickwood, D., Browne, B. C., . . . Daly, R. J. (2011). Gab2 regulates cytoskeletal organization and migration of mammary epithelial cells by modulating RhoA activation. *Mol Biol Cell*, *22*(1), 105-116. doi: 10.1091/mbc.E10-03-0185
- High, F. A., & Epstein, J. A. (2008). The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat Rev Genet*, *9*(1), 49-61. doi: 10.1038/nrg2279
- Higuchi, K., Nakaoka, Y., Shioyama, W., Arita, Y., Hashimoto, T., Yasui, T., . . . Komuro, I. (2012). Endothelial Gab1 deletion accelerates angiotensin II-dependent vascular inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circ J*, *76*(8), 2031-2040.
- Hill, A., McFarlane, S., Mulligan, K., Gillespie, H., Draffin, J. E., Trimble, A., . . . Waugh, D. J. (2006). Cortactin underpins CD44-promoted invasion and adhesion of breast cancer cells to bone marrow endothelial cells. *Oncogene*, *25*(45), 6079-6091. doi: 10.1038/sj.onc.1209628
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., & Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(16), 9349-9354.
- Hoang, M. V., Nagy, J. A., & Senger, D. R. (2011). Cdc42-mediated inhibition of GSK-3beta improves angio-architecture and lumen formation during VEGF-driven pathological angiogenesis. *Microvasc Res*, *81*(1), 34-43. doi: 10.1016/j.mvr.2010.09.001
- Hoang, M. V., Whelan, M. C., & Senger, D. R. (2004). Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(7), 1874-1879. doi: 10.1073/pnas.0308525100
- Holgado-Madruga, M., Emlet, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K., & Wong, A. J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*, *379*(6565), 560-564. doi: 10.1038/379560a0
- Holgado-Madruga, M., Moscatello, D. K., Emlet, D. R., Dieterich, R., & Wong, A. J. (1997). Grb2-associated binder-1 mediates phosphatidylinositol 3-kinase activation and the promotion of cell survival by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(23), 12419-12424.
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M., & Cross, M. J. (2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, *19*(10), 2003-2012. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.05.013
- Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., . . . Welsh, M. (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*, *279*(21), 22267-22275. doi: 10.1074/jbc.M312729200
- Hornig, C., & Weich, H. A. (1999). Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis*, *3*(1), 33-39.
- Hornstein, I., Alcover, A., & Katzav, S. (2004). Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal*, *16*(1), 1-11.
- Horowitz, A., & Simons, M. (2008). Branching morphogenesis. *Circ Res*, *103*(8), 784-795. doi: 10.1161/circresaha.108.181818
- Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., & Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, *267*(36), 26031-26037.

- Hu, G. D., Chen, Y. H., Zhang, L., Tong, W. C., Cheng, Y. X., Luo, Y. L., . . . Zhang, L. (2011). The generation of the endothelial specific cdc42-deficient mice and the effect of cdc42 deletion on the angiogenesis and embryonic development. *Chin Med J (Engl)*, *124*(24), 4155-4159.
- Huang, C., Liu, J., Haudenschild, C. C., & Zhan, X. (1998). The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem*, *273*(40), 25770-25776.
- Huang, Q., Lerner-Marmarosh, N., Che, W., Ohta, S., Osawa, M., Yoshizumi, M., . . . Abe, J. (2002). The novel role of the C-terminal region of SHP-2. Involvement of Gab1 and SHP-2 phosphatase activity in Elk-1 activation. *J Biol Chem*, *277*(32), 29330-29341. doi: 10.1074/jbc.M112450200
- Hunter, S. G., Zhuang, G., Brantley-Sieders, D., Swat, W., Cowan, C. W., & Chen, J. (2006). Essential role of Vav family guanine nucleotide exchange factors in EphA receptor-mediated angiogenesis. *Mol Cell Biol*, *26*(13), 4830-4842. doi: 10.1128/mcb.02215-05
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., . . . Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, *350*(23), 2335-2342. doi: 10.1056/NEJMoa032691
- Iden, S., & Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(11), 846-859. doi: 10.1038/nrm2521
- Ikram, M. A., Liu, F., Oostra, B. A., Hofman, A., van Duijn, C. M., & Breteler, M. M. (2009). The GAB2 gene and the risk of Alzheimer's disease: replication and meta-analysis. *Biol Psychiatry*, *65*(11), 995-999. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.014
- Illes, A., Enyedi, B., Tamas, P., Balazs, A., Bogel, G., & Buday, L. (2006). Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerisation. *Cell Signal*, *18*(6), 830-840. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.07.012
- Iruela-Arispe, M. L., & Davis, G. E. (2009). Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*, *16*(2), 222-231. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.013
- Isrie, M., Wuyts, W., Van Esch, H., & Devriendt, K. (2014). Isolated terminal limb reduction defects: extending the clinical spectrum of Adams-Oliver syndrome and ARHGAP31 mutations. *Am J Med Genet A*, *164a*(6), 1576-1579. doi: 10.1002/ajmg.a.36486
- Itoh, M., Yoshida, Y., Nishida, K., Narimatsu, M., Hibi, M., & Hirano, T. (2000). Role of Gab1 in heart, placenta, and skin development and growth factor- and cytokine-induced extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol*, *20*(10), 3695-3704.
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *21*, 247-269. doi: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721
- Jain, M., Bhat, G. P., Vijayraghavan, K., & Inamdar, M. S. (2012). Rudhira/BCAS3 is a cytoskeletal protein that controls Cdc42 activation and directional cell migration during angiogenesis. *Exp Cell Res*, *318*(6), 753-767. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.01.016
- Jain, R. K. (2005a). Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncology (Williston Park)*, *19*(4 Suppl 3), 7-16.
- Jain, R. K. (2005b). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, *307*(5706), 58-62. doi: 10.1126/science.1104819
- Jain, R. K., & Carmeliet, P. (2012). SnapShot: Tumor angiogenesis. *Cell*, *149*(6), 1408-1408.e1401. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.025
- Jenna, S., Hussain, N. K., Danek, E. I., Triki, I., Wasiak, S., McPherson, P. S., & Lamarche-Vane, N. (2002). The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem*, *277*(8), 6366-6373. doi: 10.1074/jbc.M105516200

- Jin, Z. G., Wong, C., Wu, J., & Berk, B. C. (2005). Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, *280*(13), 12305-12309. doi: 10.1074/jbc.M500294200
- Joberty, G., Petersen, C., Gao, L., & Macara, I. G. (2000). The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*, *2*(8), 531-539. doi: 10.1038/35019573
- Johnson, D. I., & Pringle, J. R. (1990). Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol*, *111*(1), 143-152.
- Julian, L., & Olson, M. F. (2014). Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): Structure, regulation, and functions. *Small GTPases*, *5*.
- Kallin, A., Demoulin, J. B., Nishida, K., Hirano, T., Ronnstrand, L., & Heldin, C. H. (2004). Gab1 contributes to cytoskeletal reorganization and chemotaxis in response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem*, *279*(17), 17897-17904. doi: 10.1074/jbc.M312996200
- Kaluza, D., Kroll, J., Gesierich, S., Yao, T. P., Boon, R. A., Hergenreider, E., . . . Urbich, C. (2011). Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *Embo j*, *30*(20), 4142-4156. doi: 10.1038/emboj.2011.298
- Kanno, S., Oda, N., Abe, M., Terai, Y., Ito, M., Shitara, K., . . . Sato, Y. (2000). Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, *19*(17), 2138-2146. doi: 10.1038/sj.onc.1203533
- Kappas, N. C., Zeng, G., Chappell, J. C., Kearney, J. B., Hazarika, S., Kallianos, K. G., . . . Bautsch, V. L. (2008). The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *J Cell Biol*, *181*(5), 847-858. doi: 10.1083/jcb.200709114
- Karimzadeh, F., Primeau, M., Mountassif, D., Rouiller, I., & Lamarche-Vane, N. (2012). A stretch of polybasic residues mediates Cdc42 GTPase-activating protein (CdGAP) binding to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and regulates its GAP activity. *J Biol Chem*, *287*(23), 19610-19621. doi: 10.1074/jbc.M112.344606
- Kather, J. N., & Kroll, J. (2013). Rho guanine exchange factors in blood vessels: fine-tuners of angiogenesis and vascular function. *Exp Cell Res*, *319*(9), 1289-1297. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.12.015
- Katoh, H., Hiramoto, K., & Negishi, M. (2006). Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci*, *119*(Pt 1), 56-65. doi: 10.1242/jcs.02720
- Katoh, H., & Negishi, M. (2003). RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature*, *424*(6947), 461-464. doi: 10.1038/nature01817
- Katzav, S., Martin-Zanca, D., & Barbacid, M. (1989). vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *Embo j*, *8*(8), 2283-2290.
- Ke, Y., Wu, D., Princen, F., Nguyen, T., Pang, Y., Lesperance, J., . . . Feng, G. S. (2007). Role of Gab2 in mammary tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*, *26*(34), 4951-4960. doi: 10.1038/sj.onc.1210315
- Keyt, B. A., Nguyen, H. V., Berleau, L. T., Duarte, C. M., Park, J., Chen, H., & Ferrara, N. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, *271*(10), 5638-5646.
- Kholodenko, B. N. (2006). Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(3), 165-176. doi: 10.1038/nrm1838
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, *362*(6423), 841-844. doi: 10.1038/362841a0

