

Université de Montréal

**Le rôle de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 dans
l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire
et la progression tumorale**

par

Patrick Fournier

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de médecine

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

11 Septembre 2015

© Patrick Fournier, 2015

Résumé

L'angiogenèse et l'augmentation de la perméabilité vasculaire sont des éléments clés pour la croissance et la progression tumorale. Par conséquent, de nombreux efforts sont déployés à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et le remodelage des vaisseaux sanguins de manière à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. De cette optique, les travaux de cette thèse se sont concentrés sur la protéine tyrosine phosphatase DEP-1, initialement identifiée comme un régulateur négatif de la prolifération et de la phosphorylation du VEGFR2 lorsque fortement exprimée dans les cellules endothéliales. Toutefois, en utilisant une approche d'ARNi, il a été démontré que via sa capacité à déphosphoryler la tyrosine inhibitrice de Src (Y529), DEP-1 était également un régulateur positif de l'activation de Src dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF. Puisque Src joue un rôle central dans la promotion de l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire, nous avons en plus démontré que DEP-1 était un promoteur de ces fonctions *in vitro* et que la tyrosine phosphorylation de sa queue C-terminale, permettant l'interaction et l'activation de Src, était requise.

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse démontrent dans un premier temps à partir d'une souris *Dep1* KO, dont le développement ne présente aucun phénotype apparent, que la perte de l'expression de DEP-1 se traduit en une inhibition de l'activation de Src et de l'un de ses substrats, la VE-Cadherine, en réponse au VEGF chez la souris adulte. Nos résultats démontrent donc, pour la première fois, le rôle primordial de DEP-1 dans l'induction de la perméabilité vasculaire et de la formation de capillaires *in vivo*. Conséquemment, la croissance tumorale et la formation de métastases aux poumons sont réduites due à une inhibition de leur vascularisation ce qui se traduit par une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses. De façon intéressante, l'expression élevée de DEP-1 dans les vaisseaux sanguins tumoraux de patientes atteintes du cancer du sein corrèle avec une vascularisation accrue de la tumeur.

En plus du rôle de DEP-1 dans la réponse angiogénique à l'âge adulte, nos travaux ont également démontré le rôle important de DEP-1 lors de la vascularisation de la rétine, un modèle *in vivo* d'angiogenèse développementale. Dans ce contexte, DEP-1 inhibe la prolifération des cellules endothéliales et limite leur bourgeonnement et la complexification du réseau vasculaire rétinien en permettant l'expression adéquate de Dll4, un régulateur crucial de l'organisation de la vascularisation développementale. Cette expression de Dll4 découlerait de la stabilisation de la β -caténine par l'inactivation de la GSK3 β , un régulateur important de la dégradation de la β -caténine, en réponse au VEGF selon la voie de signalisation VEGFR2-Src-PI3K-Akt-GSK3 β . Ainsi, ces travaux identifient DEP-1 comme un régulateur important de l'organisation vasculaire rétinienne.

Les rôles positifs de DEP-1 dans les cellules endothéliales découlent principalement de sa capacité à lier et activer la kinase Src. En plus de contribuer à la réponse angiogénique, Src est également un oncogène bien caractérisé notamment pour sa contribution au programme invasif des cellules cancéreuses mammaires. Les travaux de cette thèse illustrent que DEP-1 est préférentiellement exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires invasives et qu'il régule l'activation de Src, de voies de signalisation invasives et, par le fait même, de l'invasivité de ces cellules *in vitro* et *in vivo*. De façon intéressante, ces observations corrélerent avec des données cliniques où l'expression modérée de DEP-1 est associée à un mauvais pronostic de survie et de rechute.

Ces résultats démontrent donc, pour la première fois, le rôle positif de DEP-1 dans l'activation de Src au niveau des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses mammaires ce qui permet la régulation du bourgeonnement endothélial, de la perméabilité vasculaire, de l'angiogenèse normale et pathologique en plus de l'invasion tumorale.

Mots-clés : DEP-1, phosphatases, Src, angiogenèse, invasion, perméabilité vasculaire, cellules endothéliales, cancer du sein

Abstract

Angiogenesis and increased vascular permeability are key components of tumor growth and progression. Consequently, numerous efforts are currently deployed to elucidate the molecular mechanisms contributing to the formation and remodeling of blood vessels in order to identify new potential therapeutic targets. In that thought, the work of this thesis was focused on the protein tyrosine phosphatase DEP-1, initially identified as a negative regulator of proliferation and VEGFR2 phosphorylation when highly expressed in endothelial cells. However, using RNAi, it was shown that through its capacity to dephosphorylate the inhibitory tyrosine of Src (Y529), DEP-1 could also positively regulate Src activation in endothelial cells in response to VEGF. As Src is a central promoter of angiogenesis and vascular permeability, we showed that DEP-1 was a promoter of these vascular functions in vitro and that the tyrosine phosphorylation of its C-terminal tail, allowing interaction and activation of Src, was required. Interestingly, the catalytic inactivation of DEP-1 in mice resulted in increased proliferation in endothelial cells, but also in desorganization of vascular structures which contrast the absence of phenotype in DEP-1 complete knock-out mice (KO).

The work of this thesis demonstrates for the first time that DEP-1 deletion causes inhibition of Src and one of its substrate, VE-Cadherin, activation in response to VEGF in *Dep-1* KO mice, which develop normally. Our results show the crucial role of DEP-1 in VEGF-induced vascular permeability and capillary formation in vivo. Consequently, tumor growth and lung metastases formation were inhibited due to reduced tumor vascularisation causing reduced proliferation and increased apoptosis of tumor cells. Accordingly, high expression of DEP-1 in tumor-associated blood vessels of breast cancer patients correlates with greater tumor vascularisation.

In addition to DEP-1 role in post-natal angiogenic response, our work also demonstrates the important role of DEP-1 during retinal vascularisation, an in vivo developmental angiogenesis model. In this context, DEP-1 inhibits proliferation of endothelial

cells and limits their sprouting by allowing adequate β -catenin-dependant expression of Dll4, a Notch ligand regulating developmental vascularisation organisation. DEP-1 allows β -catenin stabilisation via inactivation of GSK3 β , an important regulator of β -catenin degradation, in response to VEGF through VEGFR2-Src-PI3K-Akt-GSK3 β signaling pathway. Thus, this work identifies DEP-1 as an important regulator of retinal vascular sprouting.

The positive roles of DEP-1 in endothelial cells depend on its ability to bind and activate the kinase Src. In addition to its contribution to angiogenic response, Src is also a well-characterized oncogene notably for its contribution to invasive program of mammary cancer cells. This work illustrates that DEP-1 is preferentially expressed in invasive mammary cancer cells and that it regulates Src activation, pro-invasive signaling pathways and, consequently, cell invasiveness in vitro and in vivo. All these activities are dependant on DEP-1 catalytic activity and ability to bind Src. Interestingly, these results correlate with clinical data where moderate expression of DEP-1 is associated with poor prognosis of survival and relapse.

Collectively, the results presented here demonstrate, for the first time, the crucial role of DEP-1 in Src activation in endothelial and breast cancer cells, leading to endothelial sprouting, vascular permeability, normal or pathological angiogenesis, and breast cancer invasiveness and metastases formation.

Keywords : DEP-1, protein tyrosine phosphatases, Src, angiogenesis, invasion, vascular permeability, endothelial cells, breast cancer.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
CHAPITRE I – Introduction.....	1
1. La formation de capillaires sanguins par angiogenèse.....	2
1.1 L’angiogenèse : un processus complexe médié par le bourgeonnement des cellules endothéliales.....	6
2. La signalisation par le VEGF et le VEGFR2.....	8
2.1 La prolifération.....	14
2.2 La survie.....	14
2.3 La migration et l’invasion.....	15
2.4 La perméabilité vasculaire.....	15
2.5 Le bourgeonnement endothélial.....	16
2.6 Les thérapies anti-angiogéniques.....	20
3. Les kinases de la familles de Src.....	22
3.1 Structures et régulation de l’activité des SFKs.....	22
3.2 Rôles de Src durant l’angiogenèse.....	24
3.3 Rôles de Src dans le cancer.....	25
3.4 Rôles de Src dans le cancer du sein.....	25
3.5 L’invasion et la formation de métastases.....	27
4. La régulation de la signalisation par les protéines tyrosine phosphatases (PTP).....	27
4.1 Régulation de l’activité des PTP.....	30
5. Exemples de PTP régulant la signalisation.....	32
5.1 Régulation de l’angiogenèse par les PTP.....	32

5.2 Régulation des cellules tumorales par les PTP	34
6. La protéine tyrosine phosphatase DEP-1	37
6.1 Rôle de DEP-1 dans l'angiogénèse.....	38
6.2 La régulation de DEP-1	44
6.3 Rôle de DEP-1 dans le cancer.....	46
7. Objectifs de recherche.....	50
CHAPITRE II	54
The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is an essential promoter of vascular permeability, angiogenesis, and tumor progression.....	55
Abstract.....	56
Introduction.....	57
Methods.....	59
Results.....	64
Discussion.....	69
Grant support	73
Authorship contributions	73
Figure legends.....	74
Figures.....	78
CHAPITRE III	86
The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ regulates sprouting angiogenesis	87
and the Notch signalling pathway.....	87
Abstract.....	88
Introduction.....	90
Materials and methods	92
Results.....	95
Discussion.....	101
Figure legends.....	105
Figures.....	107
CHAPITRE IV	113

The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and metastasis	114
Abstract.....	115
Introduction.....	117
Results.....	119
Discussion.....	124
Materials and methods	128
Conflict of interest	132
Acknowledgements.....	132
Figure legends.....	133
Figures.....	139
CHAPITRE V – Discussion	149
1. DEP-1 : un promoteur important de la réponse angiogénique in vivo	150
1.1 DEP-1 : un régulateur du bourgeonnement endothélial et de la voie de signalisation Notch lors du développement	151
1.2 DEP-1 : un modulateur positif de la formation de capillaires	153
1.3 DEP-1 : une enzyme critique dans la promotion de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF	154
1.4 Les effets pro-tumoraux de l’expression stromale de DEP-1	155
1.5 Intégration des différents rôles de DEP-1 dans le réseau vasculaire	158
1.6 Interaction potentielle entre DEP-1 et la VE-PTP et leur régulation dans les différents phénotypes endothéliaux	161
2. Les fonctions oncogéniques de DEP-1 dans le cancer du sein	165
2.1 Implications de DEP-1 dans d’autres voies de signalisation pro-invasives dans le cancer du sein.....	167
2.2 Modèle intégratif du rôle de DEP-1 dans le tissu mammaire normal et tumoral .	169
3. Régulation des niveaux d’expression de DEP-1	173
4. DEP-1 en tant que cible thérapeutique.....	174
4.1 La suractivation de DEP-1 en tant que stratégie thérapeutique	176
4.2 L’inhibition de DEP-1 comme avenue thérapeutique.....	177

5. Perspectives de recherche	179
CHAPITRE VI – Conclusion.....	181
Bibliographie.....	i
Annexe I : Taux de mutation, amplification et délétion de DEP-1 dans différents cancers.	i
Annexe II : Rôle de DEP-1 dans la production d'exosomes de cellules tumorales mammaires .	i
Annexe III : Effets de l'utilisation d'un segment extracellulaire et d'un anticorps ciblant DEP-1 sur la réponse angiogénique in vitro	ii

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure 1 : Mécanismes de formation de vaisseaux sanguins.....	5
Figure 2 : Étapes de la formation d'un capillaire sanguin en réponse aux facteurs pro-angiogéniques.	8
Figure 3 : Interactions entre les ligands de la famille du VEGF et leurs récepteurs.....	12
Figure 4 : La signalisation du VEGFR2	13
Figure 5 : L'implication de la voie Notch dans la hiérarchisation des cellules menseuses et des cellules de la tige.....	20
Figure 6: Structure et conformation des kinases de la famille de Src.....	23
Figure 7 : Classification et distribution des protéines tyrosine phosphatases.....	29
Figure 8 : Réaction enzymatique de déphosphorylation médiée par les PTP.....	30
Figure 9 : Le VEGFR2 et DEP-1 sont localisés au niveau des jonctions adhérentes.....	39
Figure 10 : Les niveaux d'expression de DEP-1 déterminent ses effets physiologiques	44
Figure 11 : Structure de DEP-1 et les principales mutations retrouvées dans le cancer.....	49

CHAPITRE II

Figure 1 : DEP-1 promotes Src activation upon VEGF stimulation in vivo.	78
Figure 2 : VEGF-induced, but not histamine-induced, vascular permeability is abrogated in DEP-1 KO mice	79
Figure 3 : DEP-1 is essential for capillary formation in response to VEGF and bFGF	80
Figure 4 : Impaired recovery from hindlimb ischemia in DEP-1 KO mice.....	81
Figure 5 : DEP-1 regulates tumor growth and tumor-associated angiogenesis	82
Figure 6 : DEP-1 regulates tumor permeability and the formation of spontaneous and experimental lung metastases	83
Figure 7 : DEP-1 expression levels correlate with Src activation in tumor vasculature, and are elevated in highly vascularized breast cancer tumors.....	84
Supplemental Figure S1 : VEGF expression in tumors collected from WT or DEP-1 KO mice is equivalent.	85

CHAPITRE III

Figure 1 : DEP-1 loss increases sprouting during retinal angiogenesis.....	107
Figure 2 : DEP-1 acts as an inhibitor of endothelial proliferation during retinal development.	108
Figure 3 : Expression of the Notch ligand Dll4 depends on DEP-1 expression in vivo.....	109
Figure 4 : DEP-1 promotes VEGF-induced β -catenin stabilization and expression of Dll4..	110
Figure 5 : DEP-1 regulates endothelial sprouting via the expression of Dll4	111
Supplemental figure 1 : ERK1/2 contributes to VEGF-induced Dll4 expression in vitro.....	112

CHAPITRE IV

Figure 1 : Higher DEP-1 expression levels in invasive breast cancer cells mediate Src activation.....	139
Figure 2 : DEP-1 promotes Src and Cortactin activation, and their localization to membrane protrusions of invasive breast cancer cells.....	140
Figure 3 : DEP-1 promotes the migration and invasion of breast cancer cells.....	141
Figure 4. Catalytically active DEP-1 promotes MDA-MB-231 cell invasion, but not cell proliferation, in a Src- and EGFR-dependent manner	142
Figure 5. DEP-1 expression is increased in the MDA-MB-231 metastatic explant cell line 1833 and correlates with higher invasiveness.....	143
Figure 6. Expression of DEP-1 in breast tumors is required for the promotion of Src-dependent signaling and the formation of metastases, but not tumor growth and angiogenesis	144
Figure 7. Moderate expression of DEP-1 is associated with a poor prognosis in breast cancer patients	145

CHAPITRE V

Figure 1 : Rôle différentiel de DEP-1 dans les phénotypes endothéliaux et sa participation aux complexes des VE-Cadherines/VEGFR2.	164
Figure 2 : Modèle des rôles et des niveaux d'expression de DEP-1 dans le tissu mammaire normal et tumoral.....	172

Liste des abréviations

ADAM	Famille de désintégrine et métalloprotéinase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Acide ribonucléique interférant
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Asp	Acide aspartique
bFGF	Facteur de croissance fibroblastique (basique)
CK2	Kinase de la caséine II
CSK	Kinase du C-terminal de Src
Cys	Cystéine
DEP-1	Density-enhanced phosphatase 1
Dll1	Delta-like ligand 1
Dll4	Delta-like ligand 4
EC	Cellule endothéliale
EGF	Facteur de croissance dérivé de l'épithélium
EGFR	Récepteur du facteur de croissance dérivé de l'épithélium
eGFP	Protéine verte fluorescente améliorée
eNOS	Synthase de l'oxide nitrique endothéliale
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EPC	Cellule endothéliale progénitrice
ER	Récepteur de l'estrogène
ERK1/2	Kinases régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2

FAK	Kinase des adhésions focales (Focal Adhesion Kinase)
FDA	Food and Drug Administration (équivalent américain de Santé Canada)
FLT3	Tyrosine kinase ressemblant à FMS 3
Gln	Glutamine
HER-1,2,3	Récepteur du facteur de croissance dérivé de l'épithélium 1, 2 ou 3
HIF-1	Facteur induit par l'hypoxie 1
HGF	Facteur de croissance hépatocytaire
IP3	Inositol triphosphate
KI	Gène complètement muté (<i>knock-in</i>)
KO	Gène complètement délété (<i>knock-out</i>)
MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes
MET	Récepteur du facteur de croissance hépatocytaire
miR	Micro-ARN
MMP	Métalloprotéinase matricielle
NICD	Domaine intracellulaire de Notch
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR	Récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PI3K	Phosphoinosite 3-kinase
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTP	Protéine tyrosine phosphatase
RET	Récepteur à activité tyrosine (REarranged during Transfection)
RPTP	Protéine tyrosine phosphatase de type récepteur

SFK	Kinase de la famille de Src
SH2	Domaine d'homologie à Src 2
SH3	Domaine d'homologie à Src 3
SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide
sVEGFR1,2	Récepteur au facteur de croissance vasculaire endothélial 1 ou 2 soluble
TAF	Facteur activant l'angiogénèse sécrété par les tumeurs (Tumor Activating Factor)
TSAd	Protéine adaptatrice spécifique aux cellules T (T-cell specific adaptor protein)
TSP-1	Thrombospondine-1
TTPA	Activateur de plasminogène de type tissulaire
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
VE-Cadherine	Cadherine de l'endothélium vasculaire
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothélial
VEGFR1,2,3	Récepteur au facteur de croissance vasculaire endothélial 1, 2 ou 3
VE-PTP	Protéine tyrosine phosphatase vasculaire endothéliale
VPF	Facteur de perméabilité vasculaire (Vascular permeability factor)

À mes girls, Émilie et Ellie

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche Isabelle Royal sans qui toute cette aventure n'aurait jamais eu lieu. Durant mon doctorat, j'ai beaucoup appris tant sur le plan personnel que professionnel grâce à toi. Je sors de cette expérience grandi et maintenant les gels n'ont plus de secret pour moi! Il va s'en dire que je remercie tous les membres de mon jury pour le temps consacré à l'évaluation de ma thèse. Particulièrement, Dr Marie-Josée Hébert, qui a suivi tout mon parcours doctoral depuis le début et qui a su poser les bonnes questions au bon moment.

Je crois qu'une bonne partie d'un doctorat est l'environnement de travail. Durant mes études doctorales, j'ai d'abord été accueilli par Isabelle elle-même avec qui on a pu discuter de bien plus que de la science! Christine, je pense que tu m'as aidé au moment où j'en avais besoin. Kathleen, tu m'as introduit à DEP-1 et a mis la table pour mon projet de doctorat. Jacinthe, on a passé tant de temps à parler de tout et de rien! Je ne peux passer à côté de tout le monde qui m'ont permis d'avancer en me disant que j'avais des grosses fesses ou bien qu'il allait kidnapper mon bébé. Mon côté pédagogue doit remercier tous mes enfants : Steph, Sabrina, Llians, Raphaël, Aurélie, Macha. De façon plus importante, j'ai découvert de bonnes amies qui me suivront bien au-delà de mon doctorat. Deborah, Katia, Sabrina. Vous avez su mettre de la lumière dans mes journées sombres, me donner des conseils qui n'auraient pas pu être plus divergeants et, surtout, vous m'avez écouté et supporté.

Je ne crois sincèrement pas que j'aurais pu réaliser mon doctorat sans le support inconditionnel de la femme de ma vie Émilie! Je dois évidemment te remercier pour ta patience, ta tolérance, ta compréhension, ta douceur, toutes les attentions que tu me portes et, par-dessus tout, pour le cadeau incroyable que tu m'as ouvert cette année : notre belle petite Ellie. Bien qu'on le dise jamais assez : je t'aime!

CHAPITRE I – Introduction

Au cours de l'évolution, le réseau vasculaire est apparu avec la croissance des organismes. Chez les petits organismes, la diffusion de l'oxygène à travers les membranes est suffisante pour leur métabolisme, tandis que l'épaississement des tissus chez les organismes de tailles supérieures nécessite la présence d'un réseau d'irrigation afin de permettre la distribution de nutriments et d'oxygène à travers l'organisme.¹ De cette façon, le rôle du réseau vasculaire dans la croissance des organes et la réparation de blessures est indéniable. Chez l'humain, la première mention du réseau vasculaire remonte au 17^e siècle où William Harvey a postulé que le cœur pompait le sang à travers l'organisme via les artères et qu'il retournait au cœur par les veines.² Lors du développement, le système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel chez l'embryon.³ Le réseau vasculaire est composé d'une multitude de structures tubulaires classées en artères, capillaires et veines. Les cellules endothéliales forment une couche cellulaire spécialisée qui tapisse l'intérieur de chaque vaisseau sanguin et en assure l'intégrité et l'étanchéité. Autour des cellules endothéliales se retrouvent les cellules murales telles que les péricytes et les cellules vasculaires musculaires lisses qui assurent plutôt le maintien, la stabilité et l'étanchéité des vaisseaux.

La génération de nouveaux vaisseaux sanguins est cruciale pour le développement de l'organisme et peut se produire selon différents mécanismes (Figure 1). En effet, chez l'embryon, un premier réseau vasculaire primitif, formé d'un labyrinthe d'artérioles et de veinules, découle de la différenciation de cellules progénitrices dérivées du mésoderme nommées angioblastes en cellules endothéliales. Ce phénomène se nomme la vasculogénèse et est particulièrement associé aux premiers stades du développement.⁴ Ensuite, ce réseau se décuplera en un réseau complexe, spécialisé et bien organisé par l'angiogénèse, où de nouveaux vaisseaux sanguins seront formés à partir d'un vaisseau pré-existant par le bourgeonnement des cellules endothéliales. Dans ce processus principalement initié par l'hypoxie, les cellules endothéliales vont proliférer et envahir leur milieu pour générer un nouveau vaisseau qui sera complété par le recrutement de cellules murales.⁵ L'intussusception

est un mécanisme alternatif à l'angiogenèse par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés. Il a été initialement rapporté lors du développement des poumons où un grand nombre de vaisseaux sont générés sur une courte période de temps lors du développement.⁶ Il s'agit d'un processus non-prolifératif au cours duquel les cellules endothéliales opposées d'un vaisseau sanguin existant font contact à travers la lumière du capillaire, puis augmentent leur volume et s'étirent afin de générer deux capillaires-filles.⁷ Ce processus serait déclenché principalement par des modifications de la pression sanguine plutôt que la présence de facteurs pro-angiogéniques.^{8,9,10} Un autre mécanisme par lequel une nouvelle artère peut être formé est l'artériogenèse. Il s'agit de la croissance d'une artère collatérale fonctionnelle à partir d'un vaisseau pré-existant. Ce processus est généralement observé suite à l'occlusion pathologique d'un vaisseau sanguin important et aux changements de pression ou de volume sanguins qui en découlent.¹¹ Il s'agit d'un processus plutôt hémodynamique qui implique davantage l'élargissement des vaisseaux sanguins que la génération d'un vaisseau. De plus, ce processus est possible en normoxie et implique des voies de signalisation distinctes de l'angiogenèse.¹² Tous ces processus co-existent et contribuent à la formation du réseau vasculaire. Néanmoins, l'angiogenèse est d'un intérêt particulier puisqu'elle est primordiale et associée à tous les stades du développement, mais en plus est considérée comme la source première de formation de vaisseaux sanguins lors de nombreuses pathologies.^{2,13}

1. La formation de capillaires sanguins par angiogenèse

L'angiogenèse est un processus crucial et essentiel qui se produit chez l'embryon durant son développement, durant la croissance de l'organisme et à l'âge adulte. Une fois le développement terminé, la majorité du réseau vasculaire adopte un phénotype de quiescence.¹⁴ Malgré tout, les cellules endothéliales présentent une grande plasticité qui leur permet de répondre aux stimuli environnementaux menant à la formation de nouveaux capillaires sanguins principalement via l'angiogenèse. Notamment, suite à un dommage vasculaire, il y aura altération de la vascularisation du tissu et apparition d'ischémie, soit la diminution de l'apport d'oxygène à un organe donné, au site du dommage.¹⁵ Dans ce contexte,

l'angiogenèse permet la formation de capillaires afin de réparer la blessure.¹⁶ Le cycle menstruel est un second exemple d'angiogenèse qui se produit chez l'adulte.¹⁷ Bien que l'angiogenèse soit considérée comme la principale voie par laquelle les vaisseaux sanguins sont formés lors du développement, de récentes évidences démontrent que la vasculogenèse pourrait agir de façon concomitante et également contribuer à la néovascularisation tel qu'observée en réponse à l'ischémie.⁴

Étant donné le rôle primordial du réseau vasculaire pour la croissance et le maintien de tous les organes, un dérèglement de l'angiogenèse peut également contribuer à de nombreuses pathologies.^{13,2} Un maintien ou une croissance déficiente du réseau vasculaire est associé, entre autres, au phénomène d'ischémie qui est observable suite à une crise cardiaque, un infarctus du myocarde et dans les maladies neurodégénératives ou associées à l'obésité. Une augmentation de la réponse angiogénique peut également contribuer à d'autres pathologies telles les rétinopathies, l'arthrite rhumatoïde, certaines maladies inflammatoires, la pré-éclampsie, le psoriasis et le cancer.^{2,18,13,19,20}

La contribution de l'angiogenèse au cancer est un concept qui a vu le jour en 1971 avec l'isolation d'un facteur, le TAF (Tumor Activating Factor), permettant l'activation des cellules endothéliales.²¹ Cette découverte a même permis d'énoncer les premières bases d'une avenue thérapeutique selon laquelle l'inhibition de l'angiogenèse permettrait de traiter le cancer.²² Depuis ce temps, l'angiogenèse dans un contexte tumoral et ses contributions ont été largement étudiées. Nous savons maintenant que la croissance tumorale au-delà de 1-2 mm³ est dépendante du développement d'un réseau vasculaire pouvant supporter ses besoins énergétiques.²³ La présence de vaisseaux sanguins tumoraux permet la croissance des cellules cancéreuses notamment en augmentant l'apport en nutriments et en oxygène et en facilitant l'élimination des déchets métaboliques.²⁴ De plus, ces mêmes vaisseaux sanguins sont généralement déstructurés et plus perméables. Ainsi, les cellules cancéreuses peuvent s'y insérer, se répandre à travers l'organisme via la circulation sanguine et former des métastases.^{25,24} Au niveau du cancer, toutes les méthodes de génération de vaisseaux sanguins classiques (i.e. vasculogenèse, angiogenèse, artériogenèse et intussusception) mentionnées

précédemment ont été rapportées.²⁶ En plus, de nouvelles méthodes d'approvisionnement par le réseau vasculaire sont observées, telles que la co-option vasculaire, le mimétisme vasculaire et la différenciation en cellules endothéliales des cellules souches cancéreuses.^{27,28} La co-option vasculaire est un processus par lequel aucun nouveau vaisseau sanguin n'est formé, mais plutôt lors duquel les cellules cancéreuses vont s'agglomérer et croître le long des vaisseaux sanguins, maximisant ainsi les échanges entre-eux.²⁷ Le mimétisme vasculaire consiste en l'organisation de cellules tumorales en structures tubulaires ressemblant à des capillaires sanguins ce qui leur permet de s'intégrer au réseau vasculaire et de maintenir le flot sanguin au sein de la tumeur, assurant ainsi l'apport nécessaire en nutriments et en oxygène.^{29,28} Finalement, de façon analogue à la vasculogénèse, les cellules souches cancéreuses peuvent se différencier, adopter un phénotype endothélial et former un réseau vasculaire primitif au sein de la tumeur en croissance.²⁸

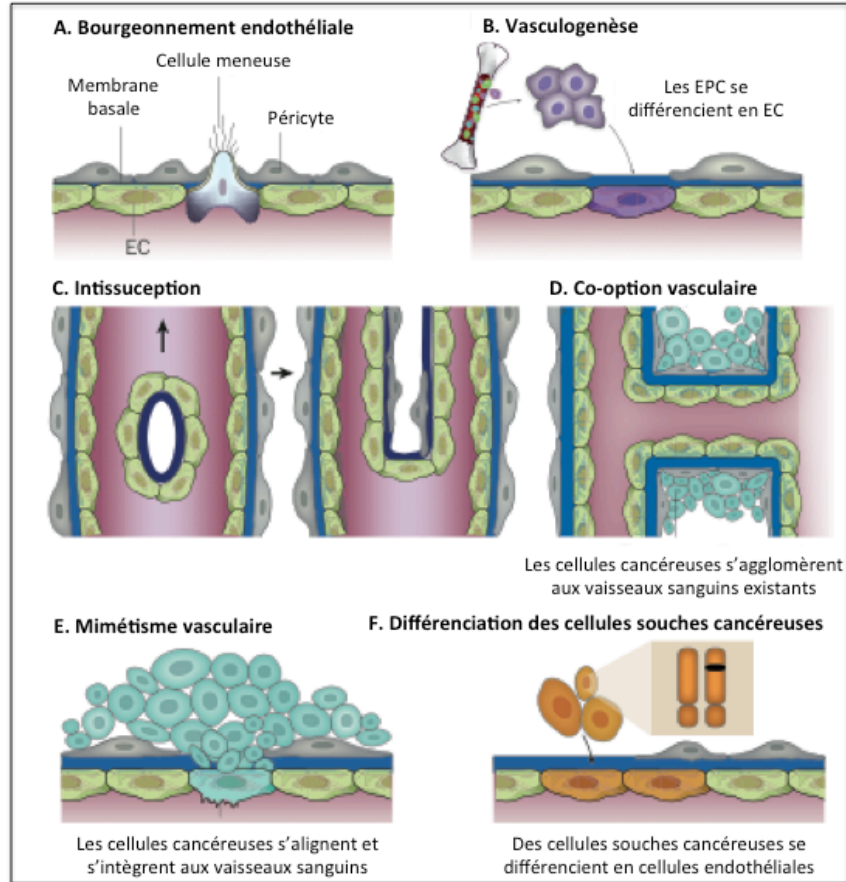


Figure 1 : Mécanismes de formation de vaisseaux sanguins.

Durant le développement ou en contexte physiologique, les vaisseaux sanguins peuvent être formés selon trois mécanismes (A-C). A) L'angiogenèse par bourgeonnement consiste en la complexification d'un réseau vasculaire existant suite à l'activation des cellules endothéliales (EC) (prolifération et migration). B) La vasculogenèse est la formation d'un vaisseau sanguin par la différenciation de cellules endothéliales progénitrices (EPC). C) L'intussusception est le processus par lequel un vaisseau sanguin existant se sépare pour donner deux vaisseaux-filles par réorganisation des cellules endothéliales de façon non-proliférative. (D-F) Dans un contexte tumoral, les cellules cancéreuses nécessitent la présence de capillaires sanguins et entraînent la formation de capillaires sanguins par les mécanismes classiques, mais également par des formes propres au cancer. D) La co-option survient lorsque les cellules cancéreuses vont croître autour d'un vaisseau sanguin existant et ainsi maximiser leur contact. E) Dans certains types de cancer, le mimétisme vasculaire où des cellules tumorales forment des structures tubulaires afin de mimer le réseau vasculaire a été observé. F) Des vaisseaux sanguins tumoraux peuvent également être formés par un mécanisme similaire à la vasculogenèse, mais il s'agit de cellules cancéreuses souches qui se différencient en cellules endothéliales pour former le vaisseau. Figure tirée de Carmeliet et al.²⁶

1.1 L'angiogenèse : un processus complexe médié par le bourgeonnement des cellules endothéliales

La formation d'un capillaire sanguin dans un contexte normal ou pathologique est un processus complexe nécessitant plusieurs fonctions cellulaires chez les cellules endothéliales dont les principales étapes sont présentées à la figure 2. L'initiation de la formation d'un capillaire sanguin est régie par le bourgeonnement des cellules endothéliales (ou le «sprouting») suite à leur activation par des facteurs pro-angiogéniques.³⁰ Ce phénomène fût introduit au début des années 2000 et a été largement caractérisé depuis.³⁰ Effectivement, la présence de facteurs pro-angiogéniques va activer les cellules du réseau vasculaire et permettre la sélection d'une première cellule endothéliale nommée cellule meneuse ou «tip cell» en anglais.³⁰ Cette cellule hautement mobile se caractérise par la présence de plusieurs protrusions lui permettant de détecter la présence des facteurs pro-angiogéniques au sein du microenvironnement ainsi que de migrer de façon polarisée en leur direction.^{30,31} Cependant, malgré leur activation, ces cellules ne semblent pas proliférer.³⁰ À ce stade, un relâchement des jonctions cellulaires et la sécrétion des protéases permettant la dégradation de la membrane basale libèrent la cellule meneuse et favorise sa migration.³² Une fois la cellule meneuse en migration, l'élongation du capillaire naissant est observée. Dans ce processus, un second phénotype de cellules endothéliales est observé, il s'agit des cellules de la tige ou «stalk cells» en anglais. Contrairement aux cellules meneuses, les cellules de la tige ne présentent pas de protrusions, prolifèrent abondamment en suivant la cellule meneuse et permettent ainsi de former le capillaire sanguin naissant.³⁰ De plus, ces cellules sont responsables de la formation de la lumière du nouveau vaisseau.³³ Ces cellules vont également déposer des composantes de la matrice extracellulaire lors de leur progression afin de faciliter la stabilisation du capillaire naissant.^{34,35,36,37} Durant sa progression, la cellule meneuse va rencontrer un capillaire existant ou une seconde cellule meneuse ce qui entraînera la fusion des vaisseaux et la répression du phénotype de cellule meneuse. Une fois les vaisseaux fusionnés, le flot sanguin sera instauré et va assurer la perfusion et l'oxygénation du tissu. À ce moment, les cellules de la tige adoptent plutôt un phénotype de cellules de phalange ou «phalanx cells» en anglais. Ces cellules présentent, quant à elle, un phénotype ressemblant à la quiescence. Il

s'agit de cellules qui sont très peu mobiles, non-prolifératives, qui présentent une lumière et des jonctions cellulaires riches en VE-Cadherine ce qui assure l'intégrité du vaisseau nouvellement formé par l'augmentation de l'adhésion cellulaire.³⁸ Ensuite, le recrutement de cellules murales permet la stabilisation et la maturation de ces vaisseaux. Cette maturation sera complétée par l'entrée en quiescence des cellules endothéliales. Ainsi, à l'âge adulte, le réseau vasculaire est composé principalement de cellules endothéliales quiescentes. Puis, en réponse à des facteurs angiogéniques, il y aura activation de ces cellules selon les trois phénotypes décrits ci-haut permettant le bourgeonnement endothélial.³⁹ De plus, ces phénotypes sont transitoires en ce sens qu'une cellule endothéliale activée durant la réponse angiogénique retrouvera un état de quiescence une fois la réponse angiogénique terminée. En plus, ces trois phénotypes endothéliaux coexistent au sein du système vasculaire activé.⁴⁰ En effet, il a été démontré qu'il s'agit de phénotypes dynamiques, c'est-à-dire qu'une même cellule peut présenter chacun de ces phénotypes à différents moments et que chaque cellule endothéliale a le potentiel d'adopter chacun des phénotypes. De plus, au cours de la formation d'un capillaire, la position de cellule meneuse peut être occupée par plus d'une cellule.⁴¹

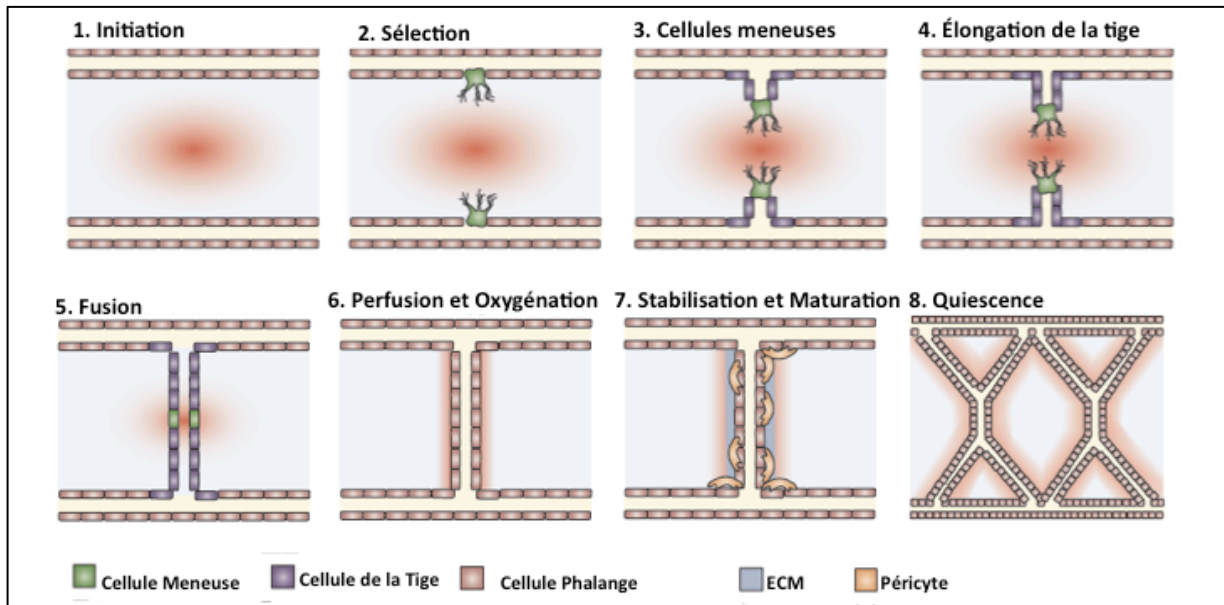


Figure 2 : Étapes de la formation d'un capillaire sanguin en réponse aux facteurs pro-angiogéniques.

Le processus angiogénique est complexe et nécessite la coordination de plusieurs fonctions cellulaires distinctes : 1) l'initiation de la réponse angiogénique par la présence de facteurs pro-angiogéniques en réponse à divers stimuli, 2) l'activation et la sélection des cellules endothéliales, 3) l'apparition d'un bourgeon endothélial, 4) l'élongation du vaisseau sanguin naissant à partir du bourgeon, 5) la fusion de vaisseaux naissants afin de s'ancrer au réseau existant, 6) la circulation sanguine dans le nouveau vaisseau sanguin assure la perfusion l'oxygénation du tissu environnant, 7) le recrutement de cellules murales afin de stabiliser le vaisseau et assurer sa maturation et finalement, 8) l'entrée en quiescence du nouveau capillaire sanguin. Figure adaptée de Carmeliet et al, 2009.⁴²

2. La signalisation par le VEGF et le VEGFR2

Parmi les nombreux facteurs pro-angiogéniques, le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est l'un des plus puissants inducteurs d'angiogénèse. Il a été initialement identifié par l'équipe de Senger en 1983 en tant que Vascular Permeability Factor (VPF), soit un facteur sécrété par les tumeurs déclenchant spécifiquement la perméabilité vasculaire.⁴³ Puis, en 1989, l'équipe de Ferrara a isolé le VEGF, un facteur mitogénique soluble spécifique

aux cellules endothéliales, à partir du milieu conditionné de cellules folliculaires pituitaires bovines.⁴⁴ Des études de clonage ont déterminé qu'il s'agissait de la même molécule et permis l'identification, pour la première fois, d'un facteur de croissance angiogénique ayant de multiples fonctions sur le réseau vasculaire.^{45,46} Le principal inducteur de l'expression du VEGF est l'hypoxie. En effet, le Hypoxia-Induced Factor-1 (HIF-1), un facteur de transcription impliqué dans la réponse hypoxique, lie une séquence en 5' du promoteur du VEGF et ainsi promeut la transcription du VEGF chez la souris, le rat et l'humain.^{47,48,49} Le VEGF est également le principal médiateur de l'angiogenèse pathologique contribuant, entre autre, à la croissance tumorale.⁵⁰ Au niveau tumoral, la grande demande énergétique et la prolifération démesurée des cellules cancéreuses surchargent le réseau vasculaire localement. Les cellules cancéreuses se retrouvent donc dans un milieu faible en oxygène et nutriments et, conséquemment, le programme transcriptionnel hypoxique sera enclenché. De cette façon, ces cellules vont sécréter du VEGF et induire une réponse angiogénique responsable de la vascularisation de la tumeur.⁵⁰

Chez l'humain, cinq ligands de la famille du VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF) sont retrouvés. Parmi ceux-ci, le ligand le plus abondant et le plus biologiquement actif est le VEGF-A. En effet, la perte d'un seul allèle de VEGF cause une létalité embryonnaire au jour E11-12 dû à une absence de vascularisation fonctionnelle et à la formation d'îlots sanguins.^{51,52} Bien que les souris VEGF-B KO soient viables, la perte du VEGF-B cause des anomalies dans le développement et la fonction cardiaque ainsi que lors du remodelage des poumons induit par l'hypoxie, sans altérer la réponse angiogénique induite par le VEGF-A.^{53,54,55} La double délétion de VEGF-C et VEGF-D se traduit par un développement vasculaire normal, mais une altération de l'étendue du réseau lymphatique, suggérant plutôt leur implication dans ce processus.⁵⁶ La délétion du PlGF résulte en un développement vasculaire normal.⁵⁷ Néanmoins, la réponse angiogénique dépendante du VEGF-A est limitée chez cette souris, incluant la perméabilité vasculaire, l'inflammation, l'angiogenèse rétinienne, la réparation de blessure ainsi que l'angiogenèse pathologique.⁵⁷ Il a été proposé que le PlGF induit ses effets en augmentant la biodisponibilité du VEGF-A. Ainsi, il est clair que le VEGF-A est indispensable au développement et à l'âge adulte et qu'il est le membre le plus important de sa famille de ligand.

Il est maintenant bien établi que l'épissage alternatif du gène du VEGF-A résulte en 4 isoformes bien distinctes comprenant 121, 165, 189 et 206 acides aminés. D'autres isoformes plus rares ont également été rapportées, soit le VEGF-A₁₄₅ et le VEGF-A₁₈₃.⁵⁸ L'isoforme la plus abondante au niveau des cellules normales ou transformées est le VEGF-A₁₆₅.⁵⁹ Les isoformes 121 et 189 sont retrouvées en faibles proportions dans la plupart des tissus. Par contre, le VEGF-A₂₀₆ est une isoforme très rare.⁶⁰ L'expression d'uniquement le VEGF-A₁₂₁ cause environ 50% de mortalités à la naissance due à des saignements et les souriceaux restants meurent dans les 14 jours suivants à cause d'insuffisance cardiaque.⁶¹ Ces animaux présentent un défaut d'angiogenèse du myocarde et du squelette.^{62,63} L'expression exclusive du VEGF-A₁₈₉, quant à elle, résulte en un défaut de développement artériel dans un modèle de vascularisation de la rétine.⁶⁴ De plus, ces souris présentent un défaut de vascularisation de l'épiphyse et de la formation de centre d'ossification secondaire causant une dysplasie du genou et le nanisme.⁶⁵ Le rôle crucial du VEGF-A₁₆₅ (nommée simplement VEGF par la suite) est supporté par des études démontrant que son expression seule est suffisante pour l'obtention d'une souris viable et en santé.⁶⁴

Chez l'humain, les ligands de la famille du VEGF peuvent interagir avec trois récepteurs à activité tyrosine kinase : le VEGFR1 (Flt-1), le VEGFR2 (KDR,Flk-1) et le VEGFR3 (Flt-4) (Figure 3). Il s'agit de récepteurs à activité tyrosine kinase comprenant sept domaines immunoglobuline-like (Ig-like) dans son domaine extra-cellulaire, un segment transmembranaire et un domaine tyrosine-kinase dans la partie intracellulaire.^{66,67,68} La structure du VEGFR3 est légèrement différente et comprends un clivage protéolytique du cinquième domaine immunoglobuline-like et la présence d'un pont disulfure.^{69,70} Au niveau du développement vasculaire, la délétion du VEGFR1 chez la souris cause une désorganisation du réseau vasculaire primitif menant à la mort de l'embryon au jour E8,5-9 sans affecter la différenciation des cellules endothéliales.^{71,72,73} Malgré cela, l'expression d'une forme mutante où le domaine kinase est délété résulte en une angiogenèse développementale normale, suggérant que le rôle du VEGFR1 est plutôt basé sur son interaction avec ses ligands que sur son activité catalytique.⁷⁴ Le VEGFR2, quant à lui, est essentiel puisque sa délétion chez la souris résulte en une létalité embryonnaire à E8,5-9,5 due à un défaut majeur d'activation des cellules hématopoïétiques et endothéliales, causant une vasculogenèse

abérante.^{75,76} Ainsi, le réseau primitif de capillaires n'est pas formé et, conséquemment, il n'y aura pas d'angiogenèse subséquente. Le VEGFR3 est principalement associé à la lymphogenèse et majoritairement exprimé au niveau des vaisseaux lymphatiques à l'âge adulte.^{77,78} Néanmoins, la délétion homozygote du VEGFR3 cause une létalité embryonnaire au jour E10-12,5 dû à un sac vitellin sous-développé, une vasculature périneurale faible et une accumulation de fluide péricardiaque.⁷⁹ De plus, l'expression du VEGFR3 au niveau de vaisseaux sanguins tumoraux est associée à une augmentation de la vascularisation de la tumeur.⁸⁰ Le VEGF lie avec grande affinité le VEGFR1 (10-20 pM) et le VEGFR2 (75-125 pM).^{81,82} Bien que le VEGFR1 ait une plus grande affinité pour le VEGF, son activation tyrosine kinase est grandement inférieure à celle du VEGFR2 et dispensable au développement. Dès lors, il a été suggéré que le VEGFR1 agirait en tant qu'atténuateur de la signalisation du VEGFR2. En effet, la liaison du VEGF au VEGFR1 limite son interaction avec le VEGFR2 et la réponse angiogénique.^{83,84,85,86,87} En plus, la déplétion du VEGFR1 augmente la phosphorylation du VEGFR2, suggérant une augmentation de son activation.⁸⁸ Toutefois, il a également été rapporté que l'activation du VEGFR1 par le PlGF permet d'augmenter l'activation du VEGFR2, vraisemblablement en causant la dissociation du VEGF et du VEGFR1. De cette façon, le VEGFR1 serait comme une éponge absorbant le VEGF disponible et limiterait la stimulation du VEGFR2. En plus des formes transmembranaires de ces récepteurs, il existe des variants solubles du VEGFR1 (sVEGFR1) et du VEGFR2 (sVEGFR2). Ces formes sont associées à l'inhibition des voies de signalisation du VEGF en limitant l'activation des récepteurs transmembranaires par le VEGF et ont donc pour fonction de limiter la réponse angiogénique.^{89,90} Collectivement, ces données supportent le rôle primordial de la signalisation induite par l'interaction VEGF/VEGFR2 dans la réponse angiogénique et que celle-ci est fait partie d'un ensemble hautement régulé.

Le VEGFR2 possède un domaine transmembranaire et est donc retrouvé au niveau de la membrane cellulaire. La localisation du VEGFR2 dépend du contexte cellulaire. En effet, dans les cellules éparses et en remodelage, le VEGFR2 est principalement en complexe avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Ce complexe promeut l'activation du VEGFR2 et la réponse angiogénique.^{91,92} Dans les cellules endothéliales confluentes ou formant un vaisseau sanguin stabilisé, les cadherines spécifiques aux cellules endothéliales, les VE-Cadherines, se

regroupent au niveau des jonctions adhérentes. Dans ces conditions, le VEGFR2 se retrouve principalement à ces jonctions où il forme un complexe avec les VE-Cadherine.⁹³ Ce complexe comprend également la β -caténine, la p120-caténine et les protéines tyrosine phosphatases DEP-1 et VE-PTP. Ainsi, de par leur proximité, les phosphatases peuvent déphosphoryler le VEGFR2 et limiter son activation.^{94,95} Ainsi, le VEGF2 est peu activable ce qui favorise l'état de quiescence découlant de la confluence cellulaire.⁹³

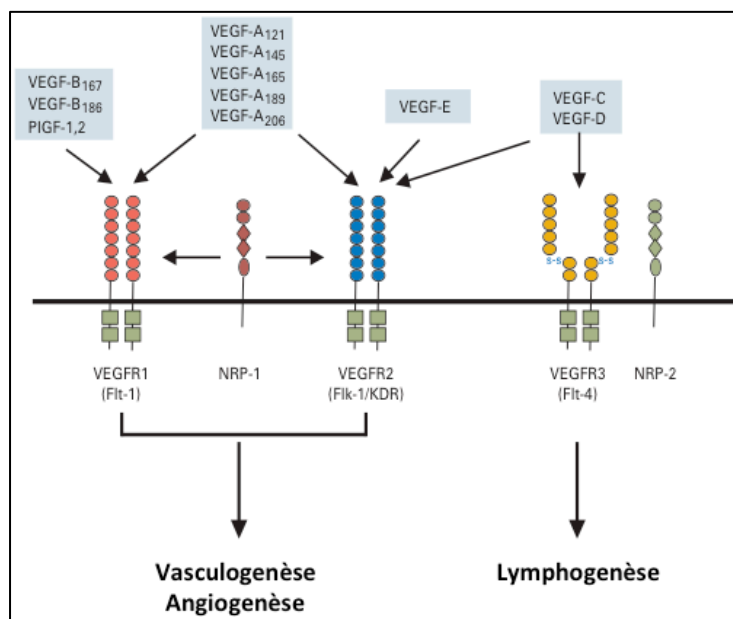


Figure 3 : Interactions entre les ligands de la famille du VEGF et leurs récepteurs.

Il existe trois membres de la famille des récepteurs du VEGF; le VEGFR1, le VEGFR2 et le VEGFR3. Les différentes isoformes du VEGF présentent une spécificité pour les divers récepteurs. Le VEGF-A lie le VEGFR1 et VEGFR2. Le VEGF-B et les PlGF sont spécifiques au VEGFR1 tandis que le VEGF-E l'est pour le VEGFR2. Les VEGF-C et VEGF-D peuvent interagir avec le VEGFR2 et le VEGFR3.⁵⁸

La liaison du VEGF au VEGFR2 induit la dimérisation du récepteur ce qui entraîne un changement conformationnel.⁹⁶ Ce dernier va permettre l'autophosphorylation du VEGFR2 via son activité tyrosine kinase. Les principaux sites de phosphorylation sont la Y801 dans la partie juxta-membranaire, les Y951/Y996 dans le domaine kinase, les Y1054/Y1059 au niveau de la boucle d'autoactivation, ainsi que les Y1175 et Y1214 en C-terminal. Ces sites phosphorylés représentent des sites d'interaction avec les molécules de signalisation et

substrats du VEGFR2 et vont permettre d'induire les cascades signalétiques subséquentes. Ainsi, le VEGFR2 induit la prolifération, la migration, l'invasion, la survie et la perméabilité vasculaire induite par le VEGF via son interaction avec ses nombreux substrats tel que résumé à la figure 4.

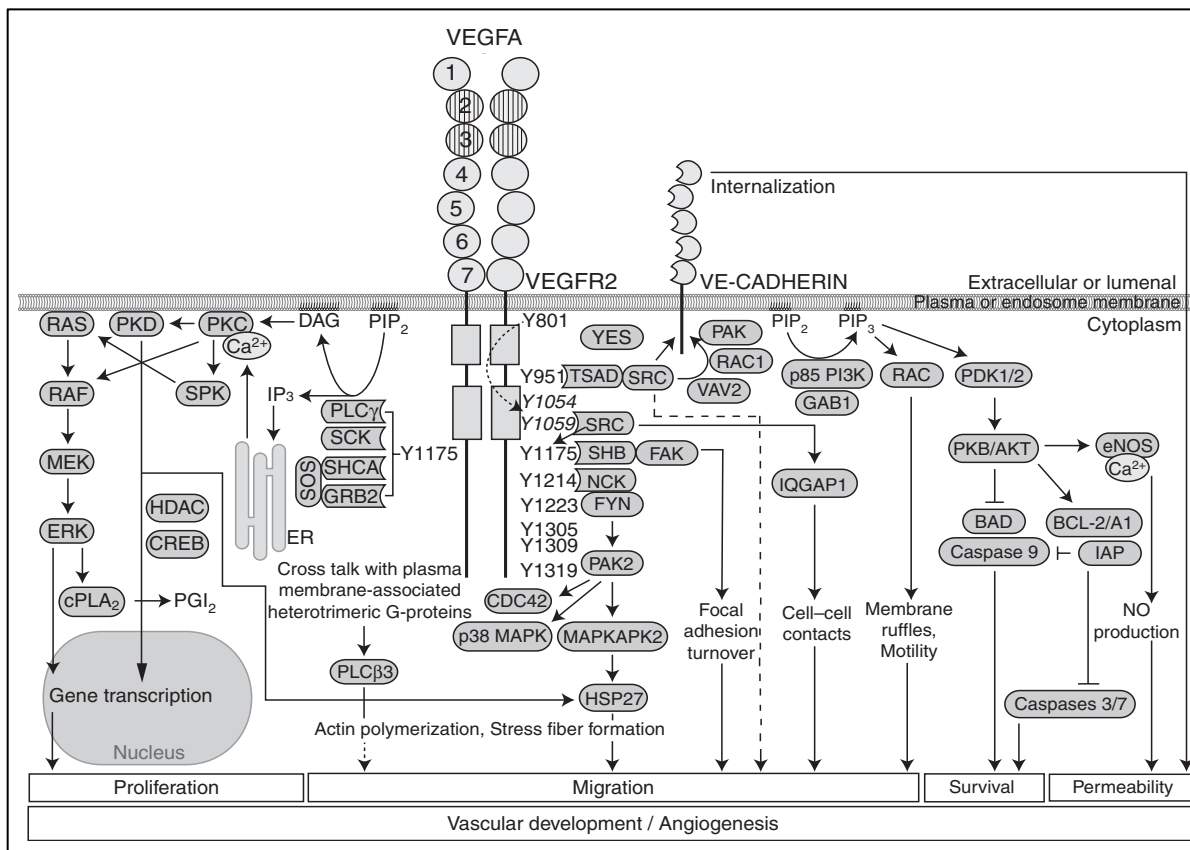


Figure 4 : La signalisation du VEGFR2

Au niveau des cellules endothéliales, le VEGF induit la dimérisation et l'activation du VEGFR2. Lorsqu'activé, le VEGFR2 est phosphorylé sur différents résidus tyrosine. Ces tyrosines permettent l'interaction entre le VEGFR2 et ses partenaires, permettant ainsi d'induire des voies signalétiques menant à la prolifération, la migration, la survie et la perméabilité vasculaire. Figure adaptée de Koch et al.⁹⁷

2.1 La prolifération

L'induction de la prolifération chez les cellules endothéliales découle principalement de l'activation de la phospholipase C gamma (PLC γ).⁹⁸ Effectivement, l'activation de la PLC γ mène à la conversion du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-triphosphate (IP3).^{99,100} Ce dernier induit une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire qui, conjointement avec le DAG, va permettre l'activation de la protéine kinase C (PKC). PKC activée stimule la prolifération des cellules endothéliales via la voie de signalisation Raf-MEK-ERK, une voie mitogénique importante permettant notamment la transition G1/S du cycle cellulaire.^{101,102,103} Dans les cellules endothéliales, les isoformes de PKC α et ζ sont responsables de l'effet mitogénique du VEGF. Bien que d'autres isoformes (δ et ϵ) soient exprimées par ces mêmes cellules, elles ne contribuent pas à ce phénomène.¹⁰³ Suite à l'activation du VEGFR2, la kinase Src sera activée et permettra la phosphorylation du VEGFR2 en Y1175, ce qui permettra le recrutement de la PLC γ et l'enclenchement de la signalisation proliférative.¹⁰⁴ De plus, les effets mitogéniques du VEGF dépendent de l'expression de Src.¹⁰⁵

2.2 La survie

Le VEGF est un facteur permettant la survie des cellules endothéliales des vaisseaux immatures.¹⁰⁶ Cet effet du VEGF est exclusivement médié par le VEGFR2 et principalement via l'activation de la voie de signalisation PI3K-Akt.¹⁰⁷ L'activation de cette voie permet notamment d'augmenter l'expression de facteurs anti-apoptotiques tels Bcl-2 et A-1 et d'inhiber les facteurs pro-apoptotiques Bad et Caspase-9.^{108,109,110} L'activation de PI3K en réponse au VEGF a été démontrée comme étant dépendante de l'activation de la kinase Src.^{111,95} Il a été suggéré que la kinase Src, tant qu'à elle, peut être activée directement par son recrutement au VEGFR2 via la tyrosine Y1059 ou via la protéine TSA δ recrutée à la Y951.^{104,112} Il a été également rapporté que Src peut être activé par la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 en réponse au VEGF.^{95,113} Cette activation de Src était nécessaire à la phosphorylation de la protéine d'échafaudage Gab1 en réponse au VEGF.⁹⁵ De façon

intéressante, la phosphorylation de Gab1 permet son interaction avec la PI3K et Akt et promeut la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF.^{114,115,116}

2.3 La migration et l'invasion

Plusieurs voies de signalisation induites par le VEGF permettent la migration et l'invasion des cellules endothéliales. D'abord, la protéine d'échafaudage Shb est recrutée à la Y1175 du VEGFR2 et permet l'activation de FAK (Focal Adhesion Kinase).^{117,118} Cette phosphorylation du VEGFR2 est assurée par l'activité kinase de Src.¹⁰⁴ De plus, le recrutement de la protéine d'achafaudage Gab1 au VEGFR2 permet, suite à sa phosphorylation par Src, l'activation de la PI3K et la génération de lipides membranaires phosphorylés. Ceux-ci permettent le remodelage du cytosquelette d'actine par Rac, essentiel à la migration.¹¹⁹ Finalement, la formation d'un complexe Nck/Fyn à la Y1214 du VEGFR2 permet la phosphorylation de PAK2 ce qui induit l'activation subséquente de CDC42 et de p38; deux protéines importantes pour la migration des cellules endothéliales.¹²⁰ En plus, le VEGF induit la sécrétion d'enzymes permettant la dégradation de la matrice extracellulaire et facilite ainsi la migration des cellules endothéliales. Parmi celles-ci, les métalloprotéases (MMP), l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA) et l'activateur de plasminogène de type tissulaire (TTPA) sont retrouvés.^{50,121}

2.4 La perméabilité vasculaire

Le VEGF induit la perméabilité vasculaire et la vasodilatation in vivo et in vitro de façon dépendante de la dose.^{43,122,123} Le relâchement des jonctions cellule-cellule est une étape cruciale à l'initiation de la réponse angiogénique et permet la perméabilité vasculaire. Le rôle de Src a été démontré dans ce contexte.¹²⁴ En réponse au VEGF, la phosphorylation de la Y951 du VEGFR2 permet le recrutement de la protéine TSAd, une protéine essentielle à l'induction de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF.¹¹² TSAd, à son tour, va permettre l'activation de Src.¹¹² La protéine tyrosine phosphatase DEP-1 a également été démontrée comme étant un promoteur de l'activation de Src et de la perméabilité vasculaire in

vitro.^{95,125} Src permet la phosphorylation des VE-Cadherines directement (Y658 et Y731) et indirectement via la voie Src-Vav2-Rac-PAK2 (S665).^{126,127,128,129} La phosphorylation des VE-Cadherines est associée à leur internalisation et conséquemment au relâchement des jonctions adhérentes.¹²⁷ La kinase FAK est également un médiateur important du remodelage des jonctions adhérentes en s'associant aux VE-Cadherine et en phosphorylant la β -caténine (Y142). Cette phosphorylation dissocie la β -caténine de la VE-Cadherine et affaiblit les jonctions adhérentes.^{130,131} Finalement, la perméabilité vasculaire induite par le VEGF peut être médiée par la production d'oxyde nitrique (NO) par eNOS.^{132,133} En réponse au VEGF, eNOS est activé par la phosphorylation dépendante d'Akt de la S1179 ou par un influx calcique dépendant de l'activation de la PLC γ .^{134,135} La phosphorylation de la Y801 du VEGFR2 est cruciale pour l'activation de la voie PI3K-Akt et conséquemment pour la production de NO par eNOS.¹³⁶

2.5 Le bourgeonnement endothélial

La voie de signalisation Notch est cruciale pour le développement et l'organisation adéquate du réseau vasculaire. Cette voie a principalement été étudiée pour son implication dans le bourgeonnement des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse.³⁴ Chez l'humain, il existe quatre récepteurs de la famille de Notch : Notch1-4.¹³⁷ Au niveau des cellules endothéliales, les récepteurs Notch1 et Notch4 sont les principaux exprimés.¹³⁸ Chez la souris, la délétion de Notch1 dans les cellules endothéliales se caractérise par la formation d'un plexus primitif normal, mais une létalité embryonnaire due à un défaut majeur de ramification du réseau, suggérant un rôle critique lors de l'angiogenèse.¹³⁹ Il a été montré que l'expression de Notch1, mais pas Notch4, est également cruciale pour l'angiogenèse post-natale induite par l'ischémie.¹⁴⁰ Pour sa part, la souris *Notch4* KO est viable et en santé.¹⁴¹ Néanmoins, l'expression d'une forme constitutivement active de Notch4 cause des changements vasculaires importants, tels que l'absence de petits vaisseaux branchés, la perte de l'intégrité vasculaire et l'apparition de court-circuits artériels.^{142,143,144,145} Par contre, la délétion de Notch1 et de Notch4, présentant des symptômes plus sévères que *Notch1* KO, sont létaux embryonnaires, caractérisés par plusieurs défauts vasculaires suggérant que Notch4 compense

en partie la perte de Notch1.¹⁴¹ Chez l'humain, des mutations de Notch1 ont été identifiées comme une cause génétique du syndrome d'Adams-oliver, une pathologie présentant de nombreuses anomalies vasculaires incluant le cutis marmota telangiectatica congenita, l'hypertension pulmonaire, l'hypertension de la veine porte, l'hypovascularisation de la rétine et des malformations cardiaques.^{146,147,148,149,150} Dès lors, la signalisation dépendante de l'activation de Notch, et particulièrement celle de Notch1, est d'un grand intérêt pour approfondir nos connaissances des mécanismes régissant l'angiogenèse par bourgeonnement.

Les récepteurs Notch, pour leur activation, nécessitent une interaction avec leur ligand. Chez les mammifères, il existe cinq ligands de Notch : Delta-like 1 (Dll1), Delta-like 3 (Dll3), Delta-like 4 (Dll4), Jagged-1 et Jagged-2.³⁴ De ces ligands, seul le Dll3 n'est pas exprimé par les cellules endothéliales.^{151,152,153,154} Le Dll4 et Jagged-1 sont les deux ligands les plus importants dans le réseau vasculaire. L'haploinsuffisance de Dll4 est létale embryonnaire et résulte en des défauts de remodelage vasculaire et des malformations artério-veineuses, principalement associées aux artères.^{155,156} Dll4 est fortement exprimé au niveau des artères embryonnaires, des vaisseaux sanguins en remodelage à l'âge adulte et de la vascularisation tumorale et est le seul ligand à avoir un profil d'expression qui permettrait l'interaction avec les Notch cruciaux au développement, démontrant son importance.^{141,157} Quant à Jagged-1, une mutation a été associée au syndrome d'Alagille, maladie causant notamment des cardiopathies congénitales, et la délétion chez la souris cause des hémorragies et des défauts de remodelage vasculaire létaux durant l'embryogenèse.^{158,159,160} De façon intéressante, bien que Jagged-1 soit exprimé à travers le réseau vasculaire lors de l'angiogenèse, la délétion spécifique aux cellules endothéliales de Jagged-1 cause principalement un défaut du recrutement des cellules vasculaires musculaires lisses tandis que l'activation endothéliale de Notch, ainsi que la différenciation artère-veine, semblent normales.^{161,162,137} À cet effet, l'expression de Jagged-1 au niveau endothélial est plutôt associé au recrutement et à la maturation des cellules murales telles que les péricytes et les cellules vasculaires musculaires lisses en activant le récepteur Notch3 à leur surface.^{163,164,161}

De nombreuses études rapportent une coordination ou une communication entre la voie du VEGF et celle de Notch.^{165,166} D'abord, la voie de signalisation du VEGF et celle de Notch

sont toutes deux cruciales pour la différenciation artérielle et l'angiogenèse induite par l'ischémie, mais la signalisation via Notch ne permet pas de compenser la perte du VEGF.^{167,140} Inversement, l'activation de la voie du VEGF ne permet pas de compenser pour la perte de Notch suggérant que ces voies agissent en parallèle. Néanmoins, la présence de VEGF permet l'induction de la signalisation de Notch1, notamment en induisant l'expression du Dll4, de Jagged-1 et de Notch1.^{168,169,170,171,172,173} En effet, l'inhibition du VEGF mène à une diminution de l'expression du Dll4 au niveau des vaisseaux tumoraux et rétiniens tandis que l'administration de VEGF de façon intravitale en cause l'augmentation au niveau de la rétine, supportant une coordination de ces voies.^{174,175,176,177}

Les mécanismes moléculaires permettant au VEGF d'induire l'expression des ligands de Notch restent méconnus. L'activation de la PI3K et d'Akt semble cependant indispensable, puisque l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K ou l'expression d'un mutant dominant-négatif d'Akt bloquent l'expression de Dll4, de Jagged-1 et de Notch1 tandis qu'une forme constitutive active les augmente.^{140,172,173} Les vaisseaux sanguins en remodelage présente une activation et une localisation nucléaire importante de la β -caténine où elle forme un complexe transcriptionnel actif avec les facteurs de transcription de la famille de TCF/LEF.^{178,179} De façon intéressante, ce complexe peut lier, de façon dépendante de la β -caténine, les promoteurs du Dll4 et de Jagged-1. Ainsi, l'activation de la β -caténine s'avère nécessaire à l'expression adéquate du Dll4 et au développement normal de la vascularisation de la rétine chez la souris.^{180,181} Ainsi, il est tentant de spéculer que la β -caténine favorise le bourgeonnement endothélial.

À ce jour, les composantes de la voie du VEGF et de Notch, particulièrement Notch1 et Dll4, sont associées au phénomène de bourgeonnement endothélial. Selon le modèle actuel, tel qu'expliqué précédemment, la présence de VEGF dans le microenvironnement induit l'activation des cellules endothéliales via le VEGFR2. À ce stade, l'activation du VEGFR2 induit l'expression du Dll4 et permettra la sélection de la cellule meneuse. Tout comme pour d'autres systèmes impliquant l'activation du récepteur Notch, le Dll4 nouvellement exprimé par une première cellule endothéliale provoque une inhibition latérale en interagissant avec le

récepteur Notch des cellules avoisinantes. Cette inhibition par le Dll4 permet la compétition entre les différentes cellules endothéliales activées pour la position de cellule meneuse. En effet, l'interaction entre le récepteur Notch et le Dll4 cause le clivage du récepteur en 2 étapes : d'abord un clivage (S2) de la partie extracellulaire par ADAM10 ou ADAM17 (ou TACE) ce qui sera suivi d'un second clivage (S3) au niveau de la membrane via l'activité de la γ -sécrétase, libérant ainsi le domaine intracellulaire de Notch (NICD).^{182,183,184,185,186} Le NICD cytosolique va transloquer au noyau et agir en tant que co-activateur transcriptionnel de RBP-J/CSL ce qui va induire un programme transcriptionnel via l'expression des facteurs de transcription Hey et Hes.¹⁸⁷ L'activation de Notch augmente l'expression des facteurs HES1, HES5, HEY1, HEY2 et HEYL.¹⁸⁸ Toutefois, seulement les isoformes HES1, HEY1 et HEY2 sont exprimées par les cellules endothéliales.¹⁸⁸ Notamment, chez la cellule endothéliale, l'activation de Notch par le Dll4 va causer une inhibition de l'expression du VEGFR2 ainsi qu'une augmentation de l'expression du VEGFR1 et du sVEGFR1, tous deux impliqués dans la séquestration du VEGF disponible, chez la cellule receveuse. De cette façon, les cellules présentant une activité Notch deviennent moins sensibles à une stimulation au VEGF. (Figure 5) Ce phénomène renforce ainsi la dominance de la cellule meneuse sur ces voisines puisque ces dernières voient leur niveau de Dll4 indirectement réduit par la baisse des niveaux de VEGFR2 et empêche conséquemment une inhibition latérale réciproque.¹⁸⁹ Ce mécanisme moléculaire permet de bien distinguer les cellules de tige et les cellules meneuses. Effectivement, les cellules meneuses sont caractérisées par des niveaux d'expression élevés de VEGFR2 et Dll4, une activité Notch faible et une grande sensibilité au VEGF tandis que les cellules de la tige présentent une activation de la voie Notch marquée. Ainsi, l'activation de la voie Notch par le Dll4 confère un phénotype de cellule de la tige à la cellule receveuse et réprime l'apparition des cellules meneuses.^{190,189,177,175} En effet, l'inhibition de l'interaction Dll4/Notch de façon génétique ou pharmacologique résulte en une augmentation importante de la complexité et du nombre de vaisseaux sanguins, ce qui s'explique par une augmentation importante du nombre de cellules meneuses dans un modèle de vascularisation de la rétine.^{176,191,177,190,192} Il s'agit d'un processus dynamique où, au cours de la formation d'un capillaire, la cellule meneuse initiale peut être remplacée par une nouvelle cellule et plutôt adopter un phénotype de cellule de la tige.⁴¹ Un autre niveau de régulation de cette hiérarchisation dépend de l'expression du Jagged-1 qui est exprimé principalement chez les

cellules de la tige. En effet, ces cellules expriment deux ligands du récepteur Notch, soit le Dll4 et Jagged-1, et ceux-ci compétitionnent pour le lier. Toutefois, puisque la liaison de Jagged-1/Notch n'induit pas l'activation de la signalisation Notch chez la cellule meneuse, cette dernière maintient son activation, son phénotype ainsi que sa dominance sur ces voisines.¹⁹³

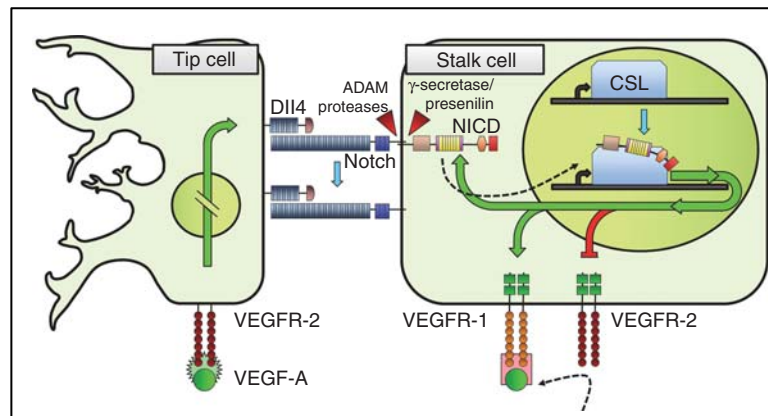


Figure 5 : L'implication de la voie Notch dans la hiérarchisation des cellules meneuses et des cellules de la tige.

