

Université de Montréal

La synthèse de prostacycline induite par le VEGF-A₁₆₅ requiert
l'hétérodimérisation des récepteurs du VEGF

par

Paul-Eduard Neagoe

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître *es* Sciences (M. Sc.)

en pharmacologie

Janvier 2005

© Paul-Eduard Neagoe, 2005



W

4

U58

2005

V.046

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

La synthèse de prostacycline induite par le VEGF-A₁₆₅ requiert
l'hétérodimérisation des récepteurs du VEGF

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

André de Léan, Ph.D.

Président-rapporteur

Martin G. Sirois, Ph.D.

Directeur de recherche

Artur Fernandes, M.D., Ph.D.

Évaluateur externe

RÉSUMÉ

Nous avons précédemment démontré que la synthèse endothéliale du facteur d'activation plaquettaire (PAF) par le *vascular endothelial growth factor* (VEGF-A₁₆₅) passe par l'activation du récepteur homodimérique VEGFR-2/R-2. Le VEGF-A₁₆₅ est aussi capable d'induire la synthèse de prostacycline (PGI₂), toutefois les récepteurs impliqués sont inconnus. Le VEGF-A₁₆₅ (agoniste des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1) et le VEGF-A₁₂₁ (agoniste des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2) (10⁻⁹ M) augmentent la synthèse de PGI₂ de 70 et 40 fois respectivement par rapport aux valeurs témoins dans les cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC). Cependant, aucun agoniste des récepteurs VEGFR-1 (VEGF-B et PlGF) ou VEGFR-2 (VEGF-C) n'a induit la synthèse de PGI₂. Un traitement des BAEC avec des antisens oligomères dirigés contre l'ARNm des récepteurs VEGFR-1 ou VEGFR-2 a diminué jusqu'à 79% la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅. De plus, un traitement avec l'inhibiteur de VEGFR-2 a inhibé de 95% l'effet du VEGF-A₁₆₅ sur la relâche de PGI₂. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'hétérodimérisation de VEGFR-1/R-2 est essentielle pour la production de PGI₂ et que la NRP-1 potentialise les effets du VEGF-A₁₆₅. Par la suite, nous avons démontré que l'activation des récepteurs VEGFR-2/R-2 et VEGFR-1/R-2 mène à la phosphorylation de la p42/44 MAPK et de la cPLA₂, qui est nécessaire à la relâche d'acide arachidonique (AA). De plus, la synthèse de PGI₂ passe par l'activation de la COX-1, qui convertit en cascade l'AA en PGG₂ et en PGH₂. La conversion de la PGH₂ en PGI₂ nécessite la dénitrosylation de la PGI₂ synthase qui est induite par le VEGF-A₁₆₅ contrairement au VEGF-C.

Mots clés : VEGF, PGI₂, BAEC, nitrosylation, antisens

ABSTRACT

We previously reported that vascular endothelial growth factor (VEGF-A₁₆₅) is mediating endothelial platelet-activating factor (PAF) synthesis upon activation of homodimeric receptors VEGFR-2/R-2. VEGF-A₁₆₅ is also capable of mediating prostacyclin (PGI₂) synthesis, but the VEGF receptors implicated are still unknown. VEGF-A₁₆₅ (VEGFR-1, VEGFR-2 and NRP-1 agonist) and VEGF-A₁₂₁ (VEGFR-1 and VEGFR-2 agonist) induced a 70- and 40-fold increase in PGI₂ production as compared to the basal level in bovine aortic endothelial cells (BAEC). However, the VEGFR-1 agonists (VEGF-B and PlGF) and VEGFR-2 agonist, VEGF-C, did not increase significantly the PGI₂ release. Treatment of BAEC with antisense oligonucleotides targeted against VEGFR-1 or VEGFR-2 mRNA decreased the release of PGI₂ induced by VEGF-A₁₆₅ up to 79%. Furthermore, treatment of EC with a specific VEGFR-2 inhibitor diminished by 95% the PGI₂ release induced by VEGF-A₁₆₅. Taken together, these results are suggesting that PGI₂ synthesis in EC requires VEGFR-1/R-2 heterodimerization and that NRP-1 coreceptor is potentiating VEGF-A₁₆₅-mediated PGI₂ release. In addition, we found that VEGFR-2/R-2 or VEGFR-1/R-2 activation lead to p42/44 MAPK and cPLA₂ phosphorylation and subsequent activation, which is required for arachidonic acid (AA) release. Furthermore, PGI₂ synthesis requires COX-1 activation, converting the AA in PGG₂ and the latter in PGH₂. The conversion of PGH₂ in PGI₂ requires the PGI₂ synthase denitrosylation, which is induced by VEGF-A₁₆₅ as opposed to VEGF-C.