- Kim, M. J., Kim, E., Ryu, S. H., & Suh, P. G. (2000). The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Exp Mol Med*, *32*(3), 101-109. doi: 10.1038/emm.2000.18
- Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M., & Schwartz, M. A. (1999). A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol*, *147*(4), 831-844.
- Kirkbride, K. C., Sung, B. H., Sinha, S., & Weaver, A. M. (2011). Cortactin: a multifunctional regulator of cellular invasiveness. *Cell Adh Migr*, *5*(2), 187-198.
- Kitamura, T., Asai, N., Enomoto, A., Maeda, K., Kato, T., Ishida, M., . . . Takahashi, M. (2008). Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol*, *10*(3), 329-337. doi: 10.1038/ncb1695
- Kiyatkin, A., Aksamitiene, E., Markevich, N. I., Borisov, N. M., Hoek, J. B., & Kholodenko, B. N. (2006). Scaffolding protein Grb2-associated binder 1 sustains epidermal growth factor-induced mitogenic and survival signaling by multiple positive feedback loops. *J Biol Chem*, *281*(29), 19925-19938. doi: 10.1074/jbc.M600482200
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T., & Matsuda, M. (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev*, *12*(21), 3331-3336.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*, *437*(2), 169-183. doi: 10.1042/bj20110301
- Koh, W., Mahan, R. D., & Davis, G. E. (2008). Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci*, *121*(Pt 7), 989-1001. doi: 10.1242/jcs.020693
- Koh, W., Sachidanandam, K., Stratman, A. N., Sacharidou, A., Mayo, A. M., Murphy, E. A., . . . Davis, G. E. (2009). Formation of endothelial lumens requires a coordinated PKCepsilon-, Src-, Pak- and Raf-kinase-dependent signaling cascade downstream of Cdc42 activation. *J Cell Sci*, *122*(Pt 11), 1812-1822. doi: 10.1242/jcs.045799
- Korhonen, J. M., Said, F. A., Wong, A. J., & Kaplan, D. R. (1999). Gab1 mediates neurite outgrowth, DNA synthesis, and survival in PC12 cells. *J Biol Chem*, *274*(52), 37307-37314.
- Kowalski, J. R., Egile, C., Gil, S., Snapper, S. B., Li, R., & Thomas, S. M. (2005). Cortactin regulates cell migration through activation of N-WASP. *J Cell Sci*, *118*(Pt 1), 79-87. doi: 10.1242/jcs.01586
- Kumar, R., Gururaj, A. E., & Barnes, C. J. (2006). p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer*, *6*(6), 459-471. doi: 10.1038/nrc1892
- Kumarswamy, R., Volkmann, I., Beermann, J., Napp, L. C., Jabs, O., Bhayadia, R., . . . Thum, T. (2014). Vascular importance of the miR-212/132 cluster. *Eur Heart J*. doi: 10.1093/eurheartj/ehu344
- Kurihara, T., Westenskow, P. D., & Friedlander, M. (2014). Hypoxia-inducible factor (HIF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in the retina. *Adv Exp Med Biol*, *801*, 275-281. doi: 10.1007/978-1-4614-3209-8_35
- Kusuhara, S., Fukushima, Y., Fukuhara, S., Jakt, L. M., Okada, M., Shimizu, Y., . . . Uemura, A. (2012). Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. *PLoS One*, *7*(9), e45858. doi: 10.1371/journal.pone.0045858
- LaLonde, D. P., Grubinger, M., Lamarche-Vane, N., & Turner, C. E. (2006). CdGAP associates with actopaxin to regulate integrin-dependent changes in cell morphology and motility. *Curr Biol*, *16*(14), 1375-1385. doi: 10.1016/j.cub.2006.05.057
- Lamallice, L., Houle, F., & 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. *J Biol Chem*, *281*(45), 34009-34020. doi: 10.1074/jbc.M603928200

- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., & Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, *23*(2), 434-445. doi: 10.1038/sj.onc.1207034
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., & Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, *100*(6), 782-794. doi: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e
- Lamarche-Vane, N., & Hall, A. (1998). CdGAP, a novel proline-rich GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac. *J Biol Chem*, *273*(44), 29172-29177.
- Lamorte, L., Rodrigues, S., Naujokas, M., & Park, M. (2002). Crk synergizes with epidermal growth factor for epithelial invasion and morphogenesis and is required for the met morphogenic program. *J Biol Chem*, *277*(40), 37904-37911. doi: 10.1074/jbc.M201743200
- Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., & Schlessinger, J. (2004). The docking protein Gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic pathway. *Mol Cell Biol*, *24*(13), 5657-5666. doi: 10.1128/mcb.24.13.5657-5666.2004
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol*, *174*(4), 593-604. doi: 10.1083/jcb.200602080
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., . . . Chen, Y. J. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), 860-921. doi: 10.1038/35057062
- Laramee, M., Chabot, C., Cloutier, M., Stenne, R., Holgado-Madruga, M., Wong, A. J., & Royal, I. (2007). The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *J Biol Chem*, *282*(11), 7758-7769. doi: 10.1074/jbc.M611327200
- Laurin, M., & Cote, J. F. (2014). Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes Dev*, *28*(6), 533-547. doi: 10.1101/gad.236349.113
- Laurin, M., Huber, J., Pelletier, A., Houalla, T., Park, M., Fukui, Y., . . . Cote, J. F. (2013). Rac-specific guanine nucleotide exchange factor DOCK1 is a critical regulator of HER2-mediated breast cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(18), 7434-7439. doi: 10.1073/pnas.1213050110
- Law, S. H., & Sargent, T. D. (2013). Maternal pak4 expression is required for primitive myelopoiesis in zebrafish. *Mech Dev*, *130*(2-3), 181-194. doi: 10.1016/j.mod.2012.09.005
- Le Boeuf, F., Houle, F., & Huot, J. (2004). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J Biol Chem*, *279*(37), 39175-39185. doi: 10.1074/jbc.M405493200
- Le Boeuf, F., Houle, F., Sussman, M., & Huot, J. (2006). Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Mol Biol Cell*, *17*(8), 3508-3520. doi: 10.1091/mbc.E05-12-1158
- Le Goff, A., Ji, Z., Leclercq, B., Bourette, R. P., Mougel, A., Guerardel, C., . . . Fafeur, V. (2012). Anti-apoptotic role of caspase-cleaved GAB1 adaptor protein in hepatocyte growth factor/scatter factor-MET receptor protein signaling. *J Biol Chem*, *287*(42), 35382-35396. doi: 10.1074/jbc.M112.409797
- Lebensohn, A. M., & Kirschner, M. W. (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell*, *36*(3), 512-524. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.024