Chez une première cellule endothéliale, la présence de VEGF dans le microenvironnement induit l'activation du VEGFR2. Cette activation lui confère un phénotype de cellule meneuse et mène à l'expression du Dll4 à sa surface. Le Dll4 de cette cellule interagit avec le récepteur Notch d'une cellule voisine. Cette liaison induit le clivage du récepteur Notch en deux étapes. D'abord, un clivage médié par les protéases ADAM, puis un second clivage par la γ -sécrétase relâchant ainsi le domaine intracellulaire de Notch (NICD). Le NICD est un co-facteur transcriptionnel qui, une fois transloqué au noyau, induit un programme transcriptionnel favorisant l'expression du VEGFR1 et diminuant l'expression du VEGFR2, limitant la réactivité de cette cellule au VEGF. Figure tirée de Tung et al.³¹

2.6 Les thérapies anti-angiogéniques

Compte tenu de son rôle capital au sein de la tumeur, cibler le réseau vasculaire et particulièrement la réponse angiogénique des cellules endothéliales semble une avenue thérapeutique intéressante. Effectivement, contrairement aux cellules cancéreuses, les cellules

endothéliales sont plutôt homogènes, peu susceptibles de développer des mutations leur conférant une résistance aux traitements utilisés et facilement accessibles aux médicaments administrés par voies intraveineuses.^{194,195,196} Au cours des vingt dernières années, de nombreux efforts ont été déployés pour élaborer des thérapies permettant de bloquer la réponse angiogénique. De nombreuses études ont démontré l'importance de l'angiogenèse et surtout de la signalisation du VEGF comme avenue thérapeutique.^{26,13} Parmi tous les traitements développés, le Bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF, est le plus étudié. Au fil du temps, il a été approuvé pour utilisation dans le traitement de nombreux cancers dont le cancer du sein, du colon, du poumon, du glioblastome multiforme (GBM), du rein, de l'ovaire, du pancréas.^{197,198,199,200,201,202,203} L'efficacité de ces traitements n'a cependant pas permis d'améliorer la survie globale que de patients ayant des cancers rénaux.^{204,203} En 2011, la FDA a même, de façon controversée, retiré sa recommandation d'utilisation du Bevacizumab pour le traitement du cancer du sein métastatique dû à un risque accrue pour la santé des patients et peu de bénéfices.²⁰⁵ Malheureusement, pour les cancers hautement agressifs comme les GBM, les traitements au Bevacizumab ont résulté en une diminution importante du volume tumoral, mais également une augmentation de l'invasivité des cellules et du taux de rechute chez les patients.²⁰⁰ Dans ce modèle, une étude moléculaire approfondie a rapporté que la voie du VEGF, lorsqu'activée, atténue une voie pro-invasive médiée via le récepteur tyrosine kinase MET.²⁰⁶ MET, le récepteur du HGF, est fréquemment activé dans le cas de GBM et son activation promeut l'invasion des tumeurs et est associée à un mauvais pronostic.²⁰⁷ Ainsi, en absence de la signalisation du VEGF ou lors d'un traitement au Bevacizumab, la signalisation dépendante de MET et la capacité invasive des cellules se trouvent augmentées, ce qui se traduit par une augmentation de l'agressivité des cellules et de la formation de métastases. D'autre part, de nombreux effets secondaires ont été rapportés chez les patients suivant ce type de traitement comme l'hypertension, des accidents thromboemboliques artériels et des saignements gastrointestinaux.^{208,209} En plus, une résistance importante est retrouvée dans les tumeurs peu dépendantes des vaisseaux sanguins, mais également dans certains cas de cancer hautement dépendants de ceux-ci, suggérant la mise en place d'approches alternatives d'induction de l'angiogenèse au sein de la tumeur.^{210,211} Ces résultats suggèrent que l'implication de la voie de signalisation du VEGF dans de nombreux processus physiologiques limite l'applicabilité de ces traitements et

interfèrent avec l'angiogenèse normale, causant ainsi de nombreux effets secondaires. En plus, des voies alternatives permettant l'angiogenèse pathologique ont été démontrées ce qui réduit l'efficacité de ce type de traitement. Néanmoins, l'inhibition de la formation de vaisseaux sanguins reste une avenue thérapeutique intéressante. Dès lors, il devient important de caractériser les mécanismes moléculaires qui régissent la réponse angiogénique afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques à la réponse angiogénique pathologique limitant les effets secondaires de tels traitements ou des cibles permettant d'inhiber l'angiogenèse induite par différentes voies de signalisation.

3. Les kinases de la familles de Src

L'étude des voies de signalisation induites par le VEGF a permis d'identifier les kinases de la famille de Src (SFKs) comme étant des médiateurs cruciaux de la réponse angiogénique. Il s'agit d'une famille de protéines à activité tyrosine kinase composée de neuf membres soit Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn et Yrk.²¹² De celles-ci, seules Src, Fyn et Yes seraient exprimées de façon ubiquitaire, tandis que les autres membres de la famille sont plutôt exprimés par les cellules myéloïdes et immunitaires.²¹³

3.1 Structures et régulation de l'activité des SFKs

Les SFKs possèdent une structure hautement conservée qui se caractérise par un domaine unique en N-terminal différent pour chaque membre de famille, suivi d'un domaine SH3, un domaine SH2, une région espaceur, un domaine catalytique et finalement une région régulatrice en C-terminal.²¹⁴ Les SFKs sont retrouvées principalement sous deux conformations, soit active («ouverte») ou inactive («fermée») qui sont régulées par leur phosphorylation sur les tyrosines 418 et 529 (chez Src) situées respectivement dans le domaine catalytique et dans la région régulatrice en C-terminal (Figure 6). Dans le cas de Src, sa conformation inactive est assurée par deux interactions intramoléculaires. D'abord, lorsque la Y529 est phosphorylée, un repliement de la protéine est observé dû à une interaction entre le domaine SH2 et la Y529.^{215,216} Sous cette forme, Src a une conformation fermée et est

plutôt inactif.²¹⁷ De plus, le domaine SH3 interagit avec une séquence riche en proline retrouvée dans l'espaceur de Src qui stabilise la conformation fermée.²¹⁸ La phosphorylation de la Y529 est assurée par deux protéines tyrosines kinases : Csk et Chk.^{219,220} Ces protéines représentent donc des régulateurs négatifs de Src. La déphosphorylation de la Y529, permettant une conformation «ouverte», est par conséquent une étape cruciale de l'activation de Src et est généralement effectuée par des protéines à activité tyrosine phosphatase dont plusieurs exemples ont été répertoriés.^{113,221,222,223,224,225,226} Alternativement, Src peut être activé suite à la liaison du domaine SH2 ou SH3 avec un ligand externe de grande affinité, ce qui dissocie les interactions intramoléculaires et favorise son ouverture. Une fois ouverte, Src procède à une autophosphorylation intermoléculaire en Y418, ce qui résulte en une activation optimale de la kinase.²¹⁸

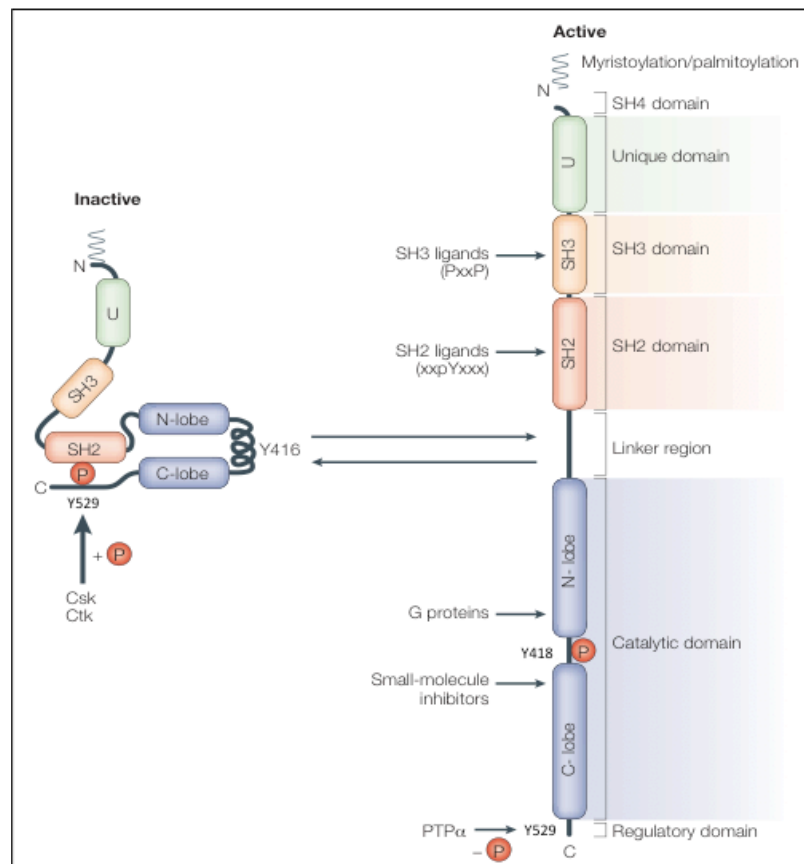


Figure 6: Structure et conformation des kinases de la famille de Src.

Structure des kinases de la famille de Src (SFKs). Les SFKs présentent un domaine unique en N-terminal suivi d'un domaine SH3, un domaine SH2, un espaceur, leur domaine catalytique et une région régulatrice en C-terminal. Deux résidus tyrosines sont hautement impliqués dans la régulation des SFKs soit les Y418 et Y529. Lorsque la Y529 est phosphorylée, une interaction intramoléculaire entre la Y529 et le domaine SH2 cause un repliement de la protéine et l'adoption d'une conformation «fermée» ou inactive. Cette phosphorylation est médiée par les kinases Csk et Chk. Inversement, la déphosphorylation de la Y529 par les phosphatases permet l'ouverture des SFKs et leur auto-activation par la phosphorylation de la Y418. Les positions d'acides aminés correspondent à la structure de Src. Figure adaptée de Salter et al.²¹⁴

3.2 Rôles de Src durant l'angiogenèse

Dans le contexte de la signalisation du VEGF induite par le VEGFR2, la kinase Src joue un rôle central et permet de médier plusieurs fonctions biologiques importantes telles que précédemment illustrées incluant la prolifération, la survie, la migration et la perméabilité vasculaire. Le rôle *in vivo* de Src dans l'angiogenèse a été étudié dans plusieurs modèles. Bien que les souris *Src*^{-/-} se développent normalement, la perméabilité vasculaire induite par le VEGF, la phosphorylation des VE-Cadherines ainsi que la formation de métastases aux poumons, phénomène hautement dépendant de la perméabilité vasculaire, sont bloquées chez ces mêmes souris.^{227,228,229,230} Toutefois, Src ne semble pas être impliqué dans la perméabilité vasculaire basale ou induite par l'histamine démontrant ainsi sa spécificité à la signalisation du VEGF.^{228,112} La phosphorylation des VE-Cadherines est associée à leur internalisation et au relâchement des jonctions adhérentes des cellules endothéliales.¹²⁷ En plus de permettre la perméabilité vasculaire, ce relâchement est également critique pour le bourgeonnement et la migration des cellules endothéliales.²³¹ Par conséquent, la formation de capillaires induite par le VEGF est abolie suite à l'infection de souris avec un dominant-négatif de Src (Src251) ou Csk, un inhibiteur endogène de Src.²²⁸ De façon intéressante, l'administration de PP2, un inhibiteur des SFKs, limite également l'angiogenèse pathologique rétinienne.²³² Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vitro*, l'inhibition de Src, Fyn et Yes résulte en l'inhibition de la migration, la formation de capillaires et la prolifération.¹⁰⁵ Ainsi, Src et d'autres membres de la famille des SFKs sont critiques à la réponse angiogéniques.

3.3 Rôles de Src dans le cancer

En plus d'être critique à la réponse angiogénique, SRC est le premier oncogène découvert et, aujourd'hui, un des plus étudiés.²³³ v-Src (pour Src viral) a été initialement identifié par Dr. Rous comme une protéine dont l'expression est induite par un virus et qui serait responsable de la transformation des cellules dans le sarcome de Rous. Une analyse structurale de la protéine a identifié une troncation de la région régulatrice de Src comprenant la Y529 causant ainsi une activation constitutive. Un analogue nommé c-Src (ou Src cellulaire) a été identifié dans les cellules normales.²³⁴ Depuis, de nombreuses études ont démontré l'importance de Src dans la tumorigenèse. Effectivement, l'activation de Src au niveau des cellules cancéreuses permet l'activation de nombreuses voies de signalisation menant notamment à la prolifération, la migration, la survie et l'angiogenèse, ce qui représente quatre des caractéristiques nécessaires à une tumeur pour son développement.^{24,25,235} Src est un oncogène présentant fréquemment une augmentation de son activité ou de son expression dans différentes formes de tumeurs solides ou hématologiques, mais très peu de cas rapportent une mutation de Src, suggérant plutôt une altération de ses régulateurs.²³⁶ Le rôle de Src au niveau des cellules cancéreuses est pléiotropique et découle des nombreuses voies de signalisation activées par celui-ci. Par exemple, l'expression de Src au niveau des cellules cancéreuses hypoxiques est nécessaire à l'expression du VEGF, permettant ainsi l'induction de l'angiogenèse tumorale.²³⁷

3.4 Rôles de Src dans le cancer du sein

Parmi les cancers auxquels Src a été associé, le cancer du sein est l'un de ceux où son rôle fût le plus étudié.²³⁸ Effectivement, dans ce cancer, Src est hautement activé comparé au tissu mammaire sain et, même si l'activation de Src n'est pas suffisante pour la transformation des cellules mammaires, elle contribue grandement à la pathologie.^{239,240,241,242,243,244} En fait, l'activation de Src corrèle avec l'agressivité du cancer chez les patientes. Plus spécifiquement, Src amplifie la signalisation et l'effet oncogénique du récepteur de l'EGFR (ou HER1).^{245,246} L'EGFR est un récepteur oncogénique qui induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), la migration et invasion des tumeurs mammaires.²⁴⁷ Src permet également l'activation

de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires via l'activation des MAPK suite à une stimulation par divers facteurs de croissance et est essentiel à la synthèse d'ADN induite par l'EGF.^{248,249,250,251} Src promeut également la motilité cellulaire et la survie sans ancrage médiées par HER2 ou l'hétérocomplexe HER2/HER3, suggérant l'association de Src et HER2.^{252,253} Il est rapporté que HER2 permet l'activation de Src et qu'un traitement au PP2, un inhibiteur des SFKs, bloque la croissance sans ancrage induite par HER2.²⁵³ La surexpression de HER2 dans le cancer du sein est associée notamment à l'augmentation de l'invasivité et de la formation de métastases.^{254,255} Src est fortement associé à la motilité et l'invasivité des cellules du cancer du sein in vitro et chez les patientes.^{256,257} De plus, Src est associé à la formation de métastases osseuses due à la combinaison de ses rôles dans le métabolisme osseux et l'agressivité des cellules tumorales.²⁵⁸ D'autre part, Src a été associé à l'EMT, processus permettant à une cellule épithéliale de modifier son profil d'expression génique afin de perdre l'expression des gènes épithéliaux et d'augmenter l'expression de gènes mésenchymateux.²⁵⁹ L'EMT augmente le potentiel migratoire des cellules et est associée à l'invasion et la formation de métastases. Vu son importance dans le cancer du sein, un traitement inhibant Src est une avenue thérapeutique prometteuse pour ce cancer et est actuellement en étude clinique.^{260,261} En plus, Src phosphoryle également la Cortactine.²⁶² Il s'agit d'une protéine associée à la migration cellulaire et la régulation de la polymérisation de l'actine de par son association et son rôle d'activateur de Arp2/3, un complexe protéique responsable de la polymérisation et du branchement de l'actine.²⁶³ La phosphorylation de la Cortactine corrèle avec une augmentation du potentiel migratoire et de la formation de métastases dans les tumeurs malignes.^{263,264} Lors de l'invasion, les cellules cancéreuses procèdent à des réarrangements du cytosquelette afin de produire des protrusions qui ont pour fonction de dégrader la matrice extra-cellulaire permettant aux cellules de se déplacer dans un nouvel environnement.^{265,266} Ces protrusions sont nommées invadopodes et sont associées à l'invasion et la formation de métastases.^{266,267} Leur formation nécessite l'activité catalytique de Src et la phosphorylation de la Cortactine.^{268,269} Ainsi, il existe de nombreuses évidences qui associent l'activation de Src et l'invasivité des cellules cancéreuses.

3.5 L'invasion et la formation de métastases

L'invasion cellulaire est un processus durant lequel une ou plusieurs cellules vont migrer, dégrader la matrice extracellulaire et adhérer à un environnement changeant.²⁷⁰ Tel que décrit ci-haut, dans le cancer du sein, l'invasion et l'EMT sont deux processus dépendants de Src qui sont hautement associés à la formation de métastases. Toutefois, la formation de métastases est un processus complexe impliquant de nombreuses étapes. D'abord, les cellules cancéreuses de la tumeur primaire devront se détacher en déstabilisant les jonctions cellulaires, procéder à l'EMT et envahir le tissu environnant. Elles pourront ensuite atteindre la circulation sanguine en infiltrant les vaisseaux sanguins. Une fois en circulation, ces cellules font atteindre le site secondaire et s'y établir en quittant le réseau vasculaire. Finalement, les cellules cancéreuses pourront proliférer afin de générer une masse métastatique au site secondaire.²⁷¹ Il s'agit d'un processus très peu efficace où seulement quelques cellules survivent. C'est pourquoi les cellules cancéreuses métastatiques devront également développer des mécanismes leur permettant d'éviter la mort cellulaire.²⁷² Plusieurs des fonctions cellulaires nécessaires à la formation de métastases font parties des caractéristiques essentielles d'une cellule tumorale (hallmarks of cancer).^{25,24} Ainsi, bien que l'activation de la kinase Src contribue à la formation de métastases, elle fait partie d'un ensemble d'évènements moléculaires y menant.

4. La régulation de la signalisation par les protéines tyrosine phosphatases (PTP)

La superfamille des phosphatases comprend des enzymes qui permettent la déphosphorylation de leurs substrats en agissant essentiellement à l'inverse des kinases. Traditionnellement, les phosphatases sont associées à la terminaison ou l'inhibition des réponses signalétiques tandis que les kinases sont plutôt considérées comme des promoteurs de ces mêmes voies.²⁷³ Toutefois, de plus en plus d'évidences supportent le rôle promoteur des phosphatases dans différents contextes. Notamment, les SFKs peuvent être activées par des phosphatases via la déphosphorylation de leur tyrosine inhibitrice (Y529). Une grande famille de phosphatases est celle des protéines tyrosine phosphatases (PTP). Cette famille comprend

un peu plus d'une centaine de gènes qui sont subdivisés en PTP classiques et phosphatases à double spécificité, donnant lieu à 107 membres chez l'humain.²⁷³ Une grande diversité de PTP est issue de ces gènes due à la présence d'épissage alternatif, de promoteurs alternatifs et de modifications post-traductionnelles. Ces modifications assurent la spécificité au niveau des substrats et de la fonction des phosphatases.²⁷⁴ Les PTP présentent un domaine catalytique d'environ 280 acides aminés ayant plusieurs petites séquences motifs et une séquence bien conservée de liaison au phosphate $HC(X)_5R$.²⁷⁵

Les PTP classiques représentent les PTP ne ciblant que des résidus tyrosine phosphorylés et sont divisées en deux grandes familles, soit les PTP de type récepteur et les PTP cytosoliques (Figure 7). Les PTP de type récepteur (RPTP) incluent toutes les PTP ayant une structure similaire à celle d'un récepteur. Leur structure se divise en une partie extracellulaire permettant des interactions avec des ligands, un segment transmembranaire et une partie intracellulaire comprenant généralement deux domaines catalytiques nommés D1 et D2. De manière générale, le domaine D2 n'est pas catalytiquement actif, mais est tout de même nécessaire au bon fonctionnement de la RPTP.²⁷⁶ Malgré la grande diversité présente dans les PTP, la réaction enzymatique de déphosphorylation est hautement conservée et dépend d'un résidu cystéine retrouvé au sein du domaine catalytique. La réaction de déphosphorylation se produit en deux étapes (Figure 8). D'abord, une attaque nucléophile de la cystéine de la phosphatase sur l'ion phosphate en collaboration avec un acide aspartique permet de dissocier le groupement phosphate de l'ensemble du substrat. Ensuite, une réorganisation intramoléculaire, coordonnant plusieurs acides aminés de la phosphatase (Cys, Asp et Gln), le groupement phosphate et une molécule d'eau, permet la libération du groupement phosphate et la réactivation de la phosphatase.²⁷³

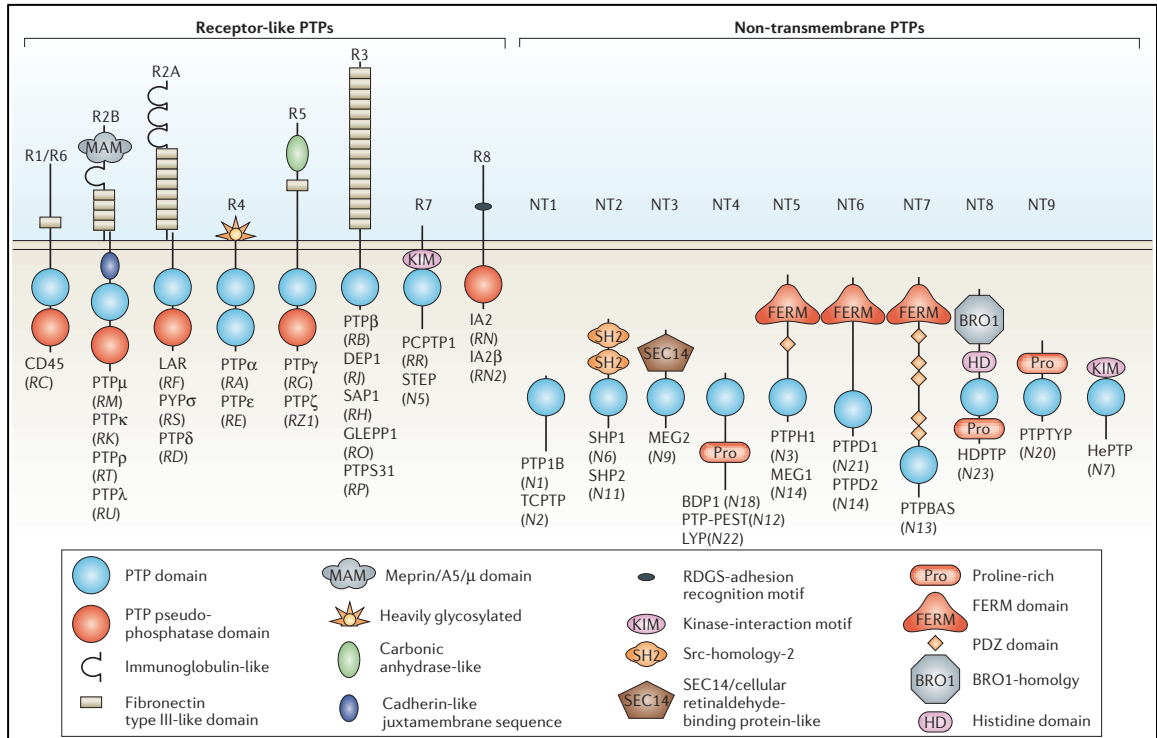


Figure 7 : Classification et distribution des protéines tyrosine phosphatases

Les PTP peuvent être classées en deux grandes catégories selon leur localisation cellulaire, soit transmembranaire ou cytosolique. Par la suite, chaque catégorie est subdivisée en classes selon les similarités structurales des différentes PTP. Figure adaptée de Tonks et al. ²⁷³

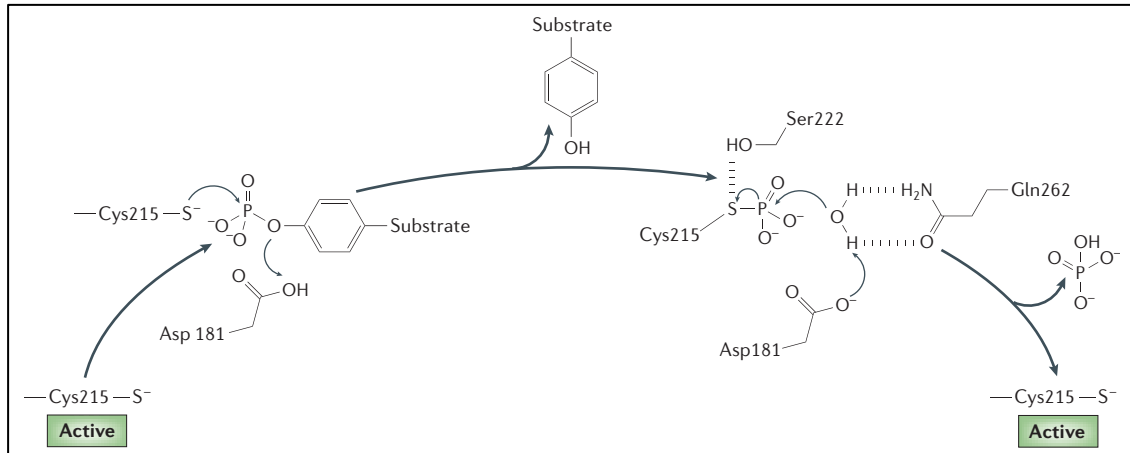


Figure 8 : Réaction enzymatique de déphosphorylation médiée par les PTP

La réaction de déphosphorylation des PTP est hautement conservée et implique une cystéine présente dans le domaine catalytique. Dans un premier temps, une attaque nucléophile sur le phosphate est initiée par la cystéine. Cette attaque est couplée à une protonation du groupement tyrosyl du substrat par un acide aspartique de la phosphatase. La deuxième étape permet l'hydrolyse de l'intermédiaire cytényl-phosphate. Essentiellement, un résidu acide glutamique permet la coordination d'une molécule d'eau. Dans ce contexte, l'acide aspartique agit comme une base et déclenche une réaction chimique résultant en la libération du groupement phosphate et le retour aux conditions initiales pour la phosphatase. Figure adaptée de Tonks et al.²⁷³

4.1 Régulation de l'activité des PTP

Vu l'importance des PTP dans les processus signalétiques, les mécanismes permettant leur régulation sont nombreux et complexes. En plus, bien que la plupart des PTP présente une faible spécificité *in vitro*, ces enzymes peuvent être hautement spécifiques *in vivo* grâce aux mécanismes les régulant.²⁷⁷ D'abord, les niveaux d'expression de certaines PTP sont hautement variables en fonction du contexte cellulaire et permettent de déterminer le niveau d'activité de la phosphatase. Par exemple, l'expression de la phosphatase DEP-1 est fortement augmentée avec la densité cellulaire tandis que son expression dans des cellules isolées est minimale.²⁷⁸ En plus, certaines phosphatases sont exprimées exclusivement dans un tissu ou un type cellulaire ce qui détermine la spécificité de leur activité. Notamment, la VE-PTP n'est exprimée que par les cellules endothéliales.²⁷⁹ La localisation cellulaire des PTP est un autre mécanisme de régulation puisque l'emplacement de la PTP détermine ses interactions

potentielles avec ses substrats. Notamment, suite à une stimulation au VEGF, la VE-PTP est relocalisée et son association au VEGFR2 est perdue. De cette façon, le VEGFR2 n'est plus déphosphorylé et peut médier sa signalisation en aval.²⁸⁰ Inversement, la phosphatase SHP-2, quant à elle, est recrutée au complexe contenant le VEGFR2 suite à une stimulation au VEGF et permet la déphosphorylation de ce récepteur.²⁸¹

Les PTP peuvent subir de l'épissage alternatif ce qui résulte en la génération de différentes isoformes de PTP.²⁸² Notamment, pour la RPTP LAR, l'épissage alternatif génère des variants dans le domaine extra-cellulaire qui pourrait modifier son interaction avec ses ligands et un des variants serait même une forme sécrétée du domaine extracellulaire.^{283,284} La protéolyse limitée des PTP est surtout observée chez les PTP non-membranaires et consiste en le clivage d'une partie de la protéine, généralement inactive, puis la libération d'un fragment catalytiquement actif.²⁸² Par exemple, la PTP-PEST est clivée par la caspase-3 ce qui augmente son activité catalytique et contribue à l'induction de l'apoptose par la caspase-3.²⁸⁵

Dans le cas des RPTP, leur dimérisation régule leur activité catalytique. Effectivement, il est rapporté que les RPTP dimérisent par l'association de leur domaine catalytique D1 ce qui cause un encombrement stérique important limitant ainsi les interactions possibles entre les RPTP et leurs substrats.^{286,287} Plus récemment, un second mécanisme impliquant plutôt une interaction entre le D1 d'une RPTP et le D2 de la seconde RPTP a été proposé.²⁸⁸ De plus, dans le cas de PTP α du moins, les domaines extracellulaires et transmembranaires contribueraient également à la formation de dimères.²⁸⁹ La présence d'un domaine extracellulaire des RPTP permet l'interaction avec des ligands qui peuvent provenir de la matrice extracellulaire, de cellules avoisinantes ou des cytokines solubles présentes dans le microenvironnement. Un exemple bien caractérisé est la liaison de la pléiotrophine à la PTP ζ . Leur liaison est connue pour inhiber l'activité phosphatase et permettre la signalisation normalement contrée ou inhibée par cette RPTP probablement en causant sa dimérisation.²⁹⁰ À l'inverse, l'association de PTP α à son ligand promeut plutôt la dissociation du dimère et favorise donc l'activation de cette RPTP.²⁷³ Par conséquent, bien que la dimérisation soit généralement inhibitrice, l'effet de l'association ligand/RPTP est variable.

L'activité d'une phosphatase peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles. L'oxydation des RPTP cause des changements conformationnels importants ayant été démontrés comme stabilisant la dimérisation et l'inactivité de ces phosphatases.²⁹¹ En effet, la cystéine du domaine catalytique des PTP peut être oxydée de façon réversible en situation de stress oxydatif, ce qui bloque la capacité de cette dernière à interagir avec les groupements phosphate de ses substrats.^{292,293} Certaines phosphatases sont même oxydées suite à une stimulation des cellules par des signaux extra-cellulaires permettant ainsi l'activation des voies signalétiques autrement inhibées par la phosphatase. Par exemple, la phosphatase PTP1B est oxydée en réponse à l'insuline et à l'EGF.^{294,295,296} La phosphorylation des PTP est un autre niveau de régulation présent. Effectivement, ces phosphorylations peuvent induire une dissociation de la PTP et de son substrat, tel que démontré par la dissociation de la β -caténine et SHP-2 suite à sa phosphorylation en réponse à la thrombine.²⁹⁷ Par contre, la phosphorylation d'une PTP peut également favoriser le recrutement de son substrat. Par exemple, la phosphorylation de la PTP α en Y789 permet son association avec la kinase Src et l'activation de cette dernière, bien que ce mécanisme soit principalement observé durant la mitose.^{221,298} En somme, tous ces mécanismes permettent la régulation de l'activité phosphatase, mais il n'existe pas de règle générale quant à la conséquence de l'un de ces mécanismes sur l'activation des PTP.

5. Exemples de PTP régulant la signalisation

5.1 Régulation de l'angiogenèse par les PTP

Les PTP sont impliquées dans tous les processus biologiques et agissent de pair avec les kinases pour la médiation efficace de la signalisation. Plusieurs phosphatases ont été récemment étudiées pour leur fonction dans les cellules endothéliales et leur impact sur l'angiogenèse. Ainsi, des PTP favorisant et réprimant l'angiogenèse, dont certains exemples sont détaillés ci-dessous, ont été identifiées et leurs études ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus angiogénique.

5.1.1 VE-PTP

Un exemple de phosphatase impliquée dans le processus angiogénique est la Vascular-Endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP ou PTPRB). Il s'agit d'une PTP de type récepteur dont l'expression est limitée aux cellules endothéliales.²⁷⁹ Elle s'associe et déphosphoryle le récepteur de l'angiopoïétine (Tie-2), la VE-Cadherine et le VEGFR2, composants essentiels du développement vasculaire.^{279,299,280} VE-PTP permet, en collaboration avec les intégrines, l'activation de Src, l'étalement des cellules et la migration en réponse au VEGF.³⁰⁰ La stimulation par le VEGF mène à la dissociation de VE-PTP et du VEGFR2 ce qui permet une signalisation dépendante du VEGFR2 adéquate.²⁸⁰ Des souris VE-PTP^{-/-} ou des souris exprimant une forme mutante de VE-PTP, où seulement le domaine extracellulaire est exprimé et sécrété, présentent une vasculogenèse normale caractérisée par la formation d'un plexus vasculaire primitif. Par contre, le remodelage et l'expansion de ce plexus sont considérablement déficients chez les souris délétées en VE-PTP, suggérant plutôt un défaut de la réponse angiogénique. Ces animaux présentent également des malformations cardiaques.^{301,302} De plus, l'inhibition de la VE-PTP par un inhibiteur chimique, le AKB-9778, limite l'angiogenèse développementale du poisson zébré et l'angiogenèse tumorale chez la souris, ce qui serait dû à une stabilisation accrue du réseau vasculaire résultant de l'activation du récepteur Tie-2, un récepteur important pour le remodelage et le maintien de l'intégrité vasculaire.^{303,304} Par contre, ce composé n'est pas spécifique à la VE-PTP et inhibe d'autres phosphatases ce qui limite l'interprétation des résultats. De façon intéressante, une mutation récurrente de VE-PTP est rapportée comme contribuant la formation des angiosarcomes.³⁰⁵ Ainsi, VE-PTP est une phosphatase aux effets pro-angiogéniques.

5.1.2 SHP-2

SHP-2 est une phosphatase de type cytosolique qui est recrutée au complexe formé par le VEGFR2 et la VE-Cadherine, une composante des complexes des jonctions adhérentes, en réponse au VEGF. Dans ce complexe, SHP-2 semble déphosphoryler le VEGFR2 et limiter sa signalisation.²⁸¹ De plus, son activité phosphatase cible également la Y685 de la VE-

Cadherine.³⁰⁶ Il s'agit d'un site de liaison important pour Csk, une kinase permettant la phosphorylation inhibitrice de Src en Y529.³⁰⁷ Ainsi, le recrutement de SHP-2 permet une activation indirecte de Src en réduisant sa répression par Csk. Conséquemment, l'inhibition de SHP-2 réprime la réponse angiogénique in vitro et in vivo.³⁰⁸

5.1.3 PTP1B

L'expression de PTP1B au niveau des cellules endothéliales provoque la déphosphorylation du VEGFR2 et une activation limitée des protéines ERK1/2 en réponse au VEGF.³⁰⁹ La déplétion de PTP1B résulte en une augmentation de la prolifération et de la perméabilité vasculaire. Par contre, la migration induite par le VEGF n'est pas affectée.³⁰⁹ Toutefois, in vivo, la délétion de PTP1B spécifiquement dans les cellules endothéliales se traduit en une augmentation de l'activation des ERK1/2, l'artériogénèse, la vascularisation de la rétine, la réparation de blessure et la formation de capillaires sanguins dans un implant de matrigel de façon dépendante du VEGF suggérant une augmentation de la réponse angiogénique.³¹⁰ Bien que PTP1B ait été démontré comme étant un activateur de Src dans d'autres modèles, son rôle endothélial sur l'activation de Src reste méconnu. Ainsi, il semble être un répresseur de la réponse angiogénique in vivo principalement via son effet anti-prolifératif.

5.2 Régulation des cellules tumorales par les PTP

Les PTP jouent un rôle intrigant au niveau des cellules cancéreuses. Effectivement, bien qu'elles soient plutôt associées à la terminaison de la signalisation ou la quiescence cellulaire, il a été rapporté que certaines PTP, dont PTP α , ont des rôles oncogéniques tandis que d'autres, telle PTPRO, présentent davantage des activités de suppresseur de tumeur. Évidemment, vu la diversité de leurs substrats, quelques phosphatases ont un effet mixte ou dépendant du contexte cellulaire. Afin d'illustrer ces propos, quelques exemples sont détaillés dans la section ci-dessous.

5.2.1 PTP α

L'association de PTP α avec Src permet son activation par un mécanisme de phosphodéplacement permettant la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice 529.²²¹ Ce mécanisme d'activation de Src est observé principalement durant la mitose.²⁹⁸ Par conséquent, l'inhibition de PTP α dans le cancer du sein et du côlon résulte en une diminution de 2 à 4 fois de l'activité de Src. Cette inhibition se traduit par une augmentation de l'apoptose pour les cellules du cancer du côlon et les cellules tumorales mammaires n'exprimant pas le récepteur à l'œstrogène (ER).³¹¹ Par contre, l'induction de l'apoptose n'est pas observable chez les cellules exprimant le ER.³¹¹ L'expression de PTP α promeut l'initiation et le maintien de tumeurs mammaires ainsi que la motilité dépendants de HER2.^{312,313} Également, en réponse à l'EGF, PTP α promeut l'activation de Src et la formation de colonies dépendante de Src.³¹⁴ Collectivement, ces données suggèrent un rôle promoteur de tumeur pour la phosphatase PTP α via l'activation de Src.

5.2.2 PTP ϵ

PTP ϵ est une phosphatase de type récepteur fortement exprimée par les cellules endothéliales. Sa surexpression est associée à une diminution importante de leur prolifération, mais l'importance de PTP ϵ sur l'angiogenèse n'est pas démontrée.³¹⁵ Par contre, le rôle de PTP ϵ dans le cancer, et particulièrement dans le cancer du sein, a été exploré. Chez la souris, la surexpression de PTP ϵ résulte en une hyperplasie des glandes mammaires ainsi qu'un risque accru de développer un cancer sporadique.³¹⁶ De plus, PTP ϵ supporte la transformation des cellules mammaires par l'oncogène Neu en permettant l'activation de Src en aval.^{317,318} PTP ϵ stimule la survie des cellules tumorales mammaires via l'activation des voies de signalisation d'Akt et de ERK en réponse à divers stimuli.³¹⁹ De façon intéressante, l'expression de PTP ϵ est augmentée dans les carcinomes mammaires invasifs comparativement au tissu normal, suggérant un rôle oncogénique de la phosphatase.³²⁰ Par contre, l'expression de PTP ϵ dans des cellules n'exprimant pas ou faiblement Neu cause plutôt une baisse de la phosphorylation des ERK1/2 dû à la déphosphorylation de la protéine Shc par la phosphatase.^{321,322} Ainsi, PTP ϵ

présente à la fois des fonctions oncogéniques et suppresseur de tumeur dépendant du contexte cellulaire dans lequel elle se trouve.

5.2.3 PTPRO

PTPRO (ou GLEPP1) est une phosphatase de type récepteur R3. Les souris PTPRO^{-/-} présentent une inhibition de l'autophagie et un risque augmenté de développer un hépatocarcinome.³²³ Parallèlement, chez l'humain, PTPRO a été identifié comme un gène suppresseur de tumeur dans les cas d'hépatocarcinomes et de cancers du poumon, où son expression est généralement diminuée.^{324,325} L'expression endogène de PTPRO augmente la sensibilité des cellules du cancer du côlon aux traitements ciblant EGFR en inhibant l'activation de Src par la déphosphorylation directe de sa tyrosine activatrice (Y418) ce qui a été confirmée par surexpression et déplétion de la phosphatase.³²⁶ Un mécanisme important régulateur de l'expression de PTPRO est la méthylation de son promoteur, ce qui diminue son expression. En effet, la méthylation du promoteur de PTPRO est retrouvée dans des cas de cancer du sein, du foie et de l'œsophage.^{327,328,329,330} En plus, son expression diminuée est associée à un mauvais pronostic et a même été suggérée comme marqueur pronostique dans les cas de cancer du sein exprimant HER2.^{328,327,331} Par ailleurs, l'expression de PTPRO dans le stroma limite la croissance tumorale et la formation de métastases expérimentales, notamment en réduisant la densité vasculaire tumorale suggérant un rôle de PTPRO à la fois dans les cellules cancéreuses et dans le microenvironnement.³³² Collectivement, ces données confirment un rôle suppresseur de tumeur pour PTPRO.

5.2.3 SHP-2

SHP-2 est une phosphatase cytosolique qui en plus de son implication dans l'angiogenèse, tel que mentionné précédemment, présente des fonctions oncogéniques. Effectivement, l'expression de SHP-2 est fréquemment augmentée dans une panoplie de lignées cellulaires et de tumeurs mammaires ductales invasives comparées au tissu sain correspondant.^{333,334} Chez ces patientes, une expression élevée de SHP-2 est même associée à un taux de rechute plus élevé.³³⁵ Dans ces cellules, SHP-2 régule la formation de colonie, les

capacités invasives, la progression tumorale et le maintien des cellules initiatrices de tumeurs.^{333,336,335} D'un point de vue moléculaire, SHP-2 permet la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice des kinases de la famille de Src, des régulateurs cruciaux de l'invasion cellulaire.³³⁵ En plus, SHP-2 est essentiel à la signalisation de nombreux récepteurs pro-tumoraux, incluant RET, EGFR et ERB2, et induit la prolifération et la survie des cellules cancéreuses via l'activation notamment des ERK, d'Akt et de STAT5.³³⁷ Des formes mutées de SHP-2 de type gain-de-fonction ont été rapportées dans plusieurs types de leucémies (leucémie myéloïde aigue, leucémie juvénile myélomonocitique, le syndrome de Noonan), ainsi que plusieurs tumeurs solides incluant les cancers de l'estomac, du poumons et du sein en plus de cas de neuroblastomes et de mélanomes.^{337,338} SHP-2 a été la première PTP à être considéré comme un oncogène dans la littérature.

6. La protéine tyrosine phosphatase DEP-1

DEP-1 (ou CD148 ou PTPRJ) est une PTP de type récepteur appartenant à la sous-famille R3. Elle possède un grand domaine extracellulaire composé de huit répétitions de type fibronectine-like III, un segment transmembranaire et une partie intracellulaire comprenant son domaine catalytique phosphatase et une petite queue C-terminale. Elle est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, épithéliales et hématopoïétiques. DEP-1 a d'abord été identifiée en 1994 par l'équipe de Nicolas Tonks.²⁷⁸ La caractérisation de son expression endogène a permis de déterminer que son expression augmente avec la confluence des cellules et il a été suggéré que DEP-1 contribuait à l'inhibition de contact, un arrêt de prolifération observé lorsque les cellules atteignent la confluence. Une seconde équipe l'a découverte en 1994 à partir de cellules de leucémie F-36P et ils l'ont nommée HPTP η . DEP-1 a été particulièrement étudié dans trois contextes : le réseau vasculaire, le système immunitaire et le cancer.

6.1 Rôle de DEP-1 dans l'angiogenèse

L'un des systèmes où DEP-1 fût le plus étudié est l'angiogenèse. Le rôle de DEP-1 dans le réseau vasculaire a été mis de l'avant suite à une étude publiée en 2003 où un modèle murin «knock-in» de DEP-1 a été généré. Ce mutant, où la partie intracellulaire de DEP-1 a été remplacée par eGFP, a résulté en une létalité embryonnaire.³³⁹ Les embryons mutants étaient caractérisés par une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, mais également une désorganisation du réseau vasculaire ce qui indique un rôle important de DEP-1 lors du développement vasculaire.³³⁹ Ces résultats furent supportés par une autre étude chez le poisson zébré, où l'inhibition de l'expression de DEP-1 par un morpholino cause un défaut de circulation dû à l'absence de formation de lumière des vaisseaux sanguins et une diminution des marqueurs de différenciation artérielle, deux phénomènes dépendant du VEGF.³⁴⁰

6.1.1 DEP-1 et le VEGFR2

Parallèlement à ces travaux, Lampugnani et collègues ont identifié DEP-1 comme une composante des jonctions cellulaires au niveau des cellules endothéliales.⁹⁴ Les jonctions cellulaires sont augmentées avec la confluence des cellules, tout comme l'expression de DEP-1, et sont des régulateurs importants de la signalisation.^{341,278} Les cadherines sont une composante importante des jonctions. Les cellules confluentes sont moins sensibles aux facteurs de croissance que les cellules éparses, suggérant que l'établissement de ces liens cellule-cellule régule leur croissance.^{342,343} L'inhibition de contact cause l'inhibition des ERK1/2 et nécessite l'expression des VE-Cadherines chez les cellules endothéliales.^{342,94} En plus, les localisations cellulaires de DEP-1 et de la VE-Cadherine sont hautement similaires suggérant une colocalisation.³⁴⁴ Lampugnani et collègues ont rapporté que les VE-Cadherines forment des complexes comprenant le VEGFR2, la p120Catenine, la β -caténine et DEP-1 à confluence (Figure 9).^{94,345,346} Dans ce contexte, l'expression de DEP-1 réduit la phosphorylation du VEGFR2 et de ERK1/2 supportant son implication dans l'inhibition de contact endothelial.⁹⁴ Cette observation laissait présager un rôle plutôt inhibiteur de DEP-1 dans le réseau vasculaire. De façon intéressante, une étude a rapporté que la β -caténine et la p120catenine sont des substrats de DEP-1 à partir d'une chromatographie d'affinité.^{347,346} Ces

données supportent donc la présence de DEP-1 au sein de ce complexe protéique. Sachant que le VEGFR2 forme un complexe avec les VE-Cadherines dans les cellules confluentes, ces études suggèrent donc que DEP-1 permettrait la régulation de la signalisation du VEGFR2 et, conséquemment, serait un régulateur de l'angiogénèse.

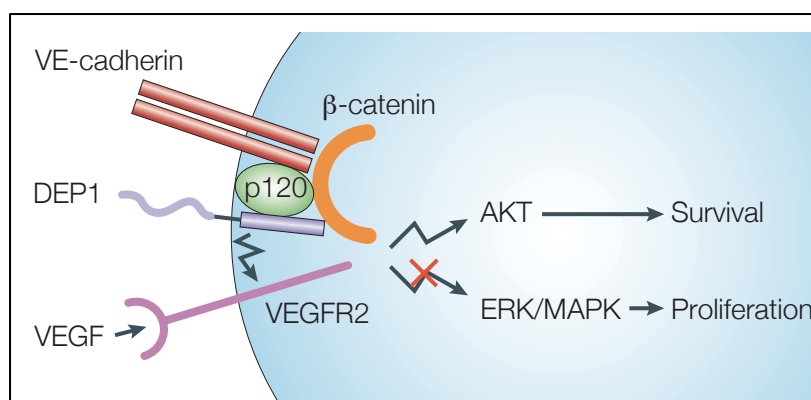


Figure 9 : Le VEGFR2 et DEP-1 sont localisés au niveau des jonctions adhérentes

Au niveau des cellules confluentes ou faisant partie d'un vaisseau sanguin mature, le VEGFR2 se retrouve principalement au niveau des jonctions adhérentes entre cellules endothéliales. Ainsi, il forme un complexe avec les VE-Cadherine, molécules d'adhésion des jonctions adhérentes, la β-caténine, la p120-caténine et la protéine tyrosine phosphatase DEP-1. De cette façon, l'activation du VEGFR2 est modulée par la présence de DEP-1 dans ce complexe. Figure adaptée de Dejana et al.⁹³

Depuis, une étude réalisée par notre équipe a démontré que DEP-1 s'associe directement au VEGFR2 et semble le déphosphoryler préférentiellement sur les Y1054 et Y1059.⁹⁵ Ces résidus se retrouvent dans la boucle d'auto-activation du récepteur. Conséquemment, la déphosphorylation de ces résidus par DEP-1 se traduit par une baisse de la phosphorylation générale du VEGFR2 sur les sites majeurs d'autophosphorylation incluant les tyrosines 801, 951, 996, 1175 et 1214.⁹⁵ Cette spécificité de DEP-1 envers le VEGFR2 est supportée par des études décrivant l'interaction entre DEP-1 et d'autres récepteurs aux

facteurs de croissance. D'abord, le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) a été identifié comme un substrat de DEP-1 à partir de fibroblastes. Dans un système de surexpression inductible, où les niveaux étudiés dépassaient largement les niveaux d'expression endogènes, DEP-1 cause une baisse de la migration des cellules notamment due à une baisse de l'activation des ERK1/2, d'Akt et de Src.³⁴⁸ Ces effets seraient principalement attribuables à la déphosphorylation spécifique par DEP-1 des tyrosines 1009 et 1021 du PDGFR.^{349,350} Effectivement, la phosphorylation de ces sites est importante pour le recrutement et l'activation de PLC γ et, conséquemment, pour l'activation des ERK1/2 par le PDGFR.³⁵¹ Le récepteur du facteur de croissance hépatocytaire (MET ou HGFR) a également été identifié comme une cible de DEP-1 à partir d'une chromatographie d'affinité in vitro de lysats de cellules cancéreuses mammaires.³⁴⁷ De façon similaire au PDGFR, DEP-1 semble déphosphoryler préférentiellement les tyrosines en C-terminal de MET soit les Y1349 et Y1365.³⁴⁷ La phosphorylation de la Y1349 est importante pour le recrutement de plusieurs médiateurs signalétiques incluant la protéine d'échaffaudage Gab1 et Src tandis que celle de la Y1365 est plutôt associée aux effets morphogéniques de l'activation de MET via des médiateurs inconnus à ce jour.³⁵² Un criblage des phosphatases ciblant le récepteur de l'insuline a permis d'identifier DEP-1 comme une phosphatase déphosphorylant ce récepteur.³⁵³ Cette association a été démontrée in vitro et in vivo à partir de cellules en culture ou de lysats de muscle squelettique et de tissu adipeux délétés en DEP-1. Dans ces conditions, le récepteur de l'insuline est déphosphorylé par DEP-1 sur plusieurs résidus tyrosines ce qui se traduit par une baisse de la signalisation dépendante d'Akt.^{354,355} DEP-1 ne semblait pas avoir de spécificité envers les différents sites.³⁵⁵ Néanmoins, une étude récente suggère plutôt que les tyrosines 960 et 1146 sont des cibles préférentielles de DEP-1 in vitro.³⁵⁶ La Y960 est importante pour l'activation de IRS-1 (insulin receptor substrate 1) qui, à son tour, permet notamment l'activation de la PI3K et de la voie Akt tandis que la Y1146 fait partie de la boucle d'activation du récepteur.³⁵⁷ Collectivement, ces études suggèrent que DEP-1 serait un régulateur important de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase et que son activité phosphatase serait spécifique à certains résidus tyrosine. Ainsi, DEP-1 serait un modulateur de certaines fonctions ou voies de signalisation plutôt qu'un atténuateur général de leur signalisation.

Dans cette optique, bien que nos travaux aient démontré que l'expression endogène de DEP-1 limitait la phosphorylation globale du VEGFR2, les voies de signalisation qui en découlent ne sont pas régulées de façon similaire. Dans ces conditions, l'activation de ERK1/2, PLC γ et eNOS est diminuée tandis que l'activité phosphatase de DEP-1 est tout de même associée à la promotion de l'activation de Src et d'Akt en réponse au VEGF.^{95,125} Ces résultats suggèrent donc une régulation différentielle de ces voies de signalisation par DEP-1. De ces médiateurs signalétiques importants, certains sont également retrouvés parmi les substrats rapportés de DEP-1. En effet, plusieurs études rapportent que l'augmentation de l'activité phosphatase de DEP-1 cause une inhibition des ERK1/2 tandis que l'inhibition de l'expression de DEP-1 par ARNi résulte plutôt en l'augmentation de leur activation.^{95,94,93,344,358,359} De plus, un traitement avec un anticorps bivalent ciblant le domaine extracellulaire de DEP-1 induit une augmentation de son activité catalytique et cause un arrêt de prolifération en G0/G1 combiné à une diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2.^{360,344} Des études récentes ont également démontré que cibler DEP-1 à partir de peptides agonistes permettait d'inhiber la prolifération, la phosphorylation des ERK1/2 et la formation de capillaires des cellules endothéliales *in vitro*.^{358,359} À partir de cellules très confluentes déplétées par ARNi, l'expression de DEP-1 a été également associée à la diminution de l'expression de uPAR, un récepteur dont l'expression dépend de l'activation des ERK1/2, ce qui renforce le lien entre DEP-1 et les ERK1/2.³⁶¹ Ces résultats pourraient s'expliquer notamment par la régulation de l'activation des récepteurs aux facteurs de croissance par DEP-1 et la baisse de leur signalisation. Néanmoins, une association directe entre DEP-1 et les ERK1/2 a été rapportée.³⁶² ERK1/2 pourrait se lier à DEP-1 via une séquence ressemblant à un domaine KIM dans la partie juxtamembranaire de la phosphatase.³⁶² Ainsi, DEP-1 semble déphosphoryler les ERK1/2 de façon dépendante de la dose. Cette inhibition des ERK1/2 supporte les effets anti-prolifératifs attribués à DEP-1.

Parallèlement à ce phénomène, DEP-1 interagit également avec les kinases de la famille de Src. Il a été démontré à partir de nombreux modèles que DEP-1 permet la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice de ces kinases et ainsi il serait un promoteur de

leur activation.^{95,113,226,363,364} Des études plus approfondies réalisées par notre équipe ont mis en lumière un mécanisme par lequel DEP-1 permet l'activation de Src dans les cellules endothéliales.¹¹³ À l'état basal, Src est phosphorylé en Y529 et adopte une conformation fermée et inactive qui est assurée par l'interaction intramoléculaire de cette tyrosine et de son domaine SH2. En réponse au VEGF, DEP-1 est phosphorylé sur deux résidus tyrosine (Y1311 et Y1320) ce qui permet le recrutement de Src via son domaine SH2. Cette liaison provoque un changement conformationnel permettant l'ouverture de la protéine et l'exposition de la tyrosine inhibitrice de Src (Y529). Ainsi, suite à leur liaison, DEP-1 peut, de par son activité catalytique, mener à la déphosphorylation de ce résidu. Par la suite, une autoactivation de Src (autophosphorylation sur Y418) mènera à sa forme pleinement active.¹²⁵ Ainsi, il a été démontré que DEP-1 permettait la promotion de l'activation de Src et de plusieurs fonctions biologiques qui en dépendent, telles la survie cellulaire, la perméabilité vasculaire, l'invasion et la formation de capillaires in vitro.^{95,113,365} Malgré les effets sur le réseau vasculaire rapportés pour la souris DEP-1 KI, la génération de modèles «knock-out» de DEP-1 s'est traduite par la production de souris viables, fertiles et n'ayant aucun phénotype apparent.^{366,367,368} Toutefois, une caractérisation plus approfondie de ces souris a révélé un rôle promoteur de DEP-1 au niveau de cellules hématopoïétiques tels les cellules T, les cellules B, les neutrophiles, les plaquettes, et les macrophages ainsi que les cellules musculaires lisses des voies respiratoires.^{364,368,369,363,226,370} Comme mécanisme, il a été suggéré que la délétion de DEP-1 mène à une diminution de l'activation des SFKs chez ces cellules.^{363,226,370,371} Ces études supportent donc le rôle de DEP-1 dans l'activation des SFKs in vivo. En plus, ces souris présentent également une diminution de leur capacité à dilater leurs vaisseaux sanguins cérébraux ce qui suggère un défaut de la réponse vasculaire suite à un stimulus.³⁶⁷

6.1.2 Les niveaux d'expression de DEP-1 : un élément clé régulant son activité

Une étude a démontré à partir de peptides phosphorylés que le domaine catalytique de DEP-1 est très peu spécifique in vitro. Dès lors, nos observations suggèrent que d'autres mécanismes régissent cette spécificité. Un élément clé rapporté par notre équipe quant au rôle de DEP-1 dans le réseau vasculaire découle de ses niveaux d'expression. Effectivement, plusieurs évidences supportent l'idée que les niveaux d'expression de DEP-1 régissent ses

effets et sa spécificité envers ses substrats (Figure 10). À ce propos, l'expression de concentrations croissantes de DEP-1 dans les cellules endothéliales a permis de mettre en évidence les effets bivalents de DEP-1 sur l'activation de Src.¹²⁵ Les niveaux physiologiques de DEP-1 permettent la déphosphorylation spécifique de la tyrosine inhibitrice de Src (Y529) ce qui résulte en une activation optimale de la kinase. Dans ces conditions, DEP-1 promeut la réponse angiogénique dépendante de Src en réponse au VEGF. Par contre, lorsque DEP-1 est déplété par ARNi, Src est hyperphosphorylée en Y529 et maintient une conformation fermée et peu active.¹⁸⁷ Une surexpression importante de DEP-1, quant à elle, résulte en la déphosphorylation de la Y529, mais également de la tyrosine activatrice de Src (Y418) ce qui se traduit également par une activité limitée de Src. Selon ce mécanisme, la présence de DEP-1 est cruciale à l'activation de Src, mais seulement des niveaux d'expression modérés permettent une activation optimale. En revanche, cet effet bivalent de DEP-1 ne semble pas s'appliquer à ses autres substrats dont les ERK1/2 pour lesquels la déphosphorylation par DEP-1 semble plutôt dépendant de la dose. Par ailleurs, physiologiquement, les niveaux de DEP-1 sont modulés en fonction du contexte cellulaire. En effet, l'expression de DEP-1 augmente avec la confluence et la maturation des vaisseaux sanguins.²⁷⁸ Dans ces conditions, DEP-1 est très actif et limite l'activation de Src, du VEGFR2 et des ERK1/2 afin de maintenir l'intégrité des vaisseaux. De façon intéressante, les niveaux d'expression de DEP-1 sont diminués dans les vaisseaux sanguins en remodelage.³⁷² Ainsi, cette baisse de DEP-1 serait permissive à la prolifération et la réponse angiogénique. Ce modèle souligne l'importance des mécanismes de régulation de DEP-1 quant à son activation et son expression.

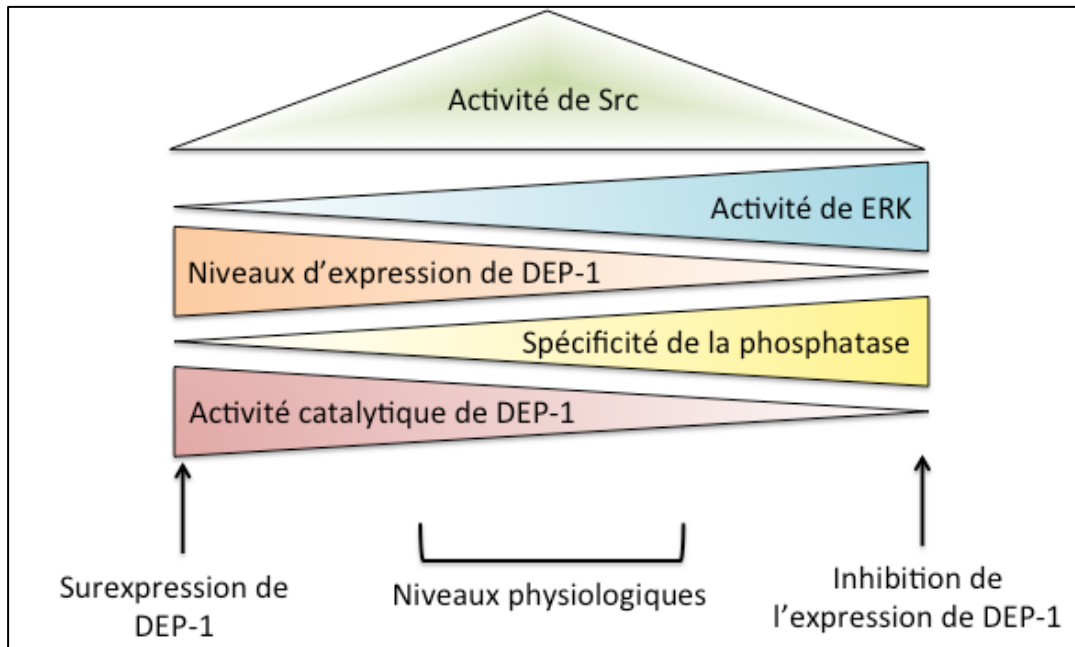


Figure 10 : Les niveaux d'expression de DEP-1 déterminent ses effets physiologiques

Les niveaux d'expression de DEP-1 sont cruciaux pour déterminer ses effets. Des niveaux modérés ou physiologiques permettent l'activation de la kinase Src par la déphosphorylation de sa tyrosine inhibitrice (Y529). L'inhibition de l'expression de DEP-1 cause une baisse de l'activation de SRC due à une hyperphosphorylation de la Y529 et un maintien de Src dans une conformation fermée et inactive. À l'inverse, une surexpression de DEP-1 assure une déphosphorylation adéquate de ce résidu. Toutefois, à niveau élevé, DEP-1 est catalytiquement plus actif et perd de sa spécificité. Dans ces conditions, il cause également la déphosphorylation de la tyrosine activatrice de Src (Y418) ce qui résulte en une inhibition globale de Src. La déphosphorylation des ERK1/2 par DEP-1 semble plutôt être dépendant de la concentration. Figure adaptée de Chabot et al. et Spring et al.^{95,125}

6.2 La régulation de DEP-1

La découverte de DEP-1 a permis d'élucider un régulateur important de son expression : la confluence cellulaire. En effet, DEP-1 est une protéine dont l'expression augmente avec la confluence et c'est même à l'origine de son nom soit Density-enhanced phosphatase 1 (DEP-1).²⁷⁸ Inversement, dans les vaisseaux en remodelage où les jonctions sont affaiblies, l'expression de DEP-1 est diminuée.³⁷² Depuis, il a été rapporté que l'expression de DEP-1 est réduite par le microARN-328, un miR impliqué dans la

prolifération et la migration de cellules dérivées de l'épithélium.^{373,374,375} Également, l'hypoxie réduit l'expression de DEP-1 dû à la présence d'éléments de réponse à l'hypoxie dans le promoteur du gène *PTPRJ* codant pour DEP-1.^{99,376}

Pour la majorité des RPTP, la dimérisation résulte en une inhibition de leur activité catalytique. Dans le cas de DEP-1, une augmentation de son activité catalytique suite à la liaison d'un anticorps bivalent, mais pas d'un anticorps monovalent, a été rapportée.³⁴⁴ Les auteurs suggèrent que leur anticorps bivalent induit la dimérisation de DEP-1 et que ceci se traduit par une activation de la phosphatase. Il a également été montré en solution que DEP-1 pouvait former des dimères via son domaine catalytique résultant ainsi en son inhibition, mais la pertinence biologique de ce dimère n'a pas été démontrée.³⁷⁷ DEP-1 appartient à la famille R3 des RPTP qui ne présente qu'un seul domaine catalytique. Dès lors, il se peut que la dimérisation de ceux-ci ait un effet différent de la plupart de RPTP. Néanmoins, la dimérisation de PTPRB, PRPTH et PTPRO, également membres de la famille R3, est associée à leur inhibition.^{378,290,379}

La liaison d'un ligand au domaine extracellulaire d'une RPTP cause des changements conformationnels. Pour DEP-1, deux ligands ont été identifiés soit la thrombospondine-1 (TSP-1) et le syndecan-2.^{380,381} L'interaction avec TSP-1 augmente l'activité catalytique de DEP-1 et inhibe la croissance cellulaire.³⁸⁰ La liaison de Syndecan-2, quant à elle, permet plutôt l'adhésion et l'étalement des cellules, mais résulte en l'inhibition de l'angiogenèse in vivo.^{381,382} De plus, la liaison du domaine extracellulaire de DEP-1 au Matrigel permet d'augmenter son activité catalytique.³⁸³

DEP-1 peut être phosphorylée sur différents résidus ce qui module ses interactions avec ses partenaires. En effet, la phosphorylation des tyrosines 1311 et 1320 de DEP-1 permet le recrutement de la kinase Src.¹²⁵ De plus, il a récemment été rapporté que la phosphorylation de la thréonine 1318 par la kinase CK2 favorise la phosphorylation en Y1320, l'association avec Src et conséquemment, la perméabilité vasculaire chez les cellules endothéliales.³⁶⁵

6.3 Rôle de DEP-1 dans le cancer

À priori, les phosphatases ont été considérées comme des inhibiteurs ou des répresseurs de la signalisation. La découverte de DEP-1 et son implication potentielle dans l'inhibition de contact a encouragé la recherche de ses rôles dans le cancer. À la lumière de nos observations réalisées chez les cellules endothéliales, il est crucial d'évaluer ces résultats en tenant compte notamment des niveaux d'expression de DEP-1 employés et du contexte cellulaire.

Dans des cas de leucémies myéloïdes aiguës, le récepteur FLT3 permet la transformation des cellules et a été identifié comme un substrat de DEP-1.³⁸⁴ Dans ces conditions, DEP-1 permet la déphosphorylation spécifique des résidus tyrosine 589, 591 et 842 de FLT3.³⁸⁴ Il a été suggéré que le processus de transformation de ces cellules par une forme mutante de FLT3 (FLT3-ITD) induit un stress oxydatif qui, lui, cause l'oxydation et l'inactivation partielle de DEP-1 favorisant ainsi l'activation du récepteur et de sa signalisation.³⁸⁵ Par contre, l'injection de cellules déplétées en DEP-1 par shRNA ne se traduit pas par une différence significative de survie, mais la réactivation de DEP-1 par réduction du stress oxydatif prolonge la vie des animaux.³⁸⁵ Ce mutant de FLT3 transforme les cellules par l'activation de la kinase Src qui interagit avec les Y589 et Y591, des cibles directes de DEP-1.³⁸⁶ Ainsi, l'inhibition partielle de DEP-1 pourrait promouvoir l'activation de Src simplement en augmentant la phosphorylation du récepteur. Néanmoins, il est également possible que, de façon analogue à nos observations avec le VEGFR2, l'activité catalytique de DEP-1 promeut l'activation de Src et que son inhibition partielle augmente sa spécificité envers la kinase Src. Une étude plus approfondie quant à l'activité de Src dans leur modèle expérimental est nécessaire afin de conclure quant au rôle de DEP-1.

Dans les cellules mammaires, leur différenciation augmente l'expression de DEP-1 et résulte en l'inhibition de leur croissance de façon analogue aux vaisseaux sanguins matures.³⁸⁷ La formation de jonctions serrées est également impliquée dans la différenciation et la stabilisation de ces cellules. De façon intéressante, l'occludin et ZO-1, deux composantes importantes des jonctions serrées essentielles au maintien de l'intégrité tissulaire, ont été identifiées comme substrats de DEP-1.³⁸⁸ La phosphorylation en tyrosine de l'occludin est associée au désassemblage des jonctions serrées et à la perte d'intégrité de l'épithélium, une étape importante de la tumorigenèse dans le cancer du sein.³⁸⁹ En plus, la surexpression de DEP-1 au niveau des cellules cancéreuses mammaires semble résulter en l'inhibition de la prolifération.³⁸⁷ Ainsi, l'expression de niveaux élevés de DEP-1 pourrait être associée au maintien de l'intégrité et à la stabilisation de l'épithélium. Il a même été suggéré que l'expression de niveau faible de DEP-1 soit associée à un mauvais pronostic de survie à partir d'une cohorte de patientes.³⁹⁰ Toutefois, cette observation ne semble pas généralisable puisqu'une seconde cohorte ne présente aucune différence de survie entre les patientes exprimant différents niveaux de DEP-1.³⁹⁰ Un criblage d'ARNi contre une grande variété de phosphatases a permis d'identifier DEP-1 comme un régulateur du récepteur du facteur de croissance épithélial.^{391,391,392} Dans cette étude, DEP-1 permet directement la déphosphorylation du EGFR et par le fait même, limite l'internalisation et la dégradation du récepteur activé dans des cellules humaines. Ces effets ont été validés à partir d'études de déplétion par ARNi et de surexpression. En plus, l'interaction entre DEP-1 et l'EGFR a également été retrouvée chez *C. Elegans* ce qui renforce le rôle de DEP-1 dans la régulation de la signalisation dépendante de l'EGFR.³⁹³ Toutefois, l'importance de DEP-1 dans la modulation des voies de signalisation qui en découlent reste à être validée.