- Lee, J. F., Ozaki, H., Zhan, X., Wang, E., Hla, T., & Lee, M. J. (2006). Sphingosine-1-phosphate signaling regulates lamellipodia localization of cortactin complexes in endothelial cells. *Histochem Cell Biol*, *126*(3), 297-304. doi: 10.1007/s00418-006-0143-z
- Leite de Oliveira, R., Hamm, A., & Mazzone, M. (2011). Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med*, *32*(2), 71-87. doi: 10.1016/j.mam.2011.04.001
- Lemarie, C. A., & Lehoux, S. (2011). The gift of Gab1 (Grb-2-associated binder 1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(5), 956-957. doi: 10.1161/atvbaha.111.225987
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, *246*(4935), 1306-1309.
- Li, B., Fuh, G., Meng, G., Xin, X., Gerritsen, M. E., Cunningham, B., & de Vos, A. M. (2000). Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. Generation and characterization. *J Biol Chem*, *275*(38), 29823-29828. doi: 10.1074/jbc.M002015200
- Lin, A. E., Westgate, M. N., van der Velde, M. E., Lacro, R. V., & Holmes, L. B. (1998). Adams-Oliver syndrome associated with cardiovascular malformations. *Clin Dysmorphol*, *7*(4), 235-241.
- Lin, D., Edwards, A. S., Fawcett, J. P., Mbamalu, G., Scott, J. D., & Pawson, T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol*, *2*(8), 540-547. doi: 10.1038/35019582
- Lin, Y., Chen, N. T., Shih, Y. P., Liao, Y. C., Xue, L., & Lo, S. H. (2010). DLC2 modulates angiogenic responses in vascular endothelial cells by regulating cell attachment and migration. *Oncogene*, *29*(20), 3010-3016. doi: 10.1038/onc.2010.54
- Liu, J., Huang, C., & Zhan, X. (1999). Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene*, *18*(48), 6700-6706. doi: 10.1038/sj.onc.1203050
- Liu, Y., & Rohrschneider, L. R. (2002). The gift of Gab. *FEBS Lett*, *515*(1-3), 1-7.
- Lizama, C. O., & Zovein, A. C. (2013). Polarizing pathways: balancing endothelial polarity, permeability, and lumen formation. *Exp Cell Res*, *319*(9), 1247-1254. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.028
- Lock, L. S., Maroun, C. R., Naujokas, M. A., & Park, M. (2002). Distinct recruitment and function of Gab1 and Gab2 in Met receptor-mediated epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell*, *13*(6), 2132-2146. doi: 10.1091/mbc.02-02-0031.
- Lock, L. S., Royal, I., Naujokas, M. A., & Park, M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*, *275*(40), 31536-31545. doi: 10.1074/jbc.M003597200
- Lu, M., Kinchen, J. M., Rossman, K. L., Grimsley, C., deBakker, C., Brugnera, E., . . . Ravichandran, K. S. (2004). PH domain of ELMO functions in trans to regulate Rac activation via Dock180. *Nat Struct Mol Biol*, *11*(8), 756-762. doi: 10.1038/nsmb800
- Lu, M., Kinchen, J. M., Rossman, K. L., Grimsley, C., Hall, M., Sondek, J., . . . Ravichandran, K. S. (2005). A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr Biol*, *15*(4), 371-377. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.050
- Lu, Y., Xiong, Y., Huo, Y., Han, J., Yang, X., Zhang, R., . . . Luo, J. (2011). Grb-2-associated binder 1 (Gab1) regulates postnatal ischemic and VEGF-induced angiogenesis through the protein kinase A-endothelial NOS pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(7), 2957-2962. doi: 10.1073/pnas.1009395108
- Lua, B. L., & Low, B. C. (2005). Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett*, *579*(3), 577-585. doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.055
- Lynch, D. K., & Daly, R. J. (2002). PKB-mediated negative feedback tightly regulates mitogenic signalling via Gab2. *Embo j*, *21*(1-2), 72-82.

- Maa, M. C., Wilson, L. K., Moyers, J. S., Vines, R. R., Parsons, J. T., & Parsons, S. J. (1992). Identification and characterization of a cytoskeleton-associated, epidermal growth factor sensitive pp60c-src substrate. *Oncogene*, *7*(12), 2429-2438.
- MacGrath, S. M., & Koleske, A. J. (2012). Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *J Cell Sci*, *125*(Pt 7), 1621-1626. doi: 10.1242/jcs.093781
- Madaule, P., & Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell*, *41*(1), 31-40.
- Madaule, P., Axel, R., & Myers, A. M. (1987). Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(3), 779-783.
- Maniscalco, M., Zedda, A., Faraone, S., de Laurentiis, G., Verde, R., Molese, V., . . . Sofia, M. (2005). Association of Adams-Oliver syndrome with pulmonary arterio-venous malformation in the same family: a further support to the vascular hypothesis. *Am J Med Genet A*, *136*(3), 269-274. doi: 10.1002/ajmg.a.30828
- Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., . . . Lim, L. (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell*, *1*(2), 183-192.
- Mao, Y., & Lee, A. W. (2005). A novel role for Gab2 in bFGF-mediated cell survival during retinoic acid-induced neuronal differentiation. *J Cell Biol*, *170*(2), 305-316. doi: 10.1083/jcb.200505061
- Marignani, P. A., & Carpenter, C. L. (2001). Vav2 is required for cell spreading. *J Cell Biol*, *154*(1), 177-186.
- Maroun, C. R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M. A., Fournier, T. M., Wong, A. J., & Park, M. (1999). The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, *19*(3), 1784-1799.
- Maroun, C. R., Moscatello, D. K., Naujokas, M. A., Holgado-Madruga, M., Wong, A. J., & Park, M. (1999). A conserved inositol phospholipid binding site within the pleckstrin homology domain of the Gab1 docking protein is required for epithelial morphogenesis. *J Biol Chem*, *274*(44), 31719-31726.
- Maroun, C. R., Naujokas, M. A., Holgado-Madruga, M., Wong, A. J., & Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol*, *20*(22), 8513-8525.
- Maroun, C. R., Naujokas, M. A., & Park, M. (2003). Membrane targeting of Grb2-associated binder-1 (Gab1) scaffolding protein through Src myristoylation sequence substitutes for Gab1 pleckstrin homology domain and switches an epidermal growth factor response to an invasive morphogenic program. *Mol Biol Cell*, *14*(4), 1691-1708. doi: 10.1091/mbc.E02-06-0352
- Martinez-Quiles, N., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., Ramesh, N., & Geha, R. S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol*, *24*(12), 5269-5280. doi: 10.1128/mcb.24.12.5269-5280.2004
- Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., . . . Claesson-Welsh, L. (2005). VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *Embo j*, *24*(13), 2342-2353. doi: 10.1038/sj.emboj.7600709
- Mattoon, D. R., Lamothe, B., Lax, I., & Schlessinger, J. (2004). The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway. *BMC Biol*, *2*, 24. doi: 10.1186/1741-7007-2-24
- Md Hashim, N. F., Nicholas, N. S., Dart, A. E., Kiriakidis, S., Paleolog, E., & Wells, C. M. (2013). Hypoxia-induced invadopodia formation: a role for beta-PIX. *Open Biol*, *3*(6), 120159. doi: 10.1098/rsob.120159

- Miki, H., Suetsugu, S., & Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo j*, *17*(23), 6932-6941. doi: 10.1093/emboj/17.23.6932
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., & Ullrich, A. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, *72*(6), 835-846.
- Miura, K., Wakayama, Y., Tanino, M., Orba, Y., Sawa, H., Hatakeyama, M., . . . Mochizuki, N. (2013). Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene*, *32*(45), 5292-5301. doi: 10.1038/onc.2012.571
- Miyashita, A., Arai, H., Asada, T., Imagawa, M., Shoji, M., Higuchi, S., . . . Kuwano, R. (2009). GAB2 is not associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. *Eur J Hum Genet*, *17*(5), 682-686. doi: 10.1038/ejhg.2008.181
- Monaghan-Benson, E., & Burrige, K. (2009). The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species. *J Biol Chem*, *284*(38), 25602-25611. doi: 10.1074/jbc.M109.009894
- Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J. P., & Raynal, P. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. *J Biol Chem*, *280*(7), 5350-5360. doi: 10.1074/jbc.M410012200
- Mossessova, E., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2003). Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol Cell*, *12*(6), 1403-1411.
- Munemitsu, S., Innis, M. A., Clark, R., McCormick, F., Ullrich, A., & Polakis, P. (1990). Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol*, *10*(11), 5977-5982.
- Munshi, N., Groopman, J. E., Gill, P. S., & Ganju, R. K. (2000). c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol*, *164*(3), 1169-1174.
- Murphy, D. A., & Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *12*(7), 413-426. doi: 10.1038/nrm3141
- Murray, B. W., Guo, C., Piraino, J., Westwick, J. K., Zhang, C., Lamerdin, J., . . . Smeal, T. (2010). Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(20), 9446-9451. doi: 10.1073/pnas.0911863107
- Murray, D. W., Didier, S., Chan, A., Paulino, V., Van Aelst, L., Ruggieri, R., . . . Symons, M. (2014). Guanine nucleotide exchange factor Dock7 mediates HGF-induced glioblastoma cell invasion via Rac activation. *Br J Cancer*, *110*(5), 1307-1315. doi: 10.1038/bjc.2014.39
- Nacmias, B., Tedde, A., Bagnoli, S., Cellini, E., Guarnieri, B. M., Piacentini, S., & Sorbi, S. (2009). Implication of GAB2 gene polymorphism in Italian patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, *16*(3), 513-515. doi: 10.3233/jad-2009-1005
- Nagy, J. A., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2007). VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol*, *2*, 251-275. doi: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.134925
- Nakaoka, Y., & Komuro, I. (2013). Gab docking proteins in cardiovascular disease, cancer, and inflammation. *Int J Inflamm*, *2013*, 141068. doi: 10.1155/2013/141068
- Nakaoka, Y., Nishida, K., Narimatsu, M., Kamiya, A., Minami, T., Sawa, H., . . . Mochizuki, N. (2007). Gab family proteins are essential for postnatal maintenance of cardiac function via neuregulin-1/ErbB signaling. *J Clin Invest*, *117*(7), 1771-1781. doi: 10.1172/jci30651