Plusieurs études utilisant différents modèles ont proposé que l'expression très abondante de DEP-1 inhibe la signalisation en général possiblement due à une perte de spécificité de la phosphatase. En effet, la croissance *in vitro* et *in vivo* de cellules tumorales pancréatiques est réduite lorsque ces cellules surexpriment DEP-1.³⁹⁴ De plus, il est rapporté que l'expression de DEP-1 supprime le phénotype transformé de cellules du cancer de la thyroïde par la stabilisation de p27 et que son expression dans les cellules de la thyroïde limite

la transformation oncogénique par une forme mutée de RET.^{395,396} Inversement, une baisse de l'expression de DEP-1 dans des cas de cancer cervicaux a été observée et cause une augmentation de la survie, la croissance et la migration de ces cellules.³⁹⁷ Certaines études plus complètes ont été réalisées où les effets de la surexpression et de l'inhibition de DEP-1 ont été évalués. Ainsi, l'expression de DEP-1 inhibe les capacités invasives et migratoires de cellules de ménangiomes et de cancer du côlon, mais leur prolifération n'est réduite que pour les cellules intestinales.^{398,399}

Au niveau génétique, il a été rapporté que les patients atteints du cancer de la thyroïde, du côlon, du pancréas et du sein présentent plus fréquemment une perte d'hétérozygotie pour le gène codant DEP-1, ce qui suggère un rôle de gène suppresseur de tumeurs dans ces pathologies.^{400,401,402,394} En plus, certains polymorphismes de DEP-1 (SNP) retrouvés dans le domaine extracellulaire influencent la susceptibilité à plusieurs cancers incluant ceux du colon, du poumon et de la tête et du cou.⁴⁰³ Dans le cancer du côlon, sept polymorphismes ont été rapportés dont cinq qui résultent en une substitution d'acides aminés.⁴⁰¹ Il a été prédit que ces mutations causeraient la perte d'une charge positive, un stress de torsion ou la perte d'un site de liaison potentielle avec d'autres protéines.^{400,403} Le gène codant pour DEP-1 (*PTPRJ*) a même été suggéré comme faisant partie du locus de susceptibilité au cancer du côlon murin.⁴⁰¹ Toutefois, la délétion complète de DEP-1 chez la souris n'augmente pas le risque de développer une tumeur spontanée.³⁶⁶ Certaines évidences suggèrent également un rôle potentiellement positif de certaines mutations de DEP-1 dans la tumorigenèse. Effectivement, une mutation de DEP-1 (K1017N) est enrichie dans des tumeurs primaires et au niveau de métastases au cerveau (Figure 11).⁴⁰⁴ Cette mutation se trouve dans la région juxta-membranaire de DEP-1 nécessaire à l'association avec les protéines ERK1/2 suggérant ainsi que cette mutation pourrait permettre d'éliminer les effets anti-prolifératif de DEP-1 et que, dans ce cas, l'expression de DEP-1 conférerait un avantage à ces cellules.³⁶²

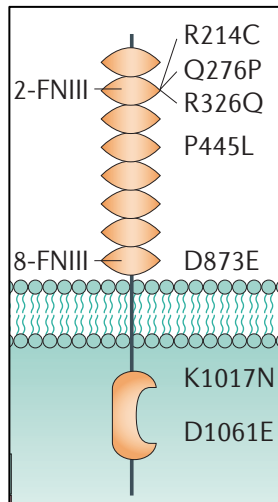


Figure 11 : Structure de DEP-1 et les principales mutations retrouvées dans le cancer

DEP-1 présente une partie extracellulaire composée de huit répétitions de type fibronectine-III, un segment transmembranaire et une partie intracellulaire comprenant son domaine catalytique et une queue C-terminale. Sept polymorphismes ont été identifiés dans le cancer du côlon dont cinq se traduiraient par une substitution d'acides aminés. La mutation K1017N a été identifiée dans des métastases au cerveau de tumeurs du sein. Figure tirée de Julien *et al.* ⁴⁰⁵

Collectivement, les travaux réalisés sur les cellules tumorales ont suggéré que les niveaux d'expression de DEP-1 étaient très variables entre les modèles employés compliquant ainsi l'interprétation des résultats. Le contexte cellulaire peut également influencer les niveaux d'expression de DEP-1 tolérés par les cellules tumorales. En plus, à partir nos travaux dans les cellules endothéliales, les effets positifs de DEP-1 semblent découler de sa capacité à activer les kinases de la famille de Src. Par conséquent, l'importance des SFKs dans un modèle tumoral serait un facteur déterminant quant au rôle de DEP-1 dans ce modèle.

7. Objectifs de recherche

Les études actuelles suggèrent un rôle de DEP-1 dans la régulation des SFKs, de l'angiogenèse et des cellules tumorales d'où son intérêt particulier. Bien que plusieurs démonstrations *in vitro* aient été réalisées, le rôle *in vivo* de DEP-1 dans ces différentes fonctions reste méconnu. Ainsi, l'objectif de recherche général de cette thèse est *de déterminer l'implication de DEP-1 dans l'activation des SFKs et particulièrement de Src in vivo dans l'angiogenèse et le cancer.*

Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont précédemment révélé que DEP-1 permettait l'activation de la kinase Src *in vitro* via leur association et la déphosphorylation de la Y529 de Src, et que DEP est impliquée dans la réponse angiogénique induite par le VEGF.^{95,113} Ainsi, DEP-1 est un promoteur de la survie cellulaire, de la perméabilité vasculaire, de l'invasion et de la formation de capillaires *in vitro*. Ces études ont démontré que les niveaux d'expression de DEP-1 définissent ses effets. Toutefois, la pertinence *in vivo* de ce mécanisme n'a pas été évalué. Le premier objectif de cette recherche était *de déterminer le rôle de DEP-1 dans l'angiogenèse et plus particulièrement dans le remodelage des liens cellule-cellule, la perméabilité vasculaire et la formation de capillaires; tous des phénomènes dépendant de l'activation de Src à partir de modèles d'angiogenèse post-natal, de réparation et tumorale chez la souris Dep-1 KO.* Cet objectif est présenté au chapitre II et avait pour buts : 1) de déterminer le rôle de DEP-1 sur l'activation de Src en réponse au VEGF *in vivo* chez la souris adulte. 2) d'évaluer l'impact de la perte de DEP-1 sur la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse post-natale *in vivo*. 3) d'évaluer le rôle de DEP-1 dans la vascularisation et la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases. Ces travaux ont permis de confirmer le rôle crucial de DEP-1 en tant qu'activateur de Src *in vivo*, et de démontrer son rôle de promoteur essentiel de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire des vaisseaux sanguins. Ainsi, en absence de DEP-1 au niveau du stroma, la croissance tumorale et la formation de métastases sont considérablement inhibées dû à une mauvaise vascularisation tumorale et une augmentation de l'étanchéité des vaisseaux sanguins.

Les résultats présentés au chapitre II ont mis de l'avant le rôle de DEP-1 dans l'angiogenèse in vivo en démontrant que la souris *Dep-1* KO présente une faible réponse angiogénique et perméabilité vasculaire, vraisemblablement due à une faible activation de Src. Un résultat important est que la formation de capillaires dans des essais d'anneaux aortiques, de boules de Matrigel ou de croissance tumorale est considérablement réduite chez la souris *Dep-1* KO. Par contre, il est impossible de déterminer à quelle étape de la formation d'un capillaire DEP-1 est impliquée. Afin de répondre à cette question, le second objectif de recherche était d'évaluer le rôle de DEP-1 dans le bourgeonnement endothélial, soit l'initiation d'un capillaire, à partir d'un modèle développemental de vascularisation de la rétine chez la souris *Dep-1* KO. Cet objectif est présenté au chapitre III et a pour buts : 1) d'évaluer le rôle de DEP-1 dans le bourgeonnement endothélial in vitro à partir d'un modèle de culture 3D de sphéroïdes, 2) d'évaluer les conséquences biologiques de la perte d'expression de DEP-1 sur la vascularisation de la rétine chez la souris, 3) de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels DEP-1 peut médier ces effets. Cette étude a permis d'identifier DEP-1 comme un régulateur du bourgeonnement et de la prolifération des cellules endothéliales durant la vascularisation de la rétine. DEP-1 inhibe la prolifération des cellules de la tige, probablement par la déphosphorylation directe des protéines ERK1/2. Les résultats suggèrent également que DEP-1 est un promoteur de la stabilité de la β -caténine en permettant l'inactivation de la GSK3 β par la voie Src-PI3K-Akt en réponse au VEGF. Dans ces conditions, la β -caténine permettrait l'expression du Dll4, une protéine impliquée dans la voie de signalisation Notch et régulant le bourgeonnement des cellules endothéliales. Donc, ces travaux montrent, pour la première fois, que DEP-1 est un régulateur de Src durant l'angiogenèse développementale et qu'il permet la régulation de la voie de signalisation Notch. De cette façon, DEP-1 permet d'atténuer le bourgeonnement endothélial non contrôlé et d'assurer une vascularisation adéquate de la rétine.

En plus d'être une pierre angulaire de l'angiogenèse, Src est également un oncogène important permettant notamment l'invasion des cellules cancéreuses mammaires. Compte tenu de l'importance de DEP-1 dans l'activation de Src au niveau des cellules endothéliales et dans la promotion de leur caractère invasif et qu'il est exprimé par plusieurs tumeurs, le troisième

objectif de cette thèse était donc de *déterminer le rôle de DEP-1 dans l'activation de Src et l'invasivité des cellules du cancer du sein elles-mêmes dépendantes de Src lors de ce processus*. Les résultats de cet objectif sont présentés au chapitre IV qui avait pour buts : 1) de déterminer si l'activation de Src était promue par l'expression de DEP-1 chez les cellules tumorales mammaires; 2) d'évaluer le rôle de DEP-1 sur l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires in vitro et in vivo. Bien que certaines études suggèrent un rôle suppresseur de tumeur, nos résultats démontrent que son expression corrèle avec l'agressivité des lignées cellulaires et suggère plutôt un rôle oncogénique. Chez ces cellules, DEP-1 permet l'activation de Src et d'une voie de signalisation invasive impliquant la Cortactine. Ainsi, l'invasion in vitro, in vivo chez la souris et dans une cohorte de patientes dépend de l'expression de DEP-1. Néanmoins, des niveaux d'expression élevés de DEP-1 causent l'inhibition de ces voies de signalisation tout comme l'inhibition de son expression, renforçant l'idée que DEP-1 présente un effet bivalent sur ces voies de signalisation.

Collectivement, ces résultats démontrent donc un rôle promoteur de la PTP DEP-1 dans les cellules cancéreuses mammaires et endothéliales, régulant ainsi la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse et l'invasivité tumorale. Les effets promoteurs de DEP-1 sont principalement attribuables à sa capacité à activer la kinase Src, un médiateur central de toutes fonctions. En plus, ces travaux soulignent l'importance des niveaux d'expression de DEP-1 pour la médiation de ces fonctions. Ainsi, ces travaux identifient DEP-1 comme une cible thérapeutique potentielle d'un grand intérêt tant pour limiter la réponse angiogénique des cellules endothéliales que la réponse invasive et prométastatique des cellules tumorales.

Cette thèse contient les articles suivants :

- 1. The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is an essential promoter of vascular permeability, angiogenesis, and tumor progression**

Article en revision pour la revue Cancer Research

- 2. DEP-1 regulates retinal vascular development through proliferation and Notch signaling pathway.**

Article en préparation pour soumission au journal Cardiovascular Research

- 3. The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and metastasis**

Oncogene. 2015 Mar 16. doi: 10.1038/onc.2015.9.

CHAPITRE II

The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is an essential promoter of vascular permeability, angiogenesis, and tumor progression

Patrick Fournier^{1,2}, Sylvie Dussault¹, Alfredo Fusco³, Alain Rivard^{1,4} and Isabelle Royal^{1,2,4*}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. ²Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC, Canada. ³Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Naples, Italy. ⁴Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Contribution des auteurs:

PF a réalisé les expériences des figures 1, 2, 3, 5, 6 et 7.

PF et SD ont réalisé des expériences de la figure 4.

PF et IR ont écrit le manuscrit.

AF a généré le modèle animal de souris *Dep-1* KO

AR a conçu les expériences de la figure 4.

IR a conçu les expériences des figures 1, 2, 3, 5, 6 et 7.

The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is an essential promoter of vascular permeability, angiogenesis, and tumor progression

Patrick Fournier^{1,2}, Sylvie Dussault¹, Alfredo Fusco³, Alain Rivard^{1,4} and Isabelle Royal^{1,2,4*}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. ²Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC, Canada. ³Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Naples, Italy. ⁴Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Running title : DEP-1 promotes angiogenesis, permeability and tumor progression

Keywords: Angiogenesis, permeability, metastasis, protein tyrosine phosphatase, Src

Financial support: This work was supported by the Cancer Research Society (to I.R.) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (MOP-123490 to A.R). P.F was supported by student scholarships from Fonds de Recherche en Santé – Québec (25988), the Canadian Institutes of Health Research (292353), and Institut du Cancer de Montréal.

Word count: 4889

Number of Figures: 7

The authors disclose no potential conflicts of interest.

Abstract

The expression of DEP-1/PTPRJ increases as endothelial cells become confluent, and mediates contact-inhibition of cell proliferation. Conversely, its expression decreases as quiescent endothelial cells become activated and involved in capillary formation in vivo. Interestingly, we previously demonstrated that DEP-1 also promotes VEGF-dependent Src activation, permeability, and capillary formation in vitro, suggesting that it positively regulates these functions in vivo. To elucidate this, we investigated post-natal angiogenesis and vascular permeability in a DEP-1 knockout (KO) mouse model. Here, we show that DEP-1 was required for Src activation and the phosphorylation of its endothelial-cell specific substrate, VE-cadherin, following systemic injection of VEGF. Accordingly, VEGF-induced vascular leakage was abrogated in the DEP-1 KO mice. Capillary formation from mouse aortic rings and in Matrigel plugs containing VEGF or FGF was also impaired. Consistent with this, ischemia-induced and tumor-associated angiogenesis were deficient in the absence of DEP-1. Hence, the growth of mammary tumor cell lines was reduced in DEP-1 KO mice and correlated with their increased apoptosis. Macrophage infiltration was also impaired, reflecting reduced vascular permeability in the tumors or a possible cell autonomous effect of DEP-1. Consequently, spontaneous and experimental lung metastasis was strongly decreased in KO mice. Interestingly, patients with poorly vascularized breast tumors similarly had lower microvascular expression of DEP-1. For the first time, these results identify DEP-1 as an essential driver of VEGF-dependent permeability and angiogenesis, and as a promoter of tumor growth and metastasis. Inhibiting DEP-1 may therefore represent a novel therapeutic strategy to impede cancer progression.

Introduction

Angiogenesis and increased vessel permeability play key roles during the development of a number of pathologies including tumor growth and cancer progression (Carmeliet, 2003 #2158). Therefore, much effort aims at understanding the molecular mechanisms underlying the formation and remodeling of blood vessels as a way to identify new approaches to harness these processes. The receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1, also named PTPRJ or CD148, is expressed in various cell types including epithelial, hematopoietic, and endothelial cells. It encompasses an extracellular domain containing eight fibronectin-type III-like motifs, a transmembrane domain, a single intracellular catalytic domain, and a short C-terminal tail.²⁷⁸ DEP-1 expression is found to increase with cell density, and contributes to cell contact-mediated growth inhibition.^{278,94} Similarly, overexpression of DEP-1 in many tumor cells is associated with inhibition of cell proliferation and migration.^{278,395,394,387,399} Consistent with this role, some of its known substrates include growth factor receptors such as the PDGFR, EGFR, MET, and ERK1/2.^{349,347,392,362}

In confluent and quiescent endothelial cells, DEP-1 co-localizes at cell-cell junctions with VEGFR2 and VE-cadherin, and negatively regulates VEGFR2 phosphorylation and cell proliferation.^{94,406,345} However, in addition to its role as an attenuator of VEGFR2 activity, DEP-1 is also a positive regulator of Src activation and of important Src kinases-dependent biological functions in VEGF-stimulated cells, including cell survival, permeability, invasion, and capillary formation.^{95,113,228,407,408,365} This is induced through the VEGF-mediated tyrosine-phosphorylation of the C-terminal tail of DEP-1 on Y1311 and Y1320, which allows DEP-1 to associate with Src and dephosphorylate its inhibitory Y529.¹¹³ Interestingly, inactivation of DEP-1 in mice, via the swapping of its catalytic domain with GFP, resulted in mid-gestation death, characterized by enlarged primitive vessels, increased endothelial cell proliferation,

and defective vascular remodeling and branching³³⁹. Surprisingly, DEP-1 knockout (KO) mice are viable and fertile, with no apparent phenotype.^{366,226,367} However, further characterization of these mouse models revealed that DEP-1 positively regulates B cell and macrophage immunoreceptor signaling, platelet activation, and airway smooth muscle contractility.^{226,363,370} As the underlying mechanism, DEP-1 was proposed to promote these biological responses via activation of Src family kinases (SFKs), similarly to what was observed in endothelial cells in vitro.⁹⁵ Therefore, to determine the role of DEP-1 during angiogenesis and permeability in vivo, the biological consequences of its lost expression were investigated in DEP-1 KO mice. We demonstrate here that DEP-1 is essential for Src activation and the phosphorylation of its substrate VE-cadherin in response to VEGF stimulation in vivo. Consequently, impaired vascular permeability, capillary formation, and recovery from hindlimb ischemia are observed in DEP-1 KO mice. Also, tumor growth and the formation of spontaneous and experimental metastases were greatly reduced in mice with no expression of DEP-1, consistent with an important reduction in tumor-associated microvessel density and defective vascular permeability in these mice. These results thus demonstrate for the first time the positive and essential role played by DEP-1 in postnatal and tumor-associated angiogenesis, and identify stroma-derived DEP-1 as an important promoter of tumor progression.

Methods

Antibodies and reagents

Antibodies against Src, non-p^{Y529}Src, p^{Y1175}VEGFR2, cleaved Caspase-3, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary IgGs were purchased from Cell Signaling Technology, New England Biolabs. p^{Y418}Src, Alexa Fluor 488-coupled donkey anti-goat, and Alexa Fluor 594-coupled donkey anti-rabbit antibodies were purchased from Invitrogen. DEP-1 goat antibody was from R&D Systems. CD31 (M-20), Ki67, PY99, and VEGFR2 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. VE-Cadherin and F4/80 (A3-1) antibodies were from BD Pharmingen (BD Biosciences) and Thermo Scientific, respectively. Recombinant human VEGF-A was obtained from the Biological Resources Branch Preclinical Repository of the National Cancer Institute - Frederick Cancer Research and Development Center. Evans blue dye and formamide were purchased from Sigma.

Animal model and cell lines

DEP-1 KO and WT mice were derived from DEP-1^{+/-} mice, after backcrossing the previously described DEP^{+/-} mice (C57/BL6J background) for at least 10 generations with FVB/N mice.³⁶⁶ All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines set out by the CRCHUM Animal Experimentation Ethics Committee. The Mvt-1/Pei-1 and MET-1 cell lines were generously provided in 2013 by Kent Hunter (NCI, MD) and in 2014 by Robert Cardiff (UC Davis, CA), respectively.^{409,410} Cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and 50µg/mL gentamycin (Wisent, St-Bruno, QC, CA). For tumor studies, both cell lines were injected at passage 17.

In vivo VEGF stimulation

Anesthetized mice were sacrificed by exsanguination 10 minutes following tail-vein injection of 2 µg of VEGF or PBS (100 µL). Lungs were collected, frozen in liquid nitrogen, crushed, and lysed in RIPA buffer pH 7.4 containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 1mM EDTA, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin (Roche Applied Science), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium fluoride, and 1 mM sodium vanadate. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay reagent (Pierce). Lung lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes (0.45 µm) (Bio-Rad). Western blotting and ECL detection (Amersham Biosciences/GE Healthcare) were performed according to the manufacturer's recommendations. Alternatively, lungs were frozen in OCT and 5 µm-cryosections were processed for immunofluorescence. Formalin-fixed sections were incubated for 1h with CD31 antibody (1/50), washed twice with PBS 5 min, and then incubated 45 minutes with Alexa Fluor 488-coupled anti-mouse antibody (1/800). After PBS washes, the same steps were followed with p^{Y418}Src (1/100) and Alexa Fluor 594-coupled anti-rabbit (1/800) antibodies. Slides were next washed twice with PBS and water, and mounted in ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen/Molecular Probes). Fluorescence was visualized using a Nikon Eclipse E600 microscope and photographed with an x20 objective lens, using a Photometrics CoolSNAP camera (Roper Scientific, Germany). Images were captured with NIS-Elements AR 3.0 software (Nikon, Japan).

Permeability assays

Anesthetized WT or DEP-1 KO mice (8/10-week-old) were injected with Evans blue (50 mg/kg) via the tail vein. Immediately after, mice were injected intradermally on each side of the ventral midline with an equal volume of PBS and VEGF (200 ng), or Histamine (625 ng).

Thirty minutes later, mice were perfused with PBS and the skin was photographed. For basal permeability assays, mice were perfused with PBS 4h after injection of Evans blue. For the quantification of intra-tumor vascular permeability, mice (28 or 21 days after injection of Mvt-1 and MET-1 cells, respectively) were injected with Evans blue and perfused with PBS after 1h. Sites of injection, organs, and tumors were collected, weighed, and incubated 48h at 56°C in formamide to extract Evans blue. Absorbance at 600 nm was determined in triplicate and normalized on tissue weight.

Mouse aortic ring assay

Mouse aortic rings were prepared according to the method of Baker et al.⁴¹¹ Briefly, thoracic aortas of 8-week-old WT and DEP-1 KO mice were dissected, cut into 0.5mm rings, and incubated in Opti-MEM (Gibco, Thermo Fischer Scientific) without serum or antibiotics overnight. Rings were next embedded in Matrigel (BD #356231; BD biosciences), and cultured in OptiMEM (2.5% FBS, 50 µg/mL gentamycin) containing PBS or VEGF (50ng/mL). At day 7, rings were photographed. Number of sprouts and total length of sprouts were calculated using the AxioVision 4.8.2 software (Zeiss) (at least in triplicate; 3 mice per group).

Matrigel plug assay

Experiments were performed as previously described.⁴¹² Briefly, growth factor-depleted Matrigel (400 µL) was pre-mixed with heparin (15 U; Sandoz), and VEGF (200 ng), bFGF (200 ng) or PBS. The mixtures were injected subcutaneously on both sides of the ventral midline of 6-week-old WT or DEP-1 KO mice and collected 12 days later. Hemoglobin content was measured using the Quantichrom Hemoglobin Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) and normalized to plug weight (10 animals/group). Neovascularization was

determined on H&E stained slices of paraffin-embedded plugs. Capillary structures were counted per region of interest (ROI) (5 ROI/plugs; 10 plugs/condition).

Hindlimb Ischemia

Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in mice as previously described.⁴¹³ Hindlimb perfusion measurements were obtained with a Laser Doppler Perfusion Imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd, Axminster, UK) immediately after surgery and 14 days later on anesthetized animals. The results are expressed as the ratio of perfusion in the ischemic versus non-ischemic hindlimb. The mice were sacrificed at day 14 (6 animals/group). Immunohistochemistry of CD31 (Pharmigen) was performed on paraffin-embedded ischemic gastrocnemium muscle. The capillary density per muscle fiber was determined on three muscle slices taken from different parts of the muscle.

Tumor growth and metastasis assay

WT and DEP-1 KO female mice (6-week-old) were injected with 2×10^5 Mvt-1/Pei-1 or 4×10^5 MET-1 cells in the mammary fat pad and sacrificed at day 28 and 25, respectively. Tumors were fixed in formaldehyde (3.7% (v/v)) and embedded in paraffin, or lysed in RIPA buffer, and then processed for immunohistochemistry (2 slices/tumor) or Western blotting, respectively.^{414,415} Lung lobes were embedded in OCT, and 5 μm -cryosections were H&E-stained to determine the metastatic burden using Photoshop (two slices/ lobe). For experimental metastasis, 8-week-old WT and KO female mice were tail-vein injected with 4×10^5 Mvt-1/Pei-1 or 7×10^5 MET-1 cells. On day 14, mice were sacrificed and lungs were processed as described above (at least 9 animals/group)

DEP-1 expression in microarray analysis

The GSE15363 dataset was downloaded from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo).⁴¹⁶ Tumor samples from breast cancer patients were segregated in two groups based 1) on microvessel density (low and high), as determined by PECAM (CD31) immunostaining, or 2) based on a distinct genetic signature defining vessels as either proliferative and undergoing active remodeling (group A), or as being more stable and mature (group B).⁴¹⁶ DEP-1 expression (probe 25355) was evaluated in each group and plotted on box and whiskers graphs. Analyses were performed with the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Data analysis

Statistical significance was evaluated with the Student t-test using GraphPad Prism 6.0 software. P values were considered significant when less than 0.05. Densitometry analyses were performed with the Quantity One 4.6.3 software (Bio-Rad).

Results

DEP-1 promotes VEGF-dependent Src activation in vivo

Despite negative regulatory functions associated with high levels of DEP-1 expression in endothelial cells, our group previously demonstrated that VEGF-induced tyrosine phosphorylation of moderately expressed DEP-1 promotes Src activation.^{113,95} This was shown to occur through a phospho-displacement mechanism allowing phosphorylated DEP-1 to bind the Src SH2 domain and dephosphorylate its inhibitory Y529, resulting in the phosphorylation of its activating Y418 residue.^{95,125} Here, to determine if DEP-1 was also involved in Src activation upon VEGF stimulation in vivo, WT and DEP-1 KO mice were systemically injected with VEGF or PBS, and lungs were collected and lysed after 10 minutes. VEGF stimulation induced the dephosphorylation of Src Y529 and the phosphorylation of Y418 in WT mice, but this was attenuated in lysates from DEP-1 KO mice (Fig. 1A-B). Consistent with this, the tyrosine phosphorylation of immunoprecipitated VE-cadherin, an endothelial cell-specific Src substrate, was inhibited upon VEGF stimulation in DEP-1 KO mice (Fig. 1C). Moreover, dephosphorylation of VE-cadherin-associated Src on Y529 was also defective, further emphasizing the inhibition of endothelial Src activity (Fig. 1C). In contrast, the relative phosphorylation of VEGFR2, a DEP-1 substrate^{94,95}, was maintained or slightly increased in DEP-1 KO mice (Fig. 1A-B), demonstrating that reduced Src activation was not resulting from impaired VEGFR2 phosphorylation. Immunofluorescence staining of p^{Y418}Src on lung cryosections confirmed that VEGF-stimulated Src activation was reduced in CD31-positive endothelial cells of the DEP-1 KO mice (Fig. 1D-E). Together, these results demonstrate the essential role of DEP-1 in VEGF-dependent Src activation in vivo.

VEGF-induced vascular permeability is impaired in the DEP-1 KO mouse

VEGF was originally described for its vascular permeability inducing capacity, which relies on its ability to induce the remodeling and loosening of intercellular adhesions.⁴¹⁷ DEP-1 and Src mediate the tyrosine and PAK2-dependent serine phosphorylation of VE-Cadherin, resulting in the weakening of its intracellular association with catenins and its increased internalization from cell-cell junctions.^{113,127,418,419,130,420} As impaired phosphorylation of Src and VE-Cadherin was observed in DEP-1 KO mice, we characterized the role of DEP-1 in VEGF-induced vascular permeability *in vivo* using a modified Miles assay. In control mice, dermal injection of VEGF led to an important vascular leakage of Evans blue dye, which was blocked in DEP-1 KO animals (Fig. 2A-B). However, we observed no difference in histamine-induced vascular permeability, shown to be Src-independent (Fig. 2C-D).^{112,228} Basal vascular permeability in lungs, liver, and brain was also equivalent in DEP-1 KO and WT mice (Fig. 2E). These results importantly demonstrate that DEP-1 is essential for the promotion of VEGF-induced vascular permeability *in vivo*, and correlate with its ability to activate the Src-dependent phosphorylation of VE-cadherin.

DEP-1 is required for capillary formation *in vivo*

Angiogenesis is a complex process requiring endothelial cell proliferation, remodeling of endothelial cell-cell junctions and cell invasion.³² We have previously shown that DEP-1 expression is required for endothelial cell invasion and the organization of capillary-like structures when grown on Matrigel.¹¹³ Src has been shown to mediate the remodeling and loosening of cell-cell junctions, and to promote angiogenesis and vascular permeability *in vivo*.^{228,127,408} To characterize the consequences of DEP-1 loss on capillary formation, several approaches were used. First, in a mouse aortic ring assay, an important induction of capillary formation was observed in response to the stimulation of WT aortic rings embedded in

Matrigel with VEGF (Fig. 3A). In contrast, a reduced number of shorter capillaries elongated from the DEP-1 KO aortic rings (Fig. 3A-C). VEGF-induced capillary formation in vivo was also studied using a Matrigel plug assay. Upon harvesting, Matrigel plugs were photographed (Fig. 3D), and the hemoglobin content was determined. Quantification indicated that VEGF induced the formation of functional capillaries in the WT mice, but not in the KO animals (Fig. 3E). Capillary density, as characterized by H&E staining of paraffin-embedded sections of the plugs (Fig. 3F), was increased in response to VEGF stimulation in the WT animals, while no induction was detected in the Matrigel plugs from the DEP-1 KO mice (Fig. 3G). Similar results were also observed in response to bFGF (Fig. 4H-K), previously reported to promote angiogenesis in a SFK-dependent manner.⁴⁰⁸ Taken together, these experiments demonstrate that DEP-1 is positively regulating the formation of perfused capillaries in vivo.

Recovery from hindlimb ischemia is attenuated in DEP-1 null mice

Ischemia is the most common angiogenic signal emerging from wounded tissues. In order to study the physiological angiogenic response of DEP-1 KO mice, we exploited the hindlimb ischemia model. In this system, angiogenesis is the primary response leading to the improved collateral blood flow detected by laser Doppler perfusion imaging (LDPI). Fourteen days after the removal of the femoral artery from the left hindlimb, LDPI measurements revealed a reduction of limb perfusion in DEP-1 null mice compared to WT mice (Fig. 4A-B), while a similar reduction of perfusion was observed in all animals immediately after surgery (data not shown). In addition, staining of paraffin-embedded ischemic gastrocnemius muscles with CD31 detected a reduction of capillaries per muscle fiber (Fig. 4C-D). Consistent with their decreased limb perfusion recovery, DEP-1 KO mice were less mobile than their WT littermates (Fig. 4E), and had a greater number of necrotic or inflamed fingers (Fig. 4F).

These data demonstrate that DEP-1 expression significantly enhances the promotion of physiological neovascularization in the context of ischemia-induced tissue damage.

DEP-1 promotes tumor angiogenesis and metastasis

The recruitment of blood vessels is essential for tumor growth and contributes to metastasis. We studied the role of DEP-1 in cancer growth and progression using two highly metastatic and syngeneic tumor cell models, Mvt-1/Pei-1 and MET-1 mammary tumor cells, following mammary fat pad injection in WT and DEP-1 KO mice.^{409,410} Tumor growth, as characterized by tumor volume and tumor weight, was significantly decreased in DEP-1 KO mice compared to WT animals (Fig. 5A-B and 5G-H). Consistent with the reduced angiogenesis previously observed in the DEP-1 KO mice (Figs. 3-4), CD31 staining also revealed a decrease in tumor microvessel density (Fig. 5C-D and 5I-J). Consistent with this, decreased proliferation and increased apoptosis of tumor cells were detected in DEP-1 KO mice, as shown by reduced Ki67 immunostaining and increased Caspase-3 cleavage, respectively (Fig 5C, 5E-F, and 5I, 5K-L). These results thus suggest that DEP-1 is a driver of tumor growth by regulating tumor-associated angiogenesis.

Tumor microvessels also facilitate the recruitment of immune cells and the dissemination of cancer cells. Tumor infiltration by macrophages was impaired in DEP-1 KO mice, as shown by the decreased F4/80 immunostaining (Fig. 5C, 5I). This may have resulted from the reduced permeability of tumors grown in DEP-1 KO mice (Fig. 6A-B), or to cell autonomous effects of DEP-1 on macrophage function.^{226,421} Importantly, in the absence of DEP-1, fewer Mvt-1 tumor cells formed spontaneous lung metastases (Fig. 6C). However, for MET-1 cells, only one WT mice presented metastatic lesions at the time of sacrifice (data not shown). Mvt-1 and MET-1 cells were also injected directly into the blood circulation to investigate experimental metastasis. Their ability to colonize the lungs of DEP-1 KO mice was

greatly diminished (Fig. 6C). As a postulated mechanism, the reduced tumor angiogenesis and metastasis observed in the DEP-1 KO mice were shown to correlate with weaker Src activation levels in the residual tumor microvessels, reinforcing the key role of DEP-1 in Src activation during these processes (Fig. 7A-B). Interestingly, in breast cancer patients, higher DEP-1 expression in tumor-associated microvessels was associated with greater vascularization of the tumors, and with a genetically defined tumor vascular subtype (A) described as being actively remodeling⁴¹⁶, further supporting a pro-angiogenic role for DEP-1 in tumor-associated angiogenesis (Fig. 7C-D).

Discussion

DEP-1 has mainly been depicted as having negative regulatory functions in a broad range of cell types. Despite reports highlighting inhibitory roles for DEP-1 in endothelial cell proliferation and capillary formation^{94,344,361}, our group previously showed that endogenously-expressed DEP-1 in non-quiescent endothelial cells positively regulates Src activation, cell invasion, permeability and capillary formation.^{95,113,365} We now show that VEGF-induced permeability (Fig. 2) and angiogenesis (Figs. 3-4), whether in response to VEGF, FGF or ischemia, are inhibited in a DEP-1 KO mouse model. In addition, tumor-associated angiogenesis, tumor growth and metastasis are also impaired in these conditions (Figs. 5-6), establishing stroma-derived DEP-1 as a promoter of cancer progression. At the molecular level, this correlates with the inhibition of VEGF-induced Src activation *in vivo*, and consequently, with the abrogated phosphorylation of its endothelial cell-specific substrate VE-cadherin, both critical mediators of vascular permeability and angiogenesis (Fig. 1).^{228,408,417} These results thus demonstrate for the first time that DEP-1 expression has positive and essential regulatory functions *in vivo* that mediate increased vascular permeability and angiogenesis.^{95,125}

One of the main functions promoted by DEP-1 is the activation of SFKs and downstream biological responses. This has now been reported in hematopoietic cells, platelets, smooth muscle cells, breast tumor cells, and endothelial cells *in vitro*, and relies on the ability of DEP-1 to dephosphorylate the inhibitory C-terminal tyrosine residue of SFKs.^{226,363,95,370,415,113} Here, we identify DEP-1 as a key mediator of VEGF-dependent Src activation *in vivo* (Fig. 1). Although this was shown in lung lysates and tissues where several cell types are present, lungs are rich in endothelial cells. Thus, the observation that its endothelial cell-specific substrate, VE-cadherin, is no longer tyrosine phosphorylated in DEP-

1 KO mice, and that decreased Src Y418 phosphorylation co-localizes with CD31-positive regions in lung tissues strongly suggest that endothelial Src activity was inhibited in the absence of DEP-1 expression. Moreover, VE-cadherin-associated Src, which represents the main pool of VEGF-activated Src in endothelial cells^{306,406}, was also not dephosphorylated on Y529 (Fig. 1C).^{95,406} These results thus clearly identify DEP-1 as a critical regulator of Src activation and VE-cadherin phosphorylation in VEGF-stimulated endothelial cells in vivo.

Since SFKs act as pivotal regulators of VEGF-dependent permeability and angiogenesis^{228,408,127,230}, our results suggest that the dramatic block of these biological responses in the DEP-1 KO mice is due to the abrogation of the Src pathway in endothelial cells. The Src-dependent phosphorylation of VE-cadherin is critical for the reorganization of cell-cell junctions that occur during permeability.^{418,127,419,420} Expression of a catalytically active DEP-1 mutant (Y1311F/Y1320F), defective in Src activation, was also unable to promote any of these biological activities in endothelial cells in vitro.¹²⁵ This then strongly suggests that through its ability to activate Src, DEP-1 is a key regulator of post-natal angiogenesis and permeability. However, since in the Src KO mice, only permeability and metastasis were affected^{228,227}, but that the inhibition of all SFKs was required to block capillary formation in Matrigel and in tumors²²⁸, we also conclude that other SFKs expressed in endothelial cells might be regulated by DEP-1 and contribute to the phenotypes observed. Notably, the Fyn kinase mediates the endothelial migratory response to VEGF stimulation and was shown to be regulated by DEP-1 in T cells^{120,364,113}, suggesting it could also be part of the pathways involved.

Our results also interestingly revealed that expression of DEP-1 in tumor blood vessels correlated with Src activation (Fig. 7), and with the development of highly vascularized tumors (Fig. 5). Thus, in DEP-1 KO mice, defective angiogenesis impaired tumor growth, consistent with the decreased tumor cell proliferation and increased apoptosis

observed (Fig. 5). As these tumors had fewer vessels and were less permeable, spontaneous metastasis was greatly reduced (Fig. 6). However, injection of Mvt-1 and MET-1 mammary tumor cells into the blood circulation of DEP-1 KO mice similarly resulted in their impaired capacity to metastasize to the lungs, suggesting that defective VEGF-induced vascular permeability in these animals impaired their ability to extravasate in the lungs. Consistent with this new role for DEP-1 in the promotion of tumor-associated angiogenesis, DEP-1 gene expression levels in the tumor vasculature of a cohort of breast cancer patients⁴¹⁶ was found to be elevated in highly vascularized tumors, and in a genetically distinct tumor vascular subtype defined as being actively remodeling (Fig. 7). These observations thus further support our conclusions that DEP-1 is an important mediator of angiogenesis in vivo.

We also observed that the recruitment of macrophages to the tumors grown in the DEP-1 KO mice was impaired. This could possibly result from the decreased vessel density and permeability of tumors grown in these mice (Figs. 5-6). Also, this could be due to a cell autonomous effect as CSF-1-induced chemotaxis of macrophages in vitro is partially mediated by DEP-1.⁴²¹ The infiltration of tumors by macrophages can contribute to the promotion of angiogenesis and cancer progression, in part via the secretion of VEGF.⁴²² However, as Mvt-1 tumor cells secrete high levels of VEGF⁴⁰⁹, no decrease in VEGF tumor levels were observed in DEP-1 KO mice (Fig. S1). Thus, although the impaired recruitment of macrophages may have contributed to the tumor phenotype observed in DEP-1 KO mice, the impaired capillary formation observed during Matrigel and aortic ring assays is most likely the primary reason for defective tumor-associated angiogenesis.

The work presented here thus brings novel insight into our comprehension of the molecular machinery regulating permeability and angiogenesis in vivo, and importantly establish stroma-derived DEP-1 as a critical promoter of tumor cell growth and metastasis. Recently, breast tumor-expressed DEP-1 was shown to mediate a Src pro-invasive signaling

pathway associated with the promotion of metastasis.⁴¹⁵ These findings together with those presented here therefore strongly suggest that inhibiting DEP-1 functions could provide a new therapeutic strategy to counteract cancer progression.

Grant support

This work was supported by the Cancer Research Society (to I.R.) and the Canadian Institute of Health Research (MOP-123490 to A.R.). P.F was supported by student scholarships from Fonds de Recherche en Santé – Québec (25988), CIHR (292353) and Institut du Cancer de Montréal.

Authorship contributions

PF realized the experiments in Figs. 1, 2, 3, 5, 6 and 7. SD and PF realized experiments in Fig. 4. IR designed the experiments for Figs. 1, 2, 3, 5, 6 and 7. AR and IR designed the experiments in Fig. 4. AF provided the animals. PF and IR analyzed the data and wrote the paper.

Figure legends

Figure 1. DEP-1 promotes Src activation upon VEGF stimulation in vivo. WT and DEP-1 KO mice were injected intravenously with VEGF (2 μ g) or PBS, and lungs were collected after 10 minutes. A, Lung lysates were studied by western blotting. B, Results were quantified by densitometric analyses and are representative of 3 independent experiments (mean \pm SD). C, VE-Cadherin was immunoprecipitated from lysates of lungs collected from WT and DEP-1 KO mice injected with VEGF. D, Alternatively, lung cryosections were double-stained by immunofluorescence with the p^{Y418}Src and CD31 antibodies. E, The intensity of the VEGF-induced p^{Y418}Src immunofluorescence signal overlapping with CD31-positive microvessels was normalized to that of CD31 (5 ROI/picture; 5 pictures/slice; 2 slices/mouse; n=2). *, p<0.05.

Figure 2. VEGF-induced, but not histamine-induced, vascular permeability is abrogated in DEP-1 KO mice. Vascular permeability was assessed using a modified Miles assay. A, Mice were tail vein-injected with Evans blue dye followed by intradermal injection of PBS and VEGF. Skin at the injection site was collected and photographed. B, Quantification of extracted Evans blue. Results were normalized on tissue weight (mean \pm SD); n=9-12. **, p<0.01. C, D, Vascular permeability was determined in response to Histamine (625 ng), as described above; n=9-12. E, Basal vascular permeability in various organs was assessed 4h following the injection of Evans blue; n=10.

Figure 3. DEP-1 is essential for capillary formation in response to VEGF and bFGF.

A, Aortic rings from WT and DEP-1 KO mice were embedded in Matrigel and cultured with either VEGF or PBS. B, The number of sprouts, and C, total length of sprouts were

determined. Results are representative of 3 independent experiments, which were performed in triplicate. D, WT and DEP-1 KO mice were injected with Matrigel containing Heparin and either VEGF or PBS on both sides of the ventral midline. Plugs were harvested and photographed. E, Hemoglobin (Hb) content was normalized to Matrigel plug weight; n=10. F, Paraffin-embedded Matrigel plugs were H&E stained. G, Capillaries, as detected by the presence of small circular purple rings with pink-colored centers, were quantified per region of interest; n=10. H-K, Matrigel plug experiments were performed in response to bFGF using the same procedure; n=10. **, p<0.01; ***, p<0.001.

Figure 4. Impaired recovery from hindlimb ischemia in DEP-1 KO mice. A, Representative results of laser Doppler measurements 14 days after hindlimb ischemia. Arrows indicate ischemic limbs. B, Quantification of laser Doppler perfusion ratios (ischemic vs non-ischemic) at day 14; n=6. C, CD31 was stained by immunohistochemistry on the ischemic gastrocnemium muscle at day 14. D, Number of capillaries (brown round-shaped staining) per muscle fiber was quantified (n=6 animals/group; 3 slices per animal). E, Ambulatory capacities of animals were evaluated before sacrifice using a home-made score chart (1=normal usage of ischemic limb; 2=good positioning but partial usage of ischemic limb; 3=good positioning but very light usage of ischemic limb; 4=bad positioning and no usage of ischemic limb); n=6. (F) Ischemic damage was evaluated at day 14 using a home-made score chart (0=no ischemic damage; 1=one inflamed finger; 2=at least two inflamed fingers; 3=one necrosed finger; 4=at least two necrosed fingers); n=6. *, p<0.05; ***, p<0.001.

Figure 5. DEP-1 regulates tumor growth and tumor-associated angiogenesis. WT and DEP-1 KO animals were orthotopically injected with A, Mvt-1/Pei-1 or G, MET-1 cells, and tumor growth was monitored; n= at least 9. B, H, Mice were sacrificed and tumor weights

were determined for Mvt-1 and MET-1 tumors after 28 and 25 days, respectively. C, I, CD31, Ki67 and F4/80 were stained by immunohistochemistry on paraffin-embedded sections of tumors; n= at least 9. D, J, The number of capillaries per region of interest (ROI) was quantified according to CD31 staining. E, K, The number of Ki67-positive cells were quantified per field of view. F, L, Representative immunodetection of cleaved caspase-3 in tumor lysates. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Figure 6. DEP-1 regulates tumor permeability and the formation of spontaneous and experimental lung metastases. A, Mvt-1 and B, MET-1 tumor vessel permeability was assessed by the Miles Assay; n= at least 9. C, The formation of spontaneous (fat pad injection) and experimental (IV injection) lung metastases was assessed by H&E staining on lung cryosections. The lung metastatic burden, as defined by the fraction of the lung surface occupied by metastatic lesions, was calculated; n= at least 9. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

Figure 7. DEP-1 expression levels correlate with Src activation in tumor vasculature, and are elevated in highly vascularized breast cancer tumors. A, Paraffin-embedded slices of MET-1 tumors were stained for CD31 and p^{Y418}Src by immunofluorescence. B, The presence of positive p^{Y418}Src signal in tumor-associated CD31-positive microvessels (broken lines) was quantified (at least 20 capillaries/tumor). C, Correlation between DEP-1 gene expression in the tumor vasculature of breast cancer patients and the microvessel density (MVD) of tumors using the GSE15363 gene microarray data set from GEO (High: n=6; Low: n=12). D, Expression of DEP-1 is higher in the “A” subtype of breast tumor MV, genetically defined as proliferating and actively remodeling, than in the “B” subtype, which reflects features of more mature MV (A: n=5; B:n=13). *, p<0.05; **, P<0.01.

Figure S1 : VEGF expression in tumors collected from WT or DEP-1 KO mice is equivalent. A, Western blot analysis of VEGF expression in protein extracts of Mvt-1 tumors grown in WT or DEP-1 KO mice. B, Quantification of the VEGF expression levels relative to Src levels by densitometric analysis (mean \pm SD).

Figures

Figure 1 : DEP-1 promotes Src activation upon VEGF stimulation in vivo.

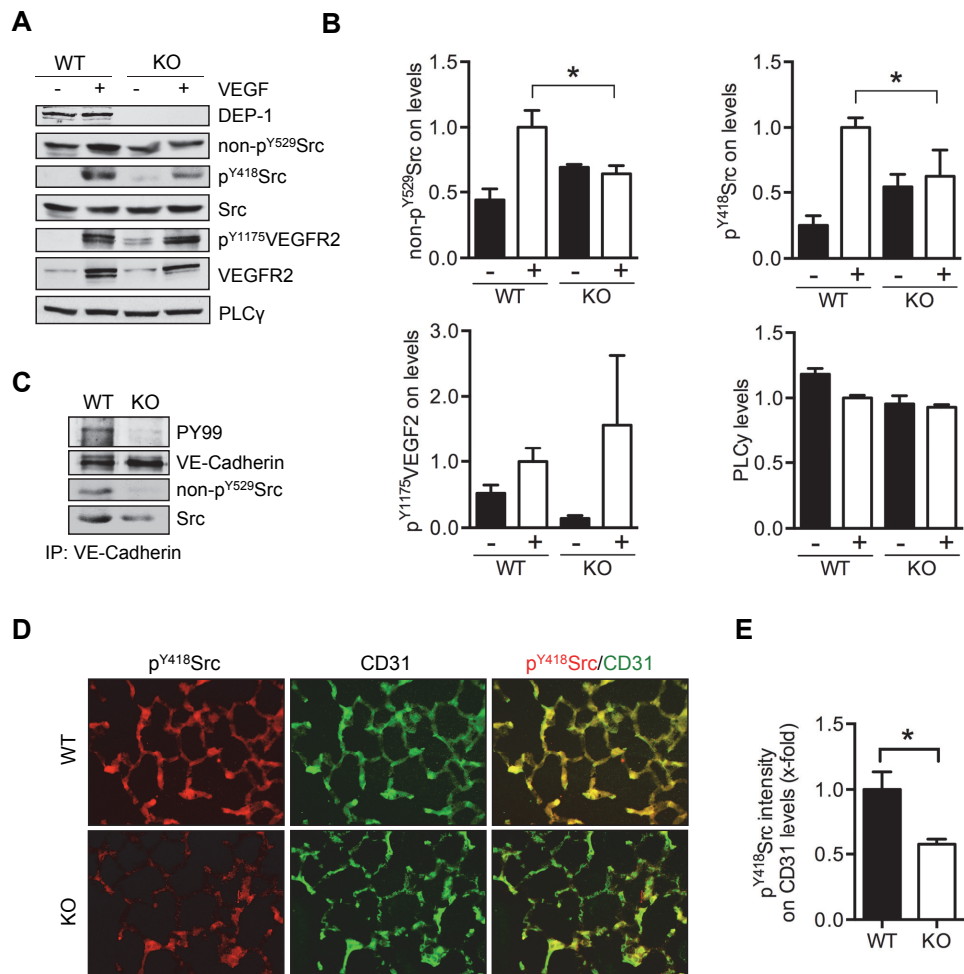


Figure 2 : VEGF-induced, but not histamine-induced, vascular permeability is abrogated in DEP-1 KO mice

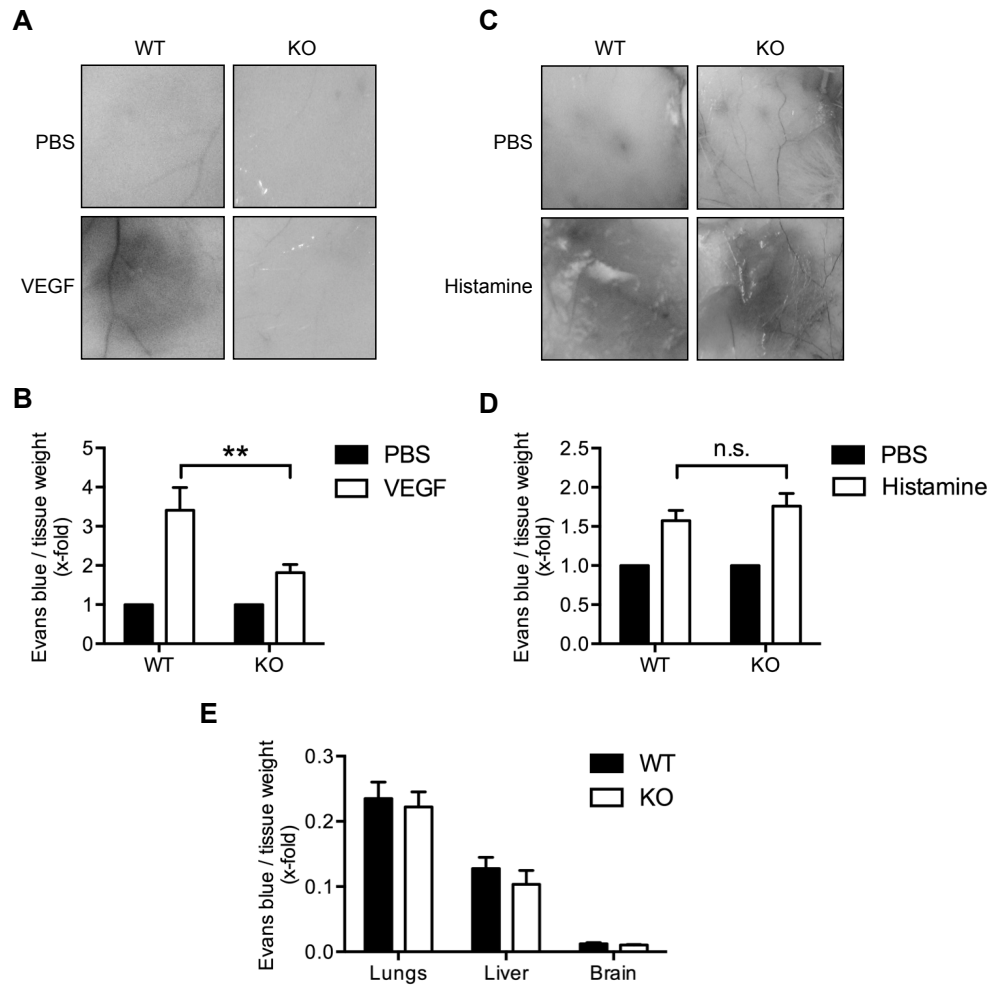


Figure 3 : DEP-1 is essential for capillary formation in response to VEGF and bFGF

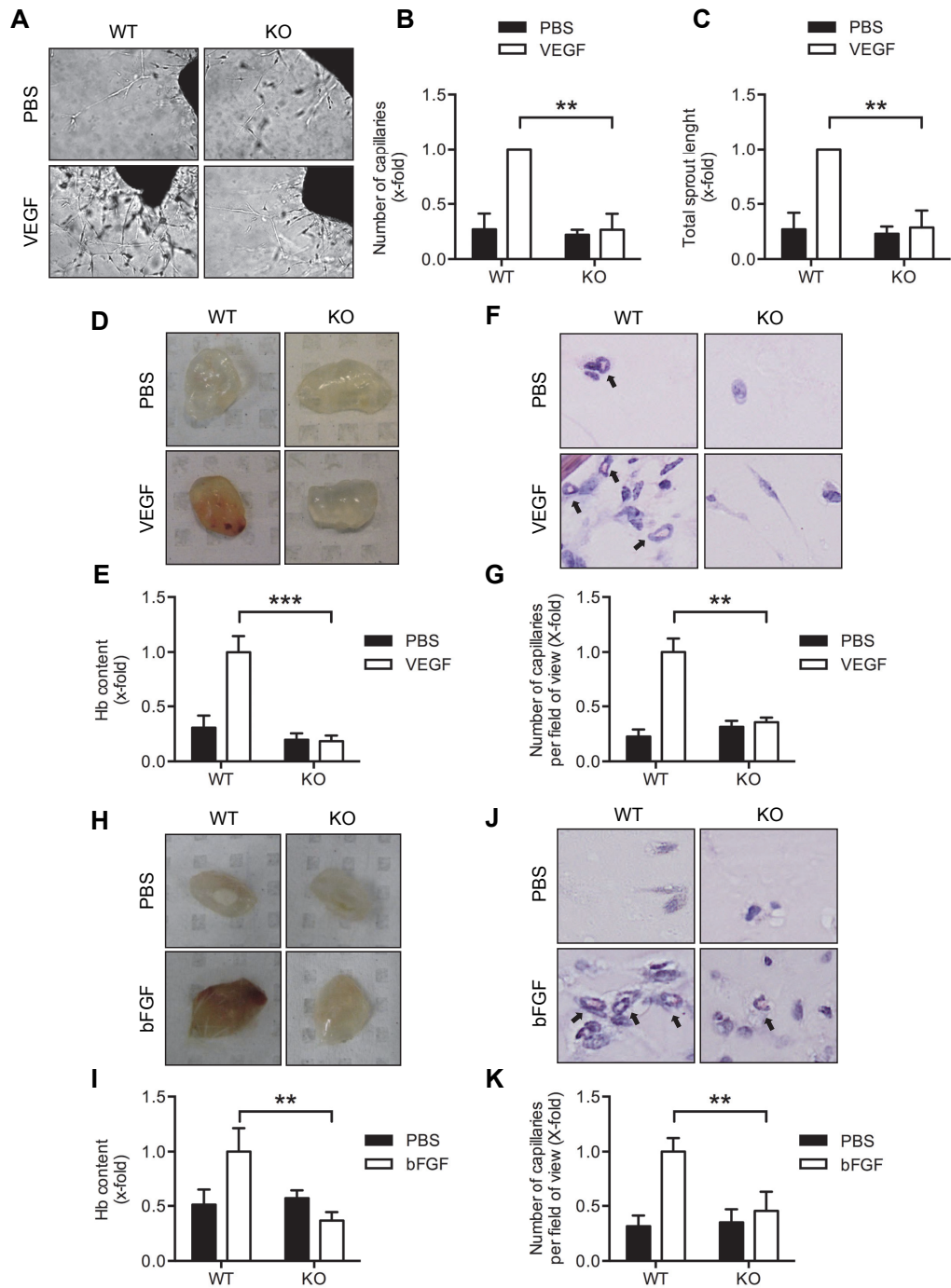


Figure 4 : Impaired recovery from hindlimb ischemia in DEP-1 KO mice

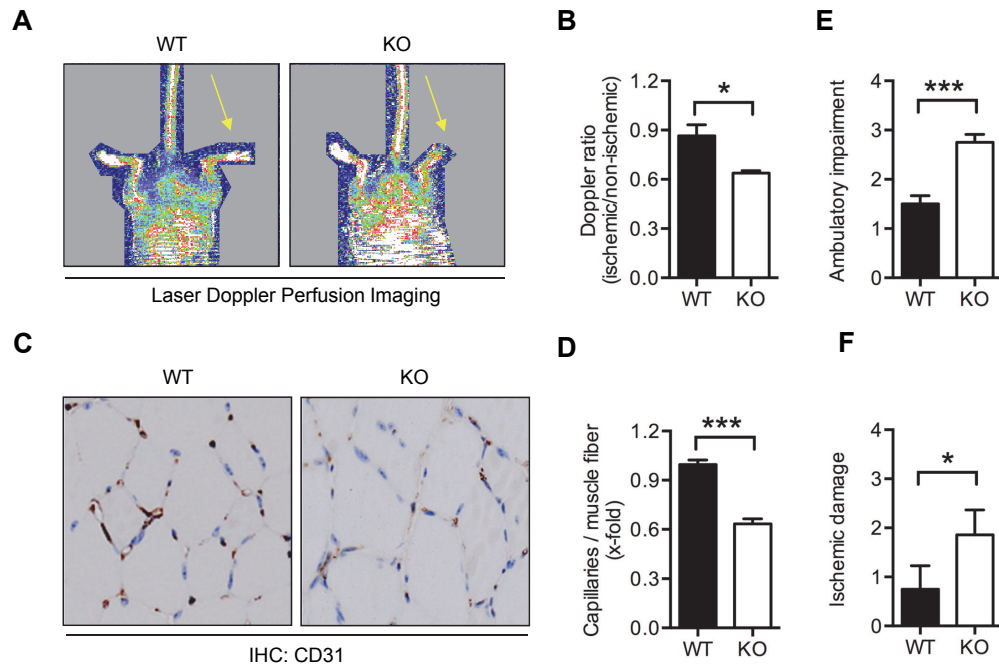


Figure 5 : DEP-1 regulates tumor growth and tumor-associated angiogenesis

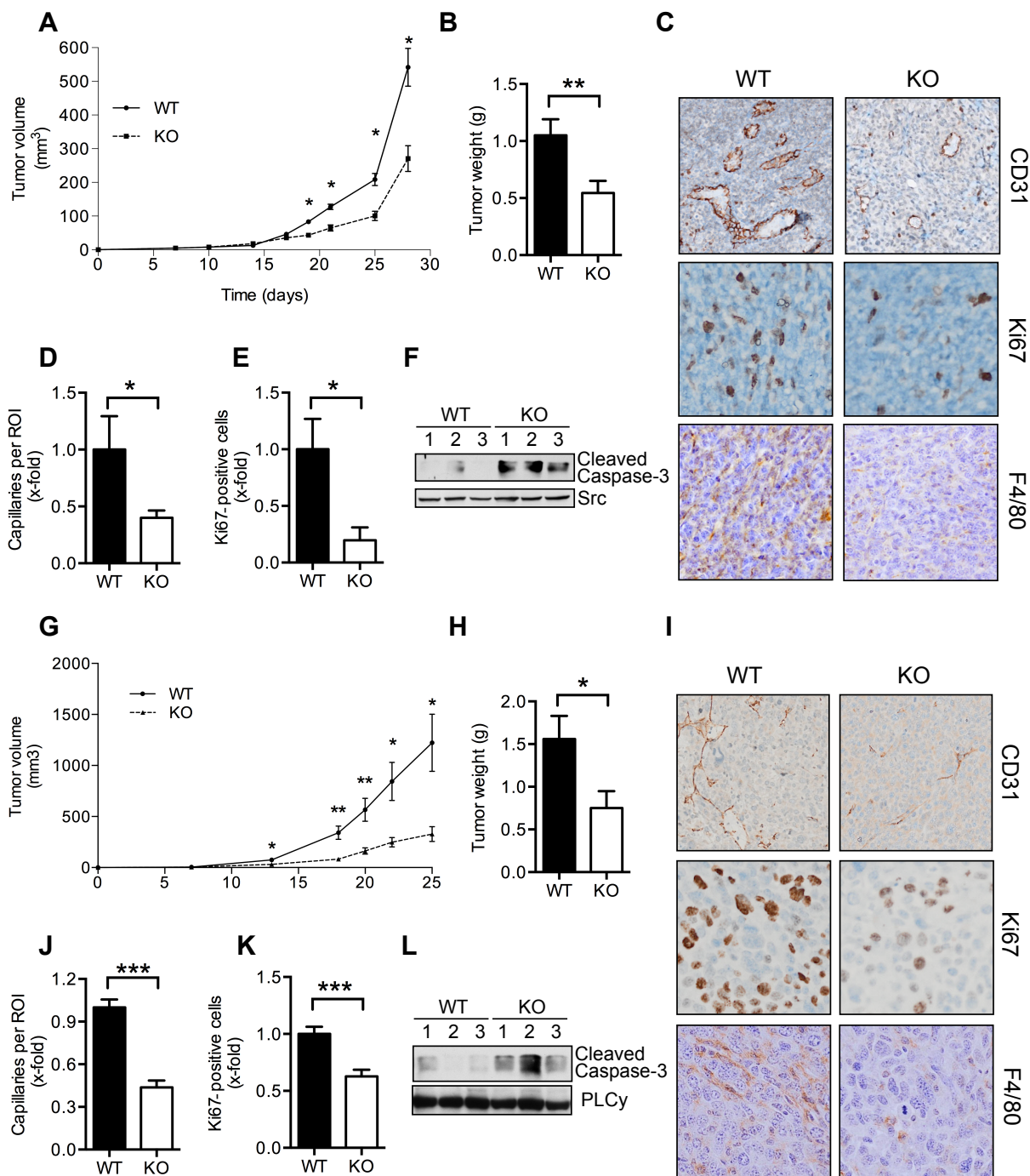


Figure 6 : DEP-1 regulates tumor permeability and the formation of spontaneous and experimental lung metastases

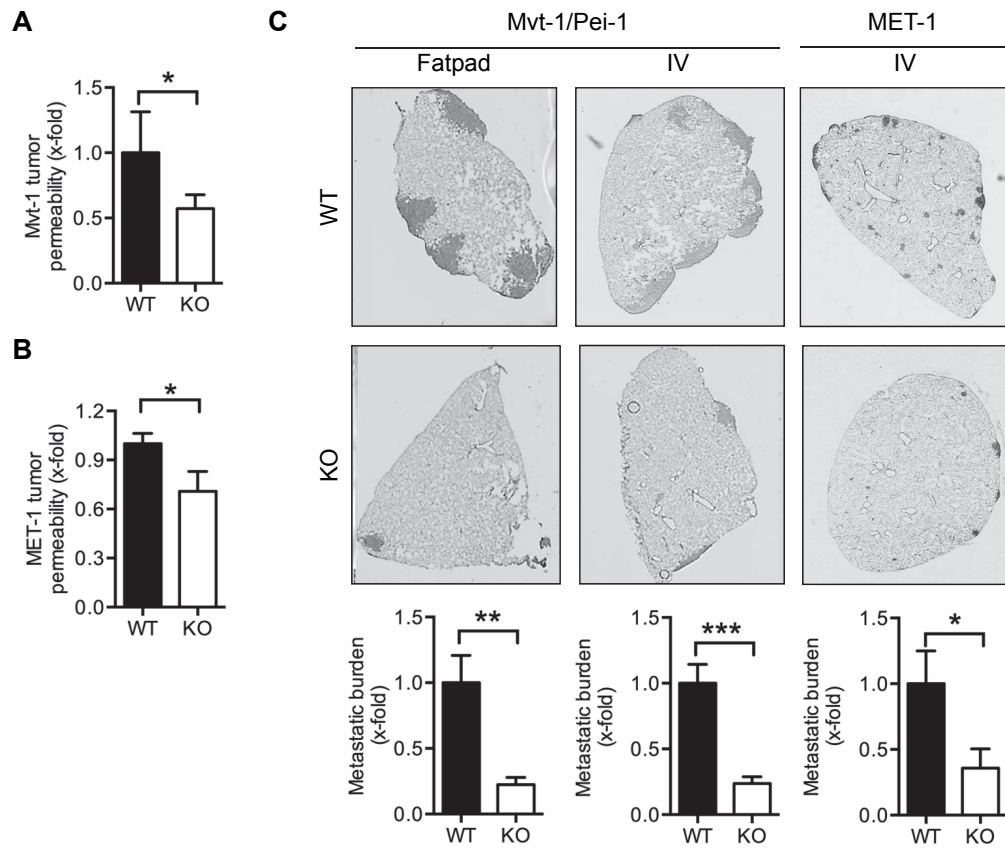
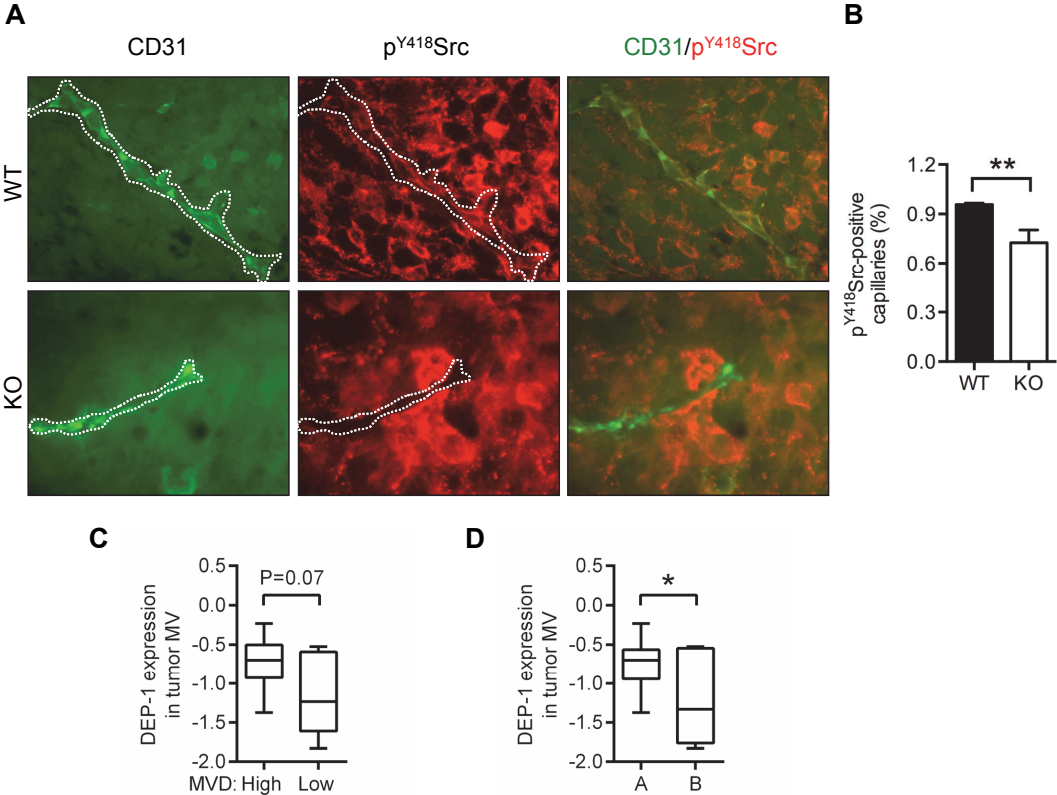
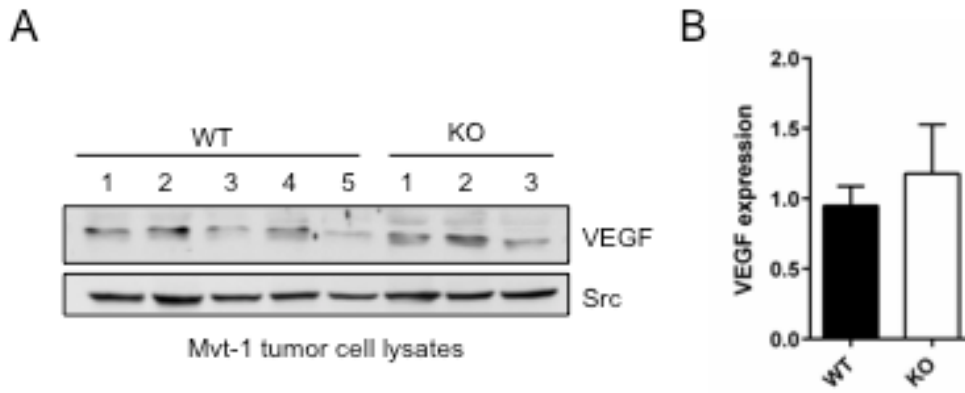


Figure 7 : DEP-1 expression levels correlate with Src activation in tumor vasculature, and are elevated in highly vascularized breast cancer tumors



Supplemental Figure S1 : VEGF expression in tumors collected from WT or DEP-1 KO mice is equivalent.



CHAPITRE III

The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ regulates sprouting angiogenesis
and the Notch signalling pathway

Patrick Fournier^{1,2}, Line Lapointe^{1,2}, Agnieszka Dejda^{3,4}, Przemyslaw Sapielha^{3,4,5} and Isabelle Royal^{1,2,6}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. ²Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Qc, Canada. ³Department of Biochemistry and Molecular Medicine and ⁴Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada. ⁵Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ⁶Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

Contribution des auteurs:

PF, et IR ont conçu les expériences.

AD et PS ont établi les protocoles expérimentaux rétinien

PF a réalisé les expériences des figures 1, 2, 3 et 4

LL a participé à la conception et réalisé l'expérience de la Fig. 4D

PF et IR ont écrit le manuscrit et préparé la figure 5

**The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ regulates sprouting angiogenesis
and the Notch signalling pathway**

Patrick Fournier^{1,2}, Agnieszka Dejda^{3,4}, Przemyslaw Sapielha^{3,4,5} and Isabelle Royal^{1,2,6}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada. ²Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Qc, Canada. ³Department of Biochemistry and Molecular Medicine and ⁴Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada ⁵Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada. ⁶Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada.

Abstract

The Dll4-Notch signaling pathway regulates capillary sprouting via the specification of endothelial tip cells. However, while VEGF is a potent inducer of Dll4 expression, the intracellular mediators remain ill-defined. The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is required for angiogenesis in normal or pathological contexts *in vivo*. It is a positive regulator of VEGF-dependent Src and Akt activation and of endothelial cell permeability and capillary formation, and a negative regulator of cell proliferation. Here, we show that sprouting angiogenesis during post-natal retinal development was altered in DEP-1 KO mice, and that retinas at post-natal day 5 showed enlarged blood vessels, as well as an increased number of tip cells and vessel branching points at the migration front of the vascular plexus. Consistent with these observations, the proliferation of blood vessel cells was increased in the retinas of DEP-1 KO mice, as revealed by greater Ki67 staining, and the increased phosphorylation of a mediator of endothelial cell proliferation, ERK1/2. In addition, the expression of Dll4 and Notch activation were decreased in the retinas of DEP-1 KO mice, and this correlated with the inhibition of the Src/Akt/ β -Catenin signalling pathway. The depletion of DEP-1 in VEGF-stimulated endothelial cells similarly resulted in impaired Dll4 expression and the inhibition of β -catenin-dependent transcriptional activity. Conversely, overexpression of WT DEP-1 in endothelial cells, but not of mutants unable to activate Src, promoted Dll4 expression. The chemical inhibition of Src, Akt, and β -catenin transcriptional activity, leading to the inhibition of Dll4 expression, demonstrated that their activation through DEP-1 was required to promote Dll4 expression in VEGF-stimulated endothelial cells. Altogether, these data demonstrate that DEP-1, via Akt and β -catenin transcriptional activation, is a critical promoter of the VEGF-

induced Dll4-Notch pathway, and an essential regulator of the tip and stalk cell phenotypes of endothelial cells.

Keywords

DEP-1, protein tyrosine phosphatase, retinal angiogenesis, Dll4, Notch

Introduction

DEP-1 is a receptor-like protein tyrosine phosphatase (PTP) expressed in endothelial, epithelial and hematopoietic cells. It was initially identified as an inhibitor of proliferation due to its increased expression in confluent cells, suggesting a contribution to cell-cell contact inhibition.²⁷⁸ Consistent with this, many of its substrates are growth factor receptors, including VEGFR2, as well as ERK1/2, and cell adhesion proteins.^{362,95,94} In vivo, embryonic lethality was reported in a knock-in mutant mouse model due to increased endothelial proliferation, and disorganization of the vascular system, suggesting that DEP-1 might also have promoting functions during vascular development.³³⁹ Depletion of DEP-1 in early development of zebrafish caused defects in vasculature, resulting in aberrant blood circulation.³⁴⁰ In vitro, our group reported that in endothelial cells, DEP-1 binds Src and dephosphorylates its inhibitory tyrosine (Y529), which leads to the auto-phosphorylation of its activating tyrosine (Y418) to allow its full activation.^{125,95} We further showed that this mechanism regulates VEGF-induced capillary formation and vascular permeability in vitro.^{125,95} Surprisingly, no apparent phenotype was observed in DEP-1 knock-out (KO) mice.^{367,366,368} However, characterization of these mice revealed impairment of signaling in different hematopoietic cells, mostly associated with Src family kinases (SFK) reduced activation.^{368,371,364,226} Furthermore, we recently showed that VEGF-induced Src activation, capillary formation in Matrigel in vivo and from aortic explants, as well as vascular permeability were impaired in the DEP-1 KO mice, prohibiting tumor growth and metastasis.⁴²³ All of these results suggested that DEP-1 was possibly involved in the initial steps of capillary sprouting.

During sprouting, endothelial cells are activated by VEGF and display different phenotypes.³⁹ The highly mobile tip cell is leading the extension of the nascent capillary and harbors numerous protrusions that allow the detection and polarized migration of the cell towards the VEGF gradient.³⁰ Adjacent cells are defined as stalk cells and proliferate to form the growing capillary.³⁰ Once capillary extension is completed, endothelial cells return to a quiescent-like state associated with the formation of stable cell-cell junctions and vessel maturation, and these are referred to as phalanx cells.³⁸ The Notch pathway is considered the main regulator of these phenotypes.⁴¹ Indeed, VEGF activation in the tip cell induces the expression of Dll4, which interacts with the Notch receptor on neighbouring cells and induces its cleavage and the release of the Notch intracellular domain (NICD).¹⁷⁶ The NICD then acts as a transcription factor co-activator, repressing the tip cell phenotype and VEGF responsiveness.¹⁸⁷ This is accomplished in part by downregulating and upregulating VEGFR2 and VEGFR1 respectively, thus favouring the stalk cell phenotype.^{192,190,191,177} Consequently, proper Dll4/Notch signalling is crucial for adequate vascular development. Impairment of this signalling pathway using antibodies against Dll4 or Notch1, Notch decoys, or by inhibiting Notch cleavage results in non-productive and oversprouting blood vessels, without adequate perfusion. Haploinsufficiency of Dll4 or Notch1 was also shown to be embryonic-lethal, due to a highly disorganized vascular system^{139,155,156}, further emphasizing the crucial role of the Dll4/Notch interaction during vascular development.^{168,176,190,175}

We show here that during retinal vascular development, DEP-1 deletion leads to increased vascular density and tip cell formation, correlating with decreased Dll4 expression. On a molecular level, this regulation is achieved by the DEP-1-dependent Src/Akt pathway

activation, leading to β -catenin-dependent transcriptional activity, a known Dll4 transcriptional promoter.¹⁸⁰ Consequently, we show, for the first time, that DEP-1 is a critical regulator of Notch signalling and endothelial sprouting during development.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Antibodies against Src, non-p^{Y529}Src, cleaved Notch (NICD), Dll4, p^{S33/S37/T41} β -catenin, p^{S552} β -catenin, p^{Y783}PLC γ , p^{S473}Akt, Akt, p44/p42 MAPK, p^{T202/Y204}p44/p42MAPK, p^{S9}GSK3 β , and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary IgGs were purchased from Cell Signaling Technology, New England Biolabs. p^{Y418}Src, Alexa Fluor 594-coupled donkey anti-rabbit antibodies were purchased from Invitrogen. DEP-1 goat antibody was from R&D Systems. Ki67 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology. PLC γ antibody was from Millipore. β -catenin and GSK3 β antibodies were purchased from BD Pharmingen (BD Biosciences). Recombinant human VEGF-A was obtained from the Biological Resources Branch Preclinical Repository of the National Cancer Institute - Frederick Cancer Research and Development Center. PP2, DMSO and MG132 were purchased from Sigma. LY294002 and PD98059 were purchased from Cell Signaling Technology, New England Biolabs. *Griffonia simplicifolia* FITC-lectin B4 was purchased from Vectors laboratories. PNU74654 and PKF115584 were purchased from Tocris Biosciences. Dual luciferase reporter assay kit was purchased from Promega.

Mice

DEP-1 KO and WT mice were derived from DEP-1^{+/-} mice in the FVB/N strain background. These were obtained after backcrossing the previously described DEP^{+/-} mice (C57/BL6J background) for at least 10 generations with FVB/N mice.³⁶⁶ All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines set out by the CRCHUM Animal Experimentation Ethics Committee.

Fluorescence staining

Eyes of five-days-old pups were collected and fixed 2 hours at room temperature in 4% formalin in PBS, and then enucleated as previously described.⁴²⁴ For Ki67 staining, retinas were dissected, permeabilized overnight at 4°C in PBS (with 1% BSA and 0,5% Triton X-100), rinsed twice and then incubated overnight with the Ki67 antibody (1/100). Retinas were next rinsed in PBS, incubated two hours at room temperature with Alexa Fluor 594-coupled donkey anti-rabbit antibodies and FITC-lectin B4 (1/100) in PBS, rinsed twice in PBS, and flat-mounted. For evaluate the retinal vascularization, FITC-lectin B4 (1/100) in PBS was incubated for two hours at room temperature, rinsed twice with PBS, and flat-mounted. Retinas were analyzed by immunofluorescence microscopy using the Nikon Eclipse E600 microscope and photographed with a x20 objective lens, using a Photometrics CoolSNAP camera (Roper Scientific, Germany). Images were captured with NIS-Elements AR 3.0 software (Nikon, Japan). From whole mount retinas, radial expansion (distance of the migrating front from the center of the retina) was measured using the axioVision program (Four measures per retina/ at least three retinas per condition). In order to measure vascular density, photographs of vascular plexus and migrating front were taken, and branching points

counted (4 photographs per retinas/ at least 3 animals per condition). Tip cell density at the migrating front was calculated based on the number of tip cell found at the migrating front reported by 100 μm of migrating front (tip cell density from the four petals of each retina/at least three retinas per condition). Width of the main veins was also measured at the first observable branching point using the Axiovision program (4 veins per retina/at least three retinas per conditions).

Retina lysis

The eyes of five-days-old pups were collected and dissected. Isolated retinas were frozen on dry ice and lysed in RIPA buffer pH 7.4 containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) sodium deoxycholate, 0.1% (w/v) SDS, 1mM EDTA, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin (Roche Applied Science), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 mM sodium fluoride, and 1 mM sodium vanadate. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay reagent (Pierce).

Nucleofection of HUVECs

HUVECs ($2\text{-}5 \times 10^6$ cells) were nucleofected using the Nucleofector II (program U-001; Lonza) with DEP-1 (Hs_PTPRJ_3_HP) or AllStars control siRNAs (Qiagen, Toronto, ON, Canada) using the Amaxa HUVEC Nucleofector Kit following manufacturer's recommendations. Cells were then incubated in M200 completed with LSGS for 48 hours before being processed for in vitro experiments.

Cell lysis and Western blotting

For in vitro cell stimulations, nucleofected cells ($3,5 \times 10^5$ cells/cm²) were plated on 0.2% gelatin-coated tissue culture plates for 48 hours, and then starved in M200 with 1% FBS for 3h hours prior to an overnight stimulation with VEGF (50ng/ml). For chemical inhibitors experiments, HUVEC cells were plated on gelatin (0,2%) at $3,2 \times 10^5$ cells/cm² for 48 hours. Then, cells were starved and pre-treated with inhibitors or vehicle for 3 hours and stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 18 hours. Cells were then 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 phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin. Protein concentration of lysates was determined using Bradford assay. Protein lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (0.45 µm) (Bio-Rad). Western blotting and ECL detection (Amersham Biosciences/GE Healthcare) were then performed according to the manufacturer's recommendations using the specified antibodies.^{95,423}

Data analysis

Densitometry analyses were performed with the Quantity One 4.6.3 software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Statistical significance was evaluated with the unpaired t-test using GraphPad Prism 6.0 software. P-values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

DEP-1 regulates the formation of tip cells and vessel branching during retinal vascularization

Previous work in our laboratory demonstrated that DEP-1 regulates the formation of capillaries in vitro and in vivo, prompting us to evaluate its implication in the sprouting process.^{125,423} The role of DEP-1 during sprouting angiogenesis was characterized in mice five days after birth (at P5) during retinal development. In the developing retina, blood vessels emerge from the centrally located optic disk and sprout toward the periphery.³⁰ Tip cells are part of the leading edge at the migrating front of the expanding retinal capillary network. In contrast, the vascular plexus is closer to the optic disk, and mainly encompasses endothelial stalk cells that proliferate and eventually form stabilized vessels.³⁰ To assess their status in control and DEP-1 knockout mice, developing retinal vessels were stained with FITC-Isolectin B4. Figure 1A shows that radial expansion was slightly decreased in DEP-1 KO mice. Further analysis of the network organization revealed that while no differences were observed at the vascular plexus (Fig. 1B), DEP-1 KO mice exhibited a much higher vascular density at the migrating front (Figure 1C). Since the number of tip cells determines the complexity of the vascular bed, we next investigated the abundance of tip cells at the leading edge of retinas from control and DEP-1 KO mice.¹⁷⁶ Consistent with the increased vascular density observed, a greater number of tip cells per length of vascular front (100 μm) was quantified in the retinas of DEP-1 KO mice (Fig. 1E). These data thus suggest that DEP-1 is a regulator of the tip cell phenotype during retinal sprouting angiogenesis.

Increased proliferation of endothelial cells in the retinas of DEP-1 KO mice

Proliferation of endothelial cells may be an additional limiting factor during the radial expansion and densification of the retinal vascular bed. It is strongly induced by VEGF, which is abundantly secreted in the surrounding hypoxic milieu.⁴²⁵ To investigate the possible contribution of DEP-1 to the proliferation of endothelial cells during retinal vascularization, we first evaluated the diameter of the main veins of the retinas of control and DEP-1 KO mice at their first branching point. Figure 1D shows that DEP-1 KO mice had larger veins than WT animals, suggesting greater proliferation of endothelial cells in these conditions. In endothelial cells, VEGF-induced proliferation is mainly mediated by PLC γ -dependent ERK1/2 activation.⁹⁸ To assess the status of this signaling pathway in control and DEP-1 KO mice, whole retina lysates were analyzed by Western blot. Figure 2A shows that ERK1/2 activation was increased in the retinas of DEP-1 KO mice, while the phosphorylation of its upstream regulator, PLC γ , was not affected. Since whole retinas are composed of multiple cells types, they were also co-stained with the proliferation marker Ki67 and FITC-isolectin B4 in order to validate the status of endothelial-specific proliferation. Consistent with increased ERK1/2 activation, Ki67+/isolectinB4+ cells from the plexus and the migrating front were more frequent in the retinas of DEP-1 KO mice at P5 (Fig. 2B).³⁰ Collectively, these results thus demonstrate an anti-proliferative function of DEP-1 in endothelial cells of the retina, and suggest that this feature may have contributed to the increased densification of the capillary network observed in DEP-1 KO mice.

DEP-1 promotes Dll4 expression and NICD accumulation

In addition to the enlarged blood vessels, DEP-1 KO mice exhibited an increased number of tip cells and greater branching at the migrating front, which resulted in a denser capillary

network (Fig. 1). Deregulation of the Notch signalling pathway is highly associated with these vascular features.^{191,168,176,190,175} Hence, we first investigated the expression of its ligand Dll4, which is the main sprouting regulator expressed by endothelial cells.¹⁵¹ Interestingly, we observed an important decrease of Dll4 expression in whole retina lysates from DEP-1 KO mice compared to controls (Fig. 3A). As Dll4 binding to Notch leads to its cleavage and the generation of the Notch intracellular domain (NICD), we also observed a great reduction in the amount of NICD in the retinas of DEP-1 KO mice. Since the translocation of the NICD to the nucleus is required to initiate a transcriptional program favouring the stalk cell phenotype, these results are consistent with the increased number of tip cells observed in the DEP-1 KO mice.¹⁷⁷ They also demonstrate that DEP-1 is an important mediator of Dll4 expression and Notch activation.

DEP-1 promotes a Src/Akt signalling pathway which induces VEGF-dependent Dll4 expression

Recent reports have suggested that Akt regulates Dll4 expression, Notch cleavage, and sprouting angiogenesis.^{140,172} We have previously demonstrated that in response to VEGF, DEP-1 promotes Akt activation through a Src/Gab1/PI3K signalling pathway.⁹⁵ In those cells, DEP-1 dephosphorylates the inhibitory tyrosine of Src (Y529), which leads to Src autophosphorylation (Y418) and full activation.^{113,95} Consistent with this, Src and Akt (S473) activation were impaired in retina lysates of DEP-1 KO mice, or in VEGF-stimulated DEP-1-depleted cells in vitro (Fig. 3B,C), in which Dll4 expression was also inhibited (Fig. 3A,C). Additional experiments performed with inhibitors of Src family kinases and PI3K, PP2 and LY294002, further demonstrated the implication of Src and Akt in the VEGF-dependent

expression of Dll4 in endothelial cells (Fig. 3D). Inversely, overexpression of DEP-1 led to increased Dll4 expression, while the latter was blocked by the expression of DEP-1 mutants unable to activate Src (YY/FF) or catalytically inactive (C/S) (Fig. 3E).¹¹³ Altogether, these results establish the importance of the DEP-1/Src/Akt pathway in the induction of VEGF-dependent Dll4 expression.

β -catenin transcriptional activity promotes Dll4 expression in a DEP-1/Akt-dependent fashion.

β -catenin/TCF complexes were shown to bind to the Dll4 promoter and to promote Dll4 expression, demonstrating that β -catenin transcriptional activation is crucial for proper Notch signalling.¹⁸⁰ Interestingly, Akt is a known regulator of β -catenin via two mechanisms: 1) directly by phosphorylating β -catenin on S552, which is associated with its translocation to the nucleus and 2) indirectly by inactivating GSK3 β , a key component of the β -catenin destruction complex, leading to β -catenin stabilization.^{426,427} Since VEGF is an important inducer of Dll4 and was reported to promote β -catenin stabilization and activation, we postulated that DEP-1 might be involved in the regulation of these processes via Akt activation.^{428,429,425,95,125,176} First, we assessed the Akt-mediated phosphorylation of β -catenin on S552 and observed its inhibition in the retinas of DEP-1 KO mice and in DEP-1 depleted cell lysates, in accordance with reduced Akt activation (Fig. 4A,B). These results suggest that, in response to VEGF, DEP-1 promotes β -catenin translocation to the nucleus. Secondly, we investigated the stabilisation of the β -catenin. We observed lower levels of β -catenin in the lysates of retinas from DEP-1 KO mice or DEP-1-depleted cells (Fig. 4A,B). Likewise, the

Akt-mediated inhibition of GSK3 β (S9), the main regulator of β -catenin degradation, is also impaired in DEP-1 KO mice and DEP-1-depleted cells, suggesting that DEP-1 might be implicated in β -catenin stabilization (Fig. 4A,B). To validate this, control and DEP-1-depleted HUVECs were incubated with the proteasome inhibitor MG132 prior to and during their stimulation with VEGF. As expected, the GSK3 β -dependent phosphorylation of β -catenin on S33/S37/T41 and β -catenin levels were increased in DEP-1-silenced cells compared to controls treated with MG132, supporting the conclusion that DEP-1 depletion caused an increased degradation of β -catenin (Fig. 4C). Knowing that DEP-1 regulates β -catenin stabilization and nuclear localisation, we next investigated whether it was also modulating β -catenin-dependent transcriptional activity. In the nucleus, activated β -catenin associates with the TCF/LEF transcription factor family to induce gene expression. β -catenin-dependent transcriptional activity was monitored in VEGF-stimulated control and DEP-1-depleted endothelial cells using the TOPflash TCF/LEF luciferase reporter assay. VEGF stimulation of control cells modestly increased β -catenin/TCF-mediated transcriptional activity, while it was greatly impaired in DEP-1-depleted cells, consistent with the altered β -catenin status in these cells (Fig. 4D). To ascertain that transcriptionally active β -catenin/TCF complexes were required for VEGF-induced Dll4 expression, their association and activity was blocked using PNU74654 or PKF115584. Results show that incubation of endothelial cells with either inhibitors abrogated VEGF-induced Dll4 expression, further demonstrating the crucial role of β -catenin transcriptional activation in this process (Fig. 4E).

Discussion

Recent evidences demonstrate that the protein tyrosine phosphatase DEP-1 acts as a promoter of angiogenic responses in vitro and in vivo.^{95,125,365,423} In this study, we demonstrate for the first time that DEP-1 is also an important regulator of Dll4 expression and of endothelial cell sprouting during retinal development. We propose that this is achieved via Src activation and the Akt-dependent induction of β -catenin transcriptional activity, a reported promoter of Dll4 expression.¹⁸⁰ In addition, through its ability to inactivate the proliferative ERK1/2 pathway, DEP-1 also controls the density of the developing vascular network of the retina.

Previous work from our laboratory demonstrated that DEP-1 regulates VEGF-induced angiogenic responses via its ability to activate the Src kinase.^{95,125,365,423} Hence, DEP-1 was shown to regulate VEGF-induced endothelial cell survival, invasion, vascular permeability, and capillary formation in vitro.^{95,125,365} In vivo, physiological or pathological angiogenesis as well as Src activation were impaired in adult DEP-1 KO mice, further demonstrating the positive and essential role of DEP-1 during these processes.⁴²³ Contrasting with these results, we show here that similarly to embryonic vascular development, retinal vascularisation still occurred in these animals (Fig. 1). However, while capillaries still formed in the retinas of DEP-1 KO mice, we found that their proper development was impaired. Indeed, in the absence of DEP-1 expression, an increase in vascular density characterized by a greater number of branching points at the migrating front was found. Consistent with this, a larger number of tip cells was also observed in the retinas of DEP-1 KO mice, showing for the first time that DEP-1 controls endothelial sprouting and the proper development of the retinal vascular network.

The regulation of endothelial sprouting is mainly regulated by the expression of Dll4, a Notch ligand, which limits tip cell formation and favours the stalk cell phenotype.^{176,190,192,191,177} While it is broadly accepted that VEGF stimulation induces Dll4 expression, the molecular pathways implicated are still ill-defined.¹⁷⁶ Here we show for the first time that DEP-1 is a promoter of Dll4 expression and, consequently, of Notch activation (Fig. 5). It was previously demonstrated that expression of a dominant-negative Akt mutant or PI3K inhibition impaired Dll4 expression.^{140,172} As DEP-1 expression was shown to be required for Src and downstream Akt signalling in endothelial cells in response to VEGF in vitro and during retinal vascular expansion (Figs. 3 and 4A), these results suggest that through its ability to activate Src and Akt, DEP-1 can lead to Dll4 expression.^{95,113} Furthermore, endothelial cells treated with chemical inhibitors targeting Src or PI3K were also deficient in their ability to promote Dll4 expression, supporting our conclusions (Fig. 3D).

The β -catenin transcriptional complex was reported to directly bind to the Dll4 promoter, and its transcriptional activity was shown to be critical for Dll4 expression.¹⁸⁰ Accordingly, we observed that the decreased expression of Dll4 in DEP-1 KO mice or DEP-1-silenced endothelial cells correlated with the reduced phosphorylation of β -catenin on S552 and with its decreased levels (Figs. 4). Interestingly, in these conditions, an important regulator of β -catenin phosphorylation and degradation by the proteasome, GSK3 β , was more active as indicated by its decreased inhibitory phosphorylation on S9 (Fig. 4). Since GSK3 β phosphorylation is mainly mediated by Akt and that Akt phosphorylates β -catenin on S552 to allow its nuclear translocation, these results suggest that DEP-1, via the Src-Akt pathway, regulates β -catenin transcriptional activity in response to VEGF stimulation.^{430,427} The results

presented here thus suggest that through these signalling pathways, DEP-1 promotes Notch signalling during retinal vascularization. Consistent with our findings, DEP-1 expression in Zebrafish was shown to promote arterial specification, which is also dependent on Notch activation.³⁴⁰

In addition to increased branching, we have also noted the increased proliferation of endothelial cells in DEP-1 KO mice (Ki67 staining – Fig. 2), consistent with the increased densification of the vascular network in their retinas. In response to VEGF, DEP-1 is known to negatively regulate proliferation through dephosphorylation of VEGFR2 and the consequent down-modulation of the proliferative PLC γ -ERK1/2 signaling cascade.⁴³¹ However, in the retina, the regulation of cell proliferation by DEP-1 seemed to occur downstream of PLC γ as there was no difference in its activation level between WT and DEP-1 KO mice. A possible explanation is that DEP-1 may be dephosphorylating ERK1/2 directly through its recruitment via its KIM domain as previously reported.³⁶² On the other hand, it has been reported that Akt activation results in inhibition of Raf, an upstream regulator of ERK1/2, and consequently in limiting proliferation.⁴³² As DEP-1 KO mice exhibit impaired Akt activation, it is possible that ERK1/2 is activated through the relieved inhibition of its upstream regulator. Also, the activation of Notch leads to the inhibition of ERK1/2 activation and, consequently, of proliferation.^{433,434} In the absence of DEP-1 and Notch activation, ERK1/2 activation would increase. Of note, ERK1/2 has also been identified as a promoter of retinal and developmental angiogenesis in vivo.^{435,436} Interestingly, we similarly observed that the inhibition of ERK1/2, using PD98059, resulted in the reduced expression of Dll4 in response to VEGF in vitro (Supp Fig. 1). However, since DEP-1 KO mice exhibit higher activation levels of ERK1/2 (Figure 2),

but still show reduced Dll4 expression, we conclude that the VEGF-induced signaling pathways involving Akt and β -catenin are also critical for optimal Dll4 expression.

Collectively, these results identify DEP-1 as a novel critical regulator of the Dll4-Notch signalling pathway controlling the proliferation and sprouting abilities of endothelial cells during retinal vascular development and might provide new insight on therapeutic approaches for vascular pathologies.

Figure legends

Figure 1 : DEP-1 loss increases sprouting during retinal angiogenesis. Retinas were isolated from five-days-old mice pups, fixed and blood vessels stained using FITC-lectin B4. A, A slight decrease of radial expansion was observed in DEP-1 KO mice. B, No difference of vessel density at the retinal plexus was observed. C, However, DEP-1 KO mice exhibit greater number of branching points at migration front. D, Width of vein at first branching point was also increased in DEP-1 KO animals. E, Number of tip cells per 100 μ m was counted.

Figure 2 : DEP-1 acts as an inhibitor of endothelial proliferation during retinal development. A, retinas were lysed and resolved by Western blots using specified antibodies of VEGF-dependent proliferation pathway. Densitometry analysis were performed on n=5. B, five-days-old pups retinas were collected, fixed and process for immunofluorescence using FITC-lectin B4 and Ki67. Ki67 and FITC-lectin B4 positive cells were counted at retinal plexus and near migrating front (cells/pictures; 5 pictures/animals; n=3).

Figure 3 : Expression of the Notch ligand Dll4 depends on DEP-1 expression in vivo. A, Retinas of five-days-old pups' were collected, lysed and resolved by Western blot using specified antibodies. Dll4 expression was inhibited in DEP-1 KO animals, which correlates with the decreased cleavage of Notch (NICD). B, Alternatively, activation of the Src-Akt signalling pathway was analyzed. C, siRNA-treated HUVEC cells were starved 3h in 1%FBS media, stimulated 18h with VEGF (50ng/mL) and lysed. D, Alternatively, HUVEC cells were treated with Src or PI3K inhibitors, PP2 (10 μ M) and LY29004 (10 μ M), during starvation and stimulation. E, DEP-1 WT, DEP-1 Y1311Y1320/FF, DEP-1 C/S or empty vector was transfected in HUVEC cells using Lipofectin. Cells were then starved, stimulated and lysed as mentioned above. Lysates were analysed by Western blot using the specified antibody. Densitometry analysis was performed on at least 4 independent experiments.

Figure 4 : DEP-1 promotes VEGF-induced β -catenin stabilization and expression of Dll4. A, Retinas of five-days-old pups' were collected, lysed and resolved by Western blot

using specified antibodies. B, HUVEC were nucleofected with DEP-1-targeting or control siRNAs. Two days later, cells were starved in M200 medium containing 1% FBS for 3h, and stimulated for 18h with VEGF (50ng/mL). Whole cell lysates were resolved by Western blot using the specified antibodies. C, Alternatively, siRNA nucleofected cells were treated with MG132 (proteasome inhibitor; 1 μ M) while starving and stimulated for 18h with VEGF. D, siRNA nucleofected cells were transfected with TopFlash and Renilla. After 24h, cells were starved, stimulated and lysed as mentioned above. TCF-dependent transcriptional activity was evaluated using Dual luciferase reporter assay kit. E, HUVEC cells were treated with inhibitors of β -catenin/TCF association and activity, PNU74654 (100 μ M) and PKF115584 (0,5 μ M), during starvation and stimulation.

Figure 5 : DEP-1 regulates endothelial sprouting via the promotion of Dll4 expression. In response to VEGF, DEP-1 promotes Src activation leading to Akt activation. Akt regulates β -catenin directly by phosphorylating its S552, cueing for its nuclear translocation, and indirectly by inhibiting GSK3 β , a major component of the β -catenin destruction complex. In that cellular state, β -catenin is less degraded, translocates to the nucleus, and consequently, is more available for transcriptional activity. In the nucleus, active β -catenin associates with TCF/LEF transcription factor to induce Dll4 expression.

Figures

Figure 1 : DEP-1 loss increases sprouting during retinal angiogenesis.

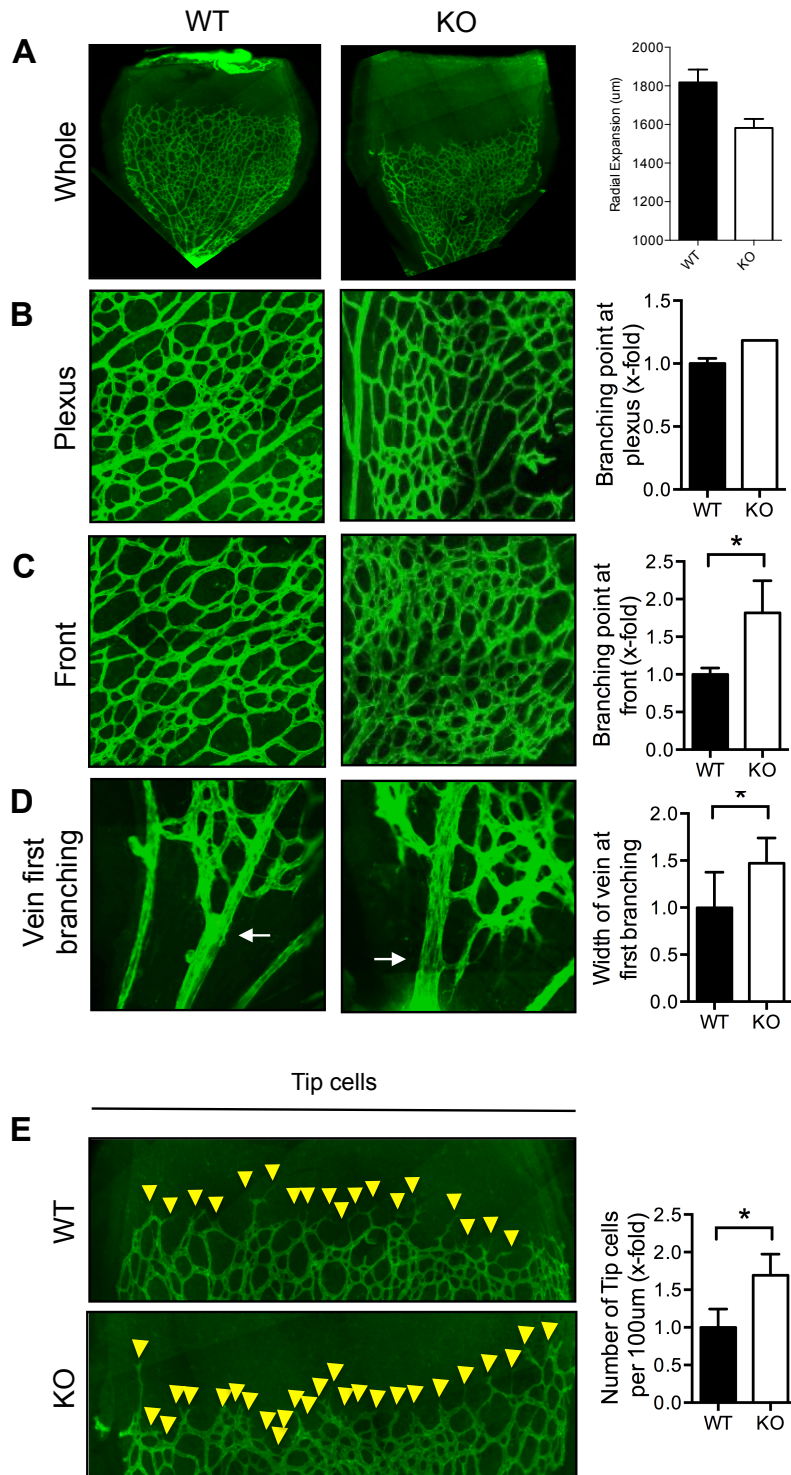


Figure 2 : DEP-1 acts as an inhibitor of endothelial proliferation during retinal development.

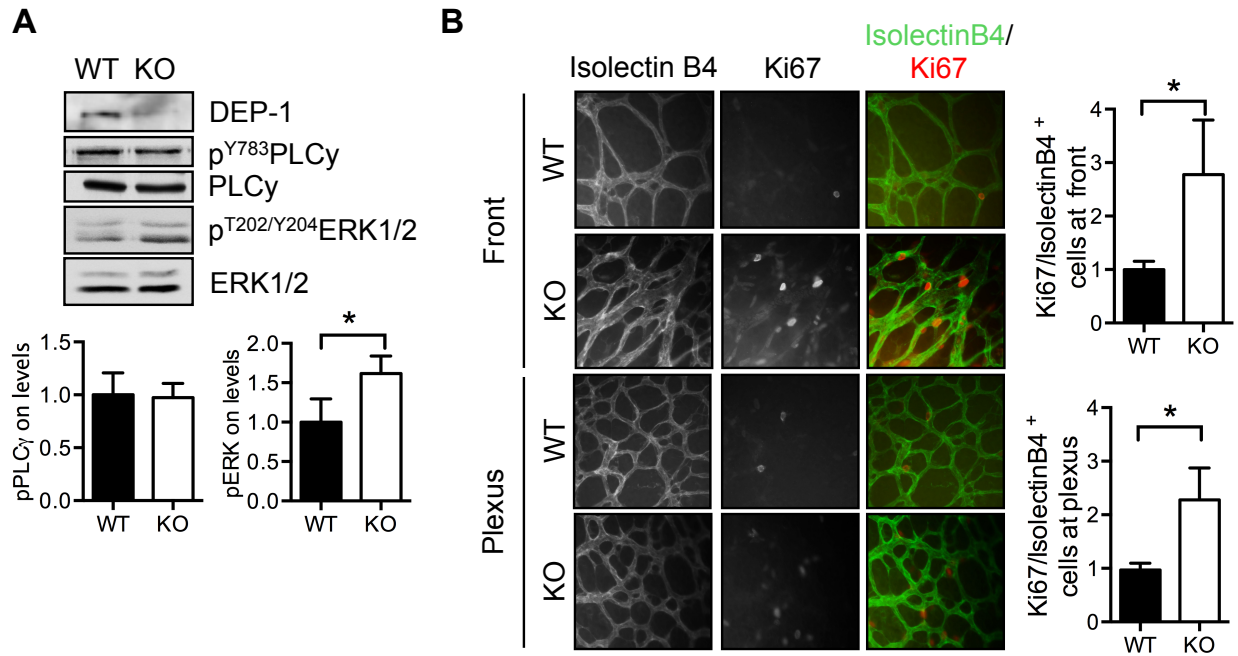


Figure 3 : Expression of the Notch ligand Dll4 depends on DEP-1 expression in vivo.

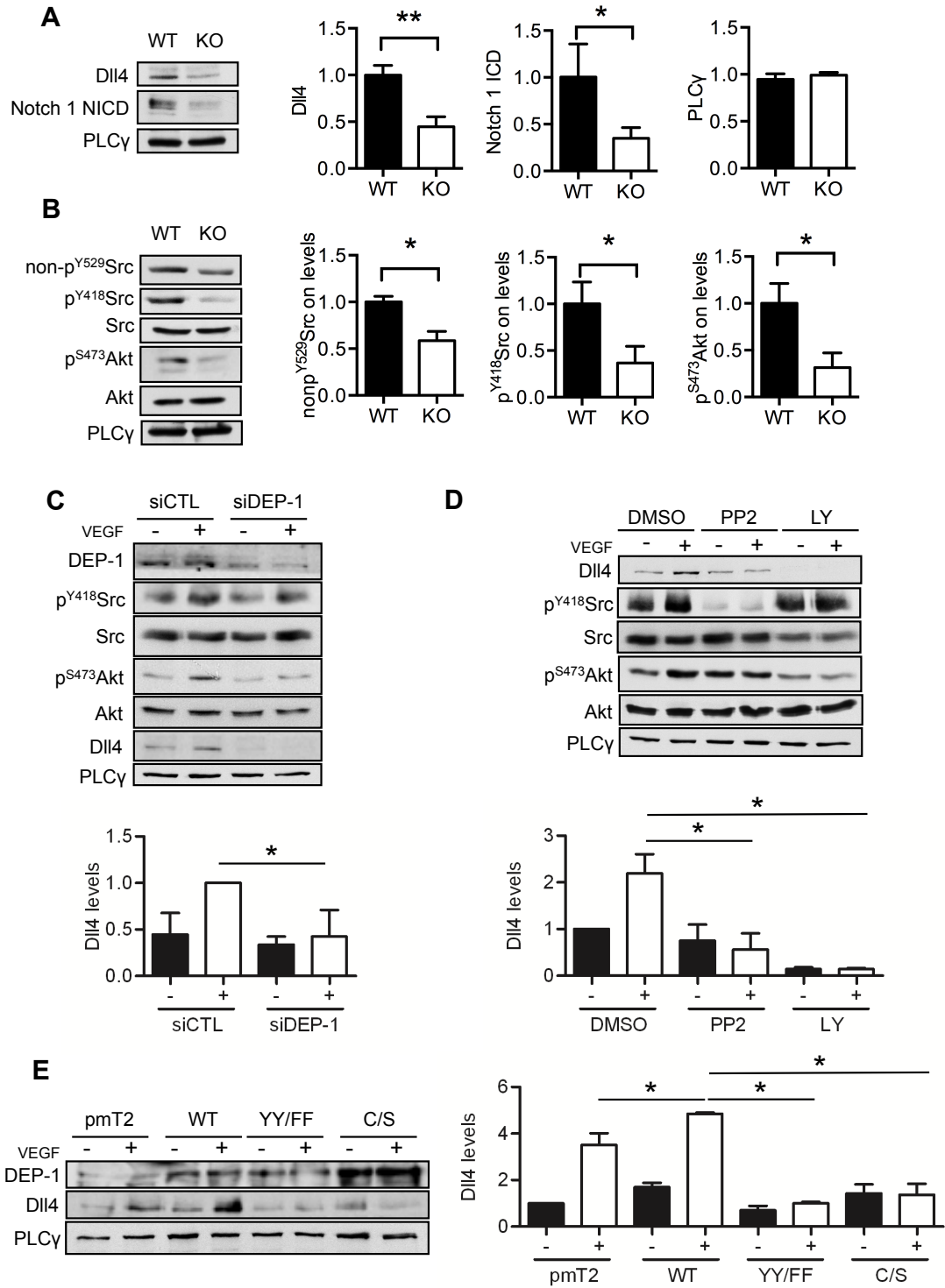


Figure 4 : DEP-1 promotes VEGF-induced β -catenin stabilization and expression of DII4.

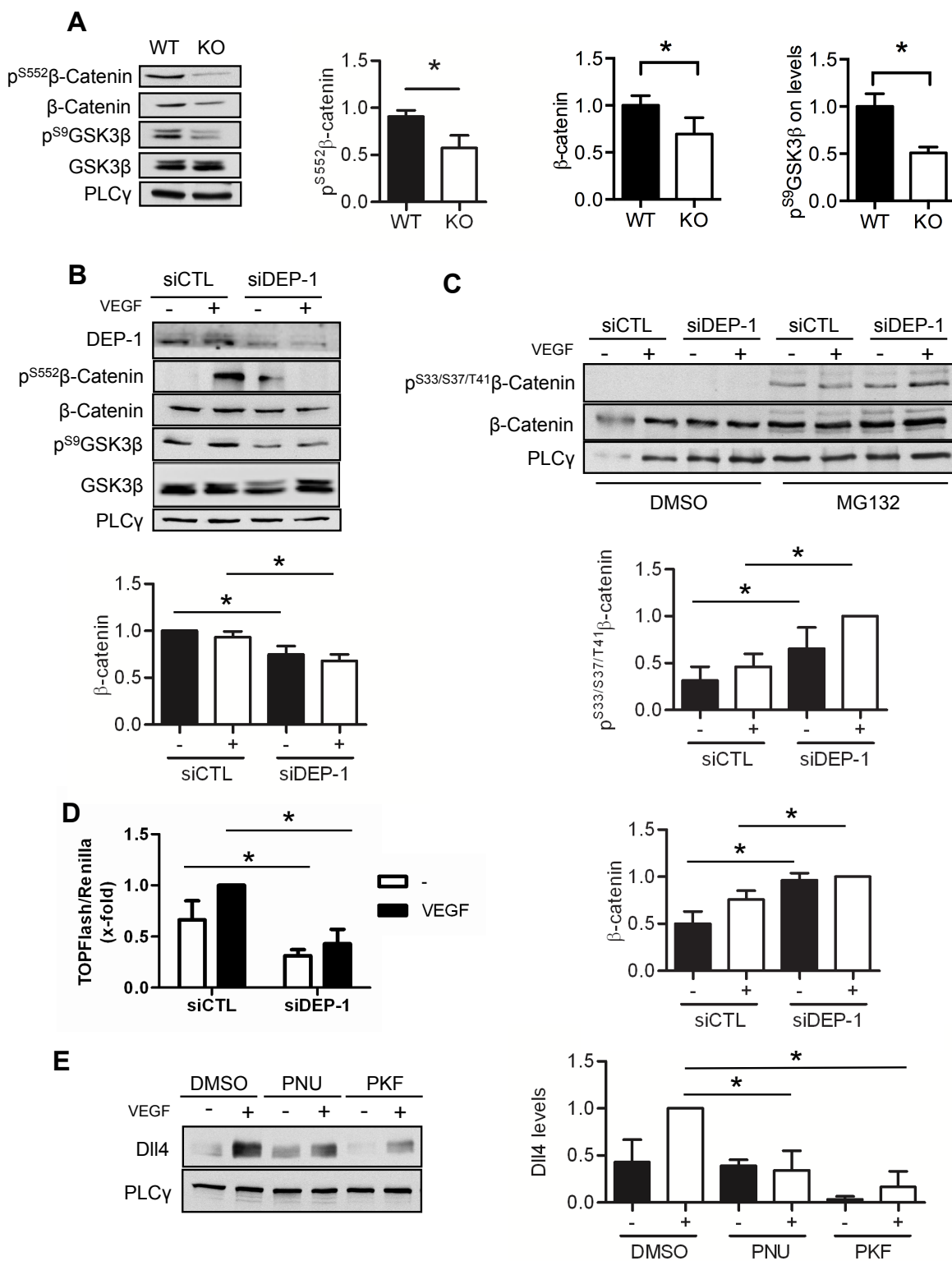
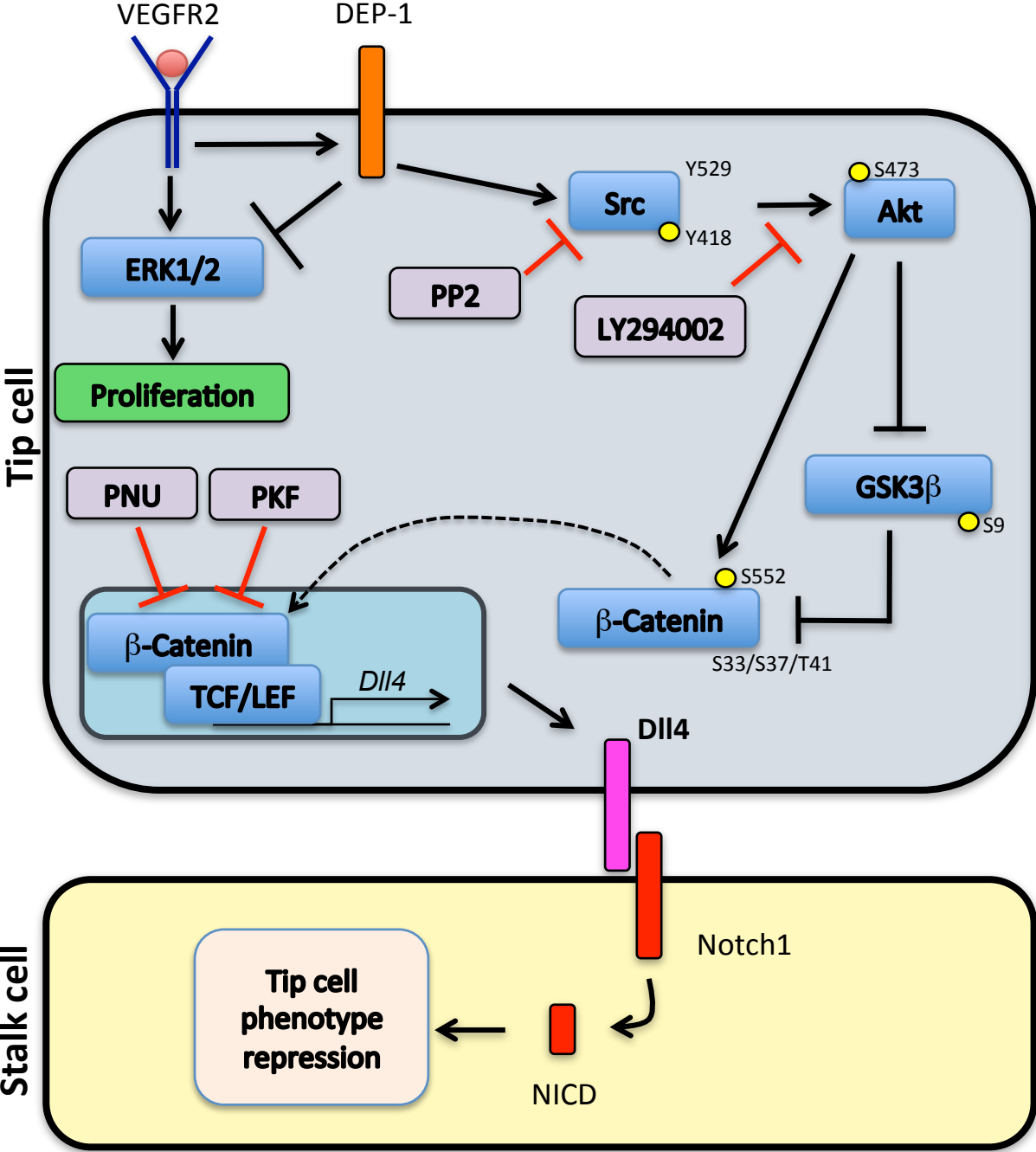
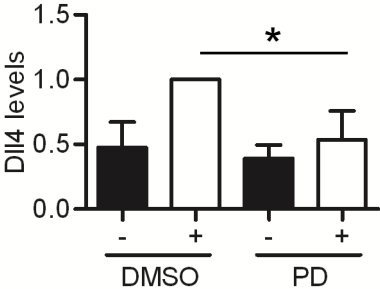
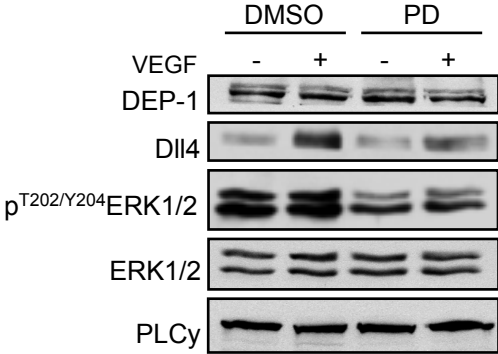


Figure 5 : DEP-1 regulates endothelial sprouting via the expression of Dll4



Supplemental figure 1 : ERK1/2 contributes to VEGF-induced Dll4 expression in vitro



CHAPITRE IV

The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes
breast cancer cell invasion and metastasis

Kathleen Spring^{1#}, Patrick Fournier^{1#}, Line Lapointe¹, Catherine Chabot¹, Jacinthe Roussy¹,
Sandra Pommey¹, John Stagg^{1,2}, and Isabelle Royal^{1,3*}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, and
Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC, Canada ; ²Faculty of Pharmacy, and

³Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Contribution des auteurs:

KS a réalisé les expériences des figures 1A, 1D-E, 2, 3 et 5

PF a réalisé les expériences des figures 1B, 4A, 4C-F, 6 et 7A-B

LL a réalisé en partie les expériences des figures 1A, 1D, 1E et 2A

CC a réalisé les expériences préliminaires des figures 1 et 2.

JR a réalisé les expériences des figures 4B

SP et JS ont généré les lignées cellulaires infectées par shRNA.

IR a conçu les expériences et écrit le manuscrit.

The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and
metastasis

Kathleen Spring^{1#}, Patrick Fournier^{1#}, Line Lapointe¹, Catherine Chabot¹, Jacinthe Roussy¹,
Sandra Pommey¹, John Stagg^{1,2}, and Isabelle Royal^{1,3*}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, and
Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC, Canada ; ²Faculty of Pharmacy, and
³Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Running title: Role of DEP-1/PTPRJ in invasion and metastasis

#Contributed equally to this work.

Financial support: This work was supported by a Cancer Research Society/Quebec Breast Cancer Foundation grant (I.R). K.S. and C.C. held partial studentships from Université de Montréal. P.F was supported by FRQS (25988) and CIHR (292353) studentships. K.S., P.F., C.C. and J. R. also held partial studentships from the Montreal Cancer Institute.

Abstract

DEP-1/PTPRJ is a receptor-like protein tyrosine phosphatase mainly known for its anti-proliferative and tumor suppressive functions. Many identified substrates are growth factor receptors, and DEP-1 is deleted and/or mutated in human cancers including that of the breast. However, DEP-1 was also identified as a promoter of Src activation and pro-invasive functions in the endothelium, suggesting it could perhaps mediate breast cancer invasiveness that is likewise driven by Src family kinases. We show here that DEP-1 expression was greater in highly invasive breast cancer cells (MDA-MB-231, Hs578T, BT-549) than in the less invasive or untransformed cell lines tested (MCF7, T47D, SK-BR3, and MCF10A). DEP-1 silencing experiments in invasive cells demonstrated that moderately expressed and catalytically active DEP-1 was required, in collaboration with basal EGFR activity, for Src activation and the phosphorylation of its substrate Cortactin, and for their co-localization at the cell's leading edge. This correlated with an increased number of cell protrusions, and an enhanced capacity of the cells to migrate and invade. Similarly, moderate overexpression of DEP-1 in the low-invasive cells resulted in the promotion of their invasiveness in a Src-dependent manner. Consistent with these data, the expression of endogenous DEP-1 was elevated in a bone metastatic cell line derived from MDA-MB-231 cells, and promoted increased Src Y418 and Cortactin Y421 phosphorylation, as well as pro-MMP9 secretion and Matrigel invasion. Importantly, the silencing of DEP-1 in MDA-MB-231 cells greatly decreased their ability to metastasize, despite having no effect on tumor growth or angiogenesis. Hence, we found that moderate expression of DEP-1 was associated with the increased relapse and decreased survival of breast cancer patients. These results therefore identify a new and unsuspected role for DEP-1 as a mediator of an invasive cell program implicating Src activation and the promotion of breast cancer progression.

Keywords: Breast cancer, protein tyrosine phosphatase, DEP-1/PTPRJ, Src, invasion, metastasis.

Introduction

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are important antagonists of tyrosine kinase-dependent signaling, and regulate various biological responses such as cell proliferation, migration, and transformation.^{338,437} Although mainly regarded as negative regulators with tumor suppressive functions, increasing evidence demonstrates that PTPs can also exhibit positive and oncogenic roles depending on the cellular context.^{338,405} DEP-1/PTPRJ/CD148 is a receptor-like PTP reported to be mutated or deleted in human breast, colon, lung, thyroid, and meningioma cancers, as well as in hematological malignancies including non-Hodgkin's lymphoma.^{402,398,400,438,390} In addition, single nucleotide polymorphisms in the extracellular domain of DEP-1 have been associated with the risk of developing several cancers, further suggesting a prominent role for DEP-1 in tumorigenesis.^{403,439,440,441,405}

Increased expression of DEP-1 has been associated with the negative regulation of cell proliferation and transformation, and with the induction of cell differentiation.^{94,387,399,442,395,390,394} Consistent with these roles and with the enriched localization of DEP-1 at adherens junctions,³⁴⁵ many substrates of DEP-1 are cell-cell adhesion proteins^{388,346,347} and receptor tyrosine kinases (RTKs).^{349,347,94,95,393,392,384} In contrast, DEP-1 was also shown to positively regulate various biological functions including B cell and macrophage development, platelet activation, cell adhesion and angiogenesis, through its ability to dephosphorylate the inhibitory tyrosine residue of Src family kinases (SFKs; Y529 in Src) and allow their autophosphorylation and activation (Y418 in Src).^{226,363,443,95,113} SFKs induce many cellular processes such as proliferation, migration/invasion and survival,^{252,444} and are often over-expressed or over-activated in

cancers including that of the breast, where they promote cancer progression and metastasis.^{445,446,447,448,449, 258, 243,450,451}

Most breast cancer deaths are due to the formation of metastases in the bones, lungs, and brain.^{452,453} Gene expression profiling of breast tumors has identified distinct molecular subgroups that can be broadly distinguished based on their expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and epidermal growth factor receptor 2 (HER2).⁴⁵⁴ About 15% of diagnosed breast cancers do not express these receptors, and are defined as “triple-negative” breast cancers (TNBC).^{455,456} These are generally more aggressive, and affected patients have faster relapses and a poor clinical outcome.⁴⁵⁵ Signaling networks activated by growth factor receptors (such as EGFR) and SFKs are enriched in this subgroup of tumors, as well as in other subtypes of drug-resistant aggressive tumors, where they mediate increased proliferation, invasion, and epithelial-mesenchymal transition.^{457,458,459,460,456,461,451,462}

Here, we show that DEP-1, in collaboration with EGFR, promotes the activation of Src and the invasion of aggressive breast cancer cells, which in contrast to the untransformed or less invasive cells tested, express increased levels of DEP-1. Importantly, we show for the first time that DEP-1 levels in breast tumor cells correlate with their ability to metastasize, and with the increased risk of breast cancer patients to relapse and die from their disease.

Results

DEP-1 expression is higher in invasive breast cancer cells and mediates Src activation

DEP-1 has been described as an inhibitor of cell proliferation and a tumor suppressor in many types of cancers.^{94,387,399,442,395,390,394} However, we demonstrated that DEP-1 could also positively modulate Src activity and pro-angiogenic functions such as invasion in VEGF-stimulated endothelial cells.^{95,113,365} Since Src activation is associated with breast cancer progression and increased invasiveness,^{445,446,447,448,449,258,243,450} we therefore investigated if DEP-1 might also promote this pathway in breast cancer cells. As a starting point, the expression level of DEP-1 was evaluated in highly invasive (TNBC cell lines expressing high levels of EGFR: MDA-MB-231, Hs578T and BT-549) or less invasive cell lines (ER/PR-positive cell lines T47D and MCF-7, and the HER2-positive SK-BR3 cell line). Surprisingly, despite the tumor suppressor functions of DEP-1, a moderate but higher DEP-1 expression was detected in the more invasive cell lines compared to the less invasive or non-tumorigenic MCF10A breast cells (Figures 1A and 1B). Similarly, analysis of gene expression data (Oncomine cancer profiling database)⁴⁶³ also showed that DEP-1 was preferentially expressed in invasive carcinomas compared to normal breast tissue (Figure 1C). Interestingly, DEP-1 expression in the breast cancer cell lines tested did not correlate with the level of basal Src activation (Figure 1A). However, the efficient silencing of DEP-1 (average of 80-90% decrease) with two siRNAs impaired the activating phosphorylation of Src on Y418 in the aggressive cell lines, but not in the less invasive ones (Figures 1D and 1E). These findings demonstrate that greater expression of DEP-1 is detected in highly invasive breast cancer cells, and that this is critical for the basal phosphorylation/activation of Src.

DEP-1 promotes pro-invasive signaling in MDA-MB-231 and Hs578T cells.

Activated Src can induce a pro-invasive signaling pathway in cancer cells, via the tyrosine phosphorylation of its target Cortactin, which promotes actin polymerization and lamellipodia stabilization during directed cell migration, matrix metalloprotease and extracellular matrix secretion, and metastasis.^{464,465,466,467,468,469} To find out if DEP-1 expression was regulating this pathway, the phosphorylation of Src and Cortactin was assessed in DEP-1-silenced MDA-MB-231 and Hs578T cells. Figure 2A and Supplementary Figure 1 show that Src dephosphorylation on Y529 and phosphorylation on Y418 were decreased in DEP-1-silenced cells following FBS stimulation compared to control cells. Consistent with this, the phosphorylation of Cortactin on the Src-dependent tyrosine 421 residue was similarly impaired.

Since membrane-associated Src and Cortactin promote the formation and stabilization of membrane protrusions in response to growth factor stimulation,^{464,467,470,471} we next investigated their cellular localization in sparsely seeded control and DEP-1-silenced MDA-MB-231 cells upon stimulation with FBS. Immunofluorescence staining experiments revealed that phosphorylated Src and Cortactin were enriched in membrane protrusions of control cells where DEP-1 was also concentrated (Figure 2B). However, this protein enrichment as well as the number of cell protrusions were greatly decreased in DEP-1-depleted cells. These results demonstrate that DEP-1 is implicated in the formation of membrane protrusions in breast cancer cells, and that this most likely involves its ability to mediate Src and Cortactin activation in these membrane domains.

DEP-1 expression is required for the migration and invasion of breast cancer cells

The previous results suggested that DEP-1 might function as a mediator of breast cancer cell migration and invasion. To test this, control and DEP-1-silenced MDA-MB-231 and Hs578T cells were first submitted to a scratch assay. Figure 3A shows that gap closure was delayed in DEP-1-depleted cells compared to controls. The silencing of DEP-1 also strongly decreased their invading capacity into Matrigel (Figure 3B). In contrast, the invasiveness of the less aggressive T47D and SK-BR-3 cells, which express low levels of DEP-1, was not affected by its silencing (Figure 3C). However, moderate overexpression of DEP-1 in these cells promoted Src activation and Matrigel invasion, which were both abrogated by the Src inhibitor PP2 (Figure 3D). These results highlight for the first time that concomitant with its ability to activate Src, endogenously expressed DEP-1 promotes the pro-migratory and pro-invasive functions of highly invasive breast cancer cells. Moreover, they further show that its moderate overexpression in less aggressive cells is sufficient to stimulate their invasiveness in a Src-dependent manner.

Catalytically active DEP-1 promotes MDA-MB-231 cell invasion, but not cell proliferation, in a Src- and EGFR-dependent manner

To demonstrate that the phosphatase activity of DEP-1 and its ability to activate Src were critical for the invasion of highly aggressive breast cancer cells, rescue experiments were performed. MDA-MB-231 cells were first infected with lentiviruses encoding control (shScramble) or two DEP-1 shRNAs (Figure 4A). The knockdown of DEP-1 expression led as expected to reduced Src and Cortactin basal activation, although the # 2872 shRNA was more potent. Consistent with this, the invasive capacities of both shDEP-1 cell populations were proportionally inhibited (Figure 4A). In contrast, despite the fact that DEP-1 has mainly been described as an inhibitor of cell proliferation,^{94,387,399,442,395,390,400} no difference in the

proliferation of control and shDEP-1 cells was observed for up to 4 days in culture (Figure 4B). Re-expression of WT DEP-1 in shDEP-1 cells restored Src and Cortactin phosphorylation (Figures 4C and 4D). However, no significant rescue was observed upon re-expression of the catalytically inactive DEP-1 C/S mutant or the DEP-1 Y1311F/Y1320F mutant that is unable to interact with and activate Src.¹¹³ Consistent with these results, only WT DEP-1 was able to promote the invasion of shDEP-1 MDA-MB-231 cells (Figure 4D). Still, as previously reported in endothelial cells,¹¹³ only moderate but not excessive levels of DEP-1 could promote Src activation and MDA-MB-231 cell invasion (Figure 4E and Supplementary Figure 2). Moreover, we also observed that incubation of the shDEP-1 2872 MDA-MB-231 cells re-expressing WT DEP-1 with PP2 and the EGFR inhibitor AG1478 similarly abrogated DEP-1-induced Src signaling and cell invasion (Figure 4F). Collectively, these results demonstrate that basal EGFR activity contributes with moderately expressed and catalytically active DEP-1 to promote Src and Cortactin activation required for MDA-MB-231 cell invasion.

DEP-1 expression is increased in a metastatic explant of MDA-MB-231 cells

An essential step for cancer progression is the ability of tumor cells to metastasize at distant sites. Src activity drives the formation of breast cancer metastases,^{472,449,448,450,473,258} and was reported to be increased in a bone metastatic explant of MDA-MB-231 cells (1833 variant).⁴⁴⁸ Based on our results linking DEP-1 expression to Src activation and cell invasion, we first investigated if DEP-1 expression was also elevated in this metastatic cell line. Figure 5A shows that Src Y418 phosphorylation was increased in 1833 cells compared to the parental MDA-MB-231 cells, as previously shown.⁴⁴⁸ Interestingly, DEP-1 expression was also higher in this cell line, and correlated with increased Cortactin phosphorylation, consistent with the greater ability of 1833 cells to invade Matrigel (Figure 5B). Conversely, DEP-1 silencing

blocked Src and Cortactin activation (Figure 5C), and significantly impaired cell invasion and the secretion of pro-MMP-9 (Figures 5D-5E). Thus, higher DEP-1 expression in the metastatic explant 1833 cell line correlates with enhanced Src-dependent pro-invasive signaling.

DEP-1 is not required for tumor growth or neovascularization, but induces a Src-dependent invasive signaling pathway in tumors and promotes breast cancer metastasis

Since cell migration and invasion are key steps of tumor cell metastasis, we investigated the role of DEP-1 during *in vivo* tumor growth using the MDA-MB-231 control and shDEP-1 cell populations. Consistent with our *in vitro* proliferation data, no significant differences in tumor volumes were observed between NSG mice injected with control or shDEP-1 2872 MDA-MB 231 cells (Figure 6A). We also did not see any changes in the extent of tumor vascularization (Figure 6B). However, Western blot analyses demonstrated that phosphorylation of Src and Cortactin was impaired in DEP-1-silenced tumors (Figure 6C). Consistent with these results, the presence of lung metastases in mice bearing DEP-1-silenced tumors was greatly reduced (Figure 6D). Importantly, a similar trend was observed following the injection of shDEP-1 2870 MDA-MB-231 cells (Supplementary Figure 3). Despite a less efficient silencing of DEP-1 in these cells (Figures 4A, 6, and Supplementary Figure 3), a proportional decrease in Src signaling and lung metastatic burden was observed. Altogether, these data demonstrate that DEP-1 does not mediate the proliferative and angiogenic functions of MDA-MB-231 tumor cells, but importantly show for the first time that it can promote breast cancer metastasis.

Moderate DEP-1 expression correlates with decreased survival of breast cancer patients

To test if there was a correlation between DEP-1 expression levels in invasive breast cancers and the severity of the disease, we first investigated the expression of DEP-1 in relation to disease-specific survival in a cohort of patients with invasive breast cancer (GSE3494 dataset downloaded from NCBI's Gene expression Omnibus). Since only moderate expression of DEP-1 promoted activation of the Src invasive pathway in breast cancer cells (Figure 4E and Supplementary Figure 2), tumors were classified into "high", "intermediate", and "low" expressing groups, representing the top 25%, 50% intermediate, and 25% lowest DEP-1 expressers, respectively. Kaplan-Meier analysis demonstrated that the disease-specific survival of patients whose tumors expressed intermediate levels of DEP-1 was significantly worse (Figure 7A; $p=0.024$). A similar analysis was also performed on a cohort of lymph-node-negative patients that provided relapse-free survival times (GSE2034 dataset). Although results were not statistically significant ($p=0.107$), moderate expression of DEP-1 (here, the 70% intermediate expressers) was also associated with the highest probability to relapse (Figure 7B). Thus, overall, these results suggest that the ability of moderately expressed DEP-1 to activate the pro-invasive Src pathway correlates with an increased probability of breast cancer patients to develop distant metastases and die from their disease.

Discussion

PTPs are emerging as critical regulators of breast cancer initiation and progression.

^{474,336,475,476,477,331,478} In this study, we demonstrate for the first time that higher levels of DEP-1 are detected in invasive breast cancer cells, and importantly promote their ability to invade

and form metastases. We show that this is due to the capacity of moderately expressed DEP-1, in collaboration with EGFR, to activate the Src kinase and the downstream phosphorylation of Cortactin, a pathway that is closely associated to breast cancer progression.^{460,459,465,479,445,449,258} Further supporting these findings, we show that moderate expression of DEP-1 correlates with the increased relapse and decreased survival of breast cancer patients (See model, Figure 7C).

The results presented here were somewhat unexpected considering that DEP-1 has mainly been reported to behave as a tumor suppressor.^{402,400,398,438,390,387,395,399,442} However, our group previously demonstrated that in endothelial cells, moderately expressed DEP-1 promotes Src activation in response to angiogenic growth factors, and that this is essential for the phosphorylation of Cortactin and cell invasion.^{95,113} As Src kinases are critical promoters of breast cancer cell invasion and metastasis^{445,446,447,448,449,258,243,450,451}, the current findings demonstrate for the first time that DEP-1 is involved in the activation of this critical pathway in invasive breast cancer cells. Cortactin is an important Src substrate linked to the acquisition of motile and invasive cellular capacities.^{480,466,467,481,468,482} The decreased phosphorylation of Cortactin in the DEP-1-silenced MDA-MB-231 and Hs578T cells therefore demonstrates that a fundamental pro-migratory and pro-invasive pathway is controlled by DEP-1 in these cells. In that same line of thought, the increased expression of DEP-1 in a highly invasive metastatic explant derived from MDA-MB-231 cells (Figure 5), and its role in promoting higher Src activity, pro-MMP9 secretion, and invasive capacity, strongly supports a contribution for DEP-1 to the enhanced metastatic potential of these cells. Accordingly, we showed that DEP-1 expression in MDA-MB-231 cells was required for the efficient formation of metastases in NSG mice (Figure 6 and Supplementary Fig. 3). Based on our accumulated data, we conclude that this was mainly due to the increased invasive capacities of the cells mediated by expression of DEP-1.

Consistent with our experimental data, analysis of clinical datasets indicated that intermediate expression of DEP-1 in invasive breast cancers correlated with faster relapse and the decreased survival of patients. In contrast, the groups of patients whose tumors expressed the lowest and highest levels of DEP-1 were both found to have a better outcome (figure 7). In light of what we have shown in vitro and in vivo, where DEP-1-silenced cells or cells overexpressing the highest levels of DEP-1 are unable to activate the Src invasive pathway, we propose that tumors within these two groups were significantly less aggressive possibly due to the repressed activation of this pathway. Similar survival analyses were performed by Smart et al.,³⁹⁰ and despite the fact that tumors expressing intermediate levels were not included in their study, both “high” and “low” groups of patients from one cohort also had a similar overall survival probability. Unfortunately, a too small number of TNBCs included in the cohorts we analyzed precluded any conclusions to be drawn with respect to DEP-1 expression and survival in this particular tumor subtype. However, in addition to their involvement in TNBCs, Src and EGFR also mediate breast cancer progression in hormone-resistant cancers^{460,459}, suggesting a general relationship between DEP-1 expression and the progression to highly aggressive breast cancers. Also consistent with this hypothesis, DEP-1 expression was found to be higher in the most invasive breast cancer cell lines and carcinomas compared to less invasive cells or normal breast tissues evaluated (Figures 1 and 5), and its over-expression in the less invasive cancer cell lines (SK-BR3 and T47D) was sufficient to promote their increased invasiveness in a Src-dependent manner (Figures 1, 3). Collectively, our results therefore suggest that moderate expression of catalytically active DEP-1 and the downstream activation of the Src pathway are linked to the promotion of a pro-invasive and pro-metastatic phenotype in breast cancer cells.

We have observed that the reduced expression of DEP-1 in MDA-MB-231 cells had no impact on their proliferation in vitro and in vivo (Figures 4, 6, and Supplementary Figure

3). This is in contrast to several studies demonstrating that DEP-1 negatively regulates the proliferation of cell types including breast cancer cells.^{387,390,399,442,395,394} This might be due in part to the delocalization of DEP-1 from its substrates in these cells. Indeed, MDA-MB-231 cells have lost E-cadherin expression and their adherens junctions, which is a potential site of interaction for DEP-1 with its RTK substrates, such as EGFR.^{345,483} The constitutive activation of downstream proliferative pathways, such as K-Ras in MDA-MB-231 cells⁴⁸⁴, might also overcome the negative regulation of growth-promoting receptors by DEP-1. In addition, polymorphisms and mutations in the DEP-1 gene could perhaps alter the growth suppressive functions of DEP-1, while still allowing Src activation and the manifestation of its pro-invasive functions.^{402,400,441,403,439,440} Indeed, a mutation potentially affecting the ability of DEP-1 to associate with ERK1/2 was found to be highly enriched in a brain metastasis, suggesting that its capacity to inactivate this pathway and proliferation might be affected in these conditions.⁴⁰⁴ Thus, alterations of DEP-1 activity during cancer progression might represent an advantage for tumor cells, allowing them to respond to the selective pressure towards Src activation and the formation of metastases.

In conclusion, we report for the first time that through its ability to activate Src, DEP-1 can promote a pro-invasive phenotype in breast cancer cells that is associated with their ability to metastasize. This identifies DEP-1 as a possible predictor of the risk to develop metastases and die from breast cancer, and as a potential target for the development of new therapeutic approaches. It will be of interest to determine if DEP-1 similarly promotes the progression of other types of cancers also shown to rely on SFKs.

Materials and methods

Cell culture and transfection

Breast cancer cells were cultured in DMEM (Wisent; St. Bruno, QC, Canada), supplemented with 10% FBS (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 50 µg/ml Gentamycin (Wisent). The parental MDA-MB-231 and metastatic 1833 variant were generously provided by Dr. Joan Massagué (New York, NY, USA).⁴⁴⁸ For siRNA experiments, cells were transfected with DEP-1 Hs_PTPRJ_3_HP and Allstars control siRNAs (Qiagen; Toronto, ON, Canada), or with siGENOME PTPRJ siRNA#6 and siGENOME Non-Targeting siRNA Pool #2 (Dharmacon/GE Healthcare; Ottawa, ON, Canada) at a final concentration of 25 nM using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. For rescue and overexpression experiments, cells were transfected with 3 µg/60 mm-dish cDNAs and 10 µl of Lipofectamine 2000. Sixteen hours post-transfection, cells were either serum-starved overnight and then stimulated with 5% FBS, or immediately processed for cell invasion assays or lysed. Cells were incubated for 2h with PP2 (10 µM), AG1478 (2 µM), or DMSO (Sigma-Aldrich; Oakville, Ontario Canada) prior to cell lysis. The empty pmT2, WT DEP-1 and C/S DEP-1 vectors were generously provided by Dr. Nick Tonks (Cold Spring Harbor, NY, USA). The DEP-1 Y1311F/Y1320F mutant construct was previously described.⁵⁰ For the generation of shRNA stable cell populations, MDA-MB-231 cells were infected with lentiviruses encompassing scramble or DEP-1 shRNA sequences (pLKO.1 vector), and selected in the presence of puromycin (5 µg/ml) for three weeks. The scramble construct was a gift of David Sabatini (Addgene vector ID 1864; Addgene, Cambridge, MA, USA), and the DEP-1 shRNAs (TRCN 2870 and TRCN 2872) were purchased from GE Healthcare/Dharmacon (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada).