- Narumiya, S., Tanji, M., & Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev*, *28*(1-2), 65-76. doi: 10.1007/s10555-008-9170-7
- Nishida, K., & Hirano, T. (2003). The role of Gab family scaffolding adapter proteins in the signal transduction of cytokine and growth factor receptors. *Cancer Sci*, *94*(12), 1029-1033.
- Nishida, K., Wang, L., Morii, E., Park, S. J., Narimatsu, M., Itoh, S., . . . Hirano, T. (2002). Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling. *Blood*, *99*(5), 1866-1869.
- Nishida, K., Yoshida, Y., Itoh, M., Fukada, T., Ohtani, T., Shirogane, T., . . . Hirano, T. (1999). Gab-family adapter proteins act downstream of cytokine and growth factor receptors and T- and B-cell antigen receptors. *Blood*, *93*(6), 1809-1816.
- Nobes, C. D., & Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, *81*(1), 53-62.
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N. W., . . . Thurston, G. (2006). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, *444*(7122), 1032-1037. doi: 10.1038/nature05355
- Noren, N. K., Liu, B. P., Burrige, K., & Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol*, *150*(3), 567-580.
- O'Connor, K., & Chen, M. (2013). Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases*, *4*(3), 141-147. doi: 10.4161/sgtp.25131
- Oh, W. K., Yoo, J. C., Jo, D., Song, Y. H., Kim, M. G., & Park, D. (1997). Cloning of a SH3 domain-containing proline-rich protein, p85SPR, and its localization in focal adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*, *235*(3), 794-798. doi: 10.1006/bbrc.1997.6875
- Olson, M. F. (2008). Applications for ROCK kinase inhibition. *Curr Opin Cell Biol*, *20*(2), 242-248. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.002
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., . . . Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, *121*(3), 335-348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034
- Ortiz-Padilla, C., Gallego-Ortega, D., Browne, B. C., Hochgrafe, F., Caldon, C. E., Lyons, R. J., . . . Daly, R. J. (2013). Functional characterization of cancer-associated Gab1 mutations. *Oncogene*, *32*(21), 2696-2702. doi: 10.1038/onc.2012.271
- Oser, M., Mader, C. C., Gil-Henn, H., Magalhaes, M., Bravo-Cordero, J. J., Koleske, A. J., & Condeelis, J. (2010). Specific tyrosine phosphorylation sites on cortactin regulate Nck1-dependent actin polymerization in invadopodia. *J Cell Sci*, *123*(Pt 21), 3662-3673. doi: 10.1242/jcs.068163
- Oshikawa, J., Kim, S. J., Furuta, E., Caliceti, C., Chen, G. F., McKinney, R. D., . . . Ushio-Fukai, M. (2012). Novel role of p66Shc in ROS-dependent VEGF signaling and angiogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *302*(3), H724-732. doi: 10.1152/ajpheart.00739.2011
- Oubaha, M., Lin, M. I., Margaron, Y., Filion, D., Price, E. N., Zon, L. I., . . . 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*(16), 3371-3381. doi: 10.1182/blood-2012-03-419721
- Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., . . . Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, *15*(3), 220-231. doi: 10.1016/j.ccr.2009.01.027

- Paliouras, G. N., Naujokas, M. A., & Park, M. (2009). Pak4, a novel Gab1 binding partner, modulates cell migration and invasion by the Met receptor. *Mol Cell Biol*, *29*(11), 3018-3032. doi: 10.1128/mcb.01286-08
- Pan, X. L., Ren, R. J., Wang, G., Tang, H. D., & Chen, S. D. (2010). The Gab2 in signal transduction and its potential role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*, *26*(3), 241-246. doi: 10.1007/s12264-010-1109-7
- Park, J. E., Keller, G. A., & Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, *4*(12), 1317-1326.
- Parry, R. V., Whittaker, G. C., Sims, M., Edmead, C. E., Welham, M. J., & Ward, S. G. (2006). Ligation of CD28 stimulates the formation of a multimeric signaling complex involving grb-2-associated binder 2 (gab2), SRC homology phosphatase-2, and phosphatidylinositol 3-kinase: evidence that negative regulation of CD28 signaling requires the gab2 pleckstrin homology domain. *J Immunol*, *176*(1), 594-602.
- Paterson, H. F., Self, A. J., Garrett, M. D., Just, I., Aktories, K., & Hall, A. (1990). Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*, *111*(3), 1001-1007.
- Pawson, T. (2007). Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol*, *19*(2), 112-116. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.013
- Pawson, T., & Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, *278*(5346), 2075-2080.
- Peglion, F., Lense, F., & Etienne-Manneville, S. (2014). Adherens junction treadmill during collective migration. *Nat Cell Biol*, *16*(7), 639-651. doi: 10.1038/ncb2985
- Pegtel, D. M., Ellenbroek, S. I., Mertens, A. E., van der Kammen, R. A., de Rooij, J., & Collard, J. G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr Biol*, *17*(19), 1623-1634. doi: 10.1016/j.cub.2007.08.035
- Peralta-Calvo, J., Pastora, N., Casa-Ventura, Y. G., Hernandez-Serrano, R., & Abelairas, J. (2012). Peripheral ischemic retinopathy in Adams-Oliver syndrome. *Arch Ophthalmol*, *130*(8), 1078-1080. doi: 10.1001/archophthalmol.2012.531
- Phung, T. L., Ziv, K., Dabydeen, D., Eyiah-Mensah, G., Riveros, M., Perruzzi, C., . . . Benjamin, L. E. (2006). Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell*, *10*(2), 159-170. doi: 10.1016/j.ccr.2006.07.003
- Piazza, A. J., Blackston, D., & Sola, A. (2004). A case of Adams-Oliver syndrome with associated brain and pulmonary involvement: further evidence of vascular pathology? *Am J Med Genet A*, *130a*(2), 172-175. doi: 10.1002/ajmg.a.30210
- Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, *36*, 451-477. doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936
- Pollard, T. D., & Beltzner, C. C. (2002). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, *12*(6), 768-774.
- Pollard, T. D., & Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, *112*(4), 453-465.
- Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, *326*(5957), 1208-1212. doi: 10.1126/science.1175862
- Porfiri, E., & McCormick, F. (1996). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by phosphorylation of the ras exchange factor hSOS1. *J Biol Chem*, *271*(10), 5871-5877.
- Potente, M., Gerhardt, H., & Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, *146*(6), 873-887. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.039

- Potter, M. D., Barbero, S., & Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem*, 280(36), 31906-31912. doi: 10.1074/jbc.M505568200
- Pratt, J. C., Igras, V. E., Maeda, H., Baksh, S., Gelfand, E. W., Burakoff, S. J., . . . Gu, H. (2000). Cutting edge: gab2 mediates an inhibitory phosphatidylinositol 3'-kinase pathway in T cell antigen receptor signaling. *J Immunol*, 165(8), 4158-4163.
- Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., . . . Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*, 57(20), 4593-4599.
- Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., & Rusnati, M. (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16(2), 159-178. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.01.004
- Primeau, M., Ben Djoudi Ouadda, A., & Lamarche-Vane, N. (2011). Cdc42 GTPase-activating protein (CdGAP) interacts with the SH3D domain of Intersectin through a novel basic-rich motif. *FEBS Lett*, 585(6), 847-853. doi: 10.1016/j.febslet.2011.02.022
- Qu, J., Li, X., Novitsch, B. G., Zheng, Y., Kohn, M., Xie, J. M., . . . Minden, A. (2003). PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Biol*, 23(20), 7122-7133.
- Raabe, T., Riesgo-Escovar, J., Liu, X., Bausenwein, B. S., Deak, P., Maroy, P., & Hafen, E. (1996). DOS, a novel pleckstrin homology domain-containing protein required for signal transduction between sevenless and Ras1 in *Drosophila*. *Cell*, 85(6), 911-920.
- Raftopoulou, M., & Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, 265(1), 23-32.
- Rahimi, N., Dayanir, V., & Lashkari, K. (2000). Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 275(22), 16986-16992. doi: 10.1074/jbc.M000528200
- Rajadurai, C. V., Havrylov, S., Zaoui, K., Vaillancourt, R., Stuibler, M., Naujokas, M., . . . Park, M. (2012). Met receptor tyrosine kinase signals through a cortactin-Gab1 scaffold complex, to mediate invadopodia. *J Cell Sci*, 125(Pt 12), 2940-2953. doi: 10.1242/jcs.100834
- Ramirez-Lorca, R., Boada, M., Saez, M. E., Hernandez, I., Mauleon, A., Rosende-Roca, M., . . . Ruiz, A. (2009). GAB2 gene does not modify the risk of Alzheimer's disease in Spanish APOE 4 carriers. *J Nutr Health Aging*, 13(3), 214-219.
- Reiman, E. M., Webster, J. A., Myers, A. J., Hardy, J., Dunckley, T., Zismann, V. L., . . . Stephan, D. A. (2007). GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron*, 54(5), 713-720. doi: 10.1016/j.neuron.2007.05.022
- Ren, G., Crampton, M. S., & Yap, A. S. (2009). Cortactin: Coordinating adhesion and the actin cytoskeleton at cellular protrusions. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(10), 865-873. doi: 10.1002/cm.20380
- Ren, Y., Meng, S., Mei, L., Zhao, Z. J., Jove, R., & Wu, J. (2004). Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 279(9), 8497-8505. doi: 10.1074/jbc.M312575200
- Renault, L., Guibert, B., & Cherfils, J. (2003). Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature*, 426(6966), 525-530. doi: 10.1038/nature02197
- Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., Wu, J., & Zhang, Z. (1994). Identification of a new catenin: the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol Cell Biol*, 14(12), 8333-8342.
- Ridley, A. J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, 145(7), 1012-1022. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.010

- Ridley, A. J., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, *70*(3), 389-399.
- Ridley, A. J., & Hall, A. (2004). Snails, Swiss, and serum: the solution for Rac 'n' Rho. *Cell*, *116*(2 Suppl), S23-25, 22 p following S25.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, *70*(3), 401-410.
- Rini, B. I., Halabi, S., Rosenberg, J. E., Stadler, W. M., Vaena, D. A., Ou, S. S., . . . Small, E. J. (2008). Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. *J Clin Oncol*, *26*(33), 5422-5428. doi: 10.1200/jco.2008.16.9847
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, *386*(6626), 671-674. doi: 10.1038/386671a0
- Risau, W., & Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *11*, 73-91. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445
- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., . . . Williams, D. A. (1999). Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity*, *10*(2), 183-196.
- Robinson, C. J., & Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci*, *114*(Pt 5), 853-865.
- Roca, C., & Adams, R. H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev*, *21*(20), 2511-2524. doi: 10.1101/gad.1589207
- Rodrigues, G. A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S. H., & Schlessinger, J. (2000). A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*, *20*(4), 1448-1459.
- Rolny, C., Nilsson, I., Magnusson, P., Armulik, A., Jakobsson, L., Wentzel, P., . . . Claesson-Welsh, L. (2006). Platelet-derived growth factor receptor-beta promotes early endothelial cell differentiation. *Blood*, *108*(6), 1877-1886. doi: 10.1182/blood-2006-04-014894
- Romero, F., & Fischer, S. (1996). Structure and function of vav. *Cell Signal*, *8*(8), 545-553.
- Ron, D., Graziani, G., Aaronson, S. A., & Eva, A. (1989). The N-terminal region of proto-dbl down regulates its transforming activity. *Oncogene*, *4*(9), 1067-1072.
- Rossman, K. L., Der, C. J., & Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(2), 167-180. doi: 10.1038/nrm1587
- Rossman, K. L., Worthylake, D. K., Snyder, J. T., Siderovski, D. P., Campbell, S. L., & Sondek, J. (2002). A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo j*, *21*(6), 1315-1326. doi: 10.1093/emboj/21.6.1315
- Rothschild, B. L., Shim, A. H., Ammer, A. G., Kelley, L. C., Irby, K. B., Head, J. A., . . . Weed, S. A. (2006). Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer Res*, *66*(16), 8017-8025. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-4490
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., & Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, *15*(18), 2169-2177. doi: 10.1038/sj.onc.1201380
- Royal, I., Lamarche-Vane, N., Lamorte, L., Kaibuchi, K., & Park, M. (2000). Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol Biol Cell*, *11*(5), 1709-1725.
- Rozakis-Adcock, M., van der Geer, P., Mbamalu, G., & Pawson, T. (1995). MAP kinase phosphorylation of mSos1 promotes dissociation of mSos1-Shc and mSos1-EGF receptor complexes. *Oncogene*, *11*(7), 1417-1426.

- Sacharidou, A., Stratman, A. N., & Davis, G. E. (2012). Molecular mechanisms controlling vascular lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. *Cells Tissues Organs*, *195*(1-2), 122-143. doi: 10.1159/000331410
- Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Muller, T., Hulsken, J., Walther, I., . . . Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J Cell Biol*, *150*(6), 1375-1384.
- Saito, T., & Yamasaki, S. (2003). Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev*, *192*, 143-160.
- Sakurai, M., Ohtsuki, T., & Watanabe, K. (2005). Modification at position 9 with 1-methyladenosine is crucial for structure and function of nematode mitochondrial tRNAs lacking the entire T-arm. *Nucleic Acids Res*, *33*(5), 1653-1661. doi: 10.1093/nar/gki309
- Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M., & de Lanerolle, P. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science*, *283*(5410), 2083-2085.
- Sanematsu, F., Hirashima, M., Laurin, M., Takii, R., Nishikimi, A., Kitajima, K., . . . Fukui, Y. (2010). DOCK180 is a Rac activator that regulates cardiovascular development by acting downstream of CXCR4. *Circ Res*, *107*(9), 1102-1105. doi: 10.1161/circresaha.110.223388
- Sarmay, G., Angyal, A., Kertesz, A., Maus, M., & Medgyesi, D. (2006). The multiple function of Grb2 associated binder (Gab) adaptor/scaffolding protein in immune cell signaling. *Immunol Lett*, *104*(1-2), 76-82. doi: 10.1016/j.imlet.2005.11.017
- Sastry, S. K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J. F., Tremblay, M. L., & Burrige, K. (2006). PTP-PEST couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP. *J Biol Chem*, *281*(17), 11627-11636. doi: 10.1074/jbc.M600897200
- Sattler, M., Mohi, M. G., Pride, Y. B., Quinnan, L. R., Malouf, N. A., Podar, K., . . . Neel, B. G. (2002). Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*, *1*(5), 479-492.
- Sawada, N., Salomone, S., Kim, H. H., Kwiatkowski, D. J., & Liao, J. K. (2008). Regulation of endothelial nitric oxide synthase and postnatal angiogenesis by Rac1. *Circ Res*, *103*(4), 360-368. doi: 10.1161/circresaha.108.178897
- Schaeper, U., Gehring, N. H., Fuchs, K. P., Sachs, M., Kempkes, B., & Birchmeier, W. (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol*, *149*(7), 1419-1432.
- Schaeper, U., Vogel, R., Chmielowiec, J., Huelsken, J., Rosario, M., & Birchmeier, W. (2007). Distinct requirements for Gab1 in Met and EGF receptor signaling in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(39), 15376-15381. doi: 10.1073/pnas.0702555104
- Schjeide, B. M., Hooli, B., Parkinson, M., Hogan, M. F., DiVito, J., Mullin, K., . . . Bertram, L. (2009). GAB2 as an Alzheimer disease susceptibility gene: follow-up of genomewide association results. *Arch Neurol*, *66*(2), 250-254. doi: 10.1001/archneurol.2008.552
- Schnoor, M., Lai, F. P., Zarbock, A., Klaver, R., Polaschegg, C., Schulte, D., . . . Vestweber, D. (2011). Cortactin deficiency is associated with reduced neutrophil recruitment but increased vascular permeability in vivo. *J Exp Med*, *208*(8), 1721-1735. doi: 10.1084/jem.20101920
- Schuebel, K. E., Bustelo, X. R., Nielsen, D. A., Song, B. J., Barbacid, M., Goldman, D., & Lee, I. J. (1996). Isolation and characterization of murine vav2, a member of the vav family of proto-oncogenes. *Oncogene*, *13*(2), 363-371.
- Schuebel, K. E., Movilla, N., Rosa, J. L., & Bustelo, X. R. (1998). Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *Embo j*, *17*(22), 6608-6621. doi: 10.1093/emboj/17.22.6608
- Schuermann, A., Helker, C. S., & Herzog, W. (2014). Angiogenesis in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*, *31c*, 106-114. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.04.037