Western blot

Cells were lysed and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting as previously described.⁹⁵ Primary antibodies used were anti-p^{Y421}Cortactin, non-p^{Y529}Src, and p^{Y418}Src from Invitrogen, anti-Cortactin (clone 4F11; EMD-Millipore, Billerica, MA, USA), anti-DEP-1 (clone 143-41; R&D Systems Minneapolis, MN, USA), anti-Src (clone 36D10), anti-pY1173 EGFR (Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Whitby, ON, Canada), anti-EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and anti-PLC γ (Upstate/EMD-Millipore). HRP-conjugated secondary antibodies were from Cell signaling Technology.

Scratch assay

Forty hours post-transfection, the cell monolayer was wounded to create 3 scratches. Pictures were taken immediately after scratching at 2 microscopic fields/scratch (t_0). Cells were allowed to migrate for 22 hours, until gaps in the monolayer of control cells were filled by 80-90% (t_{final}). Cells were then fixed with phosphate-buffered formalin and stained overnight with crystal violet (0.1% in 20% methanol). The microscopic fields that were photographed at $t=0$ were again photographed at 22 hours. Wound closures were quantified using Image-Pro Plus software (Version 5.1; Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) and Microsoft Excel. Gap widths at t_0 and t_{final} were measured, and the average gap width ratio (t_{final} / t_0) of DEP-1-depleted cells was normalized to that of control cells.

Immunofluorescence

Twenty-four hours post-transfection, cells were plated on glass coverslips (2×10^5 cells) for 24 hours. Serum-starved cells were stimulated with 5% FBS for 10 min, and then fixed in paraformaldehyde 4% (in PBS) for 20 min, followed by permeabilization with Triton X-100

(0,1% in PBS) for 10 min. Antibodies were diluted as indicated in blocking solution (5% FBS/3%BSA in PBS) and incubated 1h on cells: anti-DEP-1 (clone 143-41, 1:50), pY418Src (1:50), Src (clone GD11, 1:50), pY421Cortactin (1:50), Cortactin (1:100), Alexa350-labeled anti-goat IgG, Alexa488-labeled anti-mouse IgG, and Alexa594-labeled anti-rabbit IgG (Invitrogen; 1:500). Photos were taken on an Olympus FV1000MPE confocal microscope using a Plan SAPO 60X/1.3 NA objective. Quantitative analysis of the membrane localization of proteins was performed in 6 microscopic fields at the 20 × magnification. The number of cells with membrane protrusions or localization of proteins in these membrane domains were determined and normalized to that observed in control cells. Experiments were performed in triplicate, and 100-200 cells were analyzed per experiment.

Invasion assay

This assay was performed as described.¹¹³ Cells (MDA-MB-231 and 1833 variant at 5×10^4 , Hs578T cells at 2×10^4 and SK-BR3 and T47D at 1×10^5) were allowed to invade for 20h. The lower chamber was filled with 800 μ l of DMEM containing 5% FBS. Final concentrations of Matrigel (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) used were: 3.8 mg/ml (MDA-MB-231 and 1833 variant), 3.7 mg/ml (Hs578T), 1 mg/ml (T47D and SK-BR3). Experiments were performed at least 3 times in duplicate.

In gel zymography

Conditioned media were collected and subjected to SDS-PAGE. The volume of medium loaded on gel was normalized to the protein concentration of the corresponding cell lysate. Gelatin-containing gels (0.1%) were washed twice in 2.5% Triton X-100 for 30 min and once with developing buffer containing 50 mM Tris-HCl, 5mM CaCl₂, 0,2M NaCl and 0.02% Triton

X-100 for 30 min. Gels were then incubated overnight at 37°, then stained with Coomassie blue and destained until areas where gelatin was digested were visible.

Cell proliferation assay

Cells were plated in 6-well plates in triplicates. At each time point (24, 48, 72 and 96h), they were trypsinized and resuspended in complete medium, and then diluted in CASYton solution, as recommended by the manufacturer (Roche Innovatis AG, Bielefeld, Germany). Cell counts were made using a CASY cell counter (Roche Innovatis AG).

Tumor and metastasis assay

Cells were injected in 8-week old female NOD *scid* gamma (NSG) mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) as described by Iorns et al.¹⁷ Tumor growth was measured every three days using a caliper. Primary tumors were fixed in formaldehyde (3.7% in PBS) and embedded in paraffin. Blood vessel density was quantified by immunohistochemistry on 5µm-tumor sections using a CD31 antibody (clone M-20; Santa Cruz Biotechnology) (two slices/tumor; six animals/group). Alternatively, tumors were lysed in RIPA buffer, and total cell lysates separated by SDS-PAGE. Lungs were snap frozen in OCT. The lung metastatic burden was defined on H&E-stained 5µm-cryosections using Photoshop (Adobe Systems Canada, Ottawa, ON, Canada) as the lung surface occupied by tumor cells relative to the total lung surface.

Survival analyses from microarray studies

Affymetrix datasets (GSE3494 and GSE2034) were downloaded from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo). Clinical data were ranked according to DEP-1 expression levels (probe 214137_at), and patients were segregated in three groups

("low", "intermediate" and "high") based on a 25%/50%/25% ratio for the GSE3494 dataset, and on 15%/70%/15% ratio for the GSE2034 dataset. The Kaplan–Meier method was used to calculate the survival and relapse-free survival rates, which were compared using the two-sided log-rank test. Analyses were performed with the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Data analysis

Densitometry analyses were performed with the Quantity One 4.6.3 software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Statistical significance was evaluated with the unpaired t-test using GraphPad Prism 6.0 software. P-values less than 0.05 were considered to be significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank our colleagues for their generous gifts of plasmid DNAs and cell lines. This work was supported by a Cancer Research Society/Quebec Breast Cancer Foundation grant (I.R). K.S. and C.C. held partial studentships from Université de Montréal. P.F was supported by FRQS (25988) and CIHR (292353) studentships. K.S., P.F., C.C. and J. R. also held partial studentships from the Montreal Cancer Institute.

Figure legends

Figure 1. Higher DEP-1 expression levels in invasive breast cancer cells mediate Src activation. (a) Cell lysates (50 μ g) of breast tumor cell lines grown under the same culture conditions were immunoblotted with the indicated antibodies. Immunodetection of PLC γ reveals equivalent protein levels between samples. (b) Comparative analysis of DEP-1 expression in total cell lysates (50 μ g) of MCF10A and MDA-MB-231 cells. (c) Analysis of gene expression using the Oncomine cancer profiling database indicates that DEP-1 is overexpressed in invasive breast carcinomas (76 samples) compared to normal breast tissues (61 samples) ($P=2.44E-26$; fold change= 2.2). Microarray data are from The Cancer Genome Atlas dataset (TCGA Breast). (d) Breast cancer cell lines were transfected with control (C) or DEP-1 (D) siRNAs^{339, Qiagen} and cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (e) The same experiment was performed with a second DEP-1 siRNA (#6, Dharmacon). Results are representative of at least 3 independent experiments.

Figure 2. DEP-1 promotes Src and Cortactin activation, and their localization to membrane protrusions of invasive breast cancer cells. (a) MDA-MB-231 and Hs578T cells transfected with control (CTL) or DEP-1 siRNAs^{339, Qiagen} were stimulated with FBS (5%) for the indicated times. Activation of Src and its substrate Cortactin was evaluated by Western blotting on total cell lysates. Results are representative of at least 3 independent experiments. (b) MDA-MB-231 cells transfected with CTL or DEP-1 siRNAs #3 were plated at low density on glass coverslips for 24h. Cells were serum-starved overnight and stimulated with 5% FBS for 10 min. Cells were triple-stained with anti-DEP-1, anti-p^{Y418}Src and anti-Src antibodies, or with anti-DEP-1, anti-p^{Y421}Cortactin and anti-Cortactin antibodies. The number

of cells with membrane protrusions or with membrane localization of DEP-1, p^{Y418}Src, Src, p^{Y421}Cortactin, and Cortactin was quantified in CTL and DEP-1-silenced cells. Results are shown as fold-inductions \pm SD of the average number of DEP-1-silenced cells showing protrusions or membrane-localized proteins relative to control cells ($n=3$). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. Scale bars, 20 μ M.

Figure 3. DEP-1 promotes the migration and invasion of breast cancer cells. (a) Monolayers of MDA-MB-231 and Hs578T cells transfected with control (CTL) or DEP-1 siRNAs^{339, Qiagen} were scratched with the pointed end of a yellow pipet tip. Photographs of the gaps were taken immediately after the scratch (t_0) and 22 hours later (t_{final}). Gap width at t_0 and t_{final} were measured with Image-Pro Plus and gap width ratios were calculated (t_{final}/t_0). The average gap width ratio of DEP-1-silenced cells was compared to that of control cells, and results are shown as fold-inductions \pm SD ($n=4$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (b) MDA-MB-231 and Hs578T cells transfected with control (CTL) or DEP-1 siRNAs were submitted to a Matrigel invasion assay. DMEM containing 5% FBS was added to the bottom chamber and cells were allowed to invade Matrigel for 20 hours. The silencing of DEP-1 expression in the two cell lines was validated by Western blotting ($n=3$). **** $P < 0.0001$. (c) Low invasive T47D and SK-BR3 cells were processed as in (b), but Matrigel concentration was reduced and the number of seeded cells was increased ($n=3$). Western blotting shows the reduced expression of DEP-1 in cells transfected with DEP-1 siRNAs. (d) Low invasive T47D and SK-BR3 cells were transfected with pmT2 (empty vector) or WT DEP-1 (3 μ g). Control cells were incubated with DMSO (-) while cells overexpressing WT DEP-1 were incubated with DMSO (-) or PP2 (10 μ M), and then processed for Western blotting or Matrigel invasion. For results shown in (b) - (d), the average number of invading DEP-1-silenced cells, or of DEP-1 overexpressing

cells, was normalized to the average number of invading control cells, and are shown as average fold-inductions \pm SD ($n=3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

Figure 4. Catalytically active DEP-1 promotes MDA-MB-231 cell invasion, but not cell proliferation, in a Src- and EGFR-dependent manner. (a) MDA-MD-231 cells were infected with control (Scramble) or DEP-1 shRNAs. Immunoblots show reduced DEP-1 expression and reduced activation of Src and Cortactin in the shDEP-1 cell populations compared to shScramble cells. PLC γ levels demonstrate equal protein loading. A Matrigel invasion assay was performed in parallel with the shScramble and shDEP-1 MDA-MD-231 cell populations ($n=3$). (b) shScramble and shDEP-1 MDA-MD-231 cell populations were plated and cell counts determined at the indicated time points. Results were normalized on the number of cells plated ($n=3$). (c) The shDEP-1 2870 cell population was transfected with empty vector (pmT2), WT DEP-1, the DEP-1 Y1311/1320F mutant unable to fully activate Src, or the catalytically inactive DEP-1 C/S mutant. The expression or phosphorylation levels of DEP-1, Src, Cortactin, and EGFR were determined by Western blotting on total cell lysates. (d) The shDEP-1 2872 cell population was transfected and processed as in (c). In addition, the cells were also submitted to a Matrigel invasion assay ($n=3$). (e) shDEP-1 2872 cells were transfected with empty vector (pmT2) or increasing amounts of WT DEP-1, and processed for Western blotting or submitted to a Matrigel invasion assay ($n=3$). (f) shDEP-1 2872 cells were transfected with empty vector (pmT2) or WT DEP-1. Sixteen hours later, cells were treated with DMSO, PP2 (10 μ M), or AG1478 (2 μ M) 2h prior to cell lysis or a Matrigel invasion assay. The expression or phosphorylation levels of DEP-1, Src, Cortactin, and EGFR were determined by Western blotting on total cell lysates ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5. DEP-1 expression is increased in the MDA-MB-231 metastatic explant cell line 1833 and correlates with higher invasiveness. (a) MDA-MB 231 cells and the metastatic explant cell line 1833 were plated at 2×10^4 cells/cm² and grown for 4 days. The expression or phosphorylation levels of DEP-1, Src, Cortactin, and PLC γ (loading control) were determined by Western blotting on total cell lysates. (b) A Matrigel invasion assay was performed to determine the relative invasiveness of the MDA-MB-231 parental cells and the metastatic explant cell line 1833. DMEM containing 5% FBS was added to the bottom chamber and cells were allowed to invade for 20 h. The average number of invading 1833 cells was normalized to that of the parental MDA-MB-231 cells ($n=3$). *** $P < 0.001$. (c) The metastatic explant cell line 1833 was transfected with control (CTL) or DEP-1 siRNAs³³⁹, Qiagen, serum-starved overnight, and stimulated with FBS (5%) for the indicated time points. The expression or phosphorylation levels of DEP-1, Src, Cortactin, and PLC γ were determined by Western blotting on total cell lysates. (d) A Matrigel invasion assay was performed with the control (CTL) or DEP-1-silenced metastatic explant cell line 1833 ($n=3$). ** $P < 0.01$. (e) The secretion of gelatin-specific MMP9 and MMP2 in the culture media of control (CTL) and DEP-1-silenced 1833 cells was evaluated after 20 or 120 min of incubation by in-gel zymography. Quantification of the average intensity (as fold-inductions) of the bands representing the secreted pro-MMP9 and pro-MMP2 in the cell culture media conditioned by DEP-1-silenced cells after 120 min is shown in the graph, relative to that observed in the culture media of control cells ($n=3$). * $P < 0.05$.

Figure 6. Expression of DEP-1 in breast tumors is required for the promotion of Src-dependent signaling and the formation of metastases, but not tumor growth and angiogenesis. (a) NSG mice were injected with the shScramble or shDEP-1 2872 MDA-MB-231 cell populations in the mammary fat pad in a 1:1 mixture of collagen I and Matrigel.

Tumor size was measured with calipers at the indicated time points ($n=6$ mice per group). **(b)** Paraffin-embedded tumor sections were stained for CD31 by IHC to monitor angiogenesis. Capillaries were counted per region of interest ($n=6$ mice per group). Scale bars, 40 μm . **(c)** Tumor cell lysates were immunoblotted with the indicated phosphospecific and expression level antibodies. The average phosphorylation levels of Src and Cortactin relative to their protein expression levels in the shDEP-1 tumors were determined by densitometry analysis and normalized to those of the control shScramble condition ($n=6$ mice per group). $***P < 0.001$. **(d)** Lung cryosections were H&E stained and the average metastatic burden (%) was calculated for each lobe of mice from the shScramble and shDEP-1 tumor groups ($n=6$ mice per group). $*P < 0.05$. Scale bars, 200 μm . Arrow points at highly dense metastatic cells.

Figure 7. Moderate expression of DEP-1 is associated with a poor prognosis in breast cancer patients. Correlation between DEP-1 gene expression levels and disease-specific survival **(a)**, or relapse-free survival **(b)** of breast cancer patients were made using the Uppsala (GSE3494; $n=251$) and Rotterdam (GSE2034; $n=286$) gene microarray datasets downloaded from the GEO database. Survival data of breast cancer patients from these cohorts were classified based on their DEP-1 expression levels into three groups: “Low”, “Intermediate”, and “High”, encompassing the 25% top, 50% intermediate, and 25% lowest expressers for the GSE3494 cohort, and the 15% top, 70% intermediate, and 15% lowest expressers for the GSE2034 cohort. Kaplan-Meier survival and statistical analyses (Log-rank test) were performed using GraphPad Prism 6. **(c)** Summary model of the function of DEP-1 in invasive breast cancer. Moderate expression of DEP-1 in invasive breast tumors stimulates a Src-dependent signaling pathway in collaboration with EGFR. This leads to the activation/phosphorylation of Cortactin in membrane protrusions, and promotes tumor cell

invasion and metastasis. Since EGFR is a substrate of DEP-1,(Tarcic, 2009 #2513) additional reciprocal regulation (dashed arrows) may also possibly contribute to this pathway.

Figures

Figure 1 : Higher DEP-1 expression levels in invasive breast cancer cells mediate Src activation

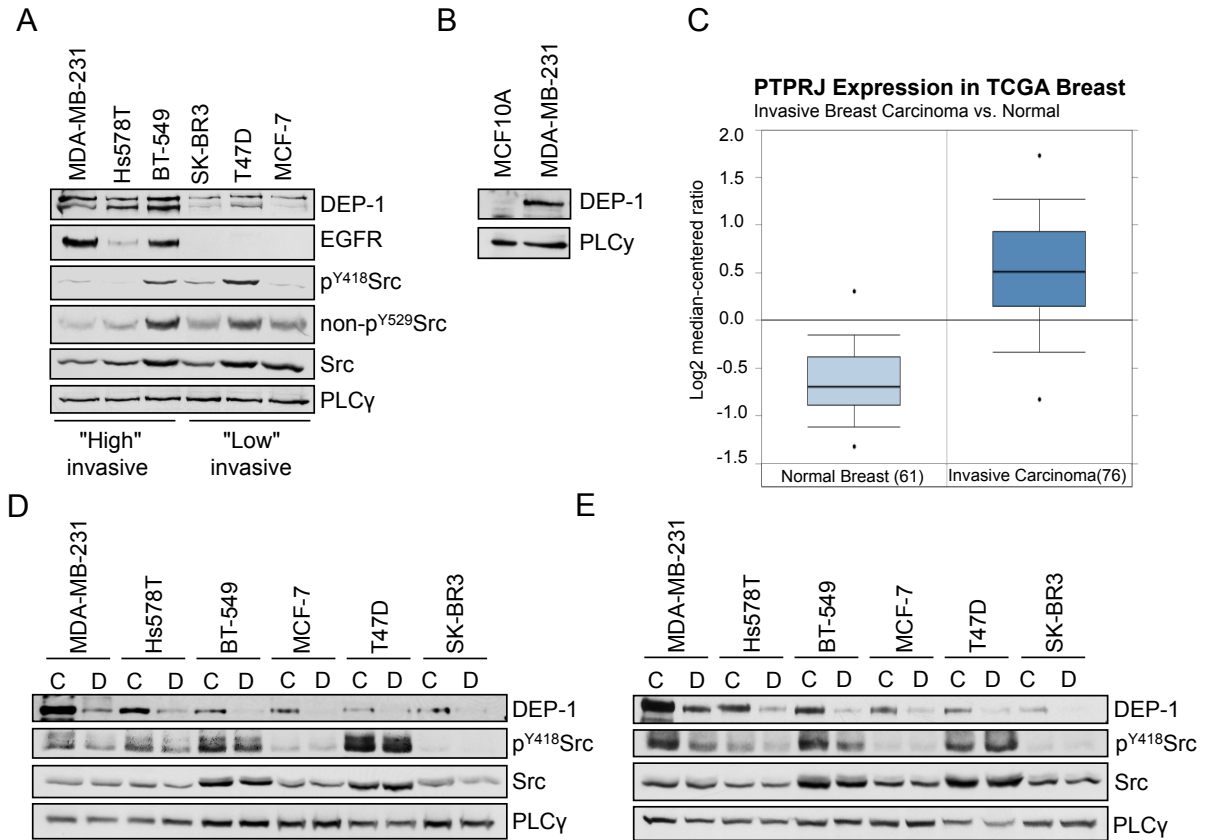


Figure 2 : DEP-1 promotes Src and Cortactin activation, and their localization to membrane protrusions of invasive breast cancer cells

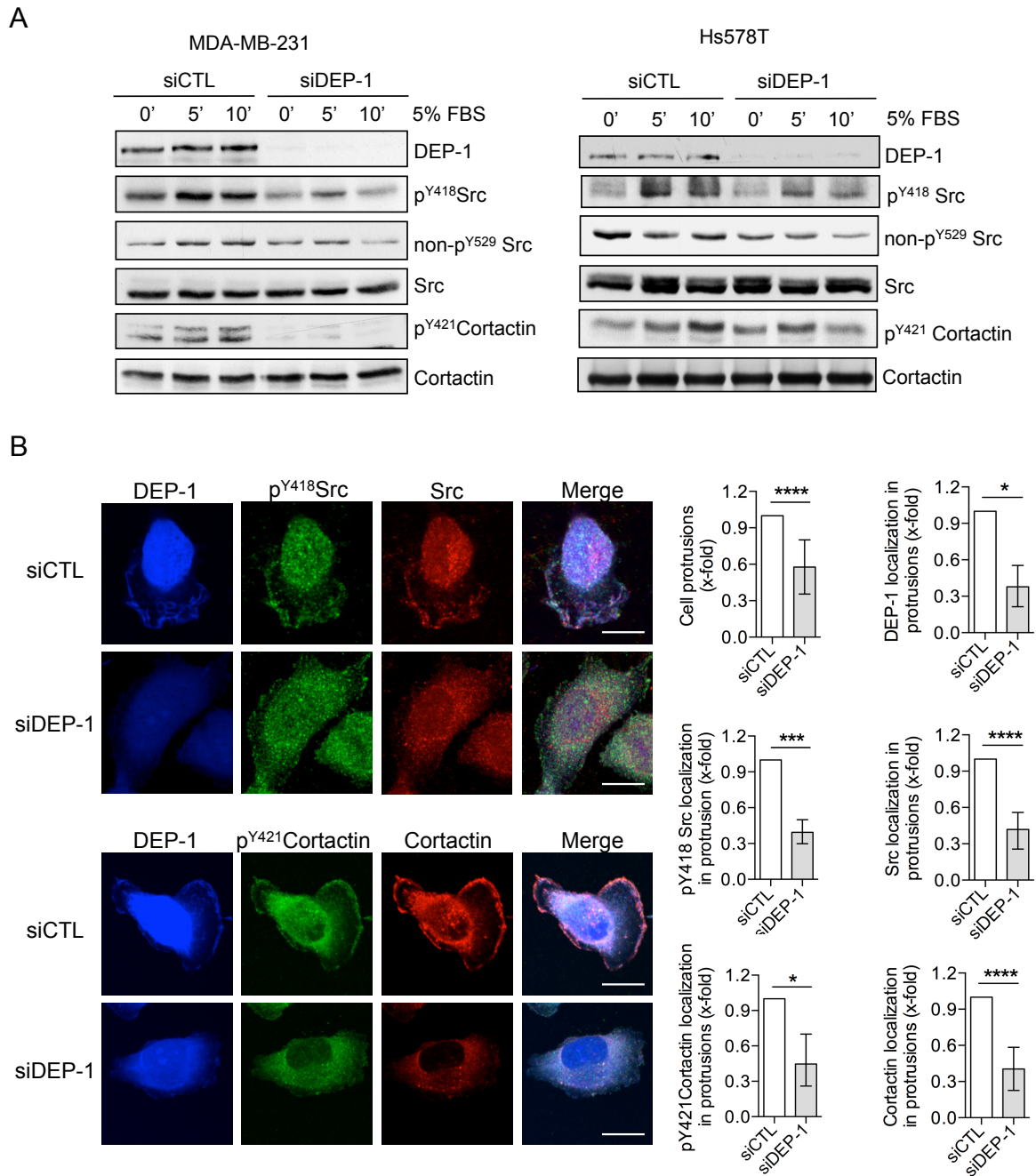


Figure 3 : DEP-1 promotes the migration and invasion of breast cancer cells

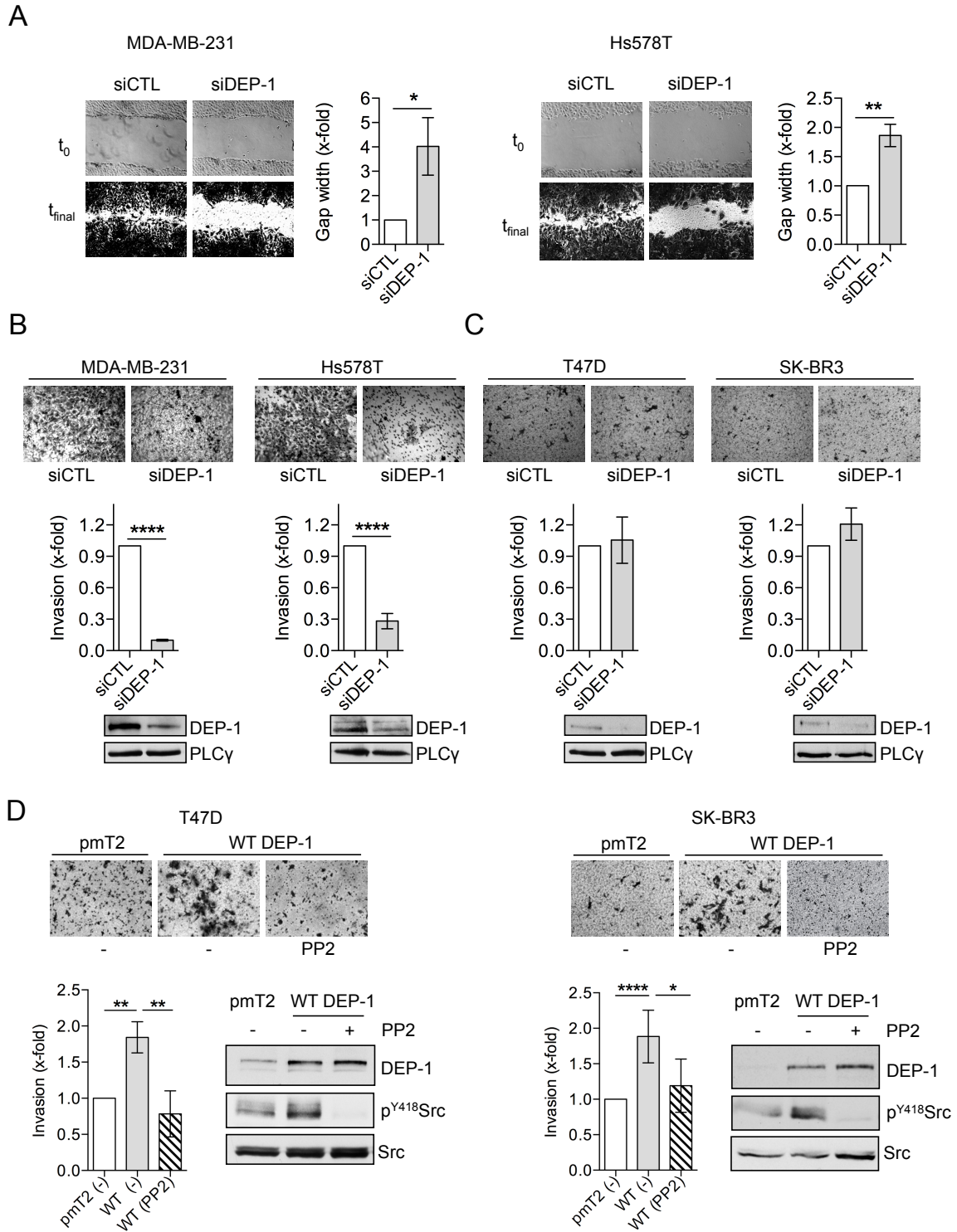


Figure 4. Catalytically active DEP-1 promotes MDA-MB-231 cell invasion, but not cell proliferation, in a Src- and EGFR-dependent manner

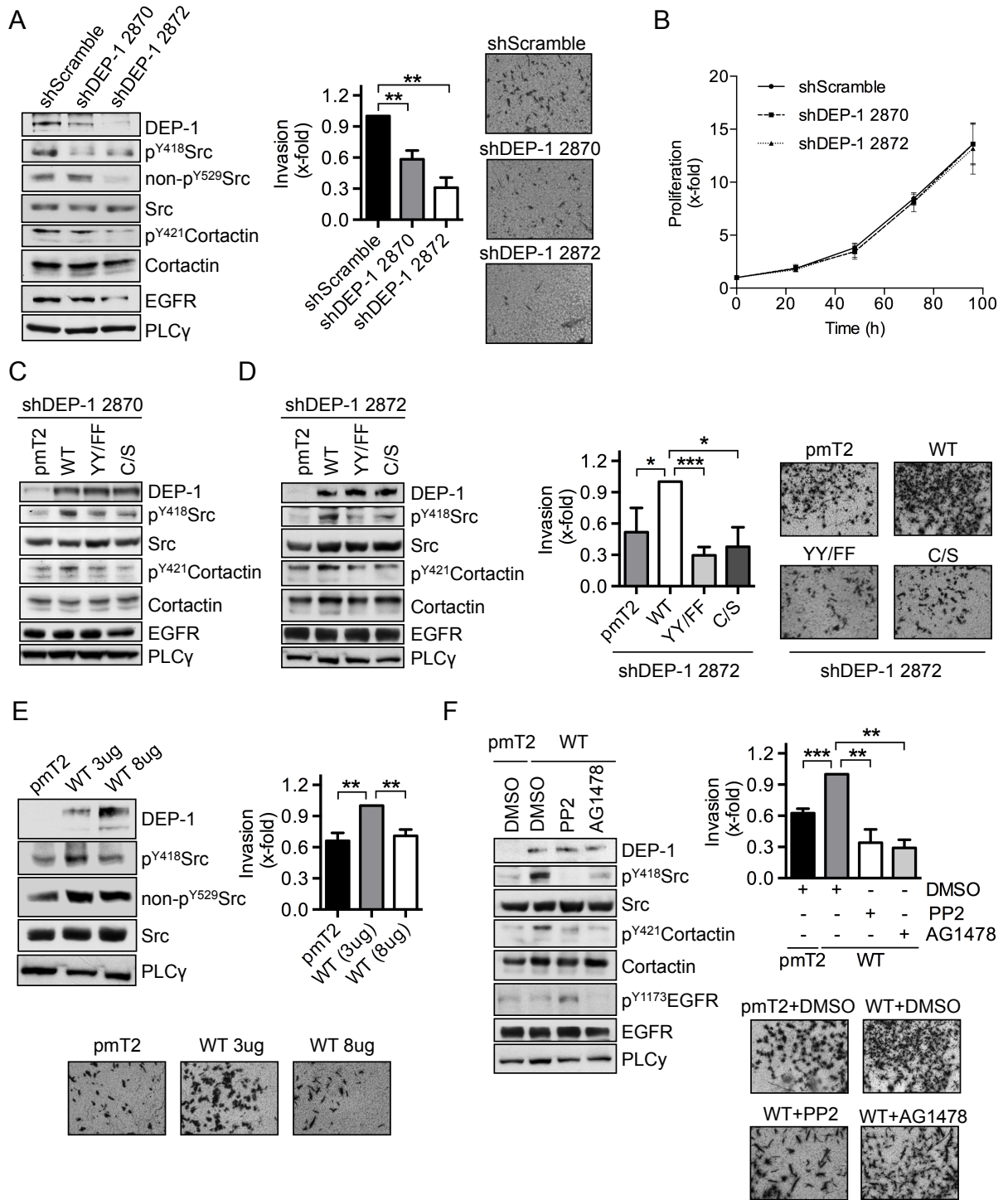


Figure 5. DEP-1 expression is increased in the MDA-MB-231 metastatic explant cell line 1833 and correlates with higher invasiveness

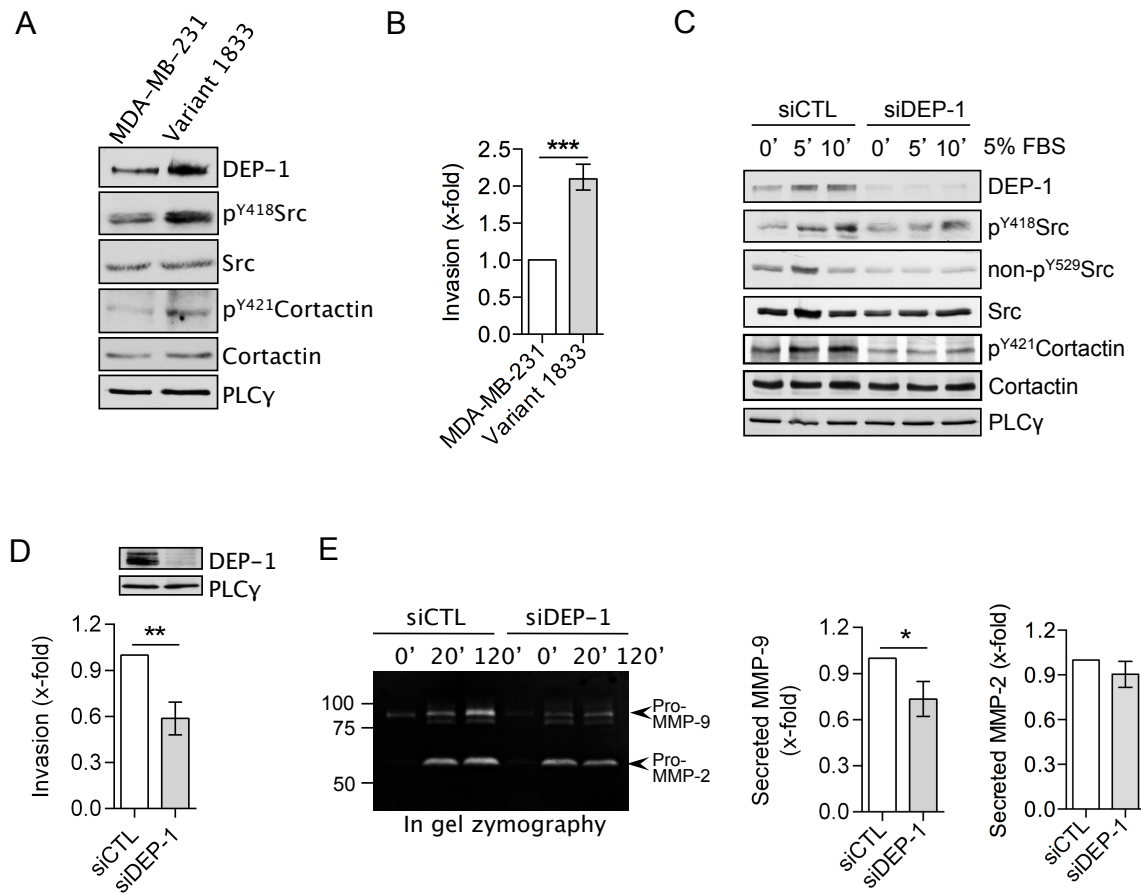


Figure 6. Expression of DEP-1 in breast tumors is required for the promotion of Src-dependent signaling and the formation of metastases, but not tumor growth and angiogenesis

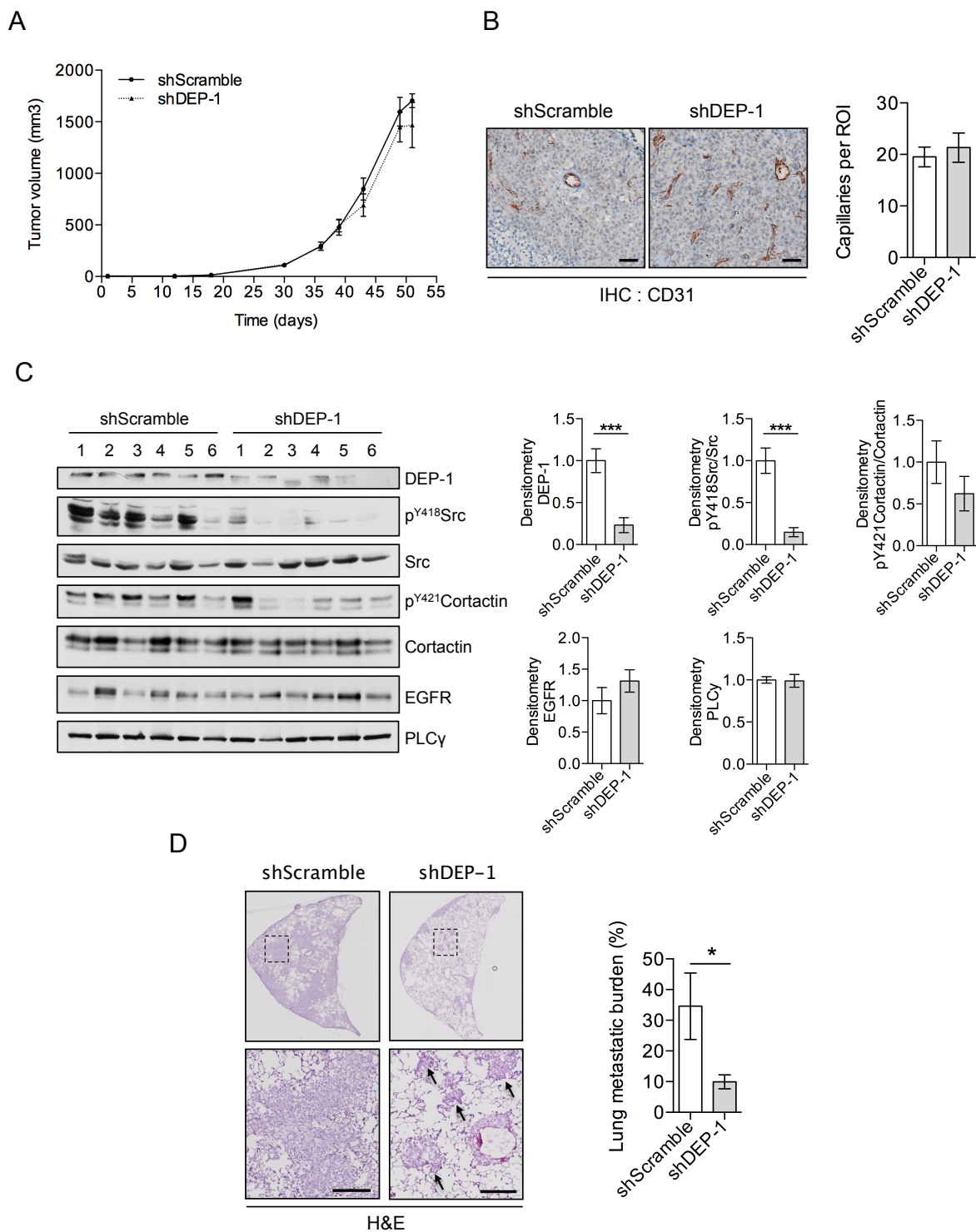
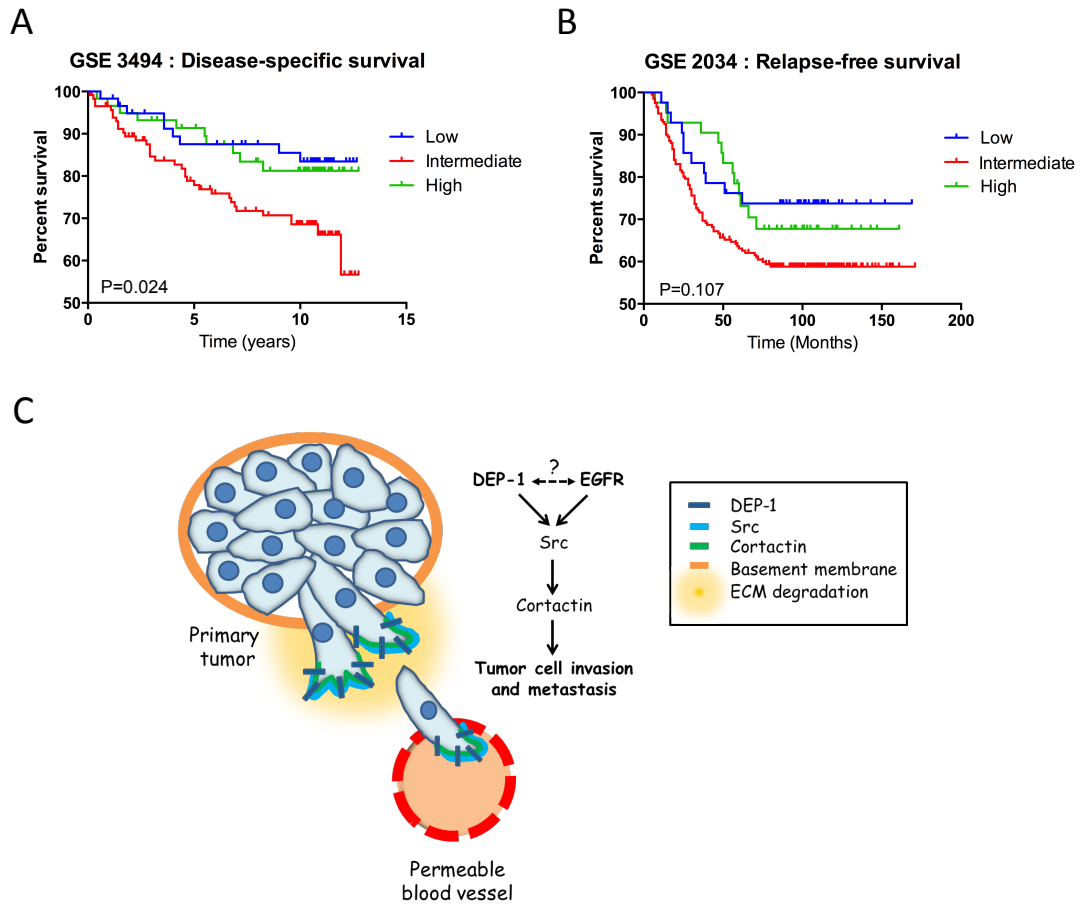


Figure 7. Moderate expression of DEP-1 is associated with a poor prognosis in breast cancer patients



Supplemental information

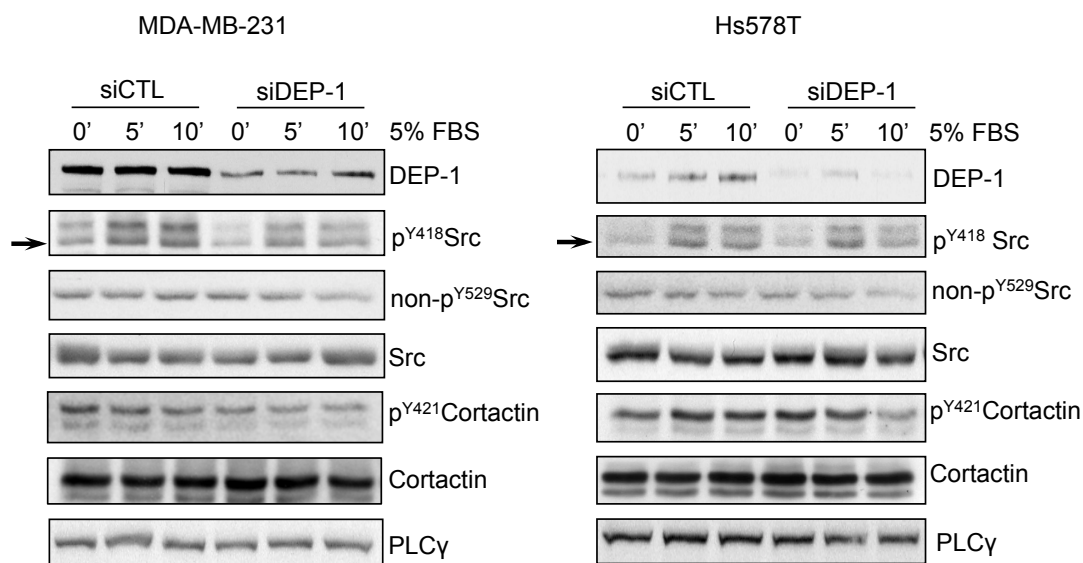
Supplementary Figures 1-3

The protein tyrosine-phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and metastasis

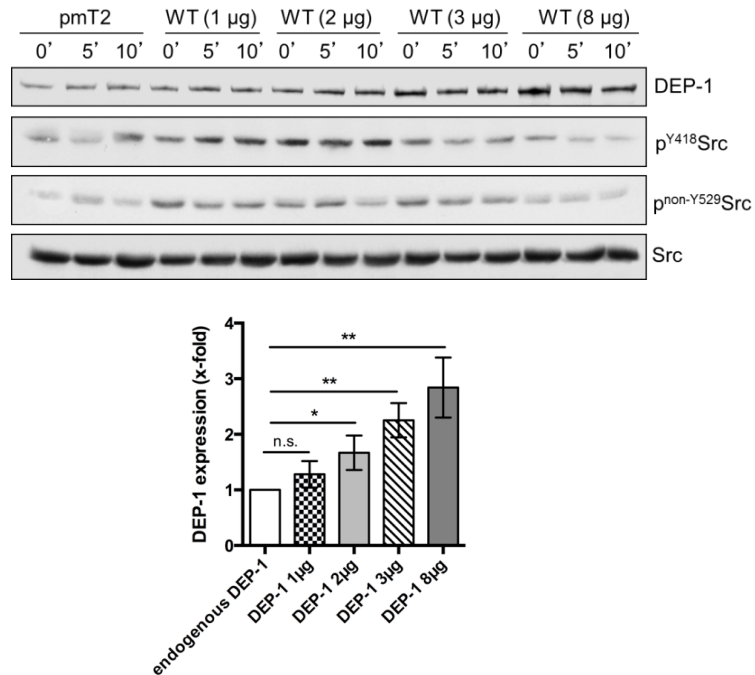
Kathleen Spring^{1#}, Patrick Fournier^{1#}, Line Lapointe¹, Catherine Chabot¹, Jacinthe Roussy¹,
Sandra Pommey¹, John Stagg^{1, 2}, and Isabelle Royal^{1, 3}

¹CRCHUM - Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, and
Institut du Cancer de Montréal, Montréal, QC, Canada; ²Faculty of Pharmacy and

³Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.



Supplementary Figure 1. DEP-1 promotes Src and Cortactin activation in invasive breast cancer cells. MDA-MB-231 and Hs578T cells transfected with control (CTL) or DEP-1 (#6; Dharmacon) siRNAs were stimulated with FBS (5%) for the indicated times. Activation of Src and its substrate Cortactin was evaluated by Western blotting on total cell lysates with phosphospecific antibodies. Results are representative of 3 independent experiments and confirm those obtained with the DEP-1 siRNA #3 from Qiagen (Fig. 2) and shRNAs (Fig. 4).



Supplementary Figure 2. Moderate expression of DEP-1 promotes Src activity in invasive breast cancer cells. MDA-MB-231 cells were transfected with empty vector (pmT2; 8 μg), or with increasing amounts of the WT DEP-1 plasmid (co-transfected with pmT2 for a constant amount of 8 μg of DNA per condition). Cells were serum-starved and stimulated with FBS (5%) for the indicated times. Results show that moderately overexpressed DEP-1 (1 and 2 μg conditions) promoted Src Y529 dephosphorylation and Y418 phosphorylation. In contrast, higher expression of DEP-1 (3 μg and more; greater than a two-fold overexpression) led to its progressive incapacity to activate Src in MDA-MB-231 cells, as previously observed in endothelial cells (Spring et al. Blood, 2012). The average intensity of the DEP-1 immunoblot signals in cells overexpressing DEP-1 was plotted as the x-fold increase of DEP-1 expression over endogenous levels. *P < 0.05, **P < 0.01.

CHAPITRE V – Discussion

Les travaux de cette thèse portent sur la caractérisation des conséquences biologiques médiées par la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 dans la réponse angiogénique et la progression tumorale. L'augmentation de son expression avec la confluence cellulaire et sa capacité à déphosphoryler de nombreux récepteurs aux facteurs de croissance ainsi que les kinases ERK1/2 ont initialement suggéré une fonction anti-proliférative importante.^{278,362,347} In vitro, la surexpression de DEP-1 dans les cellules endothéliales s'est traduite par l'inhibition de leur activation et de leur capacité à former des capillaires. Ces résultats sont également appuyés dans un modèle murin KI de DEP-1, où la partie intracellulaire est remplacée par eGFP, qui résulte en la mort des embryons due à un excès de prolifération endothéliale.³³⁹ De plus, ces embryons présentent une désorganisation vasculaire.³³⁹ À ce propos, notre laboratoire a démontré in vitro que DEP-1 lie la kinase Src, un enzyme centrale dans la réponse angiogénique, et conduit à la déphosphorylation de sa tyrosine inhibitrice (Y529) ce qui permet son autophosphorylation et son activation en réponse au VEGF.^{95,125} Par conséquent, des études d'ARNi ont permis de démontrer que DEP-1 est un régulateur important des fonctions endothéliales dépendantes de Src comme la survie, l'invasion, la perméabilité vasculaire et la formation de capillaires.^{95,113} De façon surprenante, la souris *Dep-1* KO ne présente aucun phénotype apparent.^{366,367} Néanmoins, la caractérisation approfondie des cellules hématopoïétiques a révélé de nombreux défauts principalement associés à une faible activation des SFK.^{370,371} Cependant, le rôle de DEP-1 dans la réponse angiogénique n'a jamais été évalué in vivo.

Les travaux présentés dans cette thèse ont donc permis de déterminer, pour la première fois, que DEP-1 est un médiateur essentiel de l'angiogenèse in vivo. Nos travaux ont démontré que DEP-1 est primordial à l'activation de la kinase Src dans les vaisseaux sanguins rétiniens en développement, pulmonaires ou associés aux tumeurs. De ce fait, DEP-1 promeut l'expression du Dll4 par l'activation de la β -caténine via la voie de signalisation Src-Akt dans la vascularisation de la rétine. Ces résultats ont démontré que DEP-1 est un régulateur important de la voie de signalisation Notch lors du développement. Chez la souris adulte,

DEP-1 stimule la formation de capillaires et la perméabilité vasculaire induites par le VEGF. Conséquemment, dans un contexte tumoral, la croissance des tumeurs est réduite chez les souris *Dep-1* KO due à une vascularisation déficiente. De plus, étant donné que la dissémination des cellules tumorales dépend de la perméabilité vasculaire, la formation de métastases dans les poumons est réduite lorsque DEP-1 est délété. Ainsi, l'expression de DEP-1 post-natale favorise la formation de capillaires et la perméabilité vasculaire tant dans un contexte physiologique que tumoral. Ces études permettent donc d'identifier DEP-1 comme un régulateur majeur de la réponse angiogénique *in vivo*.

1. DEP-1 : un promoteur important de la réponse angiogénique *in vivo*

Un élément clé de la signalisation régulée par DEP-1 lors de l'angiogenèse réside dans l'activation des SFKs. Nos résultats se concentrent sur l'activation de Src, le membre éponyme de cette famille. Néanmoins, tous les membres de cette famille présentent une grande homologie structurelle quant à la région interagissant avec DEP-1, ce qui permettrait une interaction entre DEP-1 et plusieurs, voire tous les membres de cette famille.⁴⁸⁵ À travers les différents types cellulaires où DEP-1 a été testé, la phosphatase permet la régulation de Src, Fyn, Lyn et Lck.^{364,368,113} Au niveau des cellules endothéliales, Src, Fyn et Yes sont exprimés et participent à la réponse angiogénique.²¹³ L'inhibition de ces SFKs par le PP2 se traduit par une inhibition de l'angiogenèse induite par le FGF, démontrant ainsi leur importance dans cette voie de signalisation.⁴⁰⁸ En ce qui concerne la perméabilité vasculaire induite par le VEGF, elle nécessite l'activation de Src et Yes puisque les souris *Src*^{-/-} ou *Yes*^{-/-} ne présentent qu'une faible perméabilité tandis que Fyn y est dispensable.²²⁸ La caractérisation de la délétion de la protéine adaptatrice TSad, un régulateur de l'activation de Src, résulte en une inhibition de la migration *in vitro*, de la perméabilité vasculaire et de la vascularisation tumorale.^{486,112} Sachant que les résultats *in vitro* et *in vivo* de la déplétion de DEP-1 résulte en l'inhibition de Src, du potentiel invasif, de la formation de capillaires et de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF, il est tentant de spéculer que le rôle de DEP-1 dans les

cellules endothéliales ne se limite pas à l'activation de Src et qu'il pourrait être un régulateur de toutes les SFKs (Chapitre III).¹²⁵

1.1 DEP-1 : un régulateur du bourgeonnement endothélial et de la voie de signalisation Notch lors du développement

Les travaux présentés au chapitre III associent, pour la première fois, l'expression de DEP-1 au phénomène de bourgeonnement endothélial via la régulation de l'expression in vivo et in vitro d'un ligand de Notch, le Dll4, au niveau de la rétine en développement. En effet, les souris *Dep-1* KO présentent une augmentation de la densité du réseau vasculaire rétinien corrélant avec un nombre de cellules meneuses augmenté. Ce phénotype rappelle celui observé lors d'un dérèglement de l'interaction Dll4/Notch, que ce soit suite à la délétion du Dll4 ou de Notch1, ou à l'utilisation : 1) d'anticorps bloquant Dll4 ou Notch1, 2) d'inhibiteur de la γ -sécrétase (limitant le clivage de Notch malgré son interaction avec Dll4) ou 3) de séquences peptidiques du domaine extracellulaire de Notch utilisées dans le même contexte.^{168,190,487} Toutefois, afin de confirmer le rôle du Dll4 dans le phénotype observé chez la souris *Dep-1* KO, de simples expériences devraient être complétées. Par exemple, l'injection intravitale de peptide Jag1 ou de Dll4, deux ligands de Notch1, devrait permettre la récupération du phénotype sauvage et ainsi valider que le phénotype est dû à la baisse de l'expression de Dll4 observée dans les lysats rétiniens de ces animaux. Toutefois, ce type d'expérience présente certaines limitations également en ce sens que l'ajout de Dll4 à une rétine en développement induira une diminution du bourgeonnement endothéliale. Dès lors, bien que cette étude appuierait l'hypothèse selon laquelle le phénotype découle d'un défaut d'expression du Dll4, elle ne permet pas d'exclure définitivement des voies alternatives. Il est également important de souligner que la souris *Dep-1* KO présente une hausse de prolifération endothéliale ce qui pourrait contribuer au bourgeonnement excessif. Conséquemment, le phénotype des souris *Dep-1* KO est la résultante de l'altération de plusieurs voies de signalisation. Nos résultats associent la présence de DEP-1 à l'activation de Src, via la déphosphorylation de la Y529, et subséquemment d'Akt. Ces observations sont supportées par des travaux antérieurs de notre laboratoire démontrant l'importance de DEP-1 dans leur

activation par interaction directe ou via la signalisation Src-Gab1-PI3K-Akt, respectivement.^{125,95} En plus, les souris DEP-1 WT présentent une phosphorylation sur la Ser9 de GSK3 β , un site dépendant d'Akt, dans des lysats rétiniens.⁴³⁰ Au niveau basal, la kinase GSK3 β est active et associée au complexe de destruction de la β -caténine. Elle induit sa dégradation par le protéasome suite à l'induction de la phosphorylation des résidus S33, S37 et T41 de la β -caténine.⁴²⁶ La phosphorylation de GSK3 β en S9 cause une diminution drastique de son activité kinase. De cette façon, étant donné que DEP-1 stimule l'activation d'Akt et l'inhibition de GSK3 β qui en dépend, la PTP permet la stabilisation de la β -caténine et favorise potentiellement son activité transcriptionnelle. Ainsi, sachant que la β -caténine participe à des complexes transcriptionnels liant le promoteur du Dll4 et que son activation est nécessaire à cette transcription dans un modèle rétinien, il est probable que DEP-1 médie l'expression du Dll4 via la stabilisation de la β -caténine.¹⁸⁰ De façon intéressante, l'activation d'Akt et de la PI3K a été également associée à l'activation de Notch par le Dll4, appuyant nos conclusions.^{140,172}

En plus de son rôle dans le bourgeonnement endothélial, la voie de signalisation Notch est impliquée dans de nombreux processus biologiques, dont la différenciation des vaisseaux sanguins en artères.⁴⁸⁸ En effet, l'activation de Notch permet l'expression des facteurs de transcription Hey1/2 qui, à leur tour, induisent l'expression d'un marqueur artériel important, l'Ephrin-B2. En plus, dans ces mêmes conditions, l'expression de l'Eph-B4, un marqueur veineux, est réprimée.¹⁸⁷ À ce propos, plusieurs composantes de la voie de signalisation Notch incluant les ligands Dll1 et Dll4 ainsi que les facteurs de transcription HEY1/2 sont nécessaires à la différenciation artérielle, démontrant l'importance de l'activation de Notch dans ce phénomène.^{489,156,155,490,491,492,493} Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de DEP-1 dans la différenciation artérielle puisque plusieurs évidences supportent l'idée que l'expression de DEP-1 la favorise. D'abord, Les travaux présentés au chapitre III démontrent l'implication de DEP-1 dans l'expression adéquate du Dll4 et l'activation de la voie Notch nécessaires à cette différenciation. En plus, à l'âge adulte, DEP-1 et le Dll4 sont retrouvés principalement au niveau des artères.^{494,345} À l'inverse, une diminution des marqueurs artériels est observée suite à l'injection de morpholinos ciblant DEP-1 chez le poisson zébré.³⁴⁰ Ainsi, il semble

plausible que DEP-1 promeut l'expression du Dll4 et serait, conséquemment, un régulateur de la différenciation artérielle des vaisseaux sanguins.

1.2 DEP-1 : un modulateur positif de la formation de capillaires

Les travaux présentés au chapitre III permettent d'élucider le rôle de DEP-1 *in vivo* sur l'angiogenèse post-natale. Dans la littérature, l'expression de DEP-1 a d'abord été associée à l'inhibition de la prolifération et la formation de capillaires à partir de cellules endothéliales hautement confluentes, où les niveaux d'expression de DEP-1 sont maximaux. Parallèlement, notre laboratoire a plutôt démontré que son expression est associée à l'activation des SFK et à la promotion de la réponse angiogénique, la survie, la perméabilité vasculaire et la formation de capillaires à partir d'études où son expression fût inhibée.^{94,113,95,93} Un gradient d'expression de DEP-1 dans les cellules endothéliales a permis de déterminer que l'effet de DEP-1 sur l'activation de Src est dépendante de son niveau d'expression. En effet, à des niveaux modérés, DEP-1 promeut l'activation optimale de Src et la réponse angiogénique. Par contre, la déplétion de DEP-1 ou sa surexpression excessive résulte en l'inhibition de Src et, conséquemment, en l'inhibition de la réponse angiogénique. Toutefois, l'impact des niveaux physiologiques de DEP-1 dans l'angiogenèse *in vivo* n'avait jamais été étudié. Lors de nos travaux, un modèle animal *Dep-1* KO a été utilisé et ce dernier ne permet que d'évaluer les conséquences de la délétion de DEP-1 lors de la réponse angiogénique lorsque comparé au niveau d'expression physiologique. Ainsi, bien que la souris *Dep-1* KO ne présente aucun phénotype apparent, l'angiogenèse post-natale et la perméabilité vasculaire induite par le VEGF sont abolies dues à un défaut d'activation de la kinase Src chez ces animaux, ce qui se traduit par une inhibition de l'angiogenèse de réparation et tumorale. (Chapitre II)

Suite à l'élongation d'un capillaire sanguin, il y a formation de la lumière à l'intérieur du nouveau vaisseau ce qui permet l'initiation de la circulation sanguine. L'initiation de la formation de la lumière nécessite le recrutement des protéines de polarité, Par3 et Par6, aux VE-Cadherines.^{495,496,497} Dès lors, les VE-Cadherines et leur régulation sont importantes dans ce processus. En effet, la déplétion des VE-Cadherines *in vitro* ou *in vivo* chez le poisson

zebré ainsi que sa délétion chez la souris résultent en l'inhibition de la formation de la lumière.^{498,499,500} Sachant que DEP-1 régule le VEGFR2 et la phosphorylation des VE-Cadherines, il serait intéressant d'évaluer son rôle dans ce mécanisme. Chez le poisson zébré, l'injection de morpholino ciblant DEP-1 résulte en la formation de vaisseaux sans lumière, ce qui suggère fortement une association entre DEP-1 et ce phénomène.³⁴⁰ De façon intéressante, une autre phosphatase de la famille R3, la VE-PTP, a récemment été associée à ce phénomène via ses effets sur les VE-Cadherines et le VEGFR2, démontrant qu'une phosphatase ayant des effets similaires sur la signalisation endothéliale peut moduler la formation de la lumière.⁵⁰¹

1.3 DEP-1 : une enzyme critique dans la promotion de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF

Le relâchement des jonctions cellulaires au niveau des vaisseaux sanguins est une étape capitale à l'induction de la perméabilité vasculaire. DEP-1 est localisé principalement au niveau de ces jonctions, suggérant de nombreuses cibles à cet endroit. Plusieurs composantes des jonctions cellulaires incluant la p120caténine, la β -caténine, la plakoglobine ont été identifiées comme des cibles de DEP-1.^{346,347} Par conséquent, étant donné que la phosphorylation de ces protéines induit la déstabilisation des jonctions cellulaires, une inhibition du remodelage de ces jonctions suite à leur déphosphorylation par la PTP aurait pu être anticipée. Toutefois, notre laboratoire a démontré que, via sa capacité à activer Src, DEP-1 induit plutôt la phosphorylation directe et indirecte des VE-Cadherines, ce qui cause leur internalisation et, conséquemment, le relâchement des jonctions cellulaires et la perméabilité vasculaire *in vitro*.^{126,127,128,129,113,365} En plus, la délétion de Src chez la souris résulte en l'abolition de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF, démontrant son importance dans ce processus.²²⁸ Les résultats *in vivo* présentés au chapitre II supportent le rôle promoteur de DEP-1 sur la perméabilité vasculaire. En effet, l'activation de Src et la phosphorylation des VE-Cadherines sont diminuées chez la souris *Dep-1* KO, ce qui explique la baisse de perméabilité observée en réponse au VEGF (Chapitre II).¹¹³ Toutefois, la perméabilité vasculaire induite par des facteurs inflammatoires comme l'huile de moutarde et l'histamine ainsi que la perméabilité basale du réseau vasculaire ne semblent pas modulées chez la souris

Dep-1 KO ou par la délétion de Src.^{112,228} Nos travaux suggèrent donc que DEP-1 est, via l'activation de Src, un promoteur de la perméabilité vasculaire par le VEGF, mais qu'il n'est que peu impliqué dans d'autres mécanismes induisant la perméabilité.

1.4 Les effets pro-tumoraux de l'expression stromale de DEP-1

Les travaux présentés au chapitre II ont permis d'établir le rôle promoteur de DEP-1 dans la formation de capillaires sanguins en plus de son rôle crucial dans l'induction de la perméabilité vasculaire *in vivo*. L'angiogenèse contribue à de nombreuses pathologies dont le cancer.² Nos travaux ont mis en lumière le rôle pro-tumoral de l'expression de DEP-1 dans le stroma. Effectivement, la croissance de deux modèles tumorales est significativement réduite chez la souris *Dep-1* KO, probablement due à un défaut important de vascularisation de la tumeur. Conséquemment, ces tumeurs présentent une augmentation de leur apoptose et une baisse de leur prolifération puisque les vaisseaux sanguins tumoraux assurent l'apport en nutriments nécessaire à la croissance tumorale.² Également, la formation de métastases dans un modèle spontané ou expérimental est également réduite chez la souris *Dep-1* KO. Sachant que la perméabilité vasculaire est un déterminant important de la dissémination des cellules cancéreuses, cette observation est cohérente avec l'inhibition de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF chez ces mêmes animaux. Donc, l'expression de DEP-1 dans le stroma joue un rôle pro-tumoral.

Nos travaux se sont concentrés sur les effets endothéliaux de DEP-1 lors de la réponse angiogénique. Étant donné que DEP-1 peut être exprimé dans divers types cellulaires incluant les cellules hématopoïétiques et que nos expériences sont basées sur une souris complètement déplétée en DEP-1, il est impossible d'exclure la contribution d'un effet de DEP-1 qui ne serait pas endothélial.^{366,502} À ce jour, l'implication de DEP-1 dans la fonction des cellules B, des cellules T, des plaquettes, des macrophages, des neutrophiles et des cellules musculaires lisses des voies respiratoires a été démontrée.^{226,368,364,369,363,370} Au niveau des les cellules B, les cellules T, les neutrophiles, les macrophages, la délétion de DEP-1 est partiellement

compensée par une seconde phosphatase, CD45, ce qui limite les conséquences biologiques de la délétion de DEP-1.^{226,368,364}

Les plaquettes sont responsables de l'aggrégation et de la coagulation lors d'une insulte tissulaire ou vasculaire.⁵⁰³ Ces cellules n'expriment pas le CD45 et le rôle joué par DEP-1 y semble plus marqué.³⁶³ En effet, les plaquettes *Dep-1* KO présentent une hypoactivation des SFK se traduisant par une réduction de l'aggrégation plaquettaire et de la thrombose.³⁶³ Un parallèle intéressant est que, tout comme pour les plaquettes, les cellules endothéliales n'expriment pas CD45 et la déplétion de DEP-1 cause également une réduction importante de l'activation des SFK.⁵⁰⁴ Depuis de nombreuses années, le dérèglement de la fonction plaquettaire est associé à l'angiogenèse.^{503,505,506,507} L'activation des plaquettes augmente la néovascularisation en réponse au bFGF et au VEGF in vitro, dans un modèle d'anneaux aortiques et un essai de Matrigel notamment via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques.^{503,505,506,507} En plus, l'aggrégation plaquettaire limite les hémorragies au niveau des vaisseaux naissants.⁵⁰⁵ L'angiogenèse tumorale, quant à elle, est également augmentée par des facteurs sécrétés par les plaquettes. Donc, il est possible qu'un défaut d'activation plaquettaire contribue à l'inhibition de la néovascularisation observée au chapitre II chez la souris *Dep-1* KO puisque dans ces cellules DEP-1 est un médiateur important des ces fonctions via l'activation des SFK.^{371,363,369}

Au niveau des cellules exprimant à la fois DEP-1 et CD45, malgré la redondance rapportée, certaines fonctions cellulaires sont tout de même modulées par la délétion de DEP-1. Par exemple, au niveau des neutrophiles, la seule délétion de DEP-1 augmente le chimiotaxisme, mais diminue leur adhésion et leur activité phagocytaire.³⁶⁸ Dans un contexte tumoral, le recrutement des neutrophiles implique plusieurs fonctions cellulaires dépendantes de DEP-1 dont l'adhésion et le chimiotaxisme.⁵⁰⁸ Récemment, il a été rapporté que leur présence dans le microenvironnement tumoral favorise l'angiogenèse pathologique via la sécrétion de MMP9.⁵⁰⁹ Ainsi, un défaut de recrutement de ces cellules au niveau de la tumeur chez la souris *Dep-1* KO pourrait contribuer à limiter de la réponse angiogénique. Au niveau

des macrophages, DEP-1 et CD45 sont exprimés, mais leur délétion unique ne semble pas complètement compensée par la seconde phosphatase. Effectivement, les deux PTP promeut l'activation des SFKs, la phagocytose et la production de cytokines.²²⁶ Le recrutement des macrophages de type II dans le microenvironnement tumoral est crucial pour l'induction de la réponse angiogénique puisque ceux-ci sont en partie responsables de la sécrétion du VEGF.^{510,15} Ainsi, la diminution du recrutement des macrophages tumoraux chez la souris *Dep-1* KO (Chapitre II) pourrait également contribuer à diminuer la réponse angiogénique, bien qu'aucune différence des niveaux de VEGF ait été observée dans les lysats tumoraux.

Les cellules immunitaires infiltrent la tumeur par un processus nommé diapédèse. De cette façon, ces cellules se faufilent entre deux cellules endothéliales formant le vaisseau sanguin. À cette étape, l'interaction entre la cellule endothéliale et la cellule immunitaire induit l'internalisation des VE-Cadherines.⁵¹¹ Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la diapédèse sont grandement différents de ceux employés pour la perméabilité vasculaire induite par le VEGF ou l'histamine.⁵¹¹ À l'état basal in vivo, les VE-Cadherines sont phosphorylées sur la Y731 de façon constitutive. Durant la diapédèse, ce résidu est déphosphorylé par SHP-2 et induit l'endocytose des VE-Cadherines, la déstabilisation des jonctions cellulaires endothéliales et le passage des cellules immunitaires, suggérant que ce mécanisme est indépendant de Src.⁴²⁰ Par conséquent, puisque DEP-1 semble médier ses effets sur la perméabilité vasculaire via Src et spécifiquement en réponse au VEGF, il est peu probable que le recrutement des cellules immunitaires par diapédèse soit limité chez la souris *Dep-1* KO. Néanmoins, la baisse de perméabilité vasculaire tumorale chez la souris *Dep-1* KO (Chapitre II) pourrait également contribuer à une diminution de l'infiltration tumorale des cellules immunitaires. Sommairement, les faibles réponses angiogéniques et de perméabilité vasculaire observées chez la souris *Dep-1* KO pourraient être dues à des effets qui ne se limitent pas aux cellules endothéliales. Ainsi, la génération d'un modèle murin déplété en DEP-1 spécifiquement dans les cellules endothéliales permettrait de préciser le rôle de DEP-1 dans ces cellules dans un contexte tumoral.

1.5 Intégration des différents rôles de DEP-1 dans le réseau vasculaire

Cette thèse a pour objectif d'étudier le rôle de DEP-1 à des niveaux physiologiques dans le contexte de l'angiogenèse développementale et post-natale à partir d'une souris *Dep-1* KO. Nos travaux ont démontré que, lors du développement de la vascularisation de la rétine, les souris *Dep-1* KO présentent un nombre de cellules meneuses, une densité de capillaires et une prolifération endothéliale plus importants, suggérant que les signaux régulant à la fois la croissance et l'organisation sont altérés. Dans ces cellules, l'expression de DEP-1 promeut l'activation de Src et l'expression du Dll4 (Chapitre III). De ce fait, l'expression de DEP-1 limite le bourgeonnement endothélial et la formation incontrôlée de vaisseaux sanguins par l'activation de la voie Notch. Néanmoins, l'augmentation de la densité de capillaires sanguins ne se traduit pas nécessairement par une plus grande fonctionnalité de la vascularisation rétinienne. En effet, l'inhibition chimique ou génique du Dll4 mène plutôt à un phénomène appelé l'«angiogenèse non-productive» où une grande quantité de vaisseaux sanguins est produite, mais ceux-ci sont très peu perfusés, ce qui résulte en une baisse du flot sanguin globale de l'organe ou de la tumeur.⁵¹² Ce phénomène a été principalement observé et étudié dans l'angiogenèse tumorale suite à un traitement ciblant le Dll4 où la croissance tumorale est inhibée malgré une vascularisation importante.¹⁷⁵ Une fois le développement terminé, DEP-1 semble plutôt promouvoir la perméabilité vasculaire, la formation de capillaires et l'angiogenèse tumorale via l'activation de Src. Ainsi, tant dans un modèle développemental que post-natal, l'expression de DEP-1 régule la signalisation angiogénique et particulièrement la kinase Src. Toutefois, la capacité de bourgeonnement des cellules endothéliales est différente dans les deux contextes expérimentaux, ce qui suggère que la régulation de l'angiogenèse par DEP-1 est complexe et dépend du contexte.