- Schutzman, J. L., Borland, C. Z., Newman, J. C., Robinson, M. K., Kokel, M., & Stern, M. J. (2001). The *Caenorhabditis elegans* EGL-15 signaling pathway implicates a DOS-like multisubstrate adaptor protein in fibroblast growth factor signal transduction. *Mol Cell Biol*, *21*(23), 8104-8116. doi: 10.1128/mcb.21.23.8104-8116.2001
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S., & Michalides, R. J. (1993). The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol*, *13*(5), 2891-2898.
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Mooi, W. J., & Michalides, R. J. (1992). Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene*, *7*(2), 355-361.
- Seiffert, M., Custodio, J. M., Wolf, I., Harkey, M., Liu, Y., Blattman, J. N., . . . Rohrschneider, L. R. (2003). Gab3-deficient mice exhibit normal development and hematopoiesis and are immunocompetent. *Mol Cell Biol*, *23*(7), 2415-2424.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, *219*(4587), 983-985.
- Sessa, W. C. (2004). eNOS at a glance. *J Cell Sci*, *117*(Pt 12), 2427-2429. doi: 10.1242/jcs.01165
- Shaheen, R., Faqieh, E., Sunker, A., Morsy, H., Al-Sheddi, T., Shamseldin, H. E., . . . 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. *Am J Hum Genet*, *89*(2), 328-333. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.07.009
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., & Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, *376*(6535), 62-66. doi: 10.1038/376062a0
- Shibuya, M. (2006). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*, *39*(5), 469-478.
- Shinjo, K., Koland, J. G., Hart, M. J., Narasimhan, V., Johnson, D. I., Evans, T., & Cerione, R. A. (1990). Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(24), 9853-9857.
- Shinkai, A., Ito, M., Anazawa, H., Yamaguchi, S., Shitara, K., & Shibuya, M. (1998). Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, *273*(47), 31283-31288.
- Shinohara, M., Kodama, A., Matozaki, T., Fukuhara, A., Tachibana, K., Nakanishi, H., & Takai, Y. (2001). Roles of cell-cell adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Gab-1. *J Biol Chem*, *276*(22), 18941-18946. doi: 10.1074/jbc.M100909200
- Shioyama, W., Nakaoka, Y., Higuchi, K., Minami, T., Taniyama, Y., Nishida, K., . . . Komuro, I. (2011). Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-met signaling. *Circ Res*, *108*(6), 664-675. doi: 10.1161/circresaha.110.232223
- Shutes, A., Onesto, C., Picard, V., Leblond, B., Schweighoffer, F., & Der, C. J. (2007). Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem*, *282*(49), 35666-35678. doi: 10.1074/jbc.M703571200
- Simister, P. C., & Feller, S. M. (2012). Order and disorder in large multi-site docking proteins of the Gab family--implications for signalling complex formation and inhibitor design strategies. *Mol Biosyst*, *8*(1), 33-46. doi: 10.1039/c1mb05272a

- Sleegers, K., Bettens, K., Brouwers, N., Engelborghs, S., van Miegroet, H., De Deyn, P. P., & Van Broeckhoven, C. (2009). Common variation in GRB-associated Binding Protein 2 (GAB2) and increased risk for Alzheimer dementia. *Hum Mutat*, *30*(2), E338-344. doi: 10.1002/humu.20909
- Soga, N., Connolly, J. O., Chellaiah, M., Kawamura, J., & Hruska, K. A. (2001). Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility. *Cell Commun Adhes*, *8*(1), 1-13.
- Soga, N., Namba, N., McAllister, S., Cornelius, L., Teitelbaum, S. L., Dowdy, S. F., . . . Hruska, K. A. (2001). Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility. *Exp Cell Res*, *269*(1), 73-87. doi: 10.1006/excr.2001.5295
- Somogyi, K., & Rorth, P. (2004). Cortactin modulates cell migration and ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev*, *121*(1), 57-64.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., . . . et al. (1994). Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol*, *14*(4), 2777-2785.
- Southgate, L., Machado, R. D., Snape, K. M., Primeau, M., Dafou, D., Ruddy, D. M., . . . Trembath, R. C. (2011). Gain-of-function mutations of ARHGAP31, a Cdc42/Rac1 GTPase regulator, cause syndromic cutis aplasia and limb anomalies. *Am J Hum Genet*, *88*(5), 574-585. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.04.013
- Stalmans, I., Ng, Y. S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., . . . D'Amore, P. A. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*, *109*(3), 327-336. doi: 10.1172/jci14362
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., & Stradal, T. E. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo j*, *23*(4), 749-759. doi: 10.1038/sj.emboj.7600084
- Stittrich, A. B., Lehman, A., Bodian, D. L., Ashworth, J., Zong, Z., Li, H., . . . Patel, M. S. (2014). Mutations in NOTCH1 Cause Adams-Oliver Syndrome. *Am J Hum Genet*. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.07.011
- Stockton, R., Reutershan, J., Scott, D., Sanders, J., Ley, K., & Schwartz, M. A. (2007). Induction of vascular permeability: beta PIX and GIT1 scaffold the activation of extracellular signal-regulated kinase by PAK. *Mol Biol Cell*, *18*(6), 2346-2355. doi: 10.1091/mbc.E06-07-0584
- Stockton, R. A., Schaefer, E., & Schwartz, M. A. (2004). p21-activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility. *J Biol Chem*, *279*(45), 46621-46630. doi: 10.1074/jbc.M408877200
- Stoletov, K. V., Ratcliffe, K. E., Spring, S. C., & Terman, B. I. (2001). NCK and PAK participate in the signaling pathway by which vascular endothelial growth factor stimulates the assembly of focal adhesions. *J Biol Chem*, *276*(25), 22748-22755. doi: 10.1074/jbc.M009720200
- Su, Z. J., Hahn, C. N., Goodall, G. J., Reck, N. M., Leske, A. F., Davy, A., . . . Gamble, J. R. (2004). A vascular cell-restricted RhoGAP, p73RhoGAP, is a key regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(33), 12212-12217. doi: 10.1073/pnas.0404631101
- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., . . . Katsuki, M. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene*, *17*(26), 3427-3433. doi: 10.1038/sj.onc.1202595
- Sulpice, E., Ding, S., Muscatelli-Groux, B., Berge, M., Han, Z. C., Plouet, J., . . . Merkulova-Rainon, T. (2009). Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol Cell*, *101*(9), 525-539. doi: 10.1042/bc20080221
- Sun, D., Xu, D., & Zhang, B. (2006). Rac signaling in tumorigenesis and as target for anticancer drug development. *Drug Resist Updat*, *9*(6), 274-287. doi: 10.1016/j.drug.2006.12.001

- Sun, J. F., Phung, T., Shiojima, I., Felske, T., Upalakalin, J. N., Feng, D., . . . Benjamin, L. E. (2005). Microvascular patterning is controlled by fine-tuning the Akt signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(1), 128-133. doi: 10.1073/pnas.0403198102
- Swartz, E. N., Sanatani, S., Sandor, G. G., & Schreiber, R. A. (1999). Vascular abnormalities in Adams-Oliver syndrome: cause or effect? *Am J Med Genet*, *82*(1), 49-52.
- Sweet, D. T., Chen, Z., Wiley, D. M., Bautch, V. L., & Tzima, E. (2012). The adaptor protein Shc integrates growth factor and ECM signaling during postnatal angiogenesis. *Blood*, *119*(8), 1946-1955. doi: 10.1182/blood-2011-10-384560
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., & 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. *Embo j*, *20*(11), 2768-2778. doi: 10.1093/emboj/20.11.2768
- Tamas, P., Solti, Z., Bauer, P., Illes, A., Sipeki, S., Bauer, A., . . . Buday, L. (2003). Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *J Biol Chem*, *278*(7), 5163-5171. doi: 10.1074/jbc.M207555200
- Tan, W., Palmby, T. R., Gavard, J., Amornphimoltham, P., Zheng, Y., & Gutkind, J. S. (2008). An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *Faseb j*, *22*(6), 1829-1838. doi: 10.1096/fj.07-096438
- Tcherkezian, J., Danek, E. I., Jenna, S., Triki, I., & Lamarche-Vane, N. (2005). Extracellular signal-regulated kinase 1 interacts with and phosphorylates CdGAP at an important regulatory site. *Mol Cell Biol*, *25*(15), 6314-6329. doi: 10.1128/mcb.25.15.6314-6329.2005
- Tcherkezian, J., & Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*, *99*(2), 67-86. doi: 10.1042/bc20060086
- Tcherkezian, J., Triki, I., Stenne, R., Danek, E. I., & Lamarche-Vane, N. (2006). The human orthologue of CdGAP is a phosphoprotein and a GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1 but not RhoA. *Biol Cell*, *98*(8), 445-456. doi: 10.1042/bc20050101
- Tehrani, S., Tomasevic, N., Weed, S., Sakowicz, R., & Cooper, J. A. (2007). Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(29), 11933-11938. doi: 10.1073/pnas.0701077104
- Thumkeo, D., Watanabe, S., & Narumiya, S. (2013). Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol*, *92*(10-11), 303-315. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.09.002
- Tian, Y., Lei, L., Cammarano, M., Nekrasova, T., & Minden, A. (2009). Essential role for the Pak4 protein kinase in extraembryonic tissue development and vessel formation. *Mech Dev*, *126*(8-9), 710-720. doi: 10.1016/j.mod.2009.05.002
- Tian, Y., Tian, X., Gawlak, G., O'Donnell, J. J., 3rd, Sacks, D. B., & Birukova, A. A. (2014). IQGAP1 regulates endothelial barrier function via EB1 - cortactin crosstalk. *Mol Cell Biol*. doi: 10.1128/mcb.00248-14
- Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X., & Claesson-Welsh, L. (2011). Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Mol Aspects Med*, *32*(2), 88-111. doi: 10.1016/j.mam.2011.04.004
- Turner, M., & Billadeau, D. D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*, *2*(7), 476-486. doi: 10.1038/nri840
- Tzima, E., Kiosses, W. B., del Pozo, M. A., & Schwartz, M. A. (2003). Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *J Biol Chem*, *278*(33), 31020-31023. doi: 10.1074/jbc.M301179200

- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., . . . Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, *389*(6654), 990-994. doi: 10.1038/40187
- Vader, P., van der Meel, R., Symons, M. H., Fens, M. H., Pieters, E., Wilschut, K. J., . . . Byrne, A. T. (2011). Examining the role of Rac1 in tumor angiogenesis and growth: a clinically relevant RNAi-mediated approach. *Angiogenesis*, *14*(4), 457-466. doi: 10.1007/s10456-011-9229-x
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T. P., & Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat Cell Biol*, *4*(9), 681-690. doi: 10.1038/ncb838
- Vadlamudi, R. K., Li, F., Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R., & Kumar, R. (2004). p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep*, *5*(2), 154-160. doi: 10.1038/sj.embor.7400079
- Valls, G., Codina, M., Miller, R. K., Del Valle-Perez, B., Vinyoles, M., Caelles, C., . . . Dunach, M. (2012). Upon Wnt stimulation, Rac1 activation requires Rac1 and Vav2 binding to p120-catenin. *J Cell Sci*, *125*(Pt 22), 5288-5301. doi: 10.1242/jcs.101030
- van Buul, J. D., Geerts, D., & Huvencers, S. (2014). Rho GAPs and GEFs: Controlling switches in endothelial cell adhesion. *Cell Adh Migr*, *8*(2).
- van der Meel, R., Gallagher, W. M., Oliveira, S., O'Connor, A. E., Schiffelers, R. M., & Byrne, A. T. (2010). Recent advances in molecular imaging biomarkers in cancer: application of bench to bedside technologies. *Drug Discov Today*, *15*(3-4), 102-114. doi: 10.1016/j.drudis.2009.12.003
- van Nieuw Amerongen, G. P., Koolwijk, P., Versteilen, A., & van Hinsbergh, V. W. (2003). Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in VEGF-induced endothelial cell migration and angiogenesis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(2), 211-217.
- van Rossum, A. G., Moolenaar, W. H., & Schuurin, E. (2006). Cortactin affects cell migration by regulating intercellular adhesion and cell spreading. *Exp Cell Res*, *312*(9), 1658-1670. doi: 10.1016/j.yexcr.2006.01.033
- van Slegtenhorst, M., Janssen, B., Nellist, M., Ramlakhan, S., Hermans, C., Hesselink, A., . . . et al. (1995). Cosmid contigs from the tuberous sclerosis candidate region on chromosome 9q34. *Eur J Hum Genet*, *3*(2), 78-86.
- Vasyutina, E., Stebler, J., Brand-Saberi, B., Schulz, S., Raz, E., & Birchmeier, C. (2005). CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev*, *19*(18), 2187-2198. doi: 10.1101/gad.346205
- Vaughan, T. Y., Verma, S., & Bunting, K. D. (2011). Grb2-associated binding (Gab) proteins in hematopoietic and immune cell biology. *Am J Blood Res*, *1*(2), 130-134.
- Vega, F. M., & Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, *582*(14), 2093-2101. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.039
- Verma, S., Vaughan, T., & Bunting, K. D. (2012). Gab adapter proteins as therapeutic targets for hematologic disease. *Adv Hematol*, *2012*, 380635. doi: 10.1155/2012/380635
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer*, *10*(12), 842-857. doi: 10.1038/nrc2960
- Vouret-Craviari, V., Bourcier, C., Boulter, E., & van Obberghen-Schilling, E. (2002). Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci*, *115*(Pt 12), 2475-2484.
- Walsh, D. A. (2007). Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. *Adv Clin Chem*, *44*, 187-221.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., & Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, *269*(43), 26988-26995.