Une explication potentielle à cette différence importante de capacité à bourgeonner des cellules endothéliales en absence de DEP-1 lors du développement et de l'angiogenèse post-natal découlerait de l'effet de DEP-1 sur la voie Notch. Effectivement, lorsque Notch est inhibée dans un contexte de vascularisation de la rétine, une augmentation du bourgeonnement est observée tandis que l'angiogenèse est inhibée dans un contexte tumoral.^{513,137} Une étude récente a démontré que l'inhibition combinée des interactions entre Notch et ses deux

principaux ligands, Dll4 et Jagged-1, résultait en des effets dépendants du contexte.⁴⁸⁷ De façon générale, l'inhibition de Dll4 mène à l'augmentation du bourgeonnement endothélial et de la complexité de la vascularisation tandis que l'inhibition de Jagged-1 est plutôt associée à une stabilisation des vaisseaux et une atténuation du bourgeonnement.^{487,191,192} Toutefois, lorsque les deux voies sont inhibées simultanément, la vascularisation de la rétine est augmentée, suggérant un effet dominant de Dll4 dans ce contexte. Cependant, le bourgeonnement de sphéroïdes endothéliaux *in vitro* et l'angiogenèse tumorale sont inhibés dans ces conditions, suggérant plutôt la dominance d'un effet dépendant de Jagged-1.⁴⁸⁷ Vu la grande similarité entre ces résultats et ceux observés chez la souris *Dep-1* KO, il devient tentant de spéculer que DEP-1 régule l'expression de Dll4 et de Jagged-1 et est, conséquemment, un régulateur important de la voie Notch. Ainsi, il serait important d'étudier le rôle de DEP-1 sur l'expression de Jagged-1. Certaines évidences supportent leur association. Tout d'abord, tout comme pour Dll4, l'expression de Jagged-1 est dépendante de l'activation de la β -caténine et de l'activation d'Akt.^{181,173} Donc, DEP-1 pourrait permettre sa régulation de par son effet sur l'activation de Src selon un mécanisme similaire à celui proposé pour Dll4. De plus, les lysats rétiniens de souris *Dep-1* KO présentent des niveaux de Jagged-1 légèrement diminués à P5 (donnée non publiée; Fournier et Royal).

Lors du développement, les souris *Dep-1* KO présentent une augmentation de bourgeonnement endothélial comparée aux souris WT tandis qu'à l'âge adulte, la réponse angiogénique est réduite chez ces même animaux. Cette divergence pourrait également s'expliquer par le rôle de DEP-1 dans la survie des cellules endothéliales. Durant le développement vasculaire, la signalisation du VEGF est cruciale et abondante au sein du réseau vasculaire. Des ces conditions, le VEGF régule de nombreuses fonctions endothéliales dont la survie. La dépendance des cellules au VEGF comme médiateur de leur survie décroît considérablement avec leur maturation et le recrutement de cellules murales comme les pericytes.^{514,515,516,517,518,519,520} En effet, une baisse du VEGF entraîne la rétraction ou même la mort des vaisseaux sanguins naissants.^{514,106} Ce phénomène permet d'expliquer notamment qu'un traitement inhibant le VEGF bloque la néovascularisation sans altérer significativement le réseau vasculaire établi et mature. De façon intéressante, notre équipe a rapporté qu'*in vitro*,

DEP-1 promeut la survie cellulaire induite par le VEGF via l'activation d'Akt.⁹⁵ Chez la souris *Dep-1* KO, l'angiogenèse post-natale est considérablement réduite en réponse au VEGF à partir d'un modèle d'anneaux aortiques ex vivo, de formation de capillaires in vivo (plug de Matrigel) et de croissance tumorale (Chapitre III). Toutefois, les méthodes employées ne permettent pas de déterminer si cette diminution est due à une inhibition de la formation de ces capillaires ou plutôt à une rétraction ou à la mort de ces derniers. À ce sujet, la caractérisation des rétines des souris *Dep-1* KO a permis de mettre en lumière la complexité de la régulation endothéliale médiée par DEP-1. Lors du développement, le réseau vasculaire est en pleine expansion et est principalement immature. À ce moment, les cellules endothéliales *Dep-1* KO présentent une augmentation de leur prolifération, ce qui est en accord avec les rôles anti-prolifératifs de DEP-1, mais également une baisse de l'activation de Src et d'Akt, régulant plutôt l'expression du Dll4 et le bourgeonnement endothélial (Chapitre III). Bien que les rétines des souris *Dep-1* KO présentent un branchement plus complexe à P5, leur apparence est similaire à celle du WT à P14 (Données non publiées). À ce stade, la vascularisation de la rétine procède à une phase de sélection et de maturation des vaisseaux sanguins au cours de laquelle des vaisseaux sanguins seront sélectionnés tandis que les autres seront éliminés. Ainsi, il est possible que les vaisseaux sanguins des souris *Dep-1* KO soient plus susceptibles de mourir lors de la phase de sélection due à la faible activation d'Akt. De façon intéressante, des résultats préliminaires montrent une augmentation de la mort cellulaire par un essai TUNEL chez la souris *Dep-1* KO à P14 (Donnée non publiée). Ce résultat suggère que, durant le développement rétinien, l'absence de DEP-1 permet une prolifération accrue des cellules endothéliales durant la phase d'expansion, mais cause également une baisse de la survie lors de la phase de sélection. Un équilibre entre ces deux phénomènes expliquerait pourquoi aucune différence phénotypique n'est observée à P14. De plus, tout comme pour DEP-1, la souris *Akt1*^{-/-} ne présente aucun défaut vasculaire embryonnaire, suggérant que l'activation d'Akt n'est pas nécessaire.^{521,522,523} Par contre, l'angiogenèse post-natale en réponse au VEGF dépend de son activation.^{524,525} En plus, la délétion d'*Akt1* spécifiquement dans les cellules endothéliales cause un retard de croissance de la vascularisation et du branchement global de la rétine, démontrant l'importance de l'activation de cette voie dans ce phénomène.⁵²⁶ Il devient donc tentant de spéculer que DEP-1 est un médiateur crucial de l'activation d'Akt tel

qu'observé in vitro et, conséquemment, régule la survie endothéliale durant l'angiogenèse post-natale.

1.6 Interaction potentielle entre DEP-1 et la VE-PTP et leur régulation dans les différents phénotypes endothéliaux

Les effets de DEP-1 dans le réseau vasculaire sont principalement attribuables à sa participation au complexe formé par les VE-Cadherines et le VEGFR2. Plusieurs évidences supportent l'implication d'une autre phosphatase, la VE-PTP, dans la régulation de l'angiogenèse et même une interaction potentielle avec DEP-1. Une souris mutante pour VE-PTP, où seulement le domaine extracellulaire est exprimé et sécrété, ainsi qu'une souris VE-PTP KO meurent à l'état embryonnaire suite à un défaut de ramification et une angiogenèse anormale, rappelant le phénotype de la souris DEP-1 KI.^{302,301,339} Tout comme DEP-1, la VE-PTP se retrouve au niveau des jonctions cellulaires, forme un complexe avec les VE-Cadherines et permet la déphosphorylation du VEGFR2 à l'état basal.^{280,299,94,527} En plus, l'expression de la VE-PTP est associée au maintien de l'intégrité vasculaire et est un régulateur de la perméabilité vasculaire, suggérant qu'elle régule des fonctions endothéliales similaires à celles dépendantes de DEP-1.⁵²⁷ Toutefois, leurs effets sur ces fonctions sont inverses. En effet, la dissociation de la VE-PTP et du VEGFR2 est induite par le VEGF et est nécessaire au relâchement des jonctions cellulaires et la perméabilité vasculaire in vitro et in vivo.^{527,528} Inversement, l'expression de DEP-1 permet l'activation de Src associé au VE-Cadherines et la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF.^{95,113,365} Ainsi, la VE-PTP semble être un atténuateur de la signalisation émergeant du complexe VEGFR2/VE-Cadherines/DEP-1 (Figure 1A-B). Bien que les effets de VE-PTP soient attribués à la déphosphorylation du VEGFR2, il est tentant de spéculer que DEP-1 pourrait être une cible également.⁵⁰¹ Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont identifié les tyrosines 1311 et

1320 phosphorylées comme des sites de liaison pour le domaine SH2 de Src et son activation par DEP-1 en réponse au VEGF.¹²⁵ De cette façon, à l'état basal dans les cellules confluentes, VE-PTP permettrait la déphosphorylation de ces résidus et diminuerait l'interaction entre Src et DEP-1, limitant ainsi la réponse angiogénique. Néanmoins, l'activité catalytique de DEP-1 serait inchangée et permettrait la déphosphorylation du VEGFR2 et des ERK1/2 puisque qu'un mutant Y1311F/Y1320F de DEP-1 présente la même activité catalytique.¹¹³ Ainsi, DEP-1 et VE-PTP assureraient conjointement l'état de quiescence des cellules endothéliales confluentes. Cette interaction entre DEP-1 et VE-PTP serait principalement retrouvée dans les vaisseaux sanguins stabilisés, où les niveaux d'expression de VE-Cadherine et DEP-1 sont élevés.^{278,94} Ces cellules forment des jonctions cellulaires stables, ce qui favorise la formation des complexes des VE-Cadherines et la stabilisation du réseau vasculaire (Figure 1B).

Lors de la réponse angiogénique, il y a relâchement des jonctions cellulaires et activation des cellules endothéliales en cellules de la tige et cellules meneuses. Sachant que l'expression de DEP-1 est régulée par les contacts cellulaires et qu'une baisse de ces niveaux est observée dans les vaisseaux sanguins en remodelage, il est probable que l'expression de DEP-1 soit réduite dans ces cellules endothéliales activées.^{278,372} De façon similaire, l'expression de la VE-Cadherine est également régulée par la confluence cellulaire et serait graduellement réduite dans ces cellules, limitant son aggrégation au niveau des jonctions et diminue l'intensité des jonctions cellulaires. Ainsi, la formation du complexe VE-Cadherine/VEGFR2/DEP-1 est limitée dans les cellules activées, ce qui permet une activation accrue de la signalisation du VEGF dans ces cellules. Pour ce qui est de la VE-PTP, il est rapporté qu'elle cause la déphosphorylation du VEGFR2 au niveau des cellules de la tige.⁵⁰¹ Cependant, sachant que le VEGF induit la dissociation de la VE-PTP et du VEGFR2 et que les niveaux de VEGF extracellulaires sont plus importants au front de migration, il est cohérent qu'elle soit dissociée du récepteur dans les cellules meneuses.^{501,527,501} Collectivement, ces résultats suggèrent que les cellules endothéliales activées présentent une sensibilité accrue à la signalisation du VEGF due à l'affaiblissement progressif des jonctions cellulaires et la diminution de la formation du complexe VE-Cadherines/VEGFR2/DEP-1/VE-PTP (Figure 1). Néanmoins, les travaux du chapitre III ont démontré que malgré une expression faible de

DEP-1 dans les cellules meneuses, la PTP est tout de même essentielle à l'expression du Dll4 et la régulation de la réponse angiogénique dans ces cellules.

Dans un modèle où VE-PTP régule l'interaction entre Src et DEP-1 par la déphosphorylation des tyrosines 1311 et 1320, DEP-1 serait peu phosphorylé et ne permettrait pas l'activation de Src dans les cellules de type phalanges vu l'abondance des complexes formés par les VE-Cadherines (Figure 1B). Au niveau de la cellule de la tige, les complexes VE-Cadherine/VEGFR2/DEP-1/VE-PTP sont moins importants. Ainsi, DEP-1 serait modérément phosphorylé et induirait une faible activation de Src (Figure 1C). Toutefois, dans la cellule meneuse, DEP-1 induirait une activation optimale de Src et des voies de signalisation qui en dépendent puisque la VE-PTP semble dissociée du VEGFR2 (Figure 1D).⁵⁰¹ Vu l'affaiblissement des jonctions dans la cellule meneuse, il est possible que DEP-1 soit également dissocié du VEGFR2, permettant ainsi la pleine activation du récepteur. Cependant, cette dissociation entre DEP-1 et le VEGFR2 n'altère pas les fonctions activatrices de DEP-1 sur Src. De cette façon, DEP-1 peut promouvoir l'invasion, l'expression du Dll4 et le réarrangement du cytosquelette caractéristiques de la cellule meneuse (Chapitre III).¹²⁵ Bien que DEP-1 ne semble plus être un régulateur négatif de la prolifération dans la cellule meneuse, cette dernière ne prolifère pas.³⁰ Une étude récente a plutôt suggéré que l'absence de prolifération de ces cellules est indépendante de l'activation des ERK1/2.³⁹¹ Conséquemment, DEP-1 semble être un médiateur important de la signalisation dépendante du VEGF et aurait un effet variant selon le contexte cellulaire et sa participation aux complexes des VE-Cadherines.

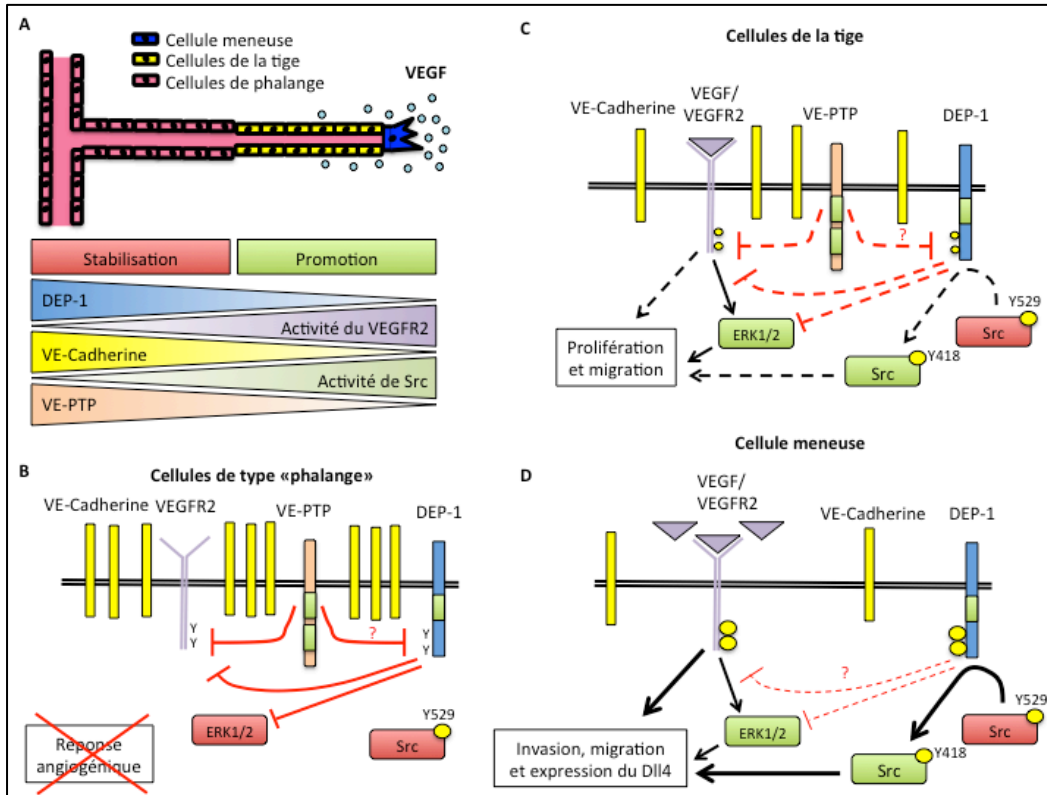


Figure 1 : Rôle différentiel de DEP-1 dans les phénotypes endothéliaux et sa participation aux complexes des VE-Cadherines/VEGFR2.

A) Le rôle de DEP-1 à travers les différents phénotypes de cellules endothéliales B) Dans les cellules de type phalange ou les vaisseaux sanguins stabilisés, des niveaux d'expression élevés de DEP-1 sont retrouvés et il est principalement localisé au niveau des complexes DEP-1/VE-Cadherine/VEGFR2/VE-PTP. Dans ces cellules, VE-PTP pourrait déphosphoryler DEP-1 (Y1311 et 1320) et ainsi limiter son interaction avec Src. Malgré cela, DEP-1 cause la déphosphorylation des ERK1/2 via son domaine KIM. En plus, DEP-1 et VE-PTP induisent la déphosphorylation du VEGFR2 et contribuent à maintenir la quiescence. C) Dans les cellules de la tige, les jonctions cellulaires sont relâchées et l'expression de DEP-1 et de la VE-Cadherine sont réduites. Ainsi, le complexe DEP-1/VE-Cadherine/VEGFR2/VE-PTP est moins présent. Dans ce contexte cellulaire, le VEGFR2 peut être modérément activé, permettant notamment la migration et la prolifération. D) Au niveau des cellules meneuses, la VE-PTP ne permet plus la déphosphorylation du VEGFR2 et ne ferait plus partie de ce complexe. Par conséquent, DEP-1 serait pleinement phosphorylé sur les résidus tyrosine 1311 et 1320, ce qui maximiserait l'activation de Src. La phosphorylation de DEP-1 par Src permet d'augmenter son activité catalytique. De cette façon, Src est pleinement activé et permet l'invasion et la migration tandis que ces mêmes cellules ne présentent pas de prolifération. Par contre, l'arrêt de prolifération des cellules meneuses est indépendant de l'activité des ERK1/2.

2. Les fonctions oncogéniques de DEP-1 dans le cancer du sein

Dans de nombreux cancers, une perte d'hétérozygotie pour le gène codant pour DEP-1 ainsi que des SNPs ont été retrouvés, ce qui suggèrerait initialement un rôle de gène suppresseur de tumeurs pour la phosphatase.^{400,401,402,394,403} Au niveau du tissu mammaire, l'expression de DEP-1 est associée à la différenciation puisque ses niveaux sont augmentés suite à la différenciation de la glande mammaire normale in vivo ainsi que par le sodium butyrate à partir de cellules tumorales.^{387,390} De plus, la surexpression excessive de DEP-1 dans les cellules cancéreuses mammaires peu invasives réduit leur prolifération et leur capacité à former des colonies.^{387,390} Ainsi, DEP-1 semble être impliqué dans le maintien de l'intégrité tissulaire. En plus, le gène codant pour DEP-1 (*PTPRJ*) a même été suggéré comme faisant partie du locus de susceptibilité au cancer du côlon murin.⁴⁰¹ Toutefois, tout comme pour les cellules endothéliales, le rôle de DEP-1 dans les cellules tumorales semble plus complexe. D'abord, la délétion complète de DEP-1 chez la souris n'augmente pas le risque de développer une tumeur spontanée, suggérant que DEP-1 ne serait pas qu'un gène suppresseur de tumeur.³⁶⁶ Certaines évidences suggèrent également un rôle potentiellement pro-tumoral de mutations de DEP-1 dans la tumorigenèse. Effectivement, une mutation de DEP-1 (K1017N) est enrichie dans des tumeurs primaires et au niveau de métastases au cerveau de cellules tumorales mammaire, ce qui suggère plutôt une association entre l'expression de DEP-1 et le potentiel invasif.⁴⁰⁴ L'étude présentée au chapitre IV démontre, pour la première fois, que l'expression endogène de DEP-1 corrèle avec l'agressivité de lignées cellulaires de cancer du sein et que son expression ainsi que sa surexpression modérée promeuvent l'activation de la kinase Src et des voies de signalisation invasives qui en dépendent. Ainsi, DEP-1 stimule l'invasion des cellules cancéreuses in vitro et augmente la formation de métastases aux poumons in vivo. Toutefois, tout comme pour les cellules endothéliales, il a été démontré que des niveaux d'expression modérés de DEP-1 favorise l'activation de Src et l'invasion tumorale tandis que des niveaux faibles ou élevés les inhibent.^{113,415} De façon intéressante, cet effet dose-dépendant de DEP-1 est également observé dans des cohortes de patientes atteintes du cancer du sein, où l'expression modérée de DEP-1 est associée avec un mauvais pronostic de survie et une taux de rechute élevé.

Les travaux présentés au chapitre IV ont déterminé que l'expression de DEP-1 est supérieure dans les lignées cellulaires hautement invasives présentant un phénotype de dédifférenciation. Ces observations contrastent avec des résultats antérieurs suggérant plutôt que DEP-1 est plus exprimé dans les tissus mammaires suite à leur différenciation et que, conséquemment, DEP-1 promeut la stabilisation de ces cellules lors du développement et la maturation de la glande mammaire de façon similaire aux observations réalisées dans les cellules endothéliales.³⁸⁷ Néanmoins, même dans les cellules moins invasives (T47D et SKBr3), la surexpression de DEP-1 résulte en une augmentation de leur potentiel invasif et l'activation de Src malgré les faibles niveaux endogènes, suggérant que l'interaction entre DEP-1 et Src est présente à tous stades de la maladie (Chapitre IV). De façon intéressante, l'expression de DEP-1 régule également l'activation de Src et corrèle de façon similaire avec le potentiel invasif de lignées cellulaires du cancer de l'ovaire (Roussy et al. Données non publiées).

Lors de notre étude, la présence de mutation de DEP-1 n'a pas été considérée, ce qui pourrait représenter un biais. À cet effet, une première étude avait initialement souligné un taux de mutations élevé de DEP-1 sur un très petit nombre d'échantillons dans le cancer du sein, du colon et de l'ovaire ce qui pouvait laisser présager que les effets pro-tumoraux de DEP-1 seraient plutôt observables pour les formes mutées.⁴⁰¹ En effet, la mutation K1017N est enrichie dans des métastases au cerveau de cellules cancéreuses mammaires.⁴⁰⁴ Cette mutation pourrait limiter l'interaction entre DEP-1 et les ERK1/2 et ainsi limiter les effets anti-prolifératifs de DEP-1. Toutefois, la banque de données Bioportal, comprenant un grand nombre d'échantillons, rapporte davantage de cas de patientes présentant des amplifications de DEP-1 pour les cancers du sein et de l'ovaire et le taux de mutation de DEP-1 est faible (Annexe I). Néanmoins, même si les modèles cellulaires exprimaient une forme mutée de DEP-1, l'expression de DEP-1 WT a permis de rétablir l'activation de Src et le potentiel invasif des cellules MDA-MB-231, T47D et SK-BR3, ce qui suggère que les résultats obtenus découlent de DEP-1 WT et non simplement d'une forme mutée.

2.1 Implications de DEP-1 dans d'autres voies de signalisation pro-invasives dans le cancer du sein

Dans le cadre de nos travaux, nous avons concentré nos efforts sur la régulation de la signalisation Notch dans la réponse angiogénique. Par contre, la suractivation de la voie Notch par surexpression de Notch ou de ses ligands a été rapportée pour de nombreux types de cancers hématologiques, dont les leucémies aux cellules B et T, les lymphomes et les leucémies myéloïdes, ainsi qu'au niveau des tumeurs solides incluant le cancer du sein, les mélanomes et les adénocarcinomes pulmonaires.^{529,530,531,532,533,534} Au sein de la tumeur, le Dll4 est exprimé par la vasculature et les cellules cancéreuses.^{175,535} Ainsi, l'utilisation d'anticorps ciblant spécifiquement le Dll4 humain ou murin dans une étude de xénogreffes a mis en lumière le rôle de Dll4 au niveau des cellules cancéreuses.⁵³⁵ Cette étude a démontré que Dll4 régule l'expression des gènes dépendants de Notch, la prolifération et la fréquence de cellules souches cancéreuses, cellules associées à la rechute des patients.⁵³⁵ Récemment, il a été montré que la présence de Dll4 sérique chez des patientes atteintes du cancer du sein corrèle avec l'agressivité de la tumeur.⁵³⁶ Nos travaux, présentés au chapitre IV, ont démontré que l'expression de DEP-1 est plus élevée dans les cas de cancer du sein agressifs classés triple négatifs n'exprimant pas les marqueurs classiques (HER2, ER, PR). De façon intéressante, l'expression de Jagged-1 et de Notch1 est également augmentée dans ce même sous-type de cancer et est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à un plus grand risque de rechute, de façon similaire à nos observations avec DEP-1.^{415,537,538,539} Ainsi, il serait fort intéressant d'approfondir le lien entre DEP-1 et la voie Notch dans la signalisation du cancer du sein puisque l'activation de Src, nécessaire à l'expression de Dll4 en réponse au VEGF, est également dépendante de DEP-1 dans les cellules tumorales mammaires.

Nos travaux ont associé l'expression de DEP-1 à l'activation de Src et de voies de signalisation invasives qui en dépendent in vitro et in vivo dans un modèle de cancer du sein invasif. Dans ce contexte, la déplétion de DEP-1 inhibe l'invasion tumorale et la formation de métastases (Chapitre IV).⁴¹⁵ Néanmoins, ces travaux n'excluent pas la possibilité que d'autres voies de signalisation contribuent aux effets promoteur de DEP-1 sur l'invasivité tumorale. À

ce propos, une interaction entre DEP-1 et la syntenine a été rapporté précédemment.⁵⁴⁰ La syntenine est une protéine d'échaffaudage présentant deux domaines PDZ. Son implication tumorale a été principalement étudiée dans des modèles de mélanomes. L'expression de la syntenine est biphasique et une baisse de son expression est observée lors des premiers stades de la progression tumorale. Par contre, son expression augmente à des stades plus avancés de la maladie, suggérant que l'expression de la syntenine est associée à l'agressivité tumorale.^{541,542} Ces données sont supportées par une étude démontrant que des lignées cellulaires métastatiques mammaires et gastriques surexpriment la syntenine comparativement au tissu sain ou à d'autres lignées cellulaires moins agressives.⁵⁴³ Sa surexpression à partir de lignées cellulaires peu agressives (MCF-7 et Az-521) augmente leur capacité invasive.⁵⁴³ Parallèlement, sa surexpression dans un modèle de mélanome favorise la formation de métastases.⁵⁴² Au niveau clinique, une augmentation de l'expression de la syntenine est associée à un mauvais pronostic de survie et un risque de rechute élevé.⁵⁴⁴ La syntenine est donc fortement associée à l'invasivité tumorale et présente de nombreuses similitudes avec DEP-1.

D'un point de vue moléculaire, les effets pro-invasifs de la syntenine dépendent de sa liaison physique à Src ainsi qu'à l'activation de ce dernier à la membrane.^{545,546} Cette interaction est nécessaire aux effets de la syntenine sur la motilité cellulaire, l'invasion et la formation de métastases *in vivo*.⁵⁴⁵ Bien que Boukerche et al. aient démontré l'interaction entre la syntenine et Src, le mécanisme par lequel Src est activé reste méconnu.⁵⁴⁵ Sachant que DEP-1 présente une séquence consensus de liaison par un domaine PDZ, qu'il interagit directement avec la syntenine et que les deux protéines sont retrouvées au niveau des jonctions cellulaires, il est tentant de spéculer que DEP-1 pourrait être impliqué dans l'activation de Src dans ce contexte et que la syntenine pourrait contribuer au phénotype pro-métastatique médié par DEP-1 dans le cancer du sein agressif.^{540,94,547} En ce sens, nos travaux ont démontré que DEP-1 permet l'activation de Src dans les cellules tumorales mammaires et des données non publiées rapportent une interaction entre DEP-1 et la syntenine par immunoprécipitation réciproque dans les cellules MDA-MB-231 (Annexe II A-C).⁴¹⁵

Au cours des dernières années, la syntenine a également été identifiée comme un régulateur important de la biogenèse des exosomes.⁵⁴⁸ Dans le modèle proposé par Baietti *et al.*, la syntenine lie le domaine intracellulaire d'une protéine transmembranaire, le Syndecan, retrouvé au niveau des corps multivésiculaires (MVB). Une fois recrutée à la membrane, la syntenine interagit avec Alix, une protéine permettant le recrutement de la machinerie ESCRT nécessaire au bourgeonnement des exosomes.^{549,550, 551} Finalement, la fusion du MVB à la membrane plasmique cause la relâche des exosomes.⁵⁵⁰ De façon intéressante, nos travaux préliminaires ont déterminé que DEP-1 s'associait à Alix en plus de la syntenine, suggérant que DEP-1 pourrait participer à la formation du complexe syntenine-Alix. À ce propos, DEP-1 a été identifié comme composant des exosomes sécrétés par les cellules tumorales, et sa présence corrèle avec celle de la syntenine (Annexe II D). Pour recruter Alix et induire la biogenèse des exosomes, la syntenine doit s'associer au Syndecan, une protéine transmembranaire, au niveau du MVB.^{549,548} Nos données préliminaires suggèrent que l'expression de DEP-1 promeut également l'association du complexe Alix-Syntenin et, par le fait même, leur présence dans les exosomes sécrétés (Annexe II D).^{549,550} Par conséquent, il serait plausible que DEP-1 soit retrouvé au niveau des exosomes syntenine-positif via un mécanisme similaire à celui du Syndecan puisque les deux protéines sont ancrées à la membrane et présentent une séquence reconnue par la syntenine dans leur domaine intracellulaire. Sachant que les exosomes sécrétés par les cellules cancéreuses sont associés à l'augmentation de l'invasion de la cellule receveuse, de la réponse angiogénique et de la formation de métastases, il serait grandement intéressant d'évaluer le rôle de DEP-1 dans leur biogenèse et leur fonctionnalité *in vitro* et *in vivo*.^{552,553,554,555,556,557,558}

2.2 Modèle intégratif du rôle de DEP-1 dans le tissu mammaire normal et tumoral

Les travaux du chapitre IV ont montré, pour la première fois, le rôle de DEP-1 dans la progression tumorale de cellules cancéreuses mammaires et ont déterminé que l'expression endogène ou la surexpression modérée de la phosphatase stimulait l'activation de Src et l'invasion qui en dépend. Cependant, le rôle de DEP-1 dans le tissu mammaire ne semble pas

se limiter à l'activation de Src. En effet, l'expression de DEP-1 est augmentée par la différenciation de la glande mammaire normale et celle de cellules cancéreuses induite par le sodium butyrate, suggérant que son expression favoriserait la stabilisation et la quiescence du tissu.^{387,390} Ainsi, tout comme pour les vaisseaux stabilisés, l'augmentation de l'expression de DEP-1 dans le tissu différencié, où les jonctions cellulaires sont abondantes, causerait une inhibition de la signalisation et de la prolifération (Figure 2). Par contre, le rôle de DEP-1 dans le cancer du sein semble plus complexe. Dans un modèle de cancer du sein, plusieurs oncogènes peuvent mener à l'initiation de la tumorigenèse et il est concevable de croire que l'expression de DEP-1 pourrait être reprimée dans certaines cellules où la phosphatase limiterait leur transformation via ses effets stabilisateurs en déphosphorylant les protéines retrouvées aux jonctions cellulaires ou via ses effets anti-prolifératifs.³⁸⁷ À ce propos, une première étude avait rapporté que l'expression de DEP-1 était plus faible dans des tissus cancéreux mammaires lorsque comparée au tissu normal.³⁹⁰ À l'inverse, des niveaux d'expression de DEP-1 plus élevés ont été observés à partir de la banque de données Oncomine en comparant uniquement des tumeurs mammaires hautement invasives aux tissus normaux (Chapitre IV). Par conséquent, il est tentant de spéculer que les niveaux d'expression de DEP-1 sont plus faibles lors de l'initiation tumorale et que ceux-ci réaugmentent lors de la progression tumorale. De plus, cette variation de l'expression de DEP-1 à travers la progression tumorales est supportée par nos résultats in vitro, où les cellules les plus agressives (MDA-MB-231, Hs578T et BT549) expriment davantage DEP-1 que les cellules moins agressives (T47D, MCF-7 et SK-Br-3) (Chapitre IV). En plus, cette expression est même davantage augmentée dans un variant métastatique des cellules MDA-MB-231, suggérant que l'expression de DEP-1 augmente avec la progression tumorale. De plus, l'augmentation de ces niveaux endogènes de DEP-1 corrèle avec une augmentation de l'activation de Src et l'invasivité. Par contre, une surexpression saturante de DEP-1, même dans ces lignées cellulaires invasives, inhibe l'invasion. En effet, tout comme pour les cellules endothéliales, il a été démontré que des niveaux d'expression modérés de DEP-1 favorise l'activation de Src via la déphosphorylation de sa tyrosine inhibitrice et, dans ces conditions, stimulent l'invasion tumorale (Chapitre IV).^{113,415} Ainsi, lorsque DEP-1 est déplété, Src est hyperphosphorylé en Y529 et maintient une conformation fermée et peu active. Une surexpression de DEP-1 résulte en la déphosphorylation de la Y529, mais également de la

Y418 de Src ce qui se traduit par une activité limitée de Src. Selon ce mécanisme, seulement des niveaux modérés d'expression de DEP-1 permettent une activation optimale de Src et l'invasion des cellules MDA-MB-231. L'invasion tumorale est associée à la formation de métastases qui sont la cause principale de mortalité par le cancer, et l'activation de Src dans les cellules cancéreuses mammaires est associée à leur capacité à former des métastases aux os et au cerveau.^{448,559,452,453} De façon intéressante, chez les patientes atteintes du cancer du sein, l'expression modérée de DEP-1 est associée à un mauvais pronostic et un taux de rechute élevé, suggérant que l'effet dépendant de la dose de DEP-1 est également applicable en clinique.

Collectivement, les données disponibles suggèrent que l'expression de DEP-1 varie lors de la progression tumorale et qu'un élément déclencheur favoriserait sa réexpression. Il est à considérer que nos résultats ont principalement été observés au niveau des cellules cancéreuses hautement invasives qui présentent plutôt un phénotype mésenchymateux, caractérisé par de faibles jonctions cellule-cellule notamment via la perte de l'expression des E-Cadherines.^{483,560} Ainsi, sachant que DEP-1 se trouve principalement localisé au niveau de ces jonctions où il interagit avec ses divers partenaires, il est probable que, dans ce contexte cellulaire, DEP-1 soit séparé de ses partenaires habituels et ait un interactome complètement différent favorisant potentiellement des effets pro-invasifs. Par exemple, l'expression de DEP-1 dans les cellules tumorales MDA-MB-231 ne semble pas moduler leur prolifération. La perte de l'expression de E-Cadherine et des jonctions cellulaires, ainsi que l'expression de marqueurs mésenchymateux, sont associées au phénomène de l'EMT.⁵⁶¹ Plusieurs évidences supportent une association entre l'EMT et DEP-1. D'abord, nos résultats démontrent que DEP-1 régule l'activation de Src et la sécrétion de MMP9 dans les cellules MDA-MB-231, deux phénomènes importants à l'initiation de l'EMT.^{415,562,563,564} L'EMT cause la perte des jonctions cellulaires et favorise l'invasion des cellules tumorales dans le tissu avoisinant, ce qui mène éventuellement à la formation de métastases.^{563,565} De façon intéressante, l'expression de DEP-1 régule ces phénomènes in vivo dans ces même cellules. En somme, il serait possible que l'EMT soit l'élément déclencheur de la réexpression de DEP-1 dans les cellules cancéreuses mammaires ou bien que DEP-1 soit réexprimé et favoriserait la

déstabilisation des jonctions cellulaires via l'activation de Src et ainsi permettrait l'EMT. Des études animales dans un modèle de développement spontané de cancer du sein à partir de souris DEP-1 WT et KO permettrait d'établir le rôle et les niveaux d'expression de DEP-1 lors des différentes phases de la progression tumorale.

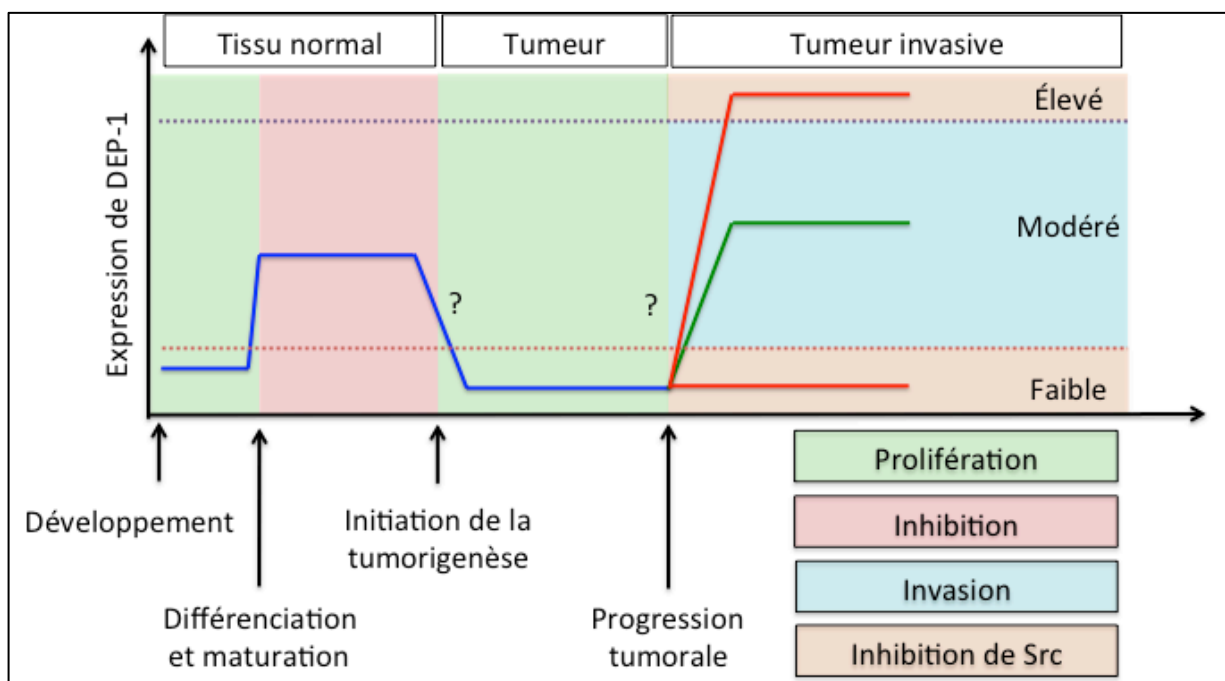


Figure 2 : Modèle des rôles et des niveaux d'expression de DEP-1 dans le tissu mammaire normal et tumoral

L'expression de DEP-1 est augmentée dans le tissu mammaire lors de sa différenciation. Ainsi, DEP-1 se retrouve fortement exprimé au niveau des jonctions cellulaires d'un tissu stable et mature. Dans ces conditions, DEP-1 assure la quiescence et l'intégrité du tissu. Lors de l'initiation de la tumorigenèse, il est possible que les niveaux de DEP-1 soient réduits afin de limiter ses effets stabilisateurs sur le tissu mammaire ce qui favoriserait la prolifération et la déstabilisation du tissu. À un stade plus avancé de la maladie coïncidant avec l'EMT, des niveaux variables de DEP-1 sont observés et déterminent l'activation de Src et l'invasivité des cellules tumorales. Des niveaux faibles ou élevés de DEP-1 résultent en l'inhibition de Src et de l'invasion tumorale via une hyperphosphorylation de Src en Y529 ou une hypophosphorylation de Src en Y418 et Y529 respectivement. Ainsi, l'expression intermédiaire de DEP-1 suite à l'EMT est permissive à l'activation optimale des voies pro-invasives régulées par Src.

3. Régulation des niveaux d'expression de DEP-1

Nos travaux mettent en lumière l'importance de la régulation de l'expression ou de l'activité catalytique de DEP-1. Tel que démontré dans les cellules endothéliales précédemment, les travaux présentés au niveau des cellules cancéreuses mammaires supportent l'idée que l'effet de DEP-1 dépend de ses niveaux d'expression.^{113,415} Ainsi, il est impératif d'approfondir nos connaissances quant aux mécanismes qui régissent les niveaux d'expression de DEP-1. À ce jour, les niveaux d'expression de DEP-1 à travers le réseau vasculaire fluctuent. Effectivement, les vaisseaux sanguins quiescents, mimant la confluence *in vitro*, présentent des niveaux de DEP-1 élevés. Inversement, des niveaux d'expression de DEP-1 plus faibles sont retrouvés dans les vaisseaux sanguins en remodelage suite à une insulte vasculaire *in vivo*, ce qui pourrait s'expliquer par un environnement hypoxique retrouvé au site de l'insulte. En effet, le promoteur de DEP-1 contient des éléments de réponse à l'hypoxie (HIF α) qui répriment son expression, suggérant que l'hypoxie pourrait promouvoir la réponse angiogénique en modulant l'expression de DEP-1.³⁷⁶ Il est possible que l'expression de DEP-1 au niveau des cellules tumorales soit également régulée par l'hypoxie. Effectivement, l'élément déclencheur de l'angiogenèse tumorale est principalement le microenvironnement hypoxique de la tumeur. Il est donc concevable que dans cet environnement, l'expression de DEP-1 soit réduite et permissive à la prolifération. Cette baisse de l'expression pourrait correspondre au stade d'initiation tumorale.

De plus, tout comme pour d'autres phosphatases de type récepteur, l'interaction entre DEP-1 et ses substrats dépend notamment de sa phosphorylation. Effectivement, les tyrosines 1311 et 1320 de DEP-1 sont des résidus essentiels à son interaction avec la kinase Src.¹¹³ Dès lors, les mécanismes menant à cette phosphorylation sont cruciaux à notre compréhension mécanistique des phénomènes régis par DEP-1. Au niveau des cellules endothéliales, la phosphorylation de ces résidus est Src-dépendante ce qui suggère que DEP-1 fait partie d'un boucle d'amplification signalétique de Src.¹¹³ En plus, récemment, il a été démontré que la phosphorylation de la tyrosine 1318 de DEP-1 par la caseine kinase 2 (CK2) promeut la phosphorylation subséquente de DEP-1 en Y1320, démontrant la complexité de la régulation

de DEP-1.³⁶⁵ De façon intéressante, nos travaux ont démontré qu'un mutant Y1311Y1320/FF ne peut activer efficacement Src dans les cellules MDA-MB-231 (Chapitre IV). Ainsi, il serait hautement intéressant de valider les mécanismes permettant la phosphorylation de DEP-1 au niveau des cellules tumorales.

La dimérisation du récepteur suite à la liaison d'un ligand permet une activation du récepteur tel que démontré par l'utilisation d'anticorps bivalents.³⁴⁴ À des niveaux d'expression élevés, la probabilité de dimérisation est également supérieure. Ainsi, l'activité phosphatase de DEP-1 est augmentée en fonction de son abondance. De plus, il pourrait aussi y avoir une perte de spécificité telle qu'observée pour des nombreuses réactions enzymatiques impliquant des phosphatases. Par exemple, la surexpression de DEP-1 cause non seulement la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice de Src (Y529), mais également de la tyrosine activatrice (Y418), tant chez les cellules endothéliales que tumorales.^{415,113} De plus, DEP-1 peut déphosphoryler ses propres résidus tyrosine et, par conséquent, l'augmentation de son activité catalytique pourrait limiter son interaction avec Src.¹²⁵ Donc, cela pourrait expliquer pourquoi, à partir d'un certain seuil d'expression, DEP-1 mène à l'inhibition de Src.

4. DEP-1 en tant que cible thérapeutique

Collectivement, les travaux de cette thèse ont démontré le rôle critique de DEP-1 en tant que régulateur important de la réponse angiogénique en réponse au VEGF, qu'elle soit physiologique ou pathologique, permettant donc d'identifier DEP-1 comme une cible thérapeutique intéressante pour contrôler l'angiogenèse. En plus, dans les cellules tumorales, DEP-1 est un régulateur de l'activation de Src et son expression modérée est associée à l'invasivité, un mauvais pronostic de survie et un taux de rechute élevé, soulignant également son importance en tant que cible thérapeutique anti-tumorale.⁴¹⁵ La combinaison de ces effets permettrait l'élaboration d'un traitement plus efficace et à effets multiples. En effet, théoriquement, un traitement ciblant DEP-1 permettrait, d'une part, d'inhiber la formation de vaisseaux sanguins associés à la tumeur et ainsi limiter l'apport en oxygène et en nutriments

de façon similaire aux traitements ciblant le VEGF. En plus, ce type de traitement devrait bloquer les capacités invasives des cellules tumorales mammaires. Par conséquent, DEP-1 est une cible thérapeutique de premier plan pour les cancers du sein invasifs. Récemment, une seconde phosphatase de la famille R3, PTPRO, a été rapportée comme médiant à la fois la régulation de la vascularisation tumorale et la progression tumorale de façon contraire aux résultats obtenus pour DEP-1.^{332,327,323} À l'inverse, la perte de VE-PTP (PTPRB), également membre de famille R3, résulte plutôt en l'augmentation de la perméabilité vasculaire.^{301,302} Ces études supportent la rationelle selon laquelle cibler une phosphatase de la famille R3 peut moduler la réponse angiogénique et tumorale.

Les effets de DEP-1 dans ces deux contextes découleraient principalement de sa capacité à activer Src. C'est pourquoi, un traitement ciblant DEP-1 devrait avoir des effets thérapeutiques similaires aux inhibiteurs de Src. À ce propos, plusieurs études cliniques ont évalué le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de Src dans le cancer du sein et de la prostate et les données préliminaires suggèrent une réponse bénéfique particulièrement au niveau des métastases osseuses.⁵⁶⁶ Plusieurs données pré-cliniques supportent également l'utilisation de tels inhibiteurs en clinique. Au niveau endothélial, l'inhibition de Src à l'aide du Dasatinib ou du Saracatinib cause une importante baisse de la perméabilité vasculaire et de la formation de capillaires induites par le VEGF.^{567,568} Au niveau des cellules tumorales mammaires, ces traitements résultent en l'inhibition de la croissance tumorale, de la migration, de l'invasion et de la formation de métastases.^{457,568,260,449} Un traitement ciblant efficacement DEP-1 devrait théoriquement présenter moins d'effets secondaires que les traitements ciblant Src de manière générale, puisque l'activation de Src médié par DEP-1 est très localisée. Au niveau des cellules endothéliales, DEP-1 régule la principale fraction de Src activée par le VEGF, soit celle associée aux VE-Cadherines au niveau des jonctions adhérentes in vitro et in vivo (Chapitre III).⁹⁵ Toutefois, un traitement ciblant DEP-1 ne devrait pas affecter l'activation de Src dans d'autres compartiments cellulaires, en réponse à d'autres stimuli ou dans des cellules où DEP-1 n'est pas essentiel. Donc, les effets d'un traitement ciblant DEP-1 seraient plus spécifiques que ceux d'un inhibiteur de Src.

Un défi entourant l'élaboration d'un traitement ciblant DEP-1 réside dans la stratégie à adopter. Tel que démontré dans les cellules endothéliales *in vitro* ainsi qu'au niveau des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo*, la déplétion de DEP-1 cause une inhibition de Src dû à une hyperphosphorylation de la tyrosine inhibitrice (Y529), résultant en son inhibition.^{415,113} À l'inverse, la surexpression excessive de DEP-1 permet la déphosphorylation de la Y529, mais également de la Y418, ce qui cause aussi une inhibition de Src. Par conséquent, induire une suractivation ou une inhibition drastique de DEP-1 serait des stratégies thérapeutiques potentielles, tant pour réprimer la réponse angiogénique que l'invasion tumorale. Toutefois, les deux approches comportent certains avantages et inconvénients.

4.1 La suractivation de DEP-1 en tant que stratégie thérapeutique

D'un point de vue théorique, la suractivation de DEP-1 serait une avenue thérapeutique potentielle pour inhiber la réponse angiogénique et pourrait mimer les résultats obtenus lorsque DEP-1 est surexprimé en abondance, au-delà des conditions permettant l'activation de Src et la promotion de la réponse angiogénique et la perméabilité vasculaire. Les effets inhibiteurs sur la prolifération et la formation de capillaires d'une telle expression ont également été démontrés *in vitro* dans les cellules endothéliales.⁹⁴

En plus de leurs effets sur Src, les suractivateurs de DEP-1 présentent de nombreux avantages. D'abord, l'activité phosphatase de DEP-1 permet la déphosphorylation de ses nombreuses cibles incluant les récepteurs aux facteurs de croissance et les ERK1/2. De ce fait, une suractivation de DEP-1 devrait causer une inhibition de la prolifération, de la survie, du potentiel migratoire ainsi que de nombreuses voies de signalisation tant pour les cellules cancéreuses que pour les cellules endothéliales.^{95,347,113,415,348} En plus, augmenter l'activité catalytique de DEP-1 devrait renforcer son effet stabilisateur dans le tissu sain mammaire et pourrait contrer les premières étapes de la tumorigenèse.^{387,390} Un effet stabilisateur de la suractivation de DEP-1 pourrait également être observé pour les vaisseaux sanguins matures et

même favoriser la normalisation des vaisseaux sanguins tumoraux.⁹⁴ Ce phénomène est maintenant considéré une avenue thérapeutique prometteuse puisque celle-ci permet l'établissement d'un flot sanguin au sein de la tumeur, ce qui facilite notamment la pénétration de la drogue dans la tumeur.⁵⁶⁹ Toutefois, l'élaboration d'un tel traitement nécessite d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes régissant l'activation de DEP-1. Pour que ce type de traitement soit efficace, l'augmentation de l'activité catalytique de DEP-1 doit être maximale tel que démontré *in vitro*, ce qui peut s'avérer difficile. Advenant une activation partielle de DEP-1, le traitement pourrait au contraire stimuler la réponse angiogénique et l'invasion tumorale.

À ce jour, peu d'exemples de mécanismes permettant l'augmentation de l'activité catalytique de DEP-1 ont été rapportés. D'abord, la liaison de la Thrombospondin-1 au domaine extracellulaire de DEP-1 permet d'augmenter son activité catalytique et favoriserait la quiescence vasculaire.³⁸⁰ D'autre part, l'utilisation d'un anticorps bivalent liant le domaine extracellulaire de DEP-1 a également permis d'augmenter son activité catalytique et résulte en une inhibition de la formation de capillaires *in vitro*.³⁴⁴ Finalement, des peptides agonistes interagissant également avec le domaine extracellulaire de DEP-1 causent l'inhibition de la formation de capillaires de cellules endothéliales et de la prolifération de cellules tumorales.^{358,359} Collectivement, ces données supportent l'idée selon laquelle un activateur de DEP-1 permet d'inhiber la réponse angiogénique et les cellules cancéreuses. Malheureusement, aucune donnée *in vivo* ne supporte l'applicabilité de ces composés. Dès lors, beaucoup de travail reste à faire afin de valider cette approche.

4.2 L'inhibition de DEP-1 comme avenue thérapeutique

Une inhibition drastique de DEP-1 devrait, théoriquement, résulter en des effets similaires à ceux obtenus par la déplétion ou délétion de DEP-1, soit une inhibition de la réponse angiogénique, de la perméabilité vasculaire et de l'invasion tumorale dues à un défaut d'activation de Src (Chapitre II et IV).^{415,125} Effectivement, dans ces conditions, Src est hyperphosphorylé en Y529 et fortement inactivé.²¹⁴ En plus, la souris *Dep-1* KO ne présente

aucune anomalie développementale, ni risque accru de développer une tumeur spontanée, suggérant que l'inhibition de DEP-1 *in vivo* serait sécuritaire.³⁶⁶

Plusieurs méthodes peuvent être employées pour inhiber DEP-1. D'abord, la cystéine du domaine catalytique de DEP-1, essentielle à la réaction enzymatique de déphosphorylation, serait une cible intéressante.²⁷³ Toutefois, cette cystéine est hautement conservée parmi les PTP et la cibler ne permettrait aucune spécificité.²⁷³ Néanmoins, une panoplie d'inhibiteurs de phosphatases présente des effets anti-angiogéniques *in vitro*, démontrant que, contrairement aux croyances, l'inhibition de phosphatases est une approche prometteuse dans le développement de traitements anti-angiogéniques.^{570,303} La structure des PTP diverge principalement dans leur domaine extracellulaire, ce qui suggère que le cibler serait la stratégie permettant la plus grande spécificité.²⁷³ Notre laboratoire a exploré deux approches afin d'inhiber DEP-1. D'abord, des travaux antérieurs ont identifié un ARNm différent de DEP-1 qui résulte en une protéine comprenant les 539 premiers acides aminés en N-terminal de DEP-1 (DEP-1₅₃₉) (Annexe III A-C). Cette partie comprend notamment le site de liaison à TSP-1, un ligand de DEP-1 régulant son activité catalytique.³⁸⁰ Lorsque DEP-1₅₃₉ est ajouté au milieu de culture de cellules HUVEC, la réponse angiogénique des cellules est réduite (Annexe III). Comme mécanisme d'action, ce variant soluble de DEP-1 pourrait agir en séquestrant les ligands activateurs de DEP-1 retrouvés dans le milieu de culture et ainsi limiter l'activation de la PTP d'une façon similaire à ce qui est observée pour les formes solubles des récepteurs du VEGF.^{89,90} D'autre part, un anticorps spécifique au domaine extracellulaire de DEP-1 (A3) a été testé pour ses effets sur la réponse angiogénique (Annexe III D-E). L'administration de cet anticorps sur des cellules HUVECs a résulté en l'augmentation de la phosphorylation de Y529, ce qui suggère un effet inhibiteur de l'activité phosphatase de DEP-1. Des données préliminaires suggèrent également que l'ajout d'anticorps A3 au milieu de culture limite la capacité des cellules endothéliales à former des capillaires et à envahir le Matrigel. Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus suite à la déplétion de DEP-1 par ARNi dans le même modèle.¹¹³ Ces travaux suggèrent donc que le développement d'inhibiteur de DEP-1 est possible et serait une avenue thérapeutique à explorer.

Bien que les travaux présentés dans cette thèse traitent du rôle de DEP-1 dans les cellules endothéliales et les cellules tumorales mammaires, l'applicabilité d'un traitement ciblant la PTP ne serait pas limitée à ces cellules. En effet, les travaux sur les cellules cancéreuses mammaires, endothéliales et immunitaires ont suggéré que DEP-1 régule l'activation des SFKs par la déphosphorylation de leur tyrosine inhibitrice et qu'il pourrait s'agir d'un mécanisme généralisable à tous les types cellulaires où la PTP est exprimée (Chapitres II, III et IV).^{363,226,364,95,113} Ainsi, il serait intéressant de caractériser l'implication de DEP-1 dans les différents cancers où l'activation des SFKs est importante à leur progression tel le cancer de l'ovaire. Un autre exemple de ce type de cancer est celui de la prostate. Dans ce cancer, Src et les SFKs sont importants à la tumorigenèse et la formation de métastases. Par exemple, la surexpression d'un ou plusieurs membres des SFKs est fréquemment retrouvée dans les cas de cancer de la prostate.⁵⁷¹ Dans ce cancer, l'activation de Src promeut la transformation des cellules prostatiques, leur invasion et la formation de métastases.^{572,573,574}

5. Perspectives de recherche

Cette thèse présente des études pionnières sur les rôles positifs de la phosphatase DEP-1 dans la signalisation des cellules endothéliales et tumorales et démontre, pour la première fois, les implications *in vivo* de son expression endogène. Au cours de la discussion, de nombreuses avenues de recherche ont été proposées et la possibilité de cibler DEP-1 en thérapie pour les cas de cancer du sein agressif a été abordée. Les connaissances actuelles permettent de prédire l'effet d'un tel traitement sur les cellules endothéliales et le réseau vasculaire. Par contre, l'implication de DEP-1 dans le cancer du sein devrait être davantage explorée afin de définir le rôle de DEP-1 dans les stades précoces de la tumorigenèse.

Afin d'étudier l'expression de DEP-1 à travers les différents stades de la progression tumorale, un modèle de développement spontané de cancer du sein serait utilisé.⁵⁶⁶ Ce modèle est bien caractérisé et représente tous les stades de la maladie (normal, hyperplasie, tumeur bénigne, tumeur maligne et métastases). De façon intéressante, les tumeurs obtenus à partir de

ce modèle animal ne présentent aucun marquage pour le récepteur de l'estrogène ou de la progestérone et qu'un très faible marquage pour HER2 ce qui en fait un excellent modèle pour évaluer les cancers du sein triple négatifs. De plus, les résultats du chapitre IV ont principalement été réalisés sur des cellules classées triple-négative (TNBC), ce qui renforce la correspondance entre les modèles. Dans un premier temps, l'expression de DEP-1 serait évaluée aux différents stades de la maladie afin de valider le modèle proposé de la variation de l'expression de DEP-1 aux différents stades de la maladie (Figure 2). Par la suite, ces animaux pourront être croisés avec les souris Dep-1 KO ou une souris où la délétion de DEP-1 sera spécifique aux cellules mammaires (gène PTPRJ floxé et expression de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur MMTV; Dep-1 MamKO). De cette façon, l'importance de DEP-1 dans le tissu mammaire et le stroma sera évaluée au cours de la tumorigenèse. À partir de ces études, le rôle de DEP-1 (tumoral et stromal) ainsi que son expression aux différents stades de la tumorigenèse mammaire seront évalués.

D'autre part, la caractérisation des tumeurs obtenues permettra d'approfondir la relation (co-expression, co-localisation et sécrétion d'exosomes circulants) entre DEP-1 et la syntenine dans un contexte tumoral. Pour compléter ces études, un mutant de DEP-1 où le domaine de liaison à la syntenine est muté (DEP-1 Δ PDZ) pourrait être généré et introduit dans les cellules MDA-MB-231 shDEP-1.⁵⁴⁰ Ces lignées cellulaires permettraient d'explorer in vitro et in vivo la contribution de cette association au phénotype invasif (activation de Src, invasion et formation de métastases) et la formation d'exosomes. Sachant que la sécrétion d'exosomes par les cellules cancéreuses est associée à la formation de métastases, les conséquences biologiques d'exosomes purifiés de populations de MDA-MB-231 (1 :shScramble+GFP; 2 :shDEP-1+GFP; 3 :shDEP-1+DEP-1WT; 4 :shDEP-1+DEP-1 Δ PDZ; 5 :shSyntenine+GFP) seront administrés aux cellules in vitro ou aux souris in vivo afin d'évaluer les capacités invasives et la formation de métastases.

Advenant des résultats prometteurs, la génération d'une souris knock-in de DEP-1 Δ PDZ serait hautement intéressante. Cette souris serait d'abord caractrisée pour la

composante endothéliale. Puis, elle pourrait être croisée au modèle de TNBC afin d'évaluer la contribution d'une telle mutation durant la tumorigenèse.

CHAPITRE VI – Conclusion

L'angiogenèse et la perméabilité vasculaire sont des éléments clés pour la croissance et la progression tumorale. Dans ce contexte, le médiateur le plus important de ces réponses du réseau vasculaire est le VEGF. L'élaboration de traitement anti-angiogénique ciblant le VEGF ou ses récepteurs a suscité un grand intérêt suite aux résultats précliniques très prometteurs de ces composés. Malheureusement, en clinique, les bénéfices pour le patient suite à ces traitements sont faibles dûs principalement à l'induction de l'angiogenèse par des voies alternatives. Conséquemment, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation et le remodelage des vaisseaux sanguins est essentielle afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. De cette optique, les travaux de cette thèse se sont concentrés sur la protéine tyrosine phosphatase DEP-1, initialement identifiée comme un régulateur négatif de la prolifération et de la phosphorylation du VEGFR2 lorsque fortement exprimée dans les cellules endothéliales. Toutefois, en utilisant une approche d'ARNi, il est démontré que via sa capacité à déphosphoryler la tyrosine inhibitrice de Src (Y529), DEP-1 était également un régulateur positif de l'activation de Src dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier le rôle de DEP-1 *in vivo* dans l'angiogenèse développementale, post-natale et pathologique, la perméabilité vasculaire et la progression tumorale *in vivo* ainsi que les mécanismes moléculaires par lesquels DEP-1 régule ces processus. En ce sens, les premiers objectifs étaient d'établir le rôle physiologique de DEP-1 au niveau des cellules endothéliales du développement à l'âge adulte ainsi que sa contribution à l'angiogenèse pathologique. Ainsi, nos travaux ont démontré que DEP-1 permettait l'activation de Src, un médiateur important de la signalisation du VEGF, par la déphosphorylation de sa tyrosine inhibitrice dans tous ces contextes. Lors du développement, DEP-1 induit l'expression du Dll4 en réponse au VEGF et, par le fait même, contrôle le

bourgeoisement endothélial. À l'âge adulte, DEP-1 régule la formation de capillaires, la perméabilité vasculaire ainsi que l'angiogénèse tumorale, ce qui se traduit par une inhibition de la croissance et de la dissémination des cellules tumorales chez la souris. Ainsi, DEP-1 est un médiateur important de la réponse angiogénique tant au cours du développement qu'à l'âge adulte.

En accord avec les résultats obtenus au niveau des cellules endothéliales, DEP-1 est également un promoteur de l'activation de Src et de l'invasion tumorale qui en dépend dans les cellules cancéreuses mammaires in vitro et in vivo. Ces travaux ont souligné l'importance des niveaux d'expression de DEP-1 de la régulation de ses effets biologiques. Effectivement, l'inhibition de l'expression de DEP-1 ou sa surexpression excessive résulte en une inhibition de la kinase Src tandis que l'expression modérée de la phosphatase promeut la kinase Src et la signalisation qui en dépend de façon similaire à ce qui a été observé dans les cellules endothéliales. De façon intéressante, les effets pro-tumoraux de DEP-1 sont également observables dans une cohorte de patientes, où l'expression modérée de DEP-1 est associée à un mauvais pronostic et un taux de rechute élevé.

Sommairement, ces travaux ont démontré que DEP-1 était un régulateur critique de la kinase Src et de ses fonctions biologiques, ce qui suggère donc que DEP-1 serait donc une cible thérapeutique intéressante. Le développement d'un traitement ciblant DEP-1 pour le cancer du sein invasif permettrait d'inhiber à la fois la réponse angiogénique et l'invasivité des cellules cancéreuses. Toutefois, l'élaboration d'un tel traitement nécessite que les mécanismes régissant l'activité de DEP-1 soient plus approfondis.

Bibliographie

1. Monahan-Earley, R.; Dvorak, A. M.; Aird, W. C., Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **2013**, *11 Suppl 1*, 46-66.
2. Carmeliet, P., Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **2005**, *438* (7070), 932-6.
3. Swift, M. R.; Weinstein, B. M., Arterial-venous specification during development. *Circulation research* **2009**, *104* (5), 576-88.
4. Drake, C. J., Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* **2003**, *69* (1), 73-82.
5. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **1997**, *386* (6626), 671-4.
6. Caduff, J. H.; Fischer, L. C.; Burri, P. H., Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical record* **1986**, *216* (2), 154-64.
7. Burri, P. H.; Hlushchuk, R.; Djonov, V., Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **2004**, *231* (3), 474-88.
8. Ribatti, D.; Nico, B.; Floris, C.; Mangieri, D.; Piras, F.; Ennas, M. G.; Vacca, A.; Sirigu, P., Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncology reports* **2005**, *14* (1), 81-4.
9. Patan, S.; Munn, L. L.; Jain, R. K., Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvascular research* **1996**, *51* (2), 260-72.
10. Djonov, V.; Andres, A. C.; Ziemiecki, A., Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microscopy research and technique* **2001**, *52* (2), 182-9.
11. Heil, M.; Eitenmuller, I.; Schmitz-Rixen, T.; Schaper, W., Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of cellular and molecular medicine* **2006**, *10* (1), 45-55.
12. Cai, W.; Schaper, W., Mechanisms of arteriogenesis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2008**, *40* (8), 681-92.
13. Carmeliet, P.; Jain, R. K., Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **2000**, *407* (6801), 249-57.
14. Hanahan, D.; Folkman, J., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **1996**, *86* (3), 353-64.
15. Crowther, M.; Brown, N. J.; Bishop, E. T.; Lewis, C. E., Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *Journal of leukocyte biology* **2001**, *70* (4), 478-90.
16. Chung, A. S.; Ferrara, N., Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* **2011**, *27*, 563-84.
17. Demir, R.; Yaba, A.; Huppertz, B., Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta histochemica* **2010**, *112* (3), 203-14.

18. Koch, A. E., Angiogenesis as a target in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **2003**, *62 Suppl 2*, ii60-7.
19. Martin, A.; Komada, M. R.; Sane, D. C., Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. *Medicinal research reviews* **2003**, *23* (2), 117-45.
20. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* **2004**, *25* (4), 581-611.
21. Folkman, J.; Merler, E.; Abernathy, C.; Williams, G., Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* **1971**, *133* (2), 275-88.
22. Folkman, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* **1971**, *285* (21), 1182-6.
23. Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute* **1990**, *82* (1), 4-6.
24. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646-74.
25. Hanahan, D.; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57-70.
26. Carmeliet, P.; Jain, R. K., Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **2011**, *473* (7347), 298-307.
27. Donnem, T.; Hu, J.; Ferguson, M.; Adighibe, O.; Snell, C.; Harris, A. L.; Gatter, K. C.; Pezzella, F., Vessel co-option in primary human tumors and metastases: an obstacle to effective anti-angiogenic treatment? *Cancer medicine* **2013**, *2* (4), 427-36.
28. Hillen, F.; Griffioen, A. W., Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer metastasis reviews* **2007**, *26* (3-4), 489-502.
29. Maniotis, A. J.; Folberg, R.; Hess, A.; SefTOR, E. A.; Gardner, L. M.; Pe'er, J.; Trent, J. M.; Meltzer, P. S.; Hendrix, M. J., Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology* **1999**, *155* (3), 739-52.
30. Gerhardt, H.; Golding, M.; Fruttiger, M.; Ruhrberg, C.; Lundkvist, A.; Abramsson, A.; Jeltsch, M.; Mitchell, C.; Alitalo, K.; Shima, D.; Betsholtz, C., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* **2003**, *161* (6), 1163-77.
31. Tung, J. J.; Tattersall, I. W.; Kitajewski, J., Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2012**, *2* (2), a006601.
32. Eilken, H. M.; Adams, R. H., Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology* **2010**, *22* (5), 617-25.
33. Thurston, G.; Kitajewski, J., VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *British journal of cancer* **2008**, *99* (8), 1204-9.
34. Phng, L. K.; Gerhardt, H., Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell* **2009**, *16* (2), 196-208.
35. Klagsbrun, M.; Moses, M. A., Molecular angiogenesis. *Chemistry & biology* **1999**, *6* (8), R217-24.
36. Papetti, M.; Herman, I. M., Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology* **2002**, *282* (5), C947-70.
37. Kalluri, R., Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **2003**, *3* (6), 422-33.

38. Blancas, A. A.; Wong, L. E.; Glaser, D. E.; McCloskey, K. E., Specialized tip/stalk-like and phalanx-like endothelial cells from embryonic stem cells. *Stem cells and development* **2013**, *22* (9), 1398-407.
39. Geudens, I.; Gerhardt, H., Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* **2011**, *138* (21), 4569-83.
40. De Smet, F.; Segura, I.; De Bock, K.; Hohensinner, P. J.; Carmeliet, P., Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2009**, *29* (5), 639-49.
41. Jakobsson, L.; Franco, C. A.; Bentley, K.; Collins, R. T.; Ponsioen, B.; Aspalter, I. M.; Rosewell, I.; Busse, M.; Thurston, G.; Medvinsky, A.; Schulte-Merker, S.; Gerhardt, H., Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology* **2010**, *12* (10), 943-53.
42. Carmeliet, P.; De Smet, F.; Loges, S.; Mazzone, M., Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nature reviews. Clinical oncology* **2009**, *6* (6), 315-26.
43. Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H. F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **1983**, *219* (4587), 983-5.
44. Ferrara, N.; Henzel, W. J., Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* **1989**, *161* (2), 851-8.
45. Keck, P. J.; Hauser, S. D.; Krivi, G.; Sanzo, K.; Warren, T.; Feder, J.; Connolly, D. T., Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **1989**, *246* (4935), 1309-12.
46. Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J.; Goeddel, D. V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **1989**, *246* (4935), 1306-9.
47. Levy, A. P.; Levy, N. S.; Wegner, S.; Goldberg, M. A., Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270* (22), 13333-40.
48. Liu, Y.; Cox, S. R.; Morita, T.; Kourembanas, S., Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation research* **1995**, *77* (3), 638-43.
49. Tang, N.; Wang, L.; Esko, J.; Giordano, F. J.; Huang, Y.; Gerber, H. P.; Ferrara, N.; Johnson, R. S., Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer cell* **2004**, *6* (5), 485-95.
50. Ferrara, N.; Davis-Smyth, T., The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* **1997**, *18* (1), 4-25.
51. Carmeliet, P.; Ferreira, V.; Breier, G.; Pollefeyt, S.; Kieckens, L.; Gertsenstein, M.; Fahrig, M.; Vandenhoeck, A.; Harpal, K.; Eberhardt, C.; Declercq, C.; Pawling, J.; Moons, L.; Collen, D.; Risau, W.; Nagy, A., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **1996**, *380* (6573), 435-9.
52. Ferrara, N.; Carver-Moore, K.; Chen, H.; Dowd, M.; Lu, L.; O'Shea, K. S.; Powell-Braxton, L.; Hillan, K. J.; Moore, M. W., Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **1996**, *380* (6573), 439-42.
53. Aase, K.; von Euler, G.; Li, X.; Ponten, A.; Thoren, P.; Cao, R.; Cao, Y.; Olofsson, B.; Gebre-Medhin, S.; Pekny, M.; Alitalo, K.; Betsholtz, C.; Eriksson, U., Vascular endothelial

growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* **2001**, *104* (3), 358-64.