- Wang, D., Paria, B. C., Zhang, Q., Karpurapu, M., Li, Q., Gerthoffer, W. T., . . . Rao, G. N. (2009). A role for Gab1/SHP2 in thrombin activation of PAK1: gene transfer of kinase-dead PAK1 inhibits injury-induced restenosis. *Circ Res*, *104*(9), 1066-1075. doi: 10.1161/circresaha.109.196691
- Wang, L., Hauser, E. R., Shah, S. H., Pericak-Vance, M. A., Haynes, C., Crosslin, D., . . . Vance, J. M. (2007). Peakwide mapping on chromosome 3q13 identifies the kalirin gene as a novel candidate gene for coronary artery disease. *Am J Hum Genet*, *80*(4), 650-663. doi: 10.1086/512981
- Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Ichihara, S., Sawa, H., Minami, A., . . . Tanaka, S. (2006). Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines. *Mol Cancer Res*, *4*(7), 499-510. doi: 10.1158/1541-7786.mcr-05-0141
- Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Konstantinou, T., Nishihara, H., Majima, T., . . . Tanaka, S. (2009). Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration. *Cell Res*, *19*(5), 638-650. doi: 10.1038/cr.2009.40
- Weaver, A. M. (2008). Cortactin in tumor invasiveness. *Cancer Lett*, *265*(2), 157-166. doi: 10.1016/j.canlet.2008.02.066
- Weaver, A. M., Heuser, J. E., Karginov, A. V., Lee, W. L., Parsons, J. T., & Cooper, J. A. (2002). Interaction of cortactin and N-WASp with Arp2/3 complex. *Curr Biol*, *12*(15), 1270-1278.
- Weed, S. A., Du, Y., & Parsons, J. T. (1998). Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci*, *111* (Pt 16), 2433-2443.
- Weed, S. A., Karginov, A. V., Schafer, D. A., Weaver, A. M., Kinley, A. W., Cooper, J. A., & Parsons, J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, *151*(1), 29-40.
- Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., & Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, *384*(6605), 173-176. doi: 10.1038/384173a0
- Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., & Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest*, *123*(8), 3190-3200. doi: 10.1172/jci70212
- Wennerberg, K., & Der, C. J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, *117*(Pt 8), 1301-1312. doi: 10.1242/jcs.01118
- Wheeler, A. P., & Ridley, A. J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*, *301*(1), 43-49. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.08.012
- Whitley, C. B., & Gorlin, R. J. (1991). Adams-Oliver syndrome revisited. *Am J Med Genet*, *40*(3), 319-326. doi: 10.1002/ajmg.1320400315
- Wigler, M., Pellicer, A., Silverstein, S., Axel, R., Urlaub, G., & Chasin, L. (1979). DNA-mediated transfer of the adenine phosphoribosyltransferase locus into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*(3), 1373-1376.
- Winnay, J. N., Bruning, J. C., Burks, D. J., & Kahn, C. R. (2000). Gab-1-mediated IGF-1 signaling in IRS-1-deficient 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, *275*(14), 10545-10550.
- Wohrle, F. U., Daly, R. J., & Brummer, T. (2009). Function, regulation and pathological roles of the Gab/DOS docking proteins. *Cell Commun Signal*, *7*, 22. doi: 10.1186/1478-811x-7-22
- Wojciak-Stothard, B., Potempa, S., Eichholtz, T., & Ridley, A. J. (2001). Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci*, *114*(Pt 7), 1343-1355.
- Wolf, I., Jenkins, B. J., Liu, Y., Seiffert, M., Custodio, J. M., Young, P., & Rohrschneider, L. R. (2002). Gab3, a new DOS/Gab family member, facilitates macrophage differentiation. *Mol Cell Biol*, *22*(1), 231-244.

- Wong, S., Reynolds, A. B., & Papkoff, J. (1992). Platelet activation leads to increased c-src kinase activity and association of c-src with an 85-kDa tyrosine phosphoprotein. *Oncogene*, *7*(12), 2407-2415.
- Wu, H., & Parsons, J. T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol*, *120*(6), 1417-1426.
- Wu, H., Reynolds, A. B., Kanner, S. B., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol*, *11*(10), 5113-5124.
- Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Ozes, O. N., Warren, R. S., & Donner, D. B. (2000). VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem*, *275*(9), 6059-6062.
- Wu, X., Ramachandran, S., Lin, M. C., Cerione, R. A., & Erickson, J. W. (2011). A minimal Rac activation domain in the unconventional guanine nucleotide exchange factor Dock180. *Biochemistry*, *50*(6), 1070-1080. doi: 10.1021/bi100971y
- Wu, X., Renuse, S., Sahasrabudde, N. A., Zahari, M. S., Chaerkady, R., Kim, M. S., . . . Pandey, A. (2014). Activation of diverse signalling pathways by oncogenic PIK3CA mutations. *Nat Commun*, *5*, 4961. doi: 10.1038/ncomms5961
- Wu, Z. Q., Rowe, R. G., Lim, K. C., Lin, Y., Willis, A., Tang, Y., . . . Weiss, S. J. (2014). A Snail1/Notch1 signalling axis controls embryonic vascular development. *Nat Commun*, *5*, 3998. doi: 10.1038/ncomms4998
- Xia, P., Aiello, L. P., Ishii, H., Jiang, Z. Y., Park, D. J., Robinson, G. S., . . . King, G. L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*, *98*(9), 2018-2026. doi: 10.1172/jci119006
- Yamasaki, S., Nishida, K., Hibi, M., Sakuma, M., Shiina, R., Takeuchi, A., . . . Saito, T. (2001). Docking protein Gab2 is phosphorylated by ZAP-70 and negatively regulates T cell receptor signaling by recruitment of inhibitory molecules. *J Biol Chem*, *276*(48), 45175-45183. doi: 10.1074/jbc.M105384200
- Yamasaki, S., Nishida, K., Sakuma, M., Berry, D., McClade, C. J., Hirano, T., & Saito, T. (2003). Gads/Grb2-mediated association with LAT is critical for the inhibitory function of Gab2 in T cells. *Mol Cell Biol*, *23*(7), 2515-2529.
- Yamasaki, S., Nishida, K., Yoshida, Y., Itoh, M., Hibi, M., & Hirano, T. (2003). Gab1 is required for EGF receptor signaling and the transformation by activated ErbB2. *Oncogene*, *22*(10), 1546-1556. doi: 10.1038/sj.onc.1206284
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., & Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, *407*(6801), 242-248. doi: 10.1038/35025215
- Yang, Z., Xue, B., Umitsu, M., Ikura, M., Muthuswamy, S. K., & Neel, B. G. (2012). The signaling adaptor GAB1 regulates cell polarity by acting as a PAR protein scaffold. *Mol Cell*, *47*(3), 469-483. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.037
- Yu, W. M., Hawley, T. S., Hawley, R. G., & Qu, C. K. (2002). Role of the docking protein Gab2 in beta(1)-integrin signaling pathway-mediated hematopoietic cell adhesion and migration. *Blood*, *99*(7), 2351-2359.
- Zapata, H. H., Sletten, L. J., & Pierpont, M. E. (1995). Congenital cardiac malformations in Adams-Oliver syndrome. *Clin Genet*, *47*(2), 80-84.
- Zebda, N., Tian, Y., Tian, X., Gawlak, G., Higginbotham, K., Reynolds, A. B., . . . Birukov, K. G. (2013). Interaction of p190RhoGAP with C-terminal domain of p120-catenin modulates endothelial

- cytoskeleton and permeability. *J Biol Chem*, 288(25), 18290-18299. doi: 10.1074/jbc.M112.432757
- Zeller, P. J., Skalak, T. C., Ponce, A. M., & Price, R. J. (2001). In vivo chemotactic properties and spatial expression of PDGF in developing mesenteric microvascular networks. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(5), H2116-2125.
- Zeng, H., Sanyal, S., & Mukhopadhyay, D. (2001). Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *J Biol Chem*, 276(35), 32714-32719. doi: 10.1074/jbc.M103130200
- Zhang, X., Lavoie, G., Fort, L., Huttlin, E. L., Tcherkezian, J., Galan, J. A., . . . Roux, P. P. (2013). Gab2 phosphorylation by RSK inhibits Shp2 recruitment and cell motility. *Mol Cell Biol*, 33(8), 1657-1670. doi: 10.1128/mcb.01353-12
- Zhang, Y., Diaz-Flores, E., Li, G., Wang, Z., Kang, Z., Haviernikova, E., . . . Bunting, K. D. (2007). Abnormal hematopoiesis in Gab2 mutant mice. *Blood*, 110(1), 116-124. doi: 10.1182/blood-2006-11-060707
- Zhao, C., Ma, H., Bossy-Wetzell, E., Lipton, S. A., Zhang, Z., & Feng, G. S. (2003). GC-GAP, a Rho family GTPase-activating protein that interacts with signaling adapters Gab1 and Gab2. *J Biol Chem*, 278(36), 34641-34653. doi: 10.1074/jbc.M304594200
- Zhao, C., Yu, D. H., Shen, R., & Feng, G. S. (1999). Gab2, a new pleckstrin homology domain-containing adapter protein, acts to uncouple signaling from ERK kinase to Elk-1. *J Biol Chem*, 274(28), 19649-19654.
- Zhao, J., Wang, W., Ha, C. H., Kim, J. Y., Wong, C., Redmond, E. M., . . . Jin, Z. G. (2011). Endothelial Grb2-associated binder 1 is crucial for postnatal angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5), 1016-1023. doi: 10.1161/atvbaha.111.224493
- Zhou, Z., Caron, E., Hartwig, E., Hall, A., & Horvitz, H. R. (2001). The *C. elegans* PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway. *Dev Cell*, 1(4), 477-489.