54. Bellomo, D.; Headrick, J. P.; Silins, G. U.; Paterson, C. A.; Thomas, P. S.; Gartside, M.; Mould, A.; Cahill, M. M.; Tonks, I. D.; Grimmond, S. M.; Townson, S.; Wells, C.; Little, M.; Cummings, M. C.; Hayward, N. K.; Kay, G. F., Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circulation research* **2000**, *86* (2), E29-35.

55. Wanstall, J. C.; Gambino, A.; Jeffery, T. K.; Cahill, M. M.; Bellomo, D.; Hayward, N. K.; Kay, G. F., Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovascular research* **2002**, *55* (2), 361-8.

56. Haiko, P.; Makinen, T.; Keskitalo, S.; Taipale, J.; Karkkainen, M. J.; Baldwin, M. E.; Stacker, S. A.; Achen, M. G.; Alitalo, K., Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. *Mol Cell Biol* **2008**, *28* (15), 4843-50.

57. Carmeliet, P.; Moons, L.; Luttun, A.; Vincenti, V.; Compernelle, V.; De Mol, M.; Wu, Y.; Bono, F.; Devy, L.; Beck, H.; Scholz, D.; Acker, T.; DiPalma, T.; Dewerchin, M.; Noel, A.; Stalmans, I.; Barra, A.; Blacher, S.; VandenDriessche, T.; Ponten, A.; Eriksson, U.; Plate, K. H.; Foidart, J. M.; Schaper, W.; Charnock-Jones, D. S.; Hicklin, D. J.; Herbert, J. M.; Collen, D.; Persico, M. G., Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine* **2001**, *7* (5), 575-83.

58. Hicklin, D. J.; Ellis, L. M., Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2005**, *23* (5), 1011-27.

59. Houck, K. A.; Leung, D. W.; Rowland, A. M.; Winer, J.; Ferrara, N., Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **1992**, *267* (36), 26031-7.

60. Houck, K. A.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; Leung, D. W., The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular endocrinology* **1991**, *5* (12), 1806-14.

61. Carmeliet, P.; Ng, Y. S.; Nuyens, D.; Theilmeier, G.; Brusselmans, K.; Cornelissen, I.; Ehler, E.; Kakkar, V. V.; Stalmans, I.; Mattot, V.; Perriard, J. C.; Dewerchin, M.; Flameng, W.; Nagy, A.; Lupu, F.; Moons, L.; Collen, D.; D'Amore, P. A.; Shima, D. T., Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature medicine* **1999**, *5* (5), 495-502.

62. Zelzer, E.; McLean, W.; Ng, Y. S.; Fukai, N.; Reginato, A. M.; Lovejoy, S.; D'Amore, P. A.; Olsen, B. R., Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* **2002**, *129* (8), 1893-904.

63. Maes, C.; Carmeliet, P.; Moermans, K.; Stockmans, I.; Smets, N.; Collen, D.; Bouillon, R.; Carmeliet, G., Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mechanisms of development* **2002**, *111* (1-2), 61-73.

64. Stalmans, I.; Ng, Y. S.; Rohan, R.; Fruttiger, M.; Bouche, A.; Yuce, A.; Fujisawa, H.; Hermans, B.; Shani, M.; Jansen, S.; Hicklin, D.; Anderson, D. J.; Gardiner, T.; Hammes, H. P.; Moons, L.; Dewerchin, M.; Collen, D.; Carmeliet, P.; D'Amore, P. A., Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *The Journal of clinical investigation* **2002**, *109* (3), 327-36.
65. Maes, C.; Stockmans, I.; Moermans, K.; Van Looveren, R.; Smets, N.; Carmeliet, P.; Bouillon, R.; Carmeliet, G., Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *The Journal of clinical investigation* **2004**, *113* (2), 188-99.
66. Matthews, W.; Jordan, C. T.; Gavin, M.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Lemischka, I. R., A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1991**, *88* (20), 9026-30.
67. Shibuya, M.; Yamaguchi, S.; Yamane, A.; Ikeda, T.; Tojo, A.; Matsushime, H.; Sato, M., Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* **1990**, *5* (4), 519-24.
68. Terman, B. I.; Carrion, M. E.; Kovacs, E.; Rasmussen, B. A.; Eddy, R. L.; Shows, T. B., Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **1991**, *6* (9), 1677-83.
69. Iljin, K.; Karkkainen, M. J.; Lawrence, E. C.; Kimak, M. A.; Uutela, M.; Taipale, J.; Pajusola, K.; Alhonen, L.; Halmekyto, M.; Finegold, D. N.; Ferrell, R. E.; Alitalo, K., VEGFR3 gene structure, regulatory region, and sequence polymorphisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2001**, *15* (6), 1028-36.
70. Pajusola, K.; Aprelikova, O.; Pelicci, G.; Weich, H.; Claesson-Welsh, L.; Alitalo, K., Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene* **1994**, *9* (12), 3545-55.
71. Fong, G. H.; Rossant, J.; Gertsenstein, M.; Breitman, M. L., Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **1995**, *376* (6535), 66-70.
72. Fong, G. H.; Klingensmith, J.; Wood, C. R.; Rossant, J.; Breitman, M. L., Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **1996**, *207* (1), 1-10.
73. Fong, G. H.; Zhang, L.; Bryce, D. M.; Peng, J., Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **1999**, *126* (13), 3015-25.
74. Hiratsuka, S.; Minowa, O.; Kuno, J.; Noda, T.; Shibuya, M., Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95* (16), 9349-54.
75. Shalaby, F.; Rossant, J.; Yamaguchi, T. P.; Gertsenstein, M.; Wu, X. F.; Breitman, M. L.; Schuh, A. C., Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **1995**, *376* (6535), 62-6.
76. Shalaby, F.; Ho, J.; Stanford, W. L.; Fischer, K. D.; Schuh, A. C.; Schwartz, L.; Bernstein, A.; Rossant, J., A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* **1997**, *89* (6), 981-90.

77. Kaipainen, A.; Korhonen, J.; Mustonen, T.; van Hinsbergh, V. W.; Fang, G. H.; Dumont, D.; Breitman, M.; Alitalo, K., Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92* (8), 3566-70.
78. Paavonen, K.; Puolakkainen, P.; Jussila, L.; Jahkola, T.; Alitalo, K., Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *The American journal of pathology* **2000**, *156* (5), 1499-504.
79. Dumont, D. J.; Jussila, L.; Taipale, J.; Lymboussaki, A.; Mustonen, T.; Pajusola, K.; Breitman, M.; Alitalo, K., Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **1998**, *282* (5390), 946-9.
80. Valtola, R.; Salven, P.; Heikkila, P.; Taipale, J.; Joensuu, H.; Rehn, M.; Pihlajaniemi, T.; Weich, H.; deWaal, R.; Alitalo, K., VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *The American journal of pathology* **1999**, *154* (5), 1381-90.
81. Terman, B. I.; Dougher-Vermazen, M.; Carrion, M. E.; Dimitrov, D.; Armellino, D. C.; Gospodarowicz, D.; Bohlen, P., Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and biophysical research communications* **1992**, *187* (3), 1579-86.
82. de Vries, C.; Escobedo, J. A.; Ueno, H.; Houck, K.; Ferrara, N.; Williams, L. T., The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **1992**, *255* (5047), 989-91.
83. Dunk, C.; Ahmed, A., Vascular endothelial growth factor receptor-2-mediated mitogenesis is negatively regulated by vascular endothelial growth factor receptor-1 in tumor epithelial cells. *The American journal of pathology* **2001**, *158* (1), 265-73.
84. Waltenberger, J.; Claesson-Welsh, L.; Siegbahn, A.; Shibuya, M.; Heldin, C. H., Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269* (43), 26988-95.
85. Gille, H.; Kowalski, J.; Yu, L.; Chen, H.; Pisabarro, M. T.; Davis-Smyth, T.; Ferrara, N., A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *The EMBO journal* **2000**, *19* (15), 4064-73.
86. Zeng, H.; Dvorak, H. F.; Mukhopadhyay, D., Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (29), 26969-79.
87. Rahimi, N.; Dayanir, V.; Lashkari, K., Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (22), 16986-92.
88. Roberts, D. M.; Kearney, J. B.; Johnson, J. H.; Rosenberg, M. P.; Kumar, R.; Bautch, V. L., The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *The American journal of pathology* **2004**, *164* (5), 1531-5.
89. Kendall, R. L.; Thomas, K. A., Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90* (22), 10705-9.

90. Lorquet, S.; Berndt, S.; Blacher, S.; Gengoux, E.; Peulen, O.; Maquoi, E.; Noel, A.; Foidart, J. M.; Munaut, C.; Pequeux, C., Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2010**, *24* (10), 3782-95.
91. Soldi, R.; Mitola, S.; Strasly, M.; Defilippi, P.; Tarone, G.; Bussolino, F., Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *The EMBO journal* **1999**, *18* (4), 882-92.
92. Somanath, P. R.; Malinin, N. L.; Byzova, T. V., Cooperation between integrin alphavbeta3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis* **2009**, *12* (2), 177-85.
93. Dejana, E., Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2004**, *5* (4), 261-70.
94. Lampugnani, M. G.; Zanetti, A.; Corada, M.; Takahashi, T.; Balconi, G.; Breviario, F.; Orsenigo, F.; Cattelino, A.; Kemler, R.; Daniel, T. O.; Dejana, E., Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, b-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J. Cell Biol.* **2003**, *161* (4), 793-804.
95. Chabot, C.; Spring, K.; Gratton, J. P.; Elchebly, M.; Royal, I., New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Mol Cell Biol* **2009**, *29* (1), 241-53.
96. Dosch, D. D.; Ballmer-Hofer, K., Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2010**, *24* (1), 32-8.
97. Koch, S.; Claesson-Welsh, L., Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2012**, *2* (7), a006502.
98. Takahashi, T.; Yamaguchi, S.; Chida, K.; Shibuya, M., A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal* **2001**, *20* (11), 2768-78.
99. ten Freyhaus, H.; Dagnell, M.; Leuchs, M.; Vantler, M.; Berghausen, E. M.; Caglayan, E.; Weissmann, N.; Dahal, B. K.; Schermuly, R. T.; Ostman, A.; Kappert, K.; Rosenkranz, S., Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. *American journal of respiratory and critical care medicine* **2011**, *183* (8), 1092-102.
100. Kim, M. J.; Kim, E.; Ryu, S. H.; Suh, P. G., The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Experimental & molecular medicine* **2000**, *32* (3), 101-9.
101. Koch, S.; Tugues, S.; Li, X.; Gualandi, L.; Claesson-Welsh, L., Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* **2011**, *437* (2), 169-83.
102. Takahashi, T.; Ueno, H.; Shibuya, M., VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **1999**, *18* (13), 2221-30.
103. Wellner, M.; Maasch, C.; Kupprion, C.; Lindschau, C.; Luft, F. C.; Haller, H., The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **1999**, *19* (1), 178-85.
104. Meyer, R. D.; Sacks, D. B.; Rahimi, N., IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *PloS one* **2008**, *3* (12), e3848.
105. Werdich, X. Q.; Penn, J. S., Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis* **2005**, *8* (4), 315-26.

106. Alon, T.; Hemo, I.; Itin, A.; Pe'er, J.; Stone, J.; Keshet, E., Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature medicine* **1995**, *1* (10), 1024-8.
107. Gerber, H. P.; McMurtry, A.; Kowalski, J.; Yan, M.; Keyt, B. A.; Dixit, V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (46), 30336-43.
108. Gerber, H. P.; Dixit, V.; Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (21), 13313-6.
109. Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E., Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **1997**, *91* (2), 231-41.
110. Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Franke, T. F.; Stanbridge, E.; Frisch, S.; Reed, J. C., Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **1998**, *282* (5392), 1318-21.
111. Haynes, M. P.; Li, L.; Sinha, D.; Russell, K. S.; Hisamoto, K.; Baron, R.; Collinge, M.; Sessa, W. C.; Bender, J. R., Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278* (4), 2118-23.
112. Sun, Z.; Li, X.; Massena, S.; Kutschera, S.; Padhan, N.; Gualandi, L.; Sundvold-Gjerstad, V.; Gustafsson, K.; Choy, W. W.; Zang, G.; Quach, M.; Jansson, L.; Phillipson, M.; Abid, M. R.; Spurkland, A.; Claesson-Welsh, L., VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA. *The Journal of experimental medicine* **2012**, *209* (7), 1363-77.
113. Spring, K.; Chabot, C.; Langlois, S.; Lapointe, L.; Trinh, N. T. N.; Caron, C.; Hebda, J. K.; Gavard, J.; Elchebly, M.; Royal, I., Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation. *Blood* **2012**, *120* (13), 2745-2756.
114. Dance, M.; Montagner, A.; Yart, A.; Masri, B.; Audigier, Y.; Perret, B.; Salles, J. P.; Raynal, P., The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (32), 23285-95.
115. Laramee, M.; Chabot, C.; Cloutier, M.; Stenne, R.; Holgado-Madruga, M.; Wong, A. J.; Royal, I., The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282* (11), 7758-69.
116. Caron, C.; Spring, K.; Laramee, M.; Chabot, C.; Cloutier, M.; Gu, H.; Royal, I., Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells. *Cellular signalling* **2009**, *21* (6), 943-53.
117. Holmqvist, K.; Cross, M. J.; Rolny, C.; Hagerkvist, R.; Rahimi, N.; Matsumoto, T.; Claesson-Welsh, L.; Welsh, M., The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (21), 22267-75.
118. Parsons, J. T., Focal adhesion kinase: the first ten years. *Journal of cell science* **2003**, *116* (Pt 8), 1409-16.

119. Cain, R. J.; Ridley, A. J., Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **2009**, *101* (1), 13-29.
120. Lamalice, L.; Houle, F.; Huot, J., Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (45), 34009-20.
121. Choong, P. F.; Nadesapillai, A. P., Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clinical orthopaedics and related research* **2003**, (415 Suppl), S46-58.
122. Ku, D. D.; Zaleski, J. K.; Liu, S.; Brock, T. A., Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *The American journal of physiology* **1993**, *265* (2 Pt 2), H586-92.
123. Yang, R.; Thomas, G. R.; Bunting, S.; Ko, A.; Ferrara, N.; Keyt, B.; Ross, J.; Jin, H., Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *Journal of cardiovascular pharmacology* **1996**, *27* (6), 838-44.
124. Esser, S.; Lampugnani, M. G.; Corada, M.; Dejana, E.; Risau, W., Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* **1998**, *111* (Pt 13), 1853-65.
125. Spring, K.; Chabot, C.; Langlois, S.; Lapointe, L.; Trinh, N. T.; Caron, C.; Hebda, J. K.; Gavard, J.; Elchebly, M.; Royal, I., Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation. *Blood* **2012**, *120* (13), 2745-56.
126. Dejana, E.; Orsenigo, F.; Lampugnani, M. G., The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* **2008**, *121* (Pt 13), 2115-22.
127. Gavard, J.; Gutkind, J. S., VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* **2006**, *8* (11), 1223-34.
128. Gavard, J., Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell adhesion & migration* **2013**, *7* (6), 455-61.
129. Adam, A. P.; Sharenko, A. L.; Pumiglia, K.; Vincent, P. A., Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (10), 7045-55.
130. Jean, C.; Chen, X. L.; Nam, J. O.; Tancioni, I.; Uryu, S.; Lawson, C.; Ward, K. K.; Walsh, C. T.; Miller, N. L.; Ghassemian, M.; Turowski, P.; Dejana, E.; Weis, S.; Cheresch, D. A.; Schlaepfer, D. D., Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *The Journal of cell biology* **2014**, *204* (2), 247-63.
131. Chen, X. L.; Nam, J. O.; Jean, C.; Lawson, C.; Walsh, C. T.; Goka, E.; Lim, S. T.; Tomar, A.; Tancioni, I.; Uryu, S.; Guan, J. L.; Acevedo, L. M.; Weis, S. M.; Cheresch, D. A.; Schlaepfer, D. D., VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Developmental cell* **2012**, *22* (1), 146-57.
132. Fukumura, D.; Gohongi, T.; Kadambi, A.; Izumi, Y.; Ang, J.; Yun, C. O.; Buerk, D. G.; Huang, P. L.; Jain, R. K., Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98* (5), 2604-9.

133. Thibeault, S.; Rautureau, Y.; Oubaha, M.; Faubert, D.; Wilkes, B. C.; Delisle, C.; Gratton, J. P., S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Molecular cell* **2010**, *39* (3), 468-76.
134. Fulton, D.; Gratton, J. P.; McCabe, T. J.; Fontana, J.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Franke, T. F.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W. C., Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **1999**, *399* (6736), 597-601.
135. Dimmeler, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Hermann, C.; Busse, R.; Zeiher, A. M., Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **1999**, *399* (6736), 601-5.
136. Blanes, M. G.; Oubaha, M.; Rautureau, Y.; Gratton, J. P., Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282* (14), 10660-9.
137. Dufraigne, J.; Funahashi, Y.; Kitajewski, J., Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* **2008**, *27* (38), 5132-7.
138. Iso, T.; Hamamori, Y.; Kedes, L., Notch signaling in vascular development. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2003**, *23* (4), 543-53.
139. Limbourg, F. P.; Takeshita, K.; Radtke, F.; Bronson, R. T.; Chin, M. T.; Liao, J. K., Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* **2005**, *111* (14), 1826-32.
140. Takeshita, K.; Satoh, M.; Ii, M.; Silver, M.; Limbourg, F. P.; Mukai, Y.; Rikitake, Y.; Radtke, F.; Gridley, T.; Losordo, D. W.; Liao, J. K., Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circulation research* **2007**, *100* (1), 70-8.
141. Krebs, L. T.; Xue, Y.; Norton, C. R.; Shutter, J. R.; Maguire, M.; Sundberg, J. P.; Gallahan, D.; Closson, V.; Kitajewski, J.; Callahan, R.; Smith, G. H.; Stark, K. L.; Gridley, T., Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & development* **2000**, *14* (11), 1343-52.
142. Uyttendaele, H.; Ho, J.; Rossant, J.; Kitajewski, J., Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98* (10), 5643-8.
143. Carlson, T. R.; Yan, Y.; Wu, X.; Lam, M. T.; Tang, G. L.; Beverly, L. J.; Messina, L. M.; Capobianco, A. J.; Werb, Z.; Wang, R., Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102* (28), 9884-9.
144. Miniati, D.; Jelin, E. B.; Ng, J.; Wu, J.; Carlson, T. R.; Wu, X.; Looney, M. R.; Wang, R. A., Constitutively active endothelial Notch4 causes lung arteriovenous shunts in mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **2010**, *298* (2), L169-77.
145. Murphy, P. A.; Lam, M. T.; Wu, X.; Kim, T. N.; Vartanian, S. M.; Bollen, A. W.; Carlson, T. R.; Wang, R. A., Endothelial Notch4 signaling induces hallmarks of brain arteriovenous malformations in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (31), 10901-6.
146. Stittrich, A. B.; Lehman, A.; Bodian, D. L.; Ashworth, J.; Zong, Z.; Li, H.; Lam, P.; Khromykh, A.; Iyer, R. K.; Vockley, J. G.; Baveja, R.; Silva, E. S.; Dixon, J.; Leon, E. L.; Solomon, B. D.; Glusman, G.; Niederhuber, J. E.; Roach, J. C.; Patel, M. S., Mutations in NOTCH1 cause Adams-Oliver syndrome. *American journal of human genetics* **2014**, *95* (3), 275-84.

147. Snape, K. M.; Ruddy, D.; Zenker, M.; Wuyts, W.; Whiteford, M.; Johnson, D.; Lam, W.; Trembath, R. C., The spectra of clinical phenotypes in aplasia cutis congenita and terminal transverse limb defects. *American journal of medical genetics. Part A* **2009**, *149A* (8), 1860-81.
148. Algaze, C.; Esplin, E. D.; Lowenthal, A.; Hudgins, L.; Tacy, T. A.; Selamet Tierney, E. S., Expanding the phenotype of cardiovascular malformations in Adams-Oliver syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* **2013**, *161A* (6), 1386-9.
149. Lin, A. E.; Westgate, M. N.; van der Velde, M. E.; Lacro, R. V.; Holmes, L. B., Adams-Oliver syndrome associated with cardiovascular malformations. *Clinical dysmorphology* **1998**, *7* (4), 235-41.
150. Maniscalco, M.; Zedda, A.; Faraone, S.; de Laurentiis, G.; Verde, R.; Molese, V.; Lapicciarella, G.; Sofia, M., Association of Adams-Oliver syndrome with pulmonary arteriovenous malformation in the same family: a further support to the vascular hypothesis. *American journal of medical genetics. Part A* **2005**, *136* (3), 269-74.
151. Villa, N.; Walker, L.; Lindsell, C. E.; Gasson, J.; Iruela-Arispe, M. L.; Weinmaster, G., Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mechanisms of development* **2001**, *108* (1-2), 161-4.
152. Claxton, S.; Fruttiger, M., Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene expression patterns : GEP* **2004**, *5* (1), 123-7.
153. Favre, C. J.; Mancuso, M.; Maas, K.; McLean, J. W.; Baluk, P.; McDonald, D. M., Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2003**, *285* (5), H1917-38.
154. Hofmann, J. J.; Iruela-Arispe, M. L., Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circulation research* **2007**, *100* (11), 1556-68.
155. Krebs, L. T.; Shutter, J. R.; Tanigaki, K.; Honjo, T.; Stark, K. L.; Gridley, T., Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & development* **2004**, *18* (20), 2469-73.
156. Gale, N. W.; Dominguez, M. G.; Noguera, I.; Pan, L.; Hughes, V.; Valenzuela, D. M.; Murphy, A. J.; Adams, N. C.; Lin, H. C.; Holash, J.; Thurston, G.; Yancopoulos, G. D., Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (45), 15949-54.
157. Mailhos, C.; Modlich, U.; Lewis, J.; Harris, A.; Bicknell, R.; Ish-Horowicz, D., Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation; research in biological diversity* **2001**, *69* (2-3), 135-44.
158. Xue, Y.; Gao, X.; Lindsell, C. E.; Norton, C. R.; Chang, B.; Hicks, C.; Gendron-Maguire, M.; Rand, E. B.; Weinmaster, G.; Gridley, T., Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Human molecular genetics* **1999**, *8* (5), 723-30.
159. Spinner, N. B.; Colliton, R. P.; Crosnier, C.; Krantz, I. D.; Hadchouel, M.; Meunier-Rotival, M., Jagged1 mutations in alagille syndrome. *Human mutation* **2001**, *17* (1), 18-33.
160. Piccoli, D. A.; Spinner, N. B., Alagille syndrome and the Jagged1 gene. *Seminars in liver disease* **2001**, *21* (4), 525-34.
161. High, F. A.; Lu, M. M.; Pear, W. S.; Loomes, K. M.; Kaestner, K. H.; Epstein, J. A., Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle

development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (6), 1955-9.

162. Siekmann, A. F.; Lawson, N. D., Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* **2007**, *445* (7129), 781-4.

163. Liu, H.; Kennard, S.; Lilly, B., NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circulation research* **2009**, *104* (4), 466-75.

164. Domenga, V.; Fardoux, P.; Lacombe, P.; Monet, M.; Maciazek, J.; Krebs, L. T.; Klonjowski, B.; Berrou, E.; Mericskay, M.; Li, Z.; Tournier-Lasserre, E.; Gridley, T.; Joutel, A., Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes & development* **2004**, *18* (22), 2730-5.

165. Holderfield, M. T.; Hughes, C. C., Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circulation research* **2008**, *102* (6), 637-52.

166. Li, J. L.; Harris, A. L., Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications. *Frontiers in bioscience* **2009**, *14*, 3094-110.

167. Lawson, N. D.; Vogel, A. M.; Weinstein, B. M., sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Developmental cell* **2002**, *3* (1), 127-36.

168. Ridgway, J.; Zhang, G.; Wu, Y.; Stawicki, S.; Liang, W. C.; Chanthery, Y.; Kowalski, J.; Watts, R. J.; Callahan, C.; Kasman, I.; Singh, M.; Chien, M.; Tan, C.; Hongo, J. A.; de Sauvage, F.; Plowman, G.; Yan, M., Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* **2006**, *444* (7122), 1083-7.

169. Hainaud, P.; Contreres, J. O.; Villemain, A.; Liu, L. X.; Plouet, J.; Tobelem, G.; Dupuy, E., The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer research* **2006**, *66* (17), 8501-10.

170. Patel, N. S.; Dobbie, M. S.; Rochester, M.; Steers, G.; Poulson, R.; Le Monnier, K.; Cranston, D. W.; Li, J. L.; Harris, A. L., Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2006**, *12* (16), 4836-44.

171. Limbourg, A.; Ploom, M.; Elligsen, D.; Sorensen, I.; Ziegelhoeffer, T.; Gossler, A.; Drexler, H.; Limbourg, F. P., Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circulation research* **2007**, *100* (3), 363-71.

172. Liu, Z. J.; Shirakawa, T.; Li, Y.; Soma, A.; Oka, M.; Dotto, G. P.; Fairman, R. M.; Velazquez, O. C.; Herlyn, M., Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* **2003**, *23* (1), 14-25.

173. Kiec-Wilk, B.; Grzybowska-Galuszka, J.; Polus, A.; Pryjma, J.; Knapp, A.; Kristiansen, K., The MAPK-dependent regulation of the Jagged/Notch gene expression by VEGF, bFGF or PPAR gamma mediated angiogenesis in HUVEC. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* **2010**, *61* (2), 217-25.

174. Li, J. L.; Sainson, R. C.; Shi, W.; Leek, R.; Harrington, L. S.; Preusser, M.; Biswas, S.; Turley, H.; Heikamp, E.; Hainfellner, J. A.; Harris, A. L., Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer research* **2007**, *67* (23), 11244-53.

175. Noguera-Troise, I.; Daly, C.; Papadopoulos, N. J.; Coetzee, S.; Boland, P.; Gale, N. W.; Lin, H. C.; Yancopoulos, G. D.; Thurston, G., Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* **2006**, *444* (7122), 1032-7.
176. Lobov, I. B.; Renard, R. A.; Papadopoulos, N.; Gale, N. W.; Thurston, G.; Yancopoulos, G. D.; Wiegand, S. J., Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (9), 3219-24.
177. Suchting, S.; Freitas, C.; le Noble, F.; Benedito, R.; Breant, C.; Duarte, A.; Eichmann, A., The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (9), 3225-30.
178. Blankesteyn, W. M.; van Gijn, M. E.; Essers-Janssen, Y. P.; Daemen, M. J.; Smits, J. F., Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction. *The American journal of pathology* **2000**, *157* (3), 877-83.
179. Kim, K. I.; Cho, H. J.; Hahn, J. Y.; Kim, T. Y.; Park, K. W.; Koo, B. K.; Shin, C. S.; Kim, C. H.; Oh, B. H.; Lee, M. M.; Park, Y. B.; Kim, H. S., Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2006**, *26* (1), 91-8.
180. Corada, M.; Nyqvist, D.; Orsenigo, F.; Caprini, A.; Giampietro, C.; Taketo, M. M.; Iruela-Arispe, M. L.; Adams, R. H.; Dejana, E., The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Developmental cell* **2010**, *18* (6), 938-49.
181. Estrach, S.; Ambler, C. A.; Lo Celso, C.; Hozumi, K.; Watt, F. M., Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis. *Development* **2006**, *133* (22), 4427-38.
182. Schroeter, E. H.; Kisslinger, J. A.; Kopan, R., Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* **1998**, *393* (6683), 382-6.
183. van Tetering, G.; van Diest, P.; Verlaan, I.; van der Wall, E.; Kopan, R.; Vooijs, M., Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (45), 31018-27.
184. Mumm, J. S.; Schroeter, E. H.; Saxena, M. T.; Griesemer, A.; Tian, X.; Pan, D. J.; Ray, W. J.; Kopan, R., A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Molecular cell* **2000**, *5* (2), 197-206.
185. De Strooper, B.; Annaert, W.; Cupers, P.; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Mumm, J. S.; Schroeter, E. H.; Schrijvers, V.; Wolfe, M. S.; Ray, W. J.; Goate, A.; Kopan, R., A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **1999**, *398* (6727), 518-22.
186. Bozkulak, E. C.; Weinmaster, G., Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling. *Mol Cell Biol* **2009**, *29* (21), 5679-95.
187. Borggreffe, T.; Oswald, F., The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2009**, *66* (10), 1631-46.
188. Katoh, M.; Katoh, M., Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent

- HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *International journal of oncology* **2007**, *31* (2), 461-6.
189. Roca, C.; Adams, R. H., Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes & development* **2007**, *21* (20), 2511-24.
190. Hellstrom, M.; Phng, L. K.; Hofmann, J. J.; Wallgard, E.; Coultas, L.; Lindblom, P.; Alva, J.; Nilsson, A. K.; Karlsson, L.; Gaiano, N.; Yoon, K.; Rossant, J.; Iruela-Arispe, M. L.; Kalen, M.; Gerhardt, H.; Betsholtz, C., Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **2007**, *445* (7129), 776-80.
191. Leslie, J. D.; Ariza-McNaughton, L.; Bermange, A. L.; McAdow, R.; Johnson, S. L.; Lewis, J., Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **2007**, *134* (5), 839-44.
192. Williams, C. K.; Li, J. L.; Murga, M.; Harris, A. L.; Tosato, G., Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* **2006**, *107* (3), 931-9.
193. Benedito, R.; Roca, C.; Sorensen, I.; Adams, S.; Gossler, A.; Fruttiger, M.; Adams, R. H., The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* **2009**, *137* (6), 1124-35.
194. Kerbel, R. S.; Yu, J.; Tran, J.; Man, S.; Vilorio-Petit, A.; Klement, G.; Coomber, B. L.; Rak, J., Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer metastasis reviews* **2001**, *20* (1-2), 79-86.
195. Folkman, J., Angiogenesis-dependent diseases. *Seminars in oncology* **2001**, *28* (6), 536-42.
196. Griffioen, A. W.; Molema, G., Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacological reviews* **2000**, *52* (2), 237-68.
197. Cohen, M. H.; Gootenberg, J.; Keegan, P.; Pazdur, R., FDA drug approval summary: bevacizumab plus FOLFOX4 as second-line treatment of colorectal cancer. *The oncologist* **2007**, *12* (3), 356-61.
198. Cohen, M. H.; Gootenberg, J.; Keegan, P.; Pazdur, R., FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer. *The oncologist* **2007**, *12* (6), 713-8.
199. Garcia, A.; Singh, H., Bevacizumab and ovarian cancer. *Therapeutic advances in medical oncology* **2013**, *5* (2), 133-41.
200. de Groot, J. F.; Fuller, G.; Kumar, A. J.; Piao, Y.; Eterovic, K.; Ji, Y.; Conrad, C. A., Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-oncology* **2010**, *12* (3), 233-42.
201. Montero, A. J.; Escobar, M.; Lopes, G.; Gluck, S.; Vogel, C., Bevacizumab in the treatment of metastatic breast cancer: friend or foe? *Current oncology reports* **2012**, *14* (1), 1-11.
202. Kindler, H. L.; Niedzwiecki, D.; Hollis, D.; Sutherland, S.; Schrag, D.; Hurwitz, H.; Innocenti, F.; Mulcahy, M. F.; O'Reilly, E.; Wozniak, T. F.; Picus, J.; Bhargava, P.; Mayer, R. J.; Schilsky, R. L.; Goldberg, R. M., Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2010**, *28* (22), 3617-22.

203. Escudier, B.; Pluzanska, A.; Koralewski, P.; Ravaud, A.; Bracarda, S.; Szczylik, C.; Chevreau, C.; Filippek, M.; Melichar, B.; Bajetta, E.; Gorbunova, V.; Bay, J. O.; Bodrogi, I.; Jagiello-Gruszfeld, A.; Moore, N.; investigators, A. T., Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **2007**, *370* (9605), 2103-11.
204. Ainsworth, N. L.; Lee, J. S.; Eisen, T., Impact of anti-angiogenic treatments on metastatic renal cell carcinoma. *Expert review of anticancer therapy* **2009**, *9* (12), 1793-805.
205. Sasich, L. D.; Sukkari, S. R., The US FDAs withdrawal of the breast cancer indication for Avastin (bevacizumab). *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* **2012**, *20* (4), 381-5.
206. Lu, K. V.; Chang, J. P.; Parachoniak, C. A.; Pandika, M. M.; Aghi, M. K.; Meyronet, D.; Isachenko, N.; Fouse, S. D.; Phillips, J. J.; Cheresch, D. A.; Park, M.; Bergers, G., VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer cell* **2012**, *22* (1), 21-35.
207. Kong, D. S.; Song, S. Y.; Kim, D. H.; Joo, K. M.; Yoo, J. S.; Koh, J. S.; Dong, S. M.; Suh, Y. L.; Lee, J. I.; Park, K.; Kim, J. H.; Nam, D. H., Prognostic significance of c-Met expression in glioblastomas. *Cancer* **2009**, *115* (1), 140-8.
208. Burger, R. A.; Sill, M. W.; Monk, B. J.; Greer, B. E.; Sorosky, J. I., Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2007**, *25* (33), 5165-71.
209. Sharma, S.; Johnson, D.; Abouammoh, M.; Hollands, S.; Brissette, A., Rate of serious adverse effects in a series of bevacizumab and ranibizumab injections. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie* **2012**, *47* (3), 275-9.
210. Jain, R. K.; Duda, D. G.; Clark, J. W.; Loeffler, J. S., Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature clinical practice. Oncology* **2006**, *3* (1), 24-40.
211. Shojaei, F.; Wu, X.; Malik, A. K.; Zhong, C.; Baldwin, M. E.; Schanz, S.; Fuh, G.; Gerber, H. P.; Ferrara, N., Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nature biotechnology* **2007**, *25* (8), 911-20.
212. Thomas, S. M.; Brugge, J. S., Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology* **1997**, *13*, 513-609.
213. Parsons, S. J.; Parsons, J. T., Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **2004**, *23* (48), 7906-9.
214. Salter, M. W.; Kalia, L. V., Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nature reviews. Neuroscience* **2004**, *5* (4), 317-28.
215. Liu, X.; Brodeur, S. R.; Gish, G.; Songyang, Z.; Cantley, L. C.; Laudano, A. P.; Pawson, T., Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* **1993**, *8* (5), 1119-26.
216. Xu, W.; Harrison, S. C.; Eck, M. J., Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **1997**, *385* (6617), 595-602.
217. Cooper, J. A.; Gould, K. L.; Cartwright, C. A.; Hunter, T., Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science* **1986**, *231* (4744), 1431-4.
218. Martin, G. S., The hunting of the Src. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2001**, *2* (6), 467-75.
219. Okada, M.; Nakagawa, H., A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *The Journal of biological chemistry* **1989**, *264* (35), 20886-93.

220. Klages, S.; Adam, D.; Class, K.; Fagnoli, J.; Bolen, J. B.; Penhallow, R. C., Ctk: a protein-tyrosine kinase related to Csk that defines an enzyme family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (7), 2597-601.
221. Zheng, X. M.; Resnick, R. J.; Shalloway, D., A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *The EMBO journal* **2000**, *19* (5), 964-78.
222. Fang, K. S.; Sabe, H.; Saito, H.; Hanafusa, H., Comparative study of three protein-tyrosine phosphatases. Chicken protein-tyrosine phosphatase lambda dephosphorylates c-Src tyrosine 527. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269* (31), 20194-200.
223. Bjorge, J. D.; Pang, A.; Fujita, D. J., Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (52), 41439-46.
224. Somani, A. K.; Bignon, J. S.; Mills, G. B.; Siminovitch, K. A.; Branch, D. R., Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272* (34), 21113-9.
225. Peng, Z. Y.; Cartwright, C. A., Regulation of the Src tyrosine kinase and Syp tyrosine phosphatase by their cellular association. *Oncogene* **1995**, *11* (10), 1955-62.
226. Zhu, J. W.; Brdicka, T.; Katsumoto, T. R.; Lin, J.; Weiss, A., Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling. *Immunity* **2008**, *28* (2), 183-96.
227. Criscuoli, M. L.; Nguyen, M.; Eliceiri, B. P., Tumor metastasis but not tumor growth is dependent on Src-mediated vascular permeability. *Blood* **2005**, *105* (4), 1508-14.
228. Eliceiri, B. P.; Paul, R.; Schwartzberg, P. L.; Hood, J. D.; Leng, J.; Chersesh, D. A., Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Molecular cell* **1999**, *4* (6), 915-24.
229. Weis, S.; Cui, J.; Barnes, L.; Chersesh, D., Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *The Journal of cell biology* **2004**, *167* (2), 223-9.
230. Weis, S. M.; Chersesh, D. A., Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* **2005**, *437* (7058), 497-504.
231. Abraham, S.; Yeo, M.; Montero-Balaguer, M.; Paterson, H.; Dejana, E.; Marshall, C. J.; Mavria, G., VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Current biology : CB* **2009**, *19* (8), 668-74.
232. Werdich, X. Q.; Penn, J. S., Specific involvement of SRC family kinase activation in the pathogenesis of retinal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* **2006**, *47* (11), 5047-56.
233. Martin, G. S., The road to Src. *Oncogene* **2004**, *23* (48), 7910-7.
234. Oppermann, H.; Levinson, A. D.; Varmus, H. E.; Levintow, L.; Bishop, J. M., Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1979**, *76* (4), 1804-8.
235. Yeatman, T. J., A renaissance for SRC. *Nature reviews. Cancer* **2004**, *4* (6), 470-80.
236. Alvarez, R. H.; Kantarjian, H. M.; Cortes, J. E., The role of Src in solid and hematologic malignancies: development of new-generation Src inhibitors. *Cancer* **2006**, *107* (8), 1918-29.

237. Mukhopadhyay, D.; Tsiokas, L.; Zhou, X. M.; Foster, D.; Brugge, J. S.; Sukhatme, V. P., Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* **1995**, *375* (6532), 577-81.
238. Finn, R. S., Targeting Src in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **2008**, *19* (8), 1379-86.
239. Shalloway, D.; Coussens, P. M.; Yaciuk, P., Overexpression of the c-src protein does not induce transformation of NIH 3T3 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, *81* (22), 7071-5.
240. Jacobs, C.; Rubsamen, H., Expression of pp60c-src protein kinase in adult and fetal human tissue: high activities in some sarcomas and mammary carcinomas. *Cancer research* **1983**, *43* (4), 1696-702.
241. Ottenhoff-Kalff, A. E.; Rijksen, G.; van Beurden, E. A.; Hennipman, A.; Michels, A. A.; Staal, G. E., Characterization of protein tyrosine kinases from human breast cancer: involvement of the c-src oncogene product. *Cancer research* **1992**, *52* (17), 4773-8.
242. Biscardi, J. S.; Belsches, A. P.; Parsons, S. J., Characterization of human epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in human breast tumor cells. *Molecular carcinogenesis* **1998**, *21* (4), 261-72.
243. Verbeek, B. S.; Vroom, T. M.; Adriaansen-Slot, S. S.; Ottenhoff-Kalff, A. E.; Geertzema, J. G.; Hennipman, A.; Rijksen, G., c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *The Journal of pathology* **1996**, *180* (4), 383-8.
244. Irby, R. B.; Yeatman, T. J., Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* **2000**, *19* (49), 5636-42.
245. Scaltriti, M.; Baselga, J., The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2006**, *12* (18), 5268-72.
246. Maa, M. C.; Leu, T. H.; McCarley, D. J.; Schatzman, R. C.; Parsons, S. J., Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src: implications for the etiology of multiple human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92* (15), 6981-5.
247. Masuda, H.; Zhang, D.; Bartholomeusz, C.; Doihara, H.; Hortobagyi, G. N.; Ueno, N. T., Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **2012**, *136* (2), 331-45.
248. Kim, H.; Laing, M.; Muller, W., c-Src-null mice exhibit defects in normal mammary gland development and ERalpha signaling. *Oncogene* **2005**, *24* (36), 5629-36.
249. Luttrell, D. K.; Luttrell, L. M.; Parsons, S. J., Augmented mitogenic responsiveness to epidermal growth factor in murine fibroblasts that overexpress pp60c-src. *Mol Cell Biol* **1988**, *8* (1), 497-501.
250. Wilson, L. K.; Luttrell, D. K.; Parsons, J. T.; Parsons, S. J., pp60c-src tyrosine kinase, myristylation, and modulatory domains are required for enhanced mitogenic responsiveness to epidermal growth factor seen in cells overexpressing c-src. *Mol Cell Biol* **1989**, *9* (4), 1536-44.
251. Olayioye, M. A.; Badache, A.; Daly, J. M.; Hynes, N. E., An essential role for Src kinase in ErbB receptor signaling through the MAPK pathway. *Experimental cell research* **2001**, *267* (1), 81-7.
252. Ishizawar, R. C.; Miyake, T.; Parsons, S. J., c-Src modulates ErbB2 and ErbB3 heterocomplex formation and function. *Oncogene* **2007**, *26* (24), 3503-10.

253. Belsches-Jablonski, A. P.; Biscardi, J. S.; Peavy, D. R.; Tice, D. A.; Romney, D. A.; Parsons, S. J., Src family kinases and HER2 interactions in human breast cancer cell growth and survival. *Oncogene* **2001**, *20* (12), 1465-75.
254. Johnson, E.; Seachrist, D. D.; DeLeon-Rodriguez, C. M.; Lozada, K. L.; Miedler, J.; Abdul-Karim, F. W.; Keri, R. A., HER2/ErbB2-induced breast cancer cell migration and invasion require p120 catenin activation of Rac1 and Cdc42. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (38), 29491-501.
255. Sorlie, T.; Perou, C. M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M. B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S. S.; Thorsen, T.; Quist, H.; Matese, J. C.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Lonning, P. E.; Borresen-Dale, A. L., Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98* (19), 10869-74.
256. Tan, M.; Li, P.; Sun, M.; Yin, G.; Yu, D., Upregulation and activation of PKC alpha by ErbB2 through Src promotes breast cancer cell invasion that can be blocked by combined treatment with PKC alpha and Src inhibitors. *Oncogene* **2006**, *25* (23), 3286-95.
257. Diaz, N.; Minton, S.; Cox, C.; Bowman, T.; Gritsko, T.; Garcia, R.; Eweis, I.; Wloch, M.; Livingston, S.; Seijo, E.; Cantor, A.; Lee, J. H.; Beam, C. A.; Sullivan, D.; Jove, R.; Muro-Cacho, C. A., Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2006**, *12* (1), 20-8.
258. Myoui, A.; Nishimura, R.; Williams, P. J.; Hiraga, T.; Tamura, D.; Michigami, T.; Mundy, G. R.; Yoneda, T., C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis. *Cancer research* **2003**, *63* (16), 5028-33.
259. Avizienyte, E.; Frame, M. C., Src and FAK signalling controls adhesion fate and the epithelial-to-mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology* **2005**, *17* (5), 542-7.
260. Finn, R. S.; Dering, J.; Ginther, C.; Wilson, C. A.; Glaspy, P.; Tchekmedyian, N.; Slamon, D. J., Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/"triple-negative" breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast cancer research and treatment* **2007**, *105* (3), 319-26.
261. Huang, F.; Reeves, K.; Han, X.; Fairchild, C.; Platero, S.; Wong, T. W.; Lee, F.; Shaw, P.; Clark, E., Identification of candidate molecular markers predicting sensitivity in solid tumors to dasatinib: rationale for patient selection. *Cancer research* **2007**, *67* (5), 2226-38.
262. Abram, C. L.; Courtneidge, S. A., Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Experimental cell research* **2000**, *254* (1), 1-13.
263. Rothschild, B. L.; Shim, A. H.; Ammer, A. G.; Kelley, L. C.; Irby, K. B.; Head, J. A.; Chen, L.; Varella-Garcia, M.; Sacks, P. G.; Frederick, B.; Raben, D.; Weed, S. A., Cortactin overexpression regulates actin-related protein 2/3 complex activity, motility, and invasion in carcinomas with chromosome 11q13 amplification. *Cancer research* **2006**, *66* (16), 8017-25.
264. Boyer, B.; Bourgeois, Y.; Poupon, M. F., Src kinase contributes to the metastatic spread of carcinoma cells. *Oncogene* **2002**, *21* (15), 2347-56.
265. Chen, W. T., Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *The Journal of experimental zoology* **1989**, *251* (2), 167-85.
266. Yamaguchi, H.; Oikawa, T., Membrane lipids in invadopodia and podosomes: key structures for cancer invasion and metastasis. *Oncotarget* **2010**, *1* (5), 320-8.

267. Linder, S., Invadosomes at a glance. *Journal of cell science* **2009**, *122* (Pt 17), 3009-13.
268. Eckert, M. A.; Yang, J., Targeting invadopodia to block breast cancer metastasis. *Oncotarget* **2011**, *2* (7), 562-8.
269. Ayala, I.; Baldassarre, M.; Giacchetti, G.; Caldieri, G.; Tete, S.; Luini, A.; Buccione, R., Multiple regulatory inputs converge on cortactin to control invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation. *Journal of cell science* **2008**, *121* (Pt 3), 369-78.
270. Friedl, P.; Wolf, K., Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews. Cancer* **2003**, *3* (5), 362-74.
271. van Zijl, F.; Krupitza, G.; Mikulits, W., Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation research* **2011**, *728* (1-2), 23-34.
272. Mehlen, P.; Puisieux, A., Metastasis: a question of life or death. *Nature reviews. Cancer* **2006**, *6* (6), 449-58.
273. Tonks, N. K., Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2006**, *7* (11), 833-46.
274. Tremblay, M. L., The PTP family photo album. *Cell* **2009**, *136* (2), 213-4.
275. Andersen, J. N.; Mortensen, O. H.; Peters, G. H.; Drake, P. G.; Iversen, L. F.; Olsen, O. H.; Jansen, P. G.; Andersen, H. S.; Tonks, N. K.; Moller, N. P., Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* **2001**, *21* (21), 7117-36.
276. Streuli, M.; Krueger, N. X.; Thai, T.; Tang, M.; Saito, H., Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR. *The EMBO journal* **1990**, *9* (8), 2399-407.
277. Stuble, M.; Dube, N.; Tremblay, M. L., PTP1B regulates cortactin tyrosine phosphorylation by targeting Tyr446. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283* (23), 15740-6.
278. Ostman, A.; Yang, Q.; Tonks, N. K., Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (21), 9680-4.
279. Fachinger, G.; Deutsch, U.; Risau, W., Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene* **1999**, *18* (43), 5948-53.
280. Mellberg, S.; Dimberg, A.; Bahram, F.; Hayashi, M.; Rennel, E.; Ameer, A.; Westholm, J. O.; Larsson, E.; Lindahl, P.; Cross, M. J.; Claesson-Welsh, L., Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2009**, *23* (5), 1490-502.
281. Mitola, S.; Brenchio, B.; Piccinini, M.; Tertoolen, L.; Zammataro, L.; Breier, G.; Rinaudo, M. T.; den Hertog, J.; Arese, M.; Bussolino, F., Type I collagen limits VEGFR-2 signaling by a SHP2 protein-tyrosine phosphatase-dependent mechanism 1. *Circulation research* **2006**, *98* (1), 45-54.
282. den Hertog, J.; Ostman, A.; Bohmer, F. D., Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. *The FEBS journal* **2008**, *275* (5), 831-47.
283. Tabiti, K.; Cui, L.; Chhatwal, V. J.; Moochhala, S.; Ngoi, S. S.; Pallen, C. J., Novel alternative splicing predicts a secreted extracellular isoform of the human receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR. *Gene* **1996**, *175* (1-2), 7-13.

284. O'Grady, P.; Krueger, N. X.; Streuli, M.; Saito, H., Genomic organization of the human LAR protein tyrosine phosphatase gene and alternative splicing in the extracellular fibronectin type-III domains. *The Journal of biological chemistry* **1994**, *269* (40), 25193-9.
285. Halle, M.; Liu, Y. C.; Hardy, S.; Theberge, J. F.; Blanchetot, C.; Bourdeau, A.; Meng, T. C.; Tremblay, M. L., Caspase-3 regulates catalytic activity and scaffolding functions of the protein tyrosine phosphatase PEST, a novel modulator of the apoptotic response. *Mol Cell Biol* **2007**, *27* (3), 1172-90.
286. Bilwes, A. M.; den Hertog, J.; Hunter, T.; Noel, J. P., Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase- α by dimerization. *Nature* **1996**, *382* (6591), 555-9.
287. Majeti, R.; Bilwes, A. M.; Noel, J. P.; Hunter, T.; Weiss, A., Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* **1998**, *279* (5347), 88-91.
288. Barr, A. J.; Ugochukwu, E.; Lee, W. H.; King, O. N.; Filippakopoulos, P.; Alfano, I.; Savitsky, P.; Burgess-Brown, N. A.; Muller, S.; Knapp, S., Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* **2009**, *136* (2), 352-63.
289. Jiang, G.; den Hertog, J.; Hunter, T., Receptor-like protein tyrosine phosphatase α homodimerizes on the cell surface. *Mol Cell Biol* **2000**, *20* (16), 5917-29.
290. Meng, K.; Rodriguez-Pena, A.; Dimitrov, T.; Chen, W.; Yamin, M.; Noda, M.; Deuel, T. F., Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of β catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase β /zeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (6), 2603-8.
291. Groen, A.; Overvoorde, J.; van der Wijk, T.; den Hertog, J., Redox regulation of dimerization of the receptor protein-tyrosine phosphatases RPTP α , LAR, RPTP μ and CD45. *The FEBS journal* **2008**, *275* (10), 2597-604.
292. Salmeen, A.; Andersen, J. N.; Myers, M. P.; Meng, T. C.; Hinks, J. A.; Tonks, N. K.; Barford, D., Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **2003**, *423* (6941), 769-73.
293. van Montfort, R. L.; Congreve, M.; Tisi, D.; Carr, R.; Jhoti, H., Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature* **2003**, *423* (6941), 773-7.
294. Lee, S. R.; Kwon, K. S.; Kim, S. R.; Rhee, S. G., Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273* (25), 15366-72.
295. Mahadev, K.; Zilbering, A.; Zhu, L.; Goldstein, B. J., Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (24), 21938-42.
296. Meng, T. C.; Buckley, D. A.; Galic, S.; Tiganis, T.; Tonks, N. K., Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (36), 37716-25.
297. Ukropec, J. A.; Hollinger, M. K.; Salva, S. M.; Woolkalis, M. J., SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (8), 5983-6.
298. Zheng, X. M.; Shalloway, D., Two mechanisms activate PTP α during mitosis. *The EMBO journal* **2001**, *20* (21), 6037-49.
299. Nawroth, R.; Poell, G.; Ranft, A.; Kloep, S.; Samulowitz, U.; Fachinger, G.; Golding, M.; Shima, D. T.; Deutsch, U.; Vestweber, D., VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact

- to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *The EMBO journal* **2002**, *21* (18), 4885-95.
300. Mori, M.; Murata, Y.; Kotani, T.; Kusakari, S.; Ohnishi, H.; Saito, Y.; Okazawa, H.; Ishizuka, T.; Mori, M.; Matozaki, T., Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins. *Journal of cellular physiology* **2010**, *224* (1), 195-204.
301. Dominguez, M. G.; Hughes, V. C.; Pan, L.; Simmons, M.; Daly, C.; Anderson, K.; Noguera-Troise, I.; Murphy, A. J.; Valenzuela, D. M.; Davis, S.; Thurston, G.; Yancopoulos, G. D.; Gale, N. W., Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (9), 3243-8.
302. Baumer, S.; Keller, L.; Holtmann, A.; Funke, R.; August, B.; Gamp, A.; Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Deutsch, U.; Vestweber, D., Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* **2006**, *107* (12), 4754-62.
303. Goel, S.; Gupta, N.; Walcott, B. P.; Snuderl, M.; Kesler, C. T.; Kirkpatrick, N. D.; Heishi, T.; Huang, Y.; Martin, J. D.; Ager, E.; Samuel, R.; Wang, S.; Yazbek, J.; Vakoc, B. J.; Peterson, R. T.; Padera, T. P.; Duda, D. G.; Fukumura, D.; Jain, R. K., Effects of vascular-endothelial protein tyrosine phosphatase inhibition on breast cancer vasculature and metastatic progression. *Journal of the National Cancer Institute* **2013**, *105* (16), 1188-201.
304. Sato, T. N.; Tozawa, Y.; Deutsch, U.; Wolburg-Buchholz, K.; Fujiwara, Y.; Gendron-Maguire, M.; Gridley, T.; Wolburg, H.; Risau, W.; Qin, Y., Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **1995**, *376* (6535), 70-4.
305. Behjati, S.; Tarpey, P. S.; Sheldon, H.; Martincorena, I.; Van Loo, P.; Gundem, G.; Wedge, D. C.; Ramakrishna, M.; Cooke, S. L.; Pillay, N.; Volland, H. K.; Papaemmanuil, E.; Koss, H.; Bunney, T. D.; Hardy, C.; Joseph, O. R.; Martin, S.; Mudie, L.; Butler, A.; Teague, J. W.; Patil, M.; Steers, G.; Cao, Y.; Gumbs, C.; Ingram, D.; Lazar, A. J.; Little, L.; Mahadeshwar, H.; Protopopov, A.; Al Sanna, G. A.; Seth, S.; Song, X.; Tang, J.; Zhang, J.; Ravi, V.; Torres, K. E.; Khatri, B.; Halai, D.; Roxanis, I.; Baumhoer, D.; Tirabosco, R.; Amary, M. F.; Boshoff, C.; McDermott, U.; Katan, M.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A.; Flanagan, A. M.; Harris, A.; Campbell, P. J., Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in angiosarcoma. *Nature genetics* **2014**, *46* (4), 376-9.
306. Ha, C. H.; Bennett, A. M.; Jin, Z. G., A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283* (11), 7261-70.
307. Baumeister, U.; Funke, R.; Ebnet, K.; Vorschmitt, H.; Koch, S.; Vestweber, D., Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *The EMBO journal* **2005**, *24* (9), 1686-95.
308. Mannell, H.; Hellwig, N.; Gloe, T.; Plank, C.; Sohn, H. Y.; Groesser, L.; Walzog, B.; Pohl, U.; Krotz, F., Inhibition of the tyrosine phosphatase SHP-2 suppresses angiogenesis in vitro and in vivo. *Journal of vascular research* **2008**, *45* (2), 153-63.
309. Nakamura, Y.; Patrushev, N.; Inomata, H.; Mehta, D.; Urao, N.; Kim, H. W.; Razvi, M.; Kini, V.; Mahadev, K.; Goldstein, B. J.; McKinney, R.; Fukai, T.; Ushio-Fukai, M., Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circulation research* **2008**, *102* (10), 1182-91.

310. Lanahan, A. A.; Lech, D.; Dubrac, A.; Zhang, J.; Zhuang, Z. W.; Eichmann, A.; Simons, M., PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation* **2014**, *130* (11), 902-9.
311. Zheng, X.; Resnick, R. J.; Shalloway, D., Apoptosis of estrogen-receptor negative breast cancer and colon cancer cell lines by PTP alpha and src RNAi. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer* **2008**, *122* (9), 1999-2007.
312. Meyer, D. S.; Aceto, N.; Sausgruber, N.; Brinkhaus, H.; Muller, U.; Pallen, C. J.; Bentires-Alj, M., Tyrosine phosphatase PTPalpha contributes to HER2-evoked breast tumor initiation and maintenance. *Oncogene* **2014**, *33* (3), 398-402.
313. Boivin, B.; Chaudhary, F.; Dickinson, B. C.; Haque, A.; Pero, S. C.; Chang, C. J.; Tonks, N. K., Receptor protein-tyrosine phosphatase alpha regulates focal adhesion kinase phosphorylation and ErbB2 oncoprotein-mediated mammary epithelial cell motility. *The Journal of biological chemistry* **2013**, *288* (52), 36926-35.
314. Wang, J.; Yu, L.; Zheng, X., PTPalpha-mediated Src activation by EGF in human breast cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **2013**, *45* (4), 320-9.
315. Thompson, L. J.; Jiang, J.; Madamanchi, N.; Runge, M. S.; Patterson, C., PTP-epsilon, a tyrosine phosphatase expressed in endothelium, negatively regulates endothelial cell proliferation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2001**, *281* (1), H396-403.
316. Elson, A., Protein tyrosine phosphatase epsilon increases the risk of mammary hyperplasia and mammary tumors in transgenic mice. *Oncogene* **1999**, *18* (52), 7535-42.
317. Gil-Henn, H.; Elson, A., Tyrosine phosphatase-epsilon activates Src and supports the transformed phenotype of Neu-induced mammary tumor cells. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278* (18), 15579-86.
318. Berman-Golan, D.; Elson, A., Neu-mediated phosphorylation of protein tyrosine phosphatase epsilon is critical for activation of Src in mammary tumor cells. *Oncogene* **2007**, *26* (49), 7028-37.
319. Nunes-Xavier, C. E.; Elson, A.; Pulido, R., Epidermal growth factor receptor (EGFR)-mediated positive feedback of protein-tyrosine phosphatase epsilon (PTPepsilon) on ERK1/2 and AKT protein pathways is required for survival of human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287* (5), 3433-44.
320. Finak, G.; Bertos, N.; Pepin, F.; Sadekova, S.; Souleimanova, M.; Zhao, H.; Chen, H.; Omeroglu, G.; Meterissian, S.; Omeroglu, A.; Hallett, M.; Park, M., Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature medicine* **2008**, *14* (5), 518-27.
321. Kraut-Cohen, J.; Muller, W. J.; Elson, A., Protein-tyrosine phosphatase epsilon regulates Shc signaling in a kinase-specific manner: increasing coherence in tyrosine phosphatase signaling. *The Journal of biological chemistry* **2008**, *283* (8), 4612-21.
322. Toledano-Katchalski, H.; Kraut, J.; Sines, T.; Granot-Attas, S.; Shohat, G.; Gil-Henn, H.; Yung, Y.; Elson, A., Protein tyrosine phosphatase epsilon inhibits signaling by mitogen-activated protein kinases. *Molecular cancer research : MCR* **2003**, *1* (7), 541-50.
323. Zhang, W.; Hou, J.; Wang, X.; Jiang, R.; Yin, Y.; Ji, J.; Deng, L.; Huang, X.; Wang, K.; Sun, B., PTPRO-mediated autophagy prevents hepatosteatosis and tumorigenesis. *Oncotarget* **2015**, *6* (11), 9420-33.
324. Hou, J.; Xu, J.; Jiang, R.; Wang, Y.; Chen, C.; Deng, L.; Huang, X.; Wang, X.; Sun, B., Estrogen-sensitive PTPRO expression represses hepatocellular carcinoma progression by control of STAT3. *Hepatology* **2013**, *57* (2), 678-88.

325. Motiwala, T.; Kutay, H.; Ghoshal, K.; Bai, S.; Seimiya, H.; Tsuruo, T.; Suster, S.; Morrison, C.; Jacob, S. T., Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101* (38), 13844-9.
326. Asbagh, L. A.; Vazquez, I.; Vecchione, L.; Budinska, E.; De Vriendt, V.; Baietti, M. F.; Steklov, M.; Jacobs, B.; Hoe, N.; Singh, S.; Imjeti, N. S.; Zimmermann, P.; Sablina, A.; Tejpar, S., The tyrosine phosphatase PTPRO sensitizes colon cancer cells to anti-EGFR therapy through activation of SRC-mediated EGFR signaling. *Oncotarget* **2014**, *5* (20), 10070-83.
327. Li, S. Y.; Li, R.; Chen, Y. L.; Xiong, L. K.; Wang, H. L.; Rong, L.; Luo, R. C., Aberrant PTPRO methylation in tumor tissues as a potential biomarker that predicts clinical outcomes in breast cancer patients. *BMC genetics* **2014**, *15*, 67.
328. Huang, Y. T.; Li, F. F.; Ke, C.; Li, Z.; Li, Z. T.; Zou, X. F.; Zheng, X. X.; Chen, Y. P.; Zhang, H., PTPRO promoter methylation is predictive of poorer outcome for HER2-positive breast cancer: indication for personalized therapy. *Journal of translational medicine* **2013**, *11*, 245.
329. You, Y. J.; Chen, Y. P.; Zheng, X. X.; Meltzer, S. J.; Zhang, H., Aberrant methylation of the PTPRO gene in peripheral blood as a potential biomarker in esophageal squamous cell carcinoma patients. *Cancer letters* **2012**, *315* (2), 138-44.
330. Hsu, S. H.; Motiwala, T.; Roy, S.; Claus, R.; Mustafa, M.; Plass, C.; Freitas, M. A.; Ghoshal, K.; Jacob, S. T., Methylation of the PTPRO gene in human hepatocellular carcinoma and identification of VCP as its substrate. *Journal of cellular biochemistry* **2013**, *114* (8), 1810-8.
331. Yu, M.; Lin, G.; Arshadi, N.; Kalatskaya, I.; Xue, B.; Haider, S.; Nguyen, F.; Boutros, P. C.; Elson, A.; Muthuswamy, L. B.; Tonks, N. K.; Muthuswamy, S. K., Expression profiling during mammary epithelial cell three-dimensional morphogenesis identifies PTPRO as a novel regulator of morphogenesis and ErbB2-mediated transformation. *Mol Cell Biol* **2012**, *32* (19), 3913-24.
332. Liu, Z.; Hou, J.; Ren, L.; He, J.; Sun, B.; Sun, L. Z.; Wang, S., Protein tyrosine phosphatase receptor type O expression in the tumor niche correlates with reduced tumor growth, angiogenesis, circulating tumor cells and metastasis of breast cancer. *Oncology reports* **2015**, *33* (4), 1908-14.
333. Zhou, X.; Coad, J.; Ducatman, B.; Agazie, Y. M., SHP2 is up-regulated in breast cancer cells and in infiltrating ductal carcinoma of the breast, implying its involvement in breast oncogenesis. *Histopathology* **2008**, *53* (4), 389-402.
334. Li, J.; Kang, Y.; Wei, L.; Liu, W.; Tian, Y.; Chen, B.; Lin, X.; Li, Y.; Feng, G. S.; Lu, Z., Tyrosine phosphatase Shp2 mediates the estrogen biological action in breast cancer via interaction with the estrogen extranuclear receptor. *PLoS one* **2014**, *9* (7), e102847.
335. Sausgruber, N.; Coissieux, M. M.; Britschgi, A.; Wyckoff, J.; Aceto, N.; Leroy, C.; Stadler, M. B.; Voshol, H.; Bonenfant, D.; Bentires-Alj, M., Tyrosine phosphatase SHP2 increases cell motility in triple-negative breast cancer through the activation of SRC-family kinases. *Oncogene* **2015**, *34* (17), 2272-8.
336. Aceto, N.; Sausgruber, N.; Brinkhaus, H.; Gaidatzis, D.; Martiny-Baron, G.; Mazzarol, G.; Confalonieri, S.; Quarto, M.; Hu, G.; Balwiercz, P. J.; Pachkov, M.; Elledge, S. J.; van Nimwegen, E.; Stadler, M. B.; Bentires-Alj, M., Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast

cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nature medicine* **2012**, *18* (4), 529-37.

337. Xu, R., Shp2, a novel oncogenic tyrosine phosphatase and potential therapeutic target for human leukemia. *Cell research* **2007**, *17* (4), 295-7.

338. Ostman, A.; Hellberg, C.; Bohmer, F. D., Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature reviews. Cancer* **2006**, *6* (4), 307-20.

339. Takahashi, T.; Takahashi, K.; St. John, P. L.; Fleming, P. A.; Tomemori, T.; Watanabe, T.; Abrahamson, D. R.; Drake, C. J.; Shirasawa, T.; Daniel, T. O., A Mutant Receptor Tyrosine Phosphatase, CD148, Causes Defects in Vascular Development. *Molecular and Cellular Biology* **2003**, *23* (5), 1817-1831.

340. Rodriguez, F.; Vacaru, A.; Overvoorde, J.; den Hertog, J., The receptor protein-tyrosine phosphatase, Dep1, acts in arterial/venous cell fate decisions in zebrafish development. *Developmental biology* **2008**, *324* (1), 122-30.

341. Fagotto, F.; Gumbiner, B. M., Cell contact-dependent signaling. *Developmental biology* **1996**, *180* (2), 445-54.

342. Vinals, F.; Pouyssegur, J., Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Mol Cell Biol* **1999**, *19* (4), 2763-72.

343. D'Amore, P. A., Mechanisms of endothelial growth control. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **1992**, *6* (1), 1-8.

344. Takahashi, T.; Takahashi, K.; Mernaugh, R. L.; Tsuboi, N.; Liu, H.; Daniel, T. O., A monoclonal antibody against CD148, a receptor-like tyrosine phosphatase, inhibits endothelial-cell growth and angiogenesis. *Blood* **2006**, *108* (4), 1234-42.

345. Takahashi, T.; Takahashi, K.; Mernaugh, R.; Drozdoff, V.; Sipe, C.; Schoecklmann, H.; Robert, B.; Abrahamson, D. R.; Daniel, T. O., Endothelial localization of receptor tyrosine phosphatase, ECRT/DEP-1, in developing and mature renal vasculature. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **1999**, *10* (10), 2135-45.

346. Holsinger, L. J.; Ward, K.; Duffield, B.; Zachwieja, J.; Jallal, B., The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120(ctn). *Oncogene* **2002**, *21* (46), 7067-76.

347. Palka, H. L.; Park, M.; Tonks, N. K., Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of biological chemistry* **2003**, *278* (8), 5728-35.

348. Jandt, E.; Denner, K.; Kovalenko, M.; Ostman, A.; Bohmer, F. D., The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene* **2003**, *22* (27), 4175-85.

349. Kovalenko, M.; Denner, K.; Sandstrom, J.; Persson, C.; Gross, S.; Jandt, E.; Vilella, R.; Bohmer, F.; Ostman, A., Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (21), 16219-26.

350. Persson, C.; Engstrom, U.; Mowbray, S. L.; Ostman, A., Primary sequence determinants responsible for site-selective dephosphorylation of the PDGF beta-receptor by the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *FEBS letters* **2002**, *517* (1-3), 27-31.

351. Ronnstrand, L.; Mori, S.; Arridsson, A. K.; Eriksson, A.; Wernstedt, C.; Hellman, U.; Claesson-Welsh, L.; Heldin, C. H., Identification of two C-terminal autophosphorylation sites

in the PDGF beta-receptor: involvement in the interaction with phospholipase C-gamma. *The EMBO journal* **1992**, *11* (11), 3911-9.

352. Organ, S. L.; Tsao, M. S., An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic advances in medical oncology* **2011**, *3* (1 Suppl), S7-S19.

353. Walchli, S.; Curchod, M. L.; Gobert, R. P.; Arkinstall, S.; Hooft van Huijsduijnen, R., Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on "substrate-trapping" mutants. *The Journal of biological chemistry* **2000**, *275* (13), 9792-6.

354. Kruger, J.; Trappiel, M.; Dagnell, M.; Stawowy, P.; Meyborg, H.; Bohm, C.; Bhanot, S.; Ostman, A.; Kintscher, U.; Kappert, K., Targeting density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) with antisense oligonucleotides improves the metabolic phenotype in high-fat diet-fed mice. *Cell communication and signaling : CCS* **2013**, *11*, 49.

355. Kruger, J.; Brachs, S.; Trappiel, M.; Kintscher, U.; Meyborg, H.; Wellnhofer, E.; Thone-Reineke, C.; Stawowy, P.; Ostman, A.; Birkenfeld, A. L.; Bohmer, F. D.; Kappert, K., Enhanced insulin signaling in density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) knockout mice. *Molecular metabolism* **2015**, *4* (4), 325-36.

356. Shintani, T.; Higashi, S.; Takeuchi, Y.; Gaudio, E.; Trapasso, F.; Fusco, A.; Noda, M., The R3 receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily inhibits insulin signalling by dephosphorylating the insulin receptor at specific sites. *Journal of biochemistry* **2015**.

357. Chen, D.; Van Horn, D. J.; White, M. F.; Backer, J. M., Insulin receptor substrate 1 rescues insulin action in CHO cells expressing mutant insulin receptors that lack a juxtamembrane NPXY motif. *Mol Cell Biol* **1995**, *15* (9), 4711-7.

358. Ortuso, F.; Paduano, F.; Carotenuto, A.; Gomez-Monterrey, I.; Bilotta, A.; Gaudio, E.; Sala, M.; Artese, A.; Vernieri, E.; Dattilo, V.; Iuliano, R.; Brancaccio, D.; Bertamino, A.; Musella, S.; Alcaro, S.; Grieco, P.; Perrotti, N.; Croce, C. M.; Novellino, E.; Fusco, A.; Campiglia, P.; Trapasso, F., Discovery of PTPRJ agonist peptides that effectively inhibit in vitro cancer cell proliferation and tube formation. *ACS chemical biology* **2013**, *8* (7), 1497-506.

359. Paduano, F.; Ortuso, F.; Campiglia, P.; Raso, C.; Iaccino, E.; Gaspari, M.; Gaudio, E.; Mangone, G.; Carotenuto, A.; Bilotta, A.; Narciso, D.; Palmieri, C.; Agosti, V.; Artese, A.; Gomez-Monterrey, I.; Sala, M.; Cuda, G.; Iuliano, R.; Perrotti, N.; Scala, G.; Viglietto, G.; Alcaro, S.; Croce, C. M.; Novellino, E.; Fusco, A.; Trapasso, F., Isolation and functional characterization of peptide agonists of PTPRJ, a tyrosine phosphatase receptor endowed with tumor suppressor activity. *ACS chemical biology* **2012**, *7* (10), 1666-76.

360. Takahashi, T.; Takahashi, K.; Mernaugh, R. L.; Tsuboi, N.; Liu, H.; Daniel, T. O., A monoclonal antibody against CD148, a receptor-like tyrosine phosphatase, inhibits endothelial-cell growth and angiogenesis. *Blood* **2006**, *108*, 1234-1242.

361. Brunner, P. M.; Heier, P. C.; Mihaly-Bison, J.; Priglinger, U.; Binder, B. R.; Prager, G. W., Density enhanced phosphatase-1 down-regulates urokinase receptor surface expression in confluent endothelial cells. *Blood* **2011**, *117* (15), 4154-61.

362. Sacco, F.; Tinti, M.; Palma, A.; Ferrari, E.; Nardoza, A. P.; Hooft van Huijsduijnen, R.; Takahashi, T.; Castagnoli, L.; Cesareni, G., Tumor suppressor density-enhanced phosphatase-1 (DEP-1) inhibits the RAS pathway by direct dephosphorylation of ERK1/2 kinases. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (33), 22048-58.

363. Senis, Y. A.; Tomlinson, M. G.; Ellison, S.; Mazharian, A.; Lim, J.; Zhao, Y.; Kornerup, K. N.; Auger, J. M.; Thomas, S. G.; Dhanjal, T.; Kalia, N.; Zhu, J. W.; Weiss, A.;

- Watson, S. P., The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis. *Blood* **2009**, *113* (20), 4942-54.
364. Stepanek, O.; Kalina, T.; Draber, P.; Skopcová, T.; Svojgr, K.; Angelisova, P.; Horejsi, V.; Weiss, A.; Brdicka, T., Regulation of Src family kinases involved in T cell receptor signaling by protein-tyrosine phosphatase CD148. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286* (25), 22101-12.
365. Spring, K.; Lapointe, L.; Caron, C.; Langlois, S.; Royal, I., Phosphorylation of DEP-1/PTPRJ on threonine 1318 regulates Src activation and endothelial cell permeability induced by vascular endothelial growth factor. *Cellular signalling* **2014**, *26* (6), 1283-93.
366. Trapasso, F.; Drusco, A.; Costinean, S.; Alder, H.; Aqeilan, R. I.; Iuliano, R.; Gaudio, E.; Raso, C.; Zanesi, N.; Croce, C. M.; Fusco, A., Genetic ablation of Ptpnj, a mouse cancer susceptibility gene, results in normal growth and development and does not predispose to spontaneous tumorigenesis. *DNA and cell biology* **2006**, *25* (6), 376-82.
367. Hackbusch, D.; Dulsner, A.; Gatzke, N.; Kruger, J.; Hillmeister, P.; Nagorka, S.; Blaschke, F.; Ritter, Z.; Thone-Reineke, C.; Bohmer, F. D.; Buschmann, I.; Kappert, K., Knockout of Density-Enhanced Phosphatase-1 impairs cerebrovascular reserve capacity in an arteriogenesis model in mice. *BioMed research international* **2013**, *2013*, 802149.
368. Zhu, J. W.; Doan, K.; Park, J.; Chau, A. H.; Zhang, H.; Lowell, C. A.; Weiss, A., Receptor-like tyrosine phosphatases CD45 and CD148 have distinct functions in chemoattractant-mediated neutrophil migration and response to *S. aureus*. *Immunity* **2011**, *35* (5), 757-69.
369. Mori, J.; Wang, Y. J.; Ellison, S.; Heising, S.; Neel, B. G.; Tremblay, M. L.; Watson, S. P.; Senis, Y. A., Dominant role of the protein-tyrosine phosphatase CD148 in regulating platelet activation relative to protein-tyrosine phosphatase-1B. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2012**, *32* (12), 2956-65.
370. Katsumoto, T. R.; Kudo, M.; Chen, C.; Sundaram, A.; Callahan, E. C.; Zhu, J. W.; Lin, J.; Rosen, C. E.; Manz, B. N.; Lee, J. W.; Matthay, M. A.; Huang, X.; Sheppard, D.; Weiss, A., The phosphatase CD148 promotes airway hyperresponsiveness through SRC family kinases. *The Journal of clinical investigation* **2013**, *123* (5), 2037-48.
371. Ellison, S.; Mori, J.; Barr, A. J.; Senis, Y. A., CD148 enhances platelet responsiveness to collagen by maintaining a pool of active Src family kinases. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **2010**, *8* (7), 1575-83.
372. Borges, L. G.; Seifert, R. A.; Grant, F. J.; Hart, C. E.; Disteché, C. M.; Edelhoff, S.; Solca, F. F.; Lieberman, M. A.; Lindner, V.; Fischer, E. H.; Lok, S.; Bowen-Pope, D. F., Cloning and characterization of rat density-enhanced phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circulation research* **1996**, *79* (3), 570-80.
373. Dave, R. K.; Dinger, M. E.; Andrew, M.; Askarian-Amiri, M.; Hume, D. A.; Kellie, S., Regulated expression of PTPRJ/CD148 and an antisense long noncoding RNA in macrophages by proinflammatory stimuli. *PloS one* **2013**, *8* (6), e68306.
374. Paduano, F.; Dattilo, V.; Narciso, D.; Bilotta, A.; Gaudio, E.; Menniti, M.; Agosti, V.; Palmieri, C.; Perrotti, N.; Fusco, A.; Trapasso, F.; Iuliano, R., Protein tyrosine phosphatase PTPRJ is negatively regulated by microRNA-328. *The FEBS journal* **2013**, *280* (2), 401-12.
375. Arora, S.; Ranade, A. R.; Tran, N. L.; Nasser, S.; Sridhar, S.; Korn, R. L.; Ross, J. T.; Dhruv, H.; Foss, K. M.; Sibenaller, Z.; Ryken, T.; Gotway, M. B.; Kim, S.; Weiss, G. J., MicroRNA-328 is associated with (non-small) cell lung cancer (NSCLC) brain metastasis and

- mediates NSCLC migration. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **2011**, *129* (11), 2621-31.
376. Casagrande, S.; Ruf, M.; Rechsteiner, M.; Morra, L.; Brun-Schmid, S.; von Teichman, A.; Krek, W.; Schraml, P.; Moch, H., The protein tyrosine phosphatase receptor type J is regulated by the pVHL-HIF axis in clear cell renal cell carcinoma. *The Journal of pathology* **2013**, *229* (4), 525-34.
377. Matozo, H. C.; Santos, M. A.; de Oliveira Neto, M.; Bleicher, L.; Lima, L. M.; Iuliano, R.; Fusco, A.; Polikarpov, I., Low-resolution structure and fluorescence anisotropy analysis of protein tyrosine phosphatase eta catalytic domain. *Biophysical journal* **2007**, *92* (12), 4424-32.
378. Hower, A. E.; Beltran, P. J.; Bixby, J. L., Dimerization of tyrosine phosphatase PTPRO decreases its activity and ability to inactivate TrkC. *Journal of neurochemistry* **2009**, *110* (5), 1635-47.
379. Walchli, S.; Espanel, X.; Hooft van Huijsduijnen, R., Sap-1/PTPRH activity is regulated by reversible dimerization. *Biochemical and biophysical research communications* **2005**, *331* (2), 497-502.
380. Takahashi, K.; Mernaugh, R. L.; Friedman, D. B.; Weller, R.; Tsuboi, N.; Yamashita, H.; Quaranta, V.; Takahashi, T., Thrombospondin-1 acts as a ligand for CD148 tyrosine phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, *109* (6), 1985-90.
381. Whiteford, J. R.; Xian, X.; Chaussade, C.; Vanhaesebroeck, B.; Nourshargh, S.; Couchman, J. R., Syndecan-2 is a novel ligand for the protein tyrosine phosphatase receptor CD148. *Molecular biology of the cell* **2011**, *22* (19), 3609-24.
382. De Rossi, G.; Evans, A. R.; Kay, E.; Woodfin, A.; McKay, T. R.; Nourshargh, S.; Whiteford, J. R., Shed syndecan-2 inhibits angiogenesis. *Journal of cell science* **2014**, *127* (21), 4788-99.
383. Sorby, M.; Sandstrom, J.; Ostman, A., An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *Oncogene* **2001**, *20* (37), 5219-24.
384. Arora, D.; Stopp, S.; Bohmer, S. A.; Schons, J.; Godfrey, R.; Masson, K.; Razumovskaya, E.; Ronnstrand, L.; Tanzer, S.; Bauer, R.; Bohmer, F. D.; Muller, J. P., Protein-tyrosine phosphatase DEP-1 controls receptor tyrosine kinase FLT3 signaling. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286* (13), 10918-29.
385. Godfrey, R.; Arora, D.; Bauer, R.; Stopp, S.; Muller, J. P.; Heinrich, T.; Bohmer, S. A.; Dagnell, M.; Schnetzke, U.; Scholl, S.; Ostman, A.; Bohmer, F. D., Cell transformation by FLT3 ITD in acute myeloid leukemia involves oxidative inactivation of the tumor suppressor protein-tyrosine phosphatase DEP-1/ PTPRJ. *Blood* **2012**, *119* (19), 4499-511.
386. Leischner, H.; Albers, C.; Grundler, R.; Razumovskaya, E.; Spiekermann, K.; Bohlander, S.; Ronnstrand, L.; Gotze, K.; Peschel, C.; Duyster, J., SRC is a signaling mediator in FLT3-ITD- but not in FLT3-TKD-positive AML. *Blood* **2012**, *119* (17), 4026-33.
387. Keane, M. M.; Lowrey, G. A.; Ettenberg, S. A.; Dayton, M. A.; Lipkowitz, S., The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer research* **1996**, *56* (18), 4236-43.
388. Sallee, J. L.; Burridge, K., Density-enhanced phosphatase 1 regulates phosphorylation of tight junction proteins and enhances barrier function of epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284* (22), 14997-5006.

389. Rao, R., Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1165*, 62-8.
390. Smart, C. E.; Askarian Amiri, M. E.; Wronski, A.; Dinger, M. E.; Crawford, J.; Ovchinnikov, D. A.; Vargas, A. C.; Reid, L.; Simpson, P. T.; Song, S.; Wiesner, C.; French, J. D.; Dave, R. K.; da Silva, L.; Purdon, A.; Andrew, M.; Mattick, J. S.; Lakhani, S. R.; Brown, M. A.; Kellie, S., Expression and function of the protein tyrosine phosphatase receptor J (PTPRJ) in normal mammary epithelial cells and breast tumors. *PloS one* **2012**, *7* (7), e40742.
391. del Toro, R.; Prahst, C.; Mathivet, T.; Siegfried, G.; Kaminker, J. S.; Larrivee, B.; Breant, C.; Duarte, A.; Takakura, N.; Fukamizu, A.; Penninger, J.; Eichmann, A., Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* **2010**, *116* (19), 4025-33.
392. Tarcic, G.; Boguslavsky, S. K.; Wakim, J.; Kiuchi, T.; Liu, A.; Reinitz, F.; Nathanson, D.; Takahashi, T.; Mischel, P. S.; Ng, T.; Yarden, Y., An unbiased screen identifies DEP-1 tumor suppressor as a phosphatase controlling EGFR endocytosis. *Current biology : CB* **2009**, *19* (21), 1788-98.
393. Berset, T. A.; Hoier, E. F.; Hajnal, A., The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Scc1 inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes & development* **2005**, *19* (11), 1328-40.
394. Trapasso, F.; Yendamuri, S.; Dumon, K. R.; Iuliano, R.; Cesari, R.; Feig, B.; Seto, R.; Infante, L.; Ishii, H.; Vecchione, A.; Doring, M. J.; Croce, C. M.; Fusco, A., Restoration of receptor-type protein tyrosine phosphatase eta function inhibits human pancreatic carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **2004**, *25* (11), 2107-14.
395. Trapasso, F.; Iuliano, R.; Boccia, A.; Stella, A.; Visconti, R.; Bruni, P.; Baldassarre, G.; Santoro, M.; Viglietto, G.; Fusco, A., Rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27(Kip1). *Mol Cell Biol* **2000**, *20* (24), 9236-46.
396. Iervolino, A.; Iuliano, R.; Trapasso, F.; Viglietto, G.; Melillo, R. M.; Carlomagno, F.; Santoro, M.; Fusco, A., The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins. *Cancer research* **2006**, *66* (12), 6280-7.
397. Yan, C. M.; Zhao, Y. L.; Cai, H. Y.; Miao, G. Y.; Ma, W., Blockage of PTPRJ promotes cell growth and resistance to 5-FU through activation of JAK1/STAT3 in the cervical carcinoma cell line C33A. *Oncology reports* **2015**, *33* (4), 1737-44.
398. Petermann, A.; Haase, D.; Wetzel, A.; Balavenkatraman, K. K.; Tenev, T.; Guhrs, K. H.; Friedrich, S.; Nakamura, M.; Mawrin, C.; Bohmer, F. D., Loss of the protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ drives meningioma cell motility. *Brain pathology* **2011**, *21* (4), 405-18.
399. Balavenkatraman, K. K.; Jandt, E.; Friedrich, K.; Kautenburger, T.; Pool-Zobel, B. L.; Ostman, A.; Bohmer, F. D., DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients. *Oncogene* **2006**, *25* (47), 6319-24.
400. Iuliano, R.; Le Pera, I.; Cristofaro, C.; Baudi, F.; Arturi, F.; Pallante, P.; Martelli, M. L.; Trapasso, F.; Chiariotti, L.; Fusco, A., The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis. *Oncogene* **2004**, *23* (52), 8432-8.
401. Ruivenkamp, C. A.; van Wezel, T.; Zanon, C.; Stassen, A. P.; Vlcek, C.; Csikos, T.; Klous, A. M.; Tripodis, N.; Perrakis, A.; Boerriqter, L.; Groot, P. C.; Lindeman, J.; Mooi, W.

- J.; Meijjer, G. A.; Scholten, G.; Dauwerse, H.; Paces, V.; van Zandwijk, N.; van Ommen, G. J.; Demant, P., PtpRJ is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Scc1* and is frequently deleted in human cancers. *Nature genetics* **2002**, *31* (3), 295-300.
402. Ruivenkamp, C.; Hermsen, M.; Postma, C.; Klous, A.; Baak, J.; Meijjer, G.; Demant, P., LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12-21. *Oncogene* **2003**, *22* (22), 3472-4.
403. Mita, Y.; Yasuda, Y.; Sakai, A.; Yamamoto, H.; Toyooka, S.; Gunduz, M.; Tanabe, S.; Naomoto, Y.; Ouchida, M.; Shimizu, K., Missense polymorphisms of PTPRJ and PTPN13 genes affect susceptibility to a variety of human cancers. *Journal of cancer research and clinical oncology* **2010**, *136* (2), 249-59.
404. Ding, L.; Ellis, M. J.; Li, S.; Larson, D. E.; Chen, K.; Wallis, J. W.; Harris, C. C.; McLellan, M. D.; Fulton, R. S.; Fulton, L. L.; Abbott, R. M.; Hoog, J.; Dooling, D. J.; Koboldt, D. C.; Schmidt, H.; Kalicki, J.; Zhang, Q.; Chen, L.; Lin, L.; Wendl, M. C.; McMichael, J. F.; Magrini, V. J.; Cook, L.; McGrath, S. D.; Vickery, T. L.; Appelbaum, E.; Deschryver, K.; Davies, S.; Guintoli, T.; Lin, L.; Crowder, R.; Tao, Y.; Snider, J. E.; Smith, S. M.; Dukes, A. F.; Sanderson, G. E.; Pohl, C. S.; Delehaunty, K. D.; Fronick, C. C.; Pape, K. A.; Reed, J. S.; Robinson, J. S.; Hodges, J. S.; Schierding, W.; Dees, N. D.; Shen, D.; Locke, D. P.; Wiechert, M. E.; Eldred, J. M.; Peck, J. B.; Oberkfell, B. J.; Lolofie, J. T.; Du, F.; Hawkins, A. E.; O'Laughlin, M. D.; Bernard, K. E.; Cunningham, M.; Elliott, G.; Mason, M. D.; Thompson, D. M., Jr.; Ivanovich, J. L.; Goodfellow, P. J.; Perou, C. M.; Weinstock, G. M.; Aft, R.; Watson, M.; Ley, T. J.; Wilson, R. K.; Mardis, E. R., Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature* **2010**, *464* (7291), 999-1005.
405. Julien, S. G.; Dube, N.; Hardy, S.; Tremblay, M. L., Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nature reviews. Cancer* **2011**, *11* (1), 35-49.
406. Giampietro, C.; Taddei, A.; Corada, M.; Sarra-Ferraris, G. M.; Alcalay, M.; Cavallaro, U.; Orsenigo, F.; Lampugnani, M. G.; Dejana, E., Overlapping and divergent signaling pathways of N-cadherin and VE-cadherin in endothelial cells. *Blood* **2012**, *119* (9), 2159-70.
407. Abu-Ghazaleh, R.; Kabir, J.; Jia, H.; Lobo, M.; Zachary, I., Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *The Biochemical journal* **2001**, *360* (Pt 1), 255-64.
408. Kilarski, W. W.; Jura, N.; Gerwins, P., Inactivation of Src family kinases inhibits angiogenesis in vivo: implications for a mechanism involving organization of the actin cytoskeleton. *Experimental cell research* **2003**, *291* (1), 70-82.
409. Pei, X. F.; Noble, M. S.; Davoli, M. A.; Rosfjord, E.; Tilli, M. T.; Furth, P. A.; Russell, R.; Johnson, M. D.; Dickson, R. B., Explant-cell culture of primary mammary tumors from MMTV-c-Myc transgenic mice. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **2004**, *40* (1-2), 14-21.
410. Borowsky, A. D.; Namba, R.; Young, L. J.; Hunter, K. W.; Hodgson, J. G.; Tepper, C. G.; McGoldrick, E. T.; Muller, W. J.; Cardiff, R. D.; Gregg, J. P., Syngeneic mouse mammary carcinoma cell lines: two closely related cell lines with divergent metastatic behavior. *Clinical & experimental metastasis* **2005**, *22* (1), 47-59.
411. Baker, M.; Robinson, S. D.; Lechertier, T.; Barber, P. R.; Tavora, B.; D'Amico, G.; Jones, D. T.; Vojnovic, B.; Hodivala-Dilke, K., Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature protocols* **2012**, *7* (1), 89-104.

412. Pin, A. L.; Houle, F.; Fournier, P.; Guillonnet, M.; Paquet, E. R.; Simard, M. J.; Royal, I.; Huot, J., Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287* (36), 30541-51.
413. Turgeon, J.; Haddad, P.; Dussault, S.; Groleau, J.; Maingrette, F.; Perez, G.; Rivard, A., Protection against vascular aging in Nox2-deficient mice: Impact on endothelial progenitor cells and reparative neovascularization. *Atherosclerosis* **2012**, *223* (1), 122-9.
414. Caceres-Gorriti, K. Y.; Carmona, E.; Barres, V.; Rahimi, K.; Letourneau, I. J.; Tonin, P. N.; Provencher, D.; Mes-Masson, A. M., RAN nucleo-cytoplasmic transport and mitotic spindle assembly partners XPO7 and TPX2 are new prognostic biomarkers in serous epithelial ovarian cancer. *PLoS one* **2014**, *9* (3), e91000.
415. Spring, K.; Fournier, P.; Lapointe, L.; Chabot, C.; Roussy, J.; Pommey, S.; Stagg, J.; Royal, I., The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ promotes breast cancer cell invasion and metastasis. *Oncogene* **2015**.
416. Pepin, F.; Bertos, N.; Laferriere, J.; Sadekova, S.; Souleimanova, M.; Zhao, H.; Finak, G.; Meterissian, S.; Hallett, M. T.; Park, M., Gene-expression profiling of microdissected breast cancer microvasculature identifies distinct tumor vascular subtypes. *Breast cancer research : BCR* **2012**, *14* (4), R120.
417. Dejana, E.; Vestweber, D., The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Progress in molecular biology and translational science* **2013**, *116*, 119-44.
418. Potter, M. D.; Barbero, S.; Cheresch, D. A., Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280* (36), 31906-12.
419. Orsenigo, F.; Giampietro, C.; Ferrari, A.; Corada, M.; Galaup, A.; Sigismund, S.; Ristagno, G.; Maddaluno, L.; Koh, G. Y.; Franco, D.; Kurtcuoglu, V.; Poulikakos, D.; Baluk, P.; McDonald, D.; Grazia Lampugnani, M.; Dejana, E., Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature communications* **2012**, *3*, 1208.
420. Wessel, F.; Winderlich, M.; Holm, M.; Frye, M.; Rivera-Galdos, R.; Vockel, M.; Linnepe, R.; Ipe, U.; Stadtmann, A.; Zarbock, A.; Nottebaum, A. F.; Vestweber, D., Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nature immunology* **2014**, *15* (3), 223-30.
421. Dave, R. K.; Hume, D. A.; Elsegood, C.; Kellie, S., CD148/DEP-1 association with areas of cytoskeletal organisation in macrophages. *Experimental cell research* **2009**, *315* (10), 1734-44.
422. Qian, B. Z.; Pollard, J. W., Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **2010**, *141* (1), 39-51.
423. Fournier, P.; Dussault, S.; Fusco, A.; Rivard, A.; Royal, I., The protein tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ is an essential promoter of vascular permeability, angiogenesis and tumor progression. *Cancer research* **2015**.
424. Dejda, A.; Mawambo, G.; Cerani, A.; Miloudi, K.; Shao, Z.; Daudelin, J. F.; Boulet, S.; Oubaha, M.; Beaudoin, F.; Akla, N.; Henriques, S.; Menard, C.; Stahl, A.; Delisle, J. S.; Rezende, F. A.; Labrecque, N.; Sapielha, P., Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk. *The Journal of clinical investigation* **2014**, *124* (11), 4807-22.

425. Stone, J.; Itin, A.; Alon, T.; Pe'er, J.; Gnessin, H.; Chan-Ling, T.; Keshet, E., Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **1995**, *15* (7 Pt 1), 4738-47.
426. Monick, M. M.; Carter, A. B.; Robeff, P. K.; Flaherty, D. M.; Peterson, M. W.; Hunninghake, G. W., Lipopolysaccharide activates Akt in human alveolar macrophages resulting in nuclear accumulation and transcriptional activity of beta-catenin. *Journal of immunology* **2001**, *166* (7), 4713-20.
427. Fang, D.; Hawke, D.; Zheng, Y.; Xia, Y.; Meisenhelder, J.; Nika, H.; Mills, G. B.; Kobayashi, R.; Hunter, T.; Lu, Z., Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry* **2007**, *282* (15), 11221-9.
428. Maes, C.; Goossens, S.; Bartunkova, S.; Drogat, B.; Coenegrachts, L.; Stockmans, I.; Moermans, K.; Nyabi, O.; Haigh, K.; Naessens, M.; Haenebalcke, L.; Tuckermann, J. P.; Tjwa, M.; Carmeliet, P.; Mandic, V.; David, J. P.; Behrens, A.; Nagy, A.; Carmeliet, G.; Haigh, J. J., Increased skeletal VEGF enhances beta-catenin activity and results in excessively ossified bones. *The EMBO journal* **2010**, *29* (2), 424-41.
429. Provis, J. M.; Leech, J.; Diaz, C. M.; Penfold, P. L.; Stone, J.; Keshet, E., Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Experimental eye research* **1997**, *65* (4), 555-68.
430. Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **1995**, *378* (6559), 785-9.
431. <J Cell Biol-2003-Lampugnani-793-804.pdf>
432. Ren, B.; Deng, Y.; Mukhopadhyay, A.; Lanahan, A. A.; Zhuang, Z. W.; Moodie, K. L.; Mulligan-Kehoe, M. J.; Byzova, T. V.; Peterson, R. T.; Simons, M., ERK1/2-Akt1 crosstalk regulates arteriogenesis in mice and zebrafish. *The Journal of clinical investigation* **2010**, *120* (4), 1217-28.
433. Sainson, R. C.; Aoto, J.; Nakatsu, M. N.; Holderfield, M.; Conn, E.; Koller, E.; Hughes, C. C., Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2005**, *19* (8), 1027-9.
434. Liu, Z. J.; Xiao, M.; Balint, K.; Soma, A.; Pinnix, C. C.; Capobianco, A. J.; Velazquez, O. C.; Herlyn, M., Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2006**, *20* (7), 1009-11.
435. Bullard, L. E.; Qi, X.; Penn, J. S., Role for extracellular signal-responsive kinase-1 and -2 in retinal angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science* **2003**, *44* (4), 1722-31.
436. Srinivasan, R.; Zabuawala, T.; Huang, H.; Zhang, J.; Gulati, P.; Fernandez, S.; Karlo, J. C.; Landreth, G. E.; Leone, G.; Ostrowski, M. C., Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PloS one* **2009**, *4* (12), e8283.
437. Tonks, N. K., Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *The FEBS journal* **2013**, *280* (2), 346-78.

438. Aya-Bonilla, C.; Green, M. R.; Camilleri, E.; Benton, M.; Keane, C.; Marlton, P.; Lea, R.; Gandhi, M. K.; Griffiths, L. R., High-resolution loss of heterozygosity screening implicates PTPRJ as a potential tumor suppressor gene that affects susceptibility to Non-Hodgkin's lymphoma. *Genes, chromosomes & cancer* **2013**, *52* (5), 467-79.
439. Iuliano, R.; Palmieri, D.; He, H.; Iervolino, A.; Borbone, E.; Pallante, P.; Cianflone, A.; Nagy, R.; Alder, H.; Calin, G. A.; Trapasso, F.; Giordano, C.; Croce, C. M.; de la Chapelle, A.; Fusco, A., Role of PTPRJ genotype in papillary thyroid carcinoma risk. *Endocrine-related cancer* **2010**, *17* (4), 1001-6.
440. Ellinghaus, E.; Stanulla, M.; Richter, G.; Ellinghaus, D.; te Kronnie, G.; Cario, G.; Cazzaniga, G.; Horstmann, M.; Panzer Grumayer, R.; Cave, H.; Trka, J.; Cinek, O.; Teigler-Schlegel, A.; ElSharawy, A.; Hasler, R.; Nebel, A.; Meissner, B.; Bartram, T.; Lescai, F.; Franceschi, C.; Giordan, M.; Nurnberg, P.; Heinzow, B.; Zimmermann, M.; Schreiber, S.; Schrappe, M.; Franke, A., Identification of germline susceptibility loci in ETV6-RUNX1-rearranged childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2012**, *26* (5), 902-9.
441. Lesueur, F.; Pharoah, P. D.; Laing, S.; Ahmed, S.; Jordan, C.; Smith, P. L.; Luben, R.; Wareham, N. J.; Easton, D. F.; Dunning, A. M.; Ponder, B. A., Allelic association of the human homologue of the mouse modifier PtpRJ with breast cancer. *Human molecular genetics* **2005**, *14* (16), 2349-56.
442. Zhang, L.; Martelli, M. L.; Battaglia, C.; Trapasso, F.; Tramontano, D.; Viglietto, G.; Porcellini, A.; Santoro, M.; Fusco, A., Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Experimental cell research* **1997**, *235* (1), 62-70.
443. Pera, I. L.; Iuliano, R.; Florio, T.; Susini, C.; Trapasso, F.; Santoro, M.; Chiariotti, L.; Schettini, G.; Viglietto, G.; Fusco, A., The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* **2005**, *24* (19), 3187-95.
444. Frame, M. C., Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* **2002**, *1602* (2), 114-30.
445. Kim, L. C.; Song, L.; Haura, E. B., Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* **2009**, *6* (10), 587-95.
446. Shor, A. C.; Keschman, E. A.; Lee, F. Y.; Muro-Cacho, C.; Letson, G. D.; Trent, J. C.; Pledger, W. J.; Jove, R., Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer research* **2007**, *67* (6), 2800-8.
447. Zhang, S.; Yu, D., Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends in pharmacological sciences* **2012**, *33* (3), 122-8.
448. Zhang, X. H.; Wang, Q.; Gerald, W.; Hudis, C. A.; Norton, L.; Smid, M.; Foekens, J. A.; Massague, J., Latent bone metastasis in breast cancer tied to Src-dependent survival signals. *Cancer cell* **2009**, *16* (1), 67-78.
449. Rucci, N.; Recchia, I.; Angelucci, A.; Alamanou, M.; Del Fattore, A.; Fortunati, D.; Susa, M.; Fabbro, D.; Bologna, M.; Teti, A., Inhibition of protein kinase c-Src reduces the incidence of breast cancer metastases and increases survival in mice: implications for therapy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2006**, *318* (1), 161-72.
450. Nam, J. S.; Ino, Y.; Sakamoto, M.; Hirohashi, S., Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2002**, *8* (7), 2430-6.

451. Hochgrafe, F.; Zhang, L.; O'Toole, S. A.; Browne, B. C.; Pinese, M.; Porta Cubas, A.; Lehrbach, G. M.; Croucher, D. R.; Rickwood, D.; Boulghourjian, A.; Shearer, R.; Nair, R.; Swarbrick, A.; Faratian, D.; Mullen, P.; Harrison, D. J.; Biankin, A. V.; Sutherland, R. L.; Raftery, M. J.; Daly, R. J., Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of Basal breast cancer cells. *Cancer research* **2010**, *70* (22), 9391-401.
452. Smid, M.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Sieuwerts, A. M.; Yu, J.; Klijn, J. G.; Foekens, J. A.; Martens, J. W., Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer research* **2008**, *68* (9), 3108-14.
453. Sihto, H.; Lundin, J.; Lundin, M.; Lehtimäki, T.; Ristimäki, A.; Holli, K.; Sailas, L.; Kataja, V.; Turpeenniemi-Hujanen, T.; Isola, J.; Heikkilä, P.; Joensuu, H., Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. *Breast cancer research : BCR* **2011**, *13* (5), R87.
454. Bertos, N. R.; Park, M., Breast cancer - one term, many entities? *The Journal of clinical investigation* **2011**, *121* (10), 3789-96.
455. Podo, F.; Buydens, L. M.; Degani, H.; Hilhorst, R.; Klipp, E.; Gribbestad, I. S.; Van Huffel, S.; van Laarhoven, H. W.; Luts, J.; Monleon, D.; Postma, G. J.; Schneiderhan-Marra, N.; Santoro, F.; Wouters, H.; Russnes, H. G.; Sorlie, T.; Tagliabue, E.; Borresen-Dale, A. L.; Consortium, F., Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Molecular oncology* **2010**, *4* (3), 209-29.
456. Lehmann, B. D.; Bauer, J. A.; Chen, X.; Sanders, M. E.; Chakravarthy, A. B.; Shyr, Y.; Pietenpol, J. A., Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation* **2011**, *121* (7), 2750-67.
457. Hiscox, S.; Morgan, L.; Green, T. P.; Barrow, D.; Gee, J.; Nicholson, R. I., Elevated Src activity promotes cellular invasion and motility in tamoxifen resistant breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **2006**, *97* (3), 263-74.
458. Elias, D.; Vever, H.; Laenkholm, A. V.; Gjerstorff, M. F.; Yde, C. W.; Lykkesfeldt, A. E.; Ditzel, H. J., Gene expression profiling identifies FYN as an important molecule in tamoxifen resistance and a predictor of early recurrence in patients treated with endocrine therapy. *Oncogene* **2015**, *34* (15), 1919-27.
459. Eccles, S. A., The epidermal growth factor receptor/Erb-B/HER family in normal and malignant breast biology. *The International journal of developmental biology* **2011**, *55* (7-9), 685-96.
460. Foley, J.; Nickerson, N. K.; Nam, S.; Allen, K. T.; Gilmore, J. L.; Nephew, K. P.; Riese, D. J., 2nd, EGFR signaling in breast cancer: bad to the bone. *Seminars in cell & developmental biology* **2010**, *21* (9), 951-60.
461. Chiorean, R.; Braicu, C.; Berindan-Neagoe, I., Another review on triple negative breast cancer. Are we on the right way towards the exit from the labyrinth? *Breast* **2013**, *22* (6), 1026-33.
462. Taube, J. H.; Herschkowitz, J. I.; Komurov, K.; Zhou, A. Y.; Gupta, S.; Yang, J.; Hartwell, K.; Onder, T. T.; Gupta, P. B.; Evans, K. W.; Hollier, B. G.; Ram, P. T.; Lander, E. S.; Rosen, J. M.; Weinberg, R. A.; Mani, S. A., Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (35), 15449-54.

463. Rhodes, D. R.; Yu, J.; Shanker, K.; Deshpande, N.; Varambally, R.; Ghosh, D.; Barrette, T.; Pandey, A.; Chinnaiyan, A. M., ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* **2004**, *6* (1), 1-6.
464. MacGrath, S. M.; Koleske, A. J., Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *Journal of cell science* **2012**, *125* (Pt 7), 1621-6.
465. Li, Y.; Tondravi, M.; Liu, J.; Smith, E.; Haudenschild, C. C.; Kaczmarek, M.; Zhan, X., Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer research* **2001**, *61* (18), 6906-11.
466. Clark, E. S.; Weaver, A. M., A new role for cortactin in invadopodia: regulation of protease secretion. *European journal of cell biology* **2008**, *87* (8-9), 581-90.
467. Bryce, N. S.; Clark, E. S.; Leysath, J. L.; Currie, J. D.; Webb, D. J.; Weaver, A. M., Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Current biology : CB* **2005**, *15* (14), 1276-85.
468. Tehrani, S.; Tomasevic, N.; Weed, S.; Sakowicz, R.; Cooper, J. A., Src phosphorylation of cortactin enhances actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104* (29), 11933-8.
469. Sung, B. H.; Zhu, X.; Kaverina, I.; Weaver, A. M., Cortactin controls cell motility and lamellipodial dynamics by regulating ECM secretion. *Current biology : CB* **2011**, *21* (17), 1460-9.
470. Mezi, S.; Todi, L.; Orsi, E.; Angeloni, A.; Mancini, P., Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells. *International journal of oncology* **2012**, *41* (6), 2128-38.
471. Guarino, M., Src signaling in cancer invasion. *Journal of cellular physiology* **2010**, *223* (1), 14-26.
472. Jallal, H.; Valentino, M. L.; Chen, G.; Boschelli, F.; Ali, S.; Rabbani, S. A., A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer research* **2007**, *67* (4), 1580-8.
473. Ma, J. G.; Huang, H.; Chen, S. M.; Chen, Y.; Xin, X. L.; Lin, L. P.; Ding, J.; Liu, H.; Meng, L. H., PH006, a novel and selective Src kinase inhibitor, suppresses human breast cancer growth and metastasis in vitro and in vivo. *Breast cancer research and treatment* **2011**, *130* (1), 85-96.
474. Shields, B. J.; Wiede, F.; Gurzov, E. N.; Wee, K.; Hauser, C.; Zhu, H. J.; Molloy, T. J.; O'Toole, S. A.; Daly, R. J.; Sutherland, R. L.; Mitchell, C. A.; McLean, C. A.; Tiganis, T., TCPTP regulates SFK and STAT3 signaling and is lost in triple-negative breast cancers. *Mol Cell Biol* **2013**, *33* (3), 557-70.
475. Bentires-Alj, M.; Neel, B. G., Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer research* **2007**, *67* (6), 2420-4.
476. Julien, S. G.; Dube, N.; Read, M.; Penney, J.; Paquet, M.; Han, Y.; Kennedy, B. P.; Muller, W. J.; Tremblay, M. L., Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nature genetics* **2007**, *39* (3), 338-46.
477. Sun, T.; Aceto, N.; Meerbrey, K. L.; Kessler, J. D.; Zhou, C.; Migliaccio, I.; Nguyen, D. X.; Pavlova, N. N.; Botero, M.; Huang, J.; Bernardi, R. J.; Schmitt, E.; Hu, G.; Li, M. Z.; Dephoure, N.; Gygi, S. P.; Rao, M.; Creighton, C. J.; Hilsenbeck, S. G.; Shaw, C. A.; Muzny, D.; Gibbs, R. A.; Wheeler, D. A.; Osborne, C. K.; Schiff, R.; Bentires-Alj, M.; Elledge, S. J.;

- Westbrook, T. F., Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase. *Cell* **2011**, *144* (5), 703-18.
478. Hardy, S.; Wong, N. N.; Muller, W. J.; Park, M.; Tremblay, M. L., Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PRL-2 correlates with breast tumor formation and progression. *Cancer research* **2010**, *70* (21), 8959-67.
479. Sabe, H.; Hashimoto, S.; Morishige, M.; Hashimoto, A.; Ogawa, E., The EGFR-GEP100-Arf6 pathway in breast cancer: Full invasiveness is not from the inside. *Cell adhesion & migration* **2008**, *2* (2), 71-3.
480. Clark, E. S.; Whigham, A. S.; Yarbrough, W. G.; Weaver, A. M., Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer research* **2007**, *67* (9), 4227-35.
481. Lai, F. P.; Szczodrak, M.; Oelkers, J. M.; Ladwein, M.; Acconcia, F.; Benesch, S.; Auinger, S.; Faix, J.; Small, J. V.; Polo, S.; Stradal, T. E.; Rottner, K., Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Molecular biology of the cell* **2009**, *20* (14), 3209-23.
482. Majumder, S.; Sowden, M. P.; Gerber, S. A.; Thomas, T.; Christie, C. K.; Mohan, A.; Yin, G.; Lord, E. M.; Berk, B. C.; Pang, J., G-protein-coupled receptor-2-interacting protein-1 is required for endothelial cell directional migration and tumor angiogenesis via cortactin-dependent lamellipodia formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2014**, *34* (2), 419-26.
483. Takahashi, K.; Suzuki, K., Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Experimental cell research* **1996**, *226* (1), 214-22.
484. Eckert, L. B.; Repasky, G. A.; Ulku, A. S.; McFall, A.; Zhou, H.; Sartor, C. I.; Der, C. J., Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer research* **2004**, *64* (13), 4585-92.
485. Boggon, T. J.; Eck, M. J., Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **2004**, *23* (48), 7918-27.
486. Matsumoto, T.; Bohman, S.; Dixelius, J.; Berge, T.; Dimberg, A.; Magnusson, P.; Wang, L.; Wikner, C.; Qi, J. H.; Wernstedt, C.; Wu, J.; Bruheim, S.; Mugishima, H.; Mukhopadhyay, D.; Spurrkland, A.; Claesson-Welsh, L., VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *The EMBO journal* **2005**, *24* (13), 2342-53.
487. Kangsamaksin, T.; Murtomaki, A.; Kofler, N. M.; Cuervo, H.; Chaudhri, R. A.; Tattersall, I. W.; Rosenstiel, P. E.; Shawber, C. J.; Kitajewski, J., NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer discovery* **2015**, *5* (2), 182-97.
488. Lawson, N. D.; Scheer, N.; Pham, V. N.; Kim, C. H.; Chitnis, A. B.; Campos-Ortega, J. A.; Weinstein, B. M., Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* **2001**, *128* (19), 3675-83.
489. Duarte, A.; Hirashima, M.; Benedito, R.; Trindade, A.; Diniz, P.; Bekman, E.; Costa, L.; Henrique, D.; Rossant, J., Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & development* **2004**, *18* (20), 2474-8.
490. Sorensen, I.; Adams, R. H.; Gossler, A., DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood* **2009**, *113* (22), 5680-8.

491. Zhong, T. P.; Childs, S.; Leu, J. P.; Fishman, M. C., Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **2001**, *414* (6860), 216-20.
492. Fischer, A.; Schumacher, N.; Maier, M.; Sendtner, M.; Gessler, M., The Notch target genes *Hey1* and *Hey2* are required for embryonic vascular development. *Genes & development* **2004**, *18* (8), 901-11.
493. Kokubo, H.; Miyagawa-Tomita, S.; Nakazawa, M.; Saga, Y.; Johnson, R. L., Mouse *hesr1* and *hesr2* genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Developmental biology* **2005**, *278* (2), 301-9.
494. Shutter, J. R.; Scully, S.; Fan, W.; Richards, W. G.; Kitajewski, J.; Deblandre, G. A.; Kintner, C. R.; Stark, K. L., *Dll4*, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes & development* **2000**, *14* (11), 1313-8.
495. Lee, C. Y.; Bautch, V. L., Ups and downs of guided vessel sprouting: the role of polarity. *Physiology* **2011**, *26* (5), 326-33.
496. Tyler, R. C.; Peterson, F. C.; Volkman, B. F., Distal interactions within the *par3*-VE-cadherin complex. *Biochemistry* **2010**, *49* (5), 951-7.
497. Iden, S.; Rehder, D.; August, B.; Suzuki, A.; Wolburg-Buchholz, K.; Wolburg, H.; Ohno, S.; Behrens, J.; Vestweber, D.; Ebnet, K., A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. *EMBO reports* **2006**, *7* (12), 1239-46.
498. Lampugnani, M. G.; Orsenigo, F.; Rudini, N.; Maddaluno, L.; Boulday, G.; Chapon, F.; Dejana, E., CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *Journal of cell science* **2010**, *123* (Pt 7), 1073-80.
499. Montero-Balaguer, M.; Swirsding, K.; Orsenigo, F.; Cotelli, F.; Mione, M.; Dejana, E., Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos. *PloS one* **2009**, *4* (6), e5772.
500. Carmeliet, P.; Lampugnani, M. G.; Moons, L.; Breviario, F.; Compennolle, V.; Bono, F.; Balconi, G.; Spagnuolo, R.; Oosthuysse, B.; Dewerchin, M.; Zanetti, A.; Angellilo, A.; Mattot, V.; Nuyens, D.; Lutgens, E.; Clotman, F.; de Ruiter, M. C.; Gittenberger-de Groot, A.; Poelmann, R.; Lupu, F.; Herbert, J. M.; Collen, D.; Dejana, E., Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **1999**, *98* (2), 147-57.
501. Hayashi, M.; Majumdar, A.; Li, X.; Adler, J.; Sun, Z.; Vertuani, S.; Hellberg, C.; Mellberg, S.; Koch, S.; Dimberg, A.; Koh, G. Y.; Dejana, E.; Belting, H. G.; Affolter, M.; Thurston, G.; Holmgren, L.; Vestweber, D.; Claesson-Welsh, L., VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation. *Nature communications* **2013**, *4*, 1672.
502. Lin, J.; Zhu, J. W.; Baker, J. E.; Weiss, A., Regulated expression of the receptor-like tyrosine phosphatase CD148 on hemopoietic cells. *Journal of immunology* **2004**, *173* (4), 2324-30.
503. Sabrkhany, S.; Griffioen, A. W.; Oude Egbrink, M. G., The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **2011**, *1815* (2), 189-96.
504. Kutcher, M. E.; Klagsbrun, M.; Mamluk, R., VEGF is required for the maintenance of dorsal root ganglia blood vessels but not neurons during development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **2004**, *18* (15), 1952-4.
505. Kisucka, J.; Butterfield, C. E.; Duda, D. G.; Eichenberger, S. C.; Saffaripour, S.; Ware, J.; Ruggeri, Z. M.; Jain, R. K.; Folkman, J.; Wagner, D. D., Platelets and platelet adhesion

support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (4), 855-60.

506. Brill, A.; Elinav, H.; Varon, D., Differential role of platelet granular mediators in angiogenesis. *Cardiovascular research* **2004**, *63* (2), 226-35.

507. Battinelli, E. M.; Markens, B. A.; Italiano, J. E., Jr., Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood* **2011**, *118* (5), 1359-69.

508. Tazzyman, S.; Niaz, H.; Murdoch, C., Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: subversion of immune responses to promote tumour growth. *Seminars in cancer biology* **2013**, *23* (3), 149-58.

509. Pahler, J. C.; Tazzyman, S.; Erez, N.; Chen, Y. Y.; Murdoch, C.; Nozawa, H.; Lewis, C. E.; Hanahan, D., Plasticity in tumor-promoting inflammation: impairment of macrophage recruitment evokes a compensatory neutrophil response. *Neoplasia* **2008**, *10* (4), 329-40.

510. Lamagna, C.; Aurrand-Lions, M.; Imhof, B. A., Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* **2006**, *80* (4), 705-13.

511. Sidibe, A.; Imhof, B. A., VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. *Nature immunology* **2014**, *15* (3), 215-7.

512. Thurston, G.; Noguera-Troise, I.; Yancopoulos, G. D., The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nature reviews. Cancer* **2007**, *7* (5), 327-31.

513. Funahashi, Y.; Hernandez, S. L.; Das, I.; Ahn, A.; Huang, J.; Vorontchikhina, M.; Sharma, A.; Kanamaru, E.; Borisenko, V.; Desilva, D. M.; Suzuki, A.; Wang, X.; Shawber, C. J.; Kandel, J. J.; Yamashiro, D. J.; Kitajewski, J., A notch1 ectodomain construct inhibits endothelial notch signaling, tumor growth, and angiogenesis. *Cancer research* **2008**, *68* (12), 4727-35.

514. Benjamin, L. E.; Golijanin, D.; Itin, A.; Pode, D.; Keshet, E., Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation* **1999**, *103* (2), 159-65.

515. Benjamin, L. E.; Hemo, I.; Keshet, E., A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **1998**, *125* (9), 1591-8.

516. Borgstrom, P.; Bourdon, M. A.; Hillan, K. J.; Sriramarao, P.; Ferrara, N., Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *The Prostate* **1998**, *35* (1), 1-10.

517. Eremina, V.; Jefferson, J. A.; Kowalewska, J.; Hochster, H.; Haas, M.; Weisstuch, J.; Richardson, C.; Kopp, J. B.; Kabir, M. G.; Backx, P. H.; Gerber, H. P.; Ferrara, N.; Barisoni, L.; Alpers, C. E.; Quaggin, S. E., VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *The New England journal of medicine* **2008**, *358* (11), 1129-36.

518. Gerber, H. P.; Hillan, K. J.; Ryan, A. M.; Kowalski, J.; Keller, G. A.; Rangell, L.; Wright, B. D.; Radtke, F.; Aguet, M.; Ferrara, N., VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **1999**, *126* (6), 1149-59.

519. Kamba, T.; Tam, B. Y.; Hashizume, H.; Haskell, A.; Sennino, B.; Mancuso, M. R.; Norberg, S. M.; O'Brien, S. M.; Davis, R. B.; Gowen, L. C.; Anderson, K. D.; Thurston, G.; Joho, S.; Springer, M. L.; Kuo, C. J.; McDonald, D. M., VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **2006**, *290* (2), H560-76.

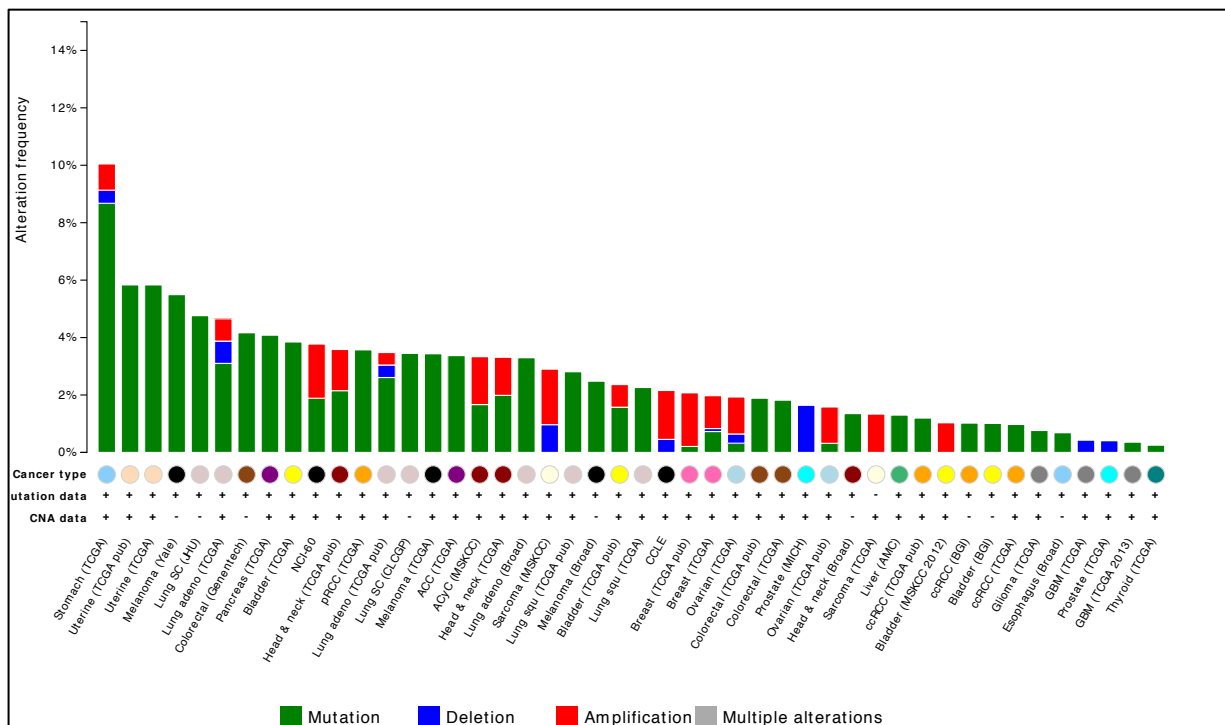
520. Yuan, F.; Chen, Y.; Dellian, M.; Safabakhsh, N.; Ferrara, N.; Jain, R. K., Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, *93* (25), 14765-70.
521. Chen, W. S.; Xu, P. Z.; Gottlob, K.; Chen, M. L.; Sokol, K.; Shiyanova, T.; Roninson, I.; Weng, W.; Suzuki, R.; Tobe, K.; Kadowaki, T.; Hay, N., Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes & development* **2001**, *15* (17), 2203-8.
522. Cho, H.; Mu, J.; Kim, J. K.; Thorvaldsen, J. L.; Chu, Q.; Crenshaw, E. B., 3rd; Kaestner, K. H.; Bartolomei, M. S.; Shulman, G. I.; Birnbaum, M. J., Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **2001**, *292* (5522), 1728-31.
523. Cho, H.; Thorvaldsen, J. L.; Chu, Q.; Feng, F.; Birnbaum, M. J., Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *The Journal of biological chemistry* **2001**, *276* (42), 38349-52.
524. Chen, J.; Somanath, P. R.; Razorenova, O.; Chen, W. S.; Hay, N.; Bornstein, P.; Byzova, T. V., Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nature medicine* **2005**, *11* (11), 1188-96.
525. Ackah, E.; Yu, J.; Zoellner, S.; Iwakiri, Y.; Skurk, C.; Shibata, R.; Ouchi, N.; Easton, R. M.; Galasso, G.; Birnbaum, M. J.; Walsh, K.; Sessa, W. C., Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* **2005**, *115* (8), 2119-27.
526. Lee, M. Y.; Luciano, A. K.; Ackah, E.; Rodriguez-Vita, J.; Bancroft, T. A.; Eichmann, A.; Simons, M.; Kyriakides, T. R.; Morales-Ruiz, M.; Sessa, W. C., Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111* (35), 12865-70.
527. Nottebaum, A. F.; Cagna, G.; Winderlich, M.; Gamp, A. C.; Linnepe, R.; Polaschegg, C.; Filippova, K.; Lyck, R.; Engelhardt, B.; Kamenyeva, O.; Bixel, M. G.; Butz, S.; Vestweber, D., VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *The Journal of experimental medicine* **2008**, *205* (12), 2929-45.
528. Broermann, A.; Winderlich, M.; Block, H.; Frye, M.; Rossaint, J.; Zarbock, A.; Cagna, G.; Linnepe, R.; Schulte, D.; Nottebaum, A. F.; Vestweber, D., Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *The Journal of experimental medicine* **2011**, *208* (12), 2393-401.
529. Aster, J. C.; Blacklow, S. C.; Pear, W. S., Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *The Journal of pathology* **2011**, *223* (2), 262-73.
530. Mirandola, L.; Comi, P.; Cobos, E.; Kast, W. M.; Chiriva-Internati, M.; Chiaramonte, R., Notch-ing from T-cell to B-cell lymphoid malignancies. *Cancer letters* **2011**, *308* (1), 1-13.
531. Al-Hussaini, H.; Subramanyam, D.; Reedijk, M.; Sridhar, S. S., Notch signaling pathway as a therapeutic target in breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* **2011**, *10* (1), 9-15.

532. Dickson, B. C.; Mulligan, A. M.; Zhang, H.; Lockwood, G.; O'Malley, F. P.; Egan, S. E.; Reedijk, M., High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **2007**, *20* (6), 685-93.
533. Chen, Y.; De Marco, M. A.; Graziani, I.; Gazdar, A. F.; Strack, P. R.; Miele, L.; Bocchetta, M., Oxygen concentration determines the biological effects of NOTCH-1 signaling in adenocarcinoma of the lung. *Cancer research* **2007**, *67* (17), 7954-9.
534. Pinnix, C. C.; Herlyn, M., The many faces of Notch signaling in skin-derived cells. *Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **2007**, *20* (6), 458-65.
535. Hoey, T.; Yen, W. C.; Axelrod, F.; Basi, J.; Donigian, L.; Dylla, S.; Fitch-Bruhns, M.; Lazetic, S.; Park, I. K.; Sato, A.; Satyal, S.; Wang, X.; Clarke, M. F.; Lewicki, J.; Gurney, A., DLL4 blockade inhibits tumor growth and reduces tumor-initiating cell frequency. *Cell stem cell* **2009**, *5* (2), 168-77.
536. Kontomanolis, E.; Panteliadou, M.; Giatromanolaki, A.; Pouliliou, S.; Efremidou, E.; Limberis, V.; Galazios, G.; Sivridis, E.; Koukourakis, M. I., Delta-like ligand 4 (DLL4) in the plasma and neoplastic tissues from breast cancer patients: correlation with metastasis. *Medical oncology* **2014**, *31* (5), 945.
537. Reedijk, M.; Pinnaduwege, D.; Dickson, B. C.; Mulligan, A. M.; Zhang, H.; Bull, S. B.; O'Malley, F. P.; Egan, S. E.; Andrulis, I. L., JAG1 expression is associated with a basal phenotype and recurrence in lymph node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **2008**, *111* (3), 439-48.
538. Reedijk, M.; Odorcic, S.; Chang, L.; Zhang, H.; Miller, N.; McCready, D. R.; Lockwood, G.; Egan, S. E., High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer research* **2005**, *65* (18), 8530-7.
539. Lee, C. W.; Simin, K.; Liu, Q.; Plescia, J.; Guha, M.; Khan, A.; Hsieh, C. C.; Altieri, D. C., A functional Notch-survivin gene signature in basal breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **2008**, *10* (6), R97.
540. Iuliano, R.; Trapasso, F.; Sama, I.; Le Pera, I.; Martelli, M. L.; Lembo, F.; Santoro, M.; Viglietto, G.; Chiariotti, L.; Fusco, A., Rat protein tyrosine phosphatase eta physically interacts with the PDZ domains of syntenin. *FEBS letters* **2001**, *500* (1-2), 41-4.
541. Helmke, B. M.; Polychronidis, M.; Benner, A.; Thome, M.; Arribas, J.; Deichmann, M., Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene. *Oncology reports* **2004**, *12* (2), 221-8.
542. Boukerche, H.; Su, Z. Z.; Emdad, L.; Baril, P.; Balme, B.; Thomas, L.; Randolph, A.; Valerie, K.; Sarkar, D.; Fisher, P. B., mda-9/Syntenin: a positive regulator of melanoma metastasis. *Cancer research* **2005**, *65* (23), 10901-11.
543. Koo, T. H.; Lee, J. J.; Kim, E. M.; Kim, K. W.; Kim, H. D.; Lee, J. H., Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cancer cell lines. *Oncogene* **2002**, *21* (26), 4080-8.
544. Yang, Y.; Hong, Q.; Shi, P.; Liu, Z.; Luo, J.; Shao, Z., Elevated expression of syntenin in breast cancer is correlated with lymph node metastasis and poor patient survival. *Breast cancer research : BCR* **2013**, *15* (3), R50.

545. Boukerche, H.; Su, Z. Z.; Prevot, C.; Sarkar, D.; Fisher, P. B., mda-9/Syntenin promotes metastasis in human melanoma cells by activating c-Src. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (41), 15914-9.
546. Lee, H.; Kim, Y.; Choi, Y.; Choi, S.; Hong, E.; Oh, E. S., Syndecan-2 cytoplasmic domain regulates colon cancer cell migration via interaction with syntenin-1. *Biochemical and biophysical research communications* **2011**, *409* (1), 148-53.
547. Zimmermann, P.; Tomatis, D.; Rosas, M.; Grootjans, J.; Leenaerts, I.; Degeest, G.; Reekmans, G.; Coomans, C.; David, G., Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Molecular biology of the cell* **2001**, *12* (2), 339-50.
548. Friand, V.; David, G.; Zimmermann, P., Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **2015**.
549. Baietti, M. F.; Zhang, Z.; Mortier, E.; Melchior, A.; Degeest, G.; Geeraerts, A.; Ivarsson, Y.; Depoortere, F.; Coomans, C.; Vermeiren, E.; Zimmermann, P.; David, G., Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature cell biology* **2012**, *14* (7), 677-85.
550. Hurley, J. H.; Odorizzi, G., Get on the exosome bus with ALIX. *Nature cell biology* **2012**, *14* (7), 654-5.
551. Odorizzi, G., The multiple personalities of Alix. *Journal of cell science* **2006**, *119* (Pt 15), 3025-32.
552. Angelucci, A.; D'Ascenzo, S.; Festuccia, C.; Gravina, G. L.; Bologna, M.; Dolo, V.; Pavan, A., Vesicle-associated urokinase plasminogen activator promotes invasion in prostate cancer cell lines. *Clinical & experimental metastasis* **2000**, *18* (2), 163-70.
553. Hong, B. S.; Cho, J. H.; Kim, H.; Choi, E. J.; Rho, S.; Kim, J.; Kim, J. H.; Choi, D. S.; Kim, Y. K.; Hwang, D.; Gho, Y. S., Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC genomics* **2009**, *10*, 556.
554. Hood, J. L.; San, R. S.; Wickline, S. A., Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer research* **2011**, *71* (11), 3792-801.
555. Tarabozetti, G.; D'Ascenzo, S.; Giusti, I.; Marchetti, D.; Borsotti, P.; Millimaggi, D.; Giavazzi, R.; Pavan, A.; Dolo, V., Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* **2006**, *8* (2), 96-103.
556. Hao, S.; Ye, Z.; Li, F.; Meng, Q.; Qureshi, M.; Yang, J.; Xiang, J., Epigenetic transfer of metastatic activity by uptake of highly metastatic B16 melanoma cell-released exosomes. *Experimental oncology* **2006**, *28* (2), 126-31.
557. Jung, T.; Castellana, D.; Klingbeil, P.; Cuesta Hernandez, I.; Vitacolonna, M.; Orlicky, D. J.; Roffler, S. R.; Brodt, P.; Zoller, M., CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* **2009**, *11* (10), 1093-105.
558. Lima, L. G.; Chammas, R.; Monteiro, R. Q.; Moreira, M. E.; Barcinski, M. A., Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer letters* **2009**, *283* (2), 168-75.
559. Zhang, S.; Huang, W. C.; Zhang, L.; Zhang, C.; Lowery, F. J.; Ding, Z.; Guo, H.; Wang, H.; Huang, S.; Sahin, A. A.; Aldape, K. D.; Steeg, P. S.; Yu, D., SRC family kinases as novel therapeutic targets to treat breast cancer brain metastases. *Cancer research* **2013**, *73* (18), 5764-74.

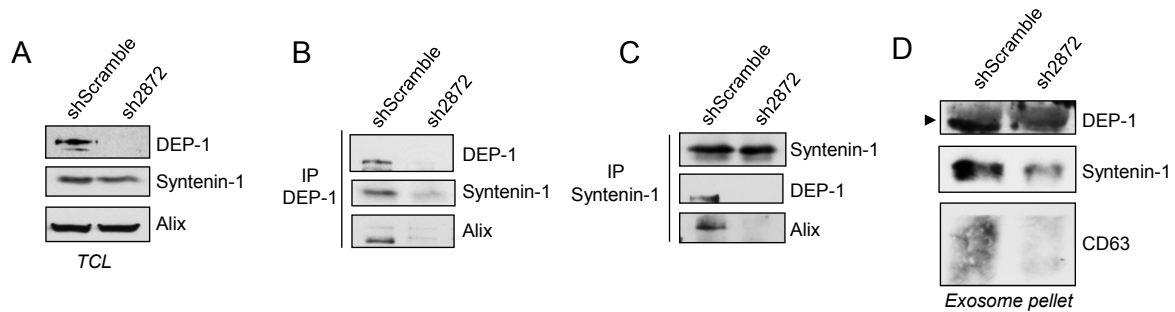
560. Choi, Y. L.; Bocanegra, M.; Kwon, M. J.; Shin, Y. K.; Nam, S. J.; Yang, J. H.; Kao, J.; Godwin, A. K.; Pollack, J. R., LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer research* **2010**, *70* (6), 2296-306.
561. Cowin, P.; Rowlands, T. M.; Hatsell, S. J., Cadherins and catenins in breast cancer. *Current opinion in cell biology* **2005**, *17* (5), 499-508.
562. Lin, C. Y.; Tsai, P. H.; Kandaswami, C. C.; Lee, P. P.; Huang, C. J.; Hwang, J. J.; Lee, M. T., Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition. *Cancer science* **2011**, *102* (4), 815-27.
563. Orlichenko, L. S.; Radisky, D. C., Matrix metalloproteinases stimulate epithelial-mesenchymal transition during tumor development. *Clinical & experimental metastasis* **2008**, *25* (6), 593-600.
564. Zhao, Y.; Li, X.; Sun, X.; Zhang, Y.; Ren, H., EMT phenotype is induced by increased Src kinase activity via Src-mediated caspase-8 phosphorylation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **2012**, *29* (3-4), 341-52.
565. Tsai, J. H.; Yang, J., Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & development* **2013**, *27* (20), 2192-206.
566. Saad, F.; Lipton, A., SRC kinase inhibition: targeting bone metastases and tumor growth in prostate and breast cancer. *Cancer treatment reviews* **2010**, *36* (2), 177-84.
567. Laird, A. D.; Li, G.; Moss, K. G.; Blake, R. A.; Broome, M. A.; Cherrington, J. M.; Mendel, D. B., Src family kinase activity is required for signal transducer and activator of transcription 3 and focal adhesion kinase phosphorylation and vascular endothelial growth factor signaling in vivo and for anchorage-dependent and -independent growth of human tumor cells. *Molecular cancer therapeutics* **2003**, *2* (5), 461-9.
568. Nautiyal, J.; Majumder, P.; Patel, B. B.; Lee, F. Y.; Majumdar, A. P., Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling. *Cancer letters* **2009**, *283* (2), 143-51.
569. Jain, R. K., Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **2005**, *307* (5706), 58-62.
570. Sylvest, L.; Bendiksen, C. D.; Houen, G., Phosphatase inhibitors with anti-angiogenic effect in vitro. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **2010**, *118* (1), 49-59.
571. Fizazi, K., The role of Src in prostate cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **2007**, *18* (11), 1765-73.
572. Cai, H.; Babic, I.; Wei, X.; Huang, J.; Witte, O. N., Invasive prostate carcinoma driven by c-Src and androgen receptor synergy. *Cancer research* **2011**, *71* (3), 862-72.
573. Cai, H.; Smith, D. A.; Memarzadeh, S.; Lowell, C. A.; Cooper, J. A.; Witte, O. N., Differential transformation capacity of Src family kinases during the initiation of prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108* (16), 6579-84.
574. Varkaris, A.; Katsiampoura, A. D.; Araujo, J. C.; Gallick, G. E.; Corn, P. G., Src signaling pathways in prostate cancer. *Cancer metastasis reviews* **2014**, *33* (2-3), 595-606.
575. Zheng, L.; Zhou, B.; Meng, X.; Zhu, W.; Zuo, A.; Wang, X.; Jiang, R.; Yu, S., A model of spontaneous mouse mammary tumor for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast cancer. *International journal of oncology* **2014**, *45* (6), 2241-9.

Annexe I : Taux de mutation, amplification et délétion de DEP-1 dans différents cancers.



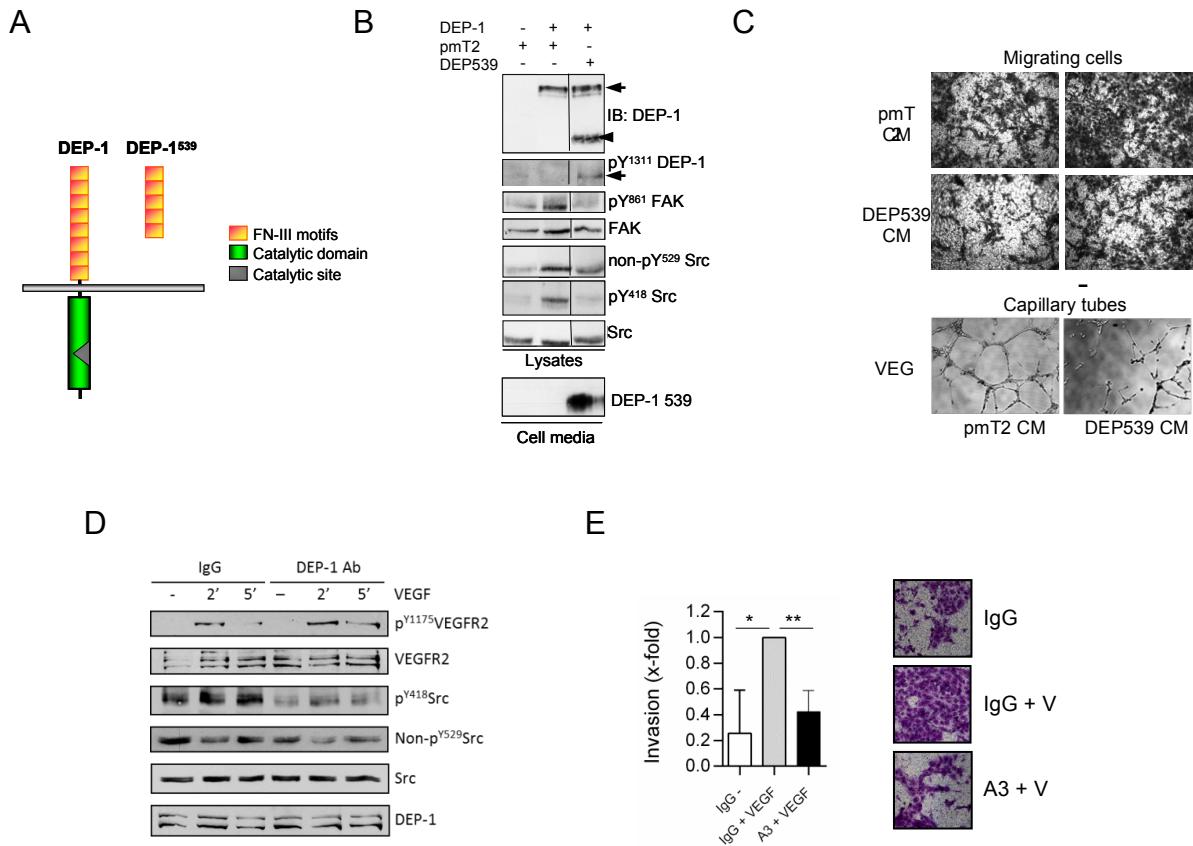
Taux de mutation, amplification et délétion de DEP-1 dans différents cancers. Graphique tire de la base de données Bioportal.

Annexe II : Rôle de DEP-1 dans la production d'exosomes de cellules tumorales mammaires



DEP-1 forme un complexe avec la syntenine-1 et Alix et régule leur association dans les exosomes. (A) Des populations de cellules MDA-MB-231 déplétées par un shRNA ciblant DEP-1 ou un shRNA contrôle expriment des niveaux de syntenine-1 et Alix équivalents. (B) DEP-1 s'associe à la syntenine-1 et à Alix dans les cellules MDA-MB-231. (C) L'association de la syntenine et d'Alix est perdue dans les cellules déplétées en DEP-1. (D) La présence de syntenine-1 et CD63 est diminuée dans les exosomes isolés de cellules MDA-MB-231 déplétées en DEP-1.

Annexe III : Effets de l'utilisation d'un segment extracellulaire et d'un anticorps ciblant DEP-1 sur la réponse angiogénique in vitro



DEP-1₅₃₉ ou un anticorps ciblant DEP-1 bloquent la signalisation et les réponses biologiques dépendantes de Src. (A) DEP-1₅₃₉ comprends les 539 premiers acides aminés de DEP-1 et représente un fragment du domaine extracellulaire. (B) La co-expression de DEP-1₅₃₉ (tête de flèche) et DEP-1 de type sauvage (flèche) dans les cellules HEK293T inhibe l'activation de Src dépendante de DEP-1 (déphosphorylation en Y529 et phosphorylation en Y418 réduites) et diminue la phosphorylation d'un substrat de Src, la kinase FAK (Y861). Puisque DEP-1 peut se déphosphoryler lui-même, une augmentation de la phosphorylation en Y1311 est consistant avec une baisse de son activité catalytique. L'expression de DEP-1₅₃₉ résulte en sa sécrétion abondante dans le milieu de culture. (C) Le milieu conditionné (CM)

contenant du DEP-1₅₃₉, mais pas celui provenant de cellule contrôle, inhibe la migration basale et en réponse au VEGF des cellules HUVECs en plus de limiter leur capacité à former des capillaires. (D) L'incubation de cellules HUVEC avec l'anticorps A3 inhibe la déphosphorylation de la tyrosine 529 de Src et la phosphorylation en Y418 résultante médiées par le VEGF, contrairement à une incubation avec un anticorps IgG contrôle. Par contre, la phosphorylation du VEGFR2 est augmentée ce qui est consistant avec une baisse de l'activité catalytique de DEP-1. (E) L'inhibition de Src par l'anticorps A3 bloque l'invasion cellulaire médiée par le VEGF. N=4. **p<0.01 ; ***p<0.001.

Ces travaux ont été réalisés conjointement par Kathleen Spring, Line Lapointe et Christine Caron.