Key words : VEGF, PGI₂, BAEC, nitrosylation, antisense

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
REMERCIEMENTS	ix
1.0 INTRODUCTION.....	1
1.1 BIOLOGIE DU SYSTÈME VASCULAIRE.....	1
1.1.1 L'endothélium et ses fonctions physiologiques	1
1.1.2 Les fonctions physiologiques de l'endothélium.....	2
1.1.3 Les fonctions pathologiques de l'endothélium.....	3
1.2 LE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF).....	4
1.2.1 Origines et fonctions générales du VEGF	4
1.2.2 Isoformes et analogues du VEGF.....	5
1.2.3 Généralités sur les récepteurs du VEGF.....	8
1.2.4 Le VEGFR-1, récepteur de clairance	10
1.2.5 Le VEGFR-2, médiateur principal des actions du VEGF-A.....	12
1.2.6 La neuropiline, corécepteur du VEGFR-2.....	13
1.2.7 Le VEGFR-3, un récepteur des vaisseaux lymphatiques.....	14
1.2.8 Dimérisation des récepteurs du VEGF	17
1.3 TONUS VASCULAIRE ET PROSTACYCLINE (PGI ₂).....	19
1.3.1 Principaux régulateurs du tonus vasculaire : NO et PGI ₂	19
1.3.2 Mécanismes de synthèse de la prostacycline	20
1.3.3 Rôles de la prostacycline et les inducteurs de sa synthèse.....	23

1.3.4	La nitrosylation : un phénomène nouveau et opposé à la phosphorylation	24
1.4.	Problématique et but de l'étude.....	25
2.0	ARTICLE	26
	SUMMARY	31
	INTRODUCTION.....	33
	METHODOLOGY	35
	RESULTS.....	40
	DISCUSSION	47
	REFERENCES.....	54
	FIGURE LEGENDS	59
	FIGURES	64
3.0	DISCUSSION	74
3.1	Les récepteurs du VEGF impliqués dans la synthèse de PGI ₂	75
3.2	L'hétérodimérisation des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 est nécessaire pour la synthèse de prostacycline.....	79
3.3	Voies de signalisation de la synthèse de PGI ₂ induite par le VEGF-A ₁₆₅ ...	80
3.4	Différences et similitudes entre la signalisation des récepteurs homodimères et hétérodimères du VEGF	82
4.0	CONCLUSION	85
5.0	RÉFÉRENCES.....	86

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les isoformes du VEGF.....	7
Figure 2: Les récepteurs du VEGF et leurs analogues respectifs.....	9
Figure 3: Voies de signalisation induites suite à l'activation des récepteurs du VEGF...16	
Figure 4: Voie de synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique.....	22

Article

Figure 1: PGI ₂ synthesis mediated by VEGF-A isoforms.....	64
Figure 2: NRP-1 coreceptor potentiates PGI ₂ synthesis induced by VEGF-A ₁₆₅	65
Figure 3: Effect of VEGFR-1 and VEGFR-2 agonists on PGI ₂ synthesis.....	66
Figure 4: Expression and regulation of VEGF receptors by corresponding agonists.....	67
Figure 5: Heterodimerization capacity of VEGFR-1 and VEGFR-2 subunits.....	68
Figure 6: Contribution of VEGF receptors on PGI ₂ synthesis induced by VEGF-A isoforms.....	69
Figure 7: Regulation of VEGF receptors phosphorylation by selective inhibitors.....	70
Figure 8: Cell signaling pathway by which VEGF-A ₁₆₅ promotes PGI ₂ synthesis.....	71
Figure 9: S-Nitrosylation of PGI ₂ synthase in presence of VEGF-A ₁₆₅ and VEGF-C.....	72
Figure 10: Proposed signaling pathway by which VEGF-A ₁₆₅ mediates PGI ₂ synthesis..	73

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	:	Acide arachidonique
bFGF	:	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BAEC	:	Cellules endothéliales d'aorte bovine
CE	:	Cellules endothéliales
CMLv	:	Cellules musculaires lisses vasculaires
COX	:	Cyclooxygénase
cPLA ₂	:	Phospholipase A ₂ cytosolique
eNOS	:	Synthase endothéliale du monoxyde d'azote
iPLA ₂	:	Phospholipase A ₂ indépendante du calcium
MAPK	:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MKK	:	<i>MAP kinase kinase</i>
NO	:	Monoxyde d'azote
NRP-1	:	Neuropiline-1
PAF	:	Facteur d'activation plaquettaire
PGI ₂	:	Prostacycline
PLA ₂	:	Phospholipase A ₂
PIGF	:	<i>Placental growth factor</i>
PLC	:	Phospholipase C
sPLA ₂	:	Phospholipase A ₂ sécrétée
VEGF	:	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	:	Récepteur du VEGF

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Martin G. Sirois, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir aidé à développer mon « assiduité scientifique » en me permettant d'effectuer un stage et la formation de maîtrise. Ses conseils, ses idées et son support financier m'ont grandement aidé dans ma démarche scientifique.

Je remercie le Département de pharmacologie et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leur support financier et la qualité des études offertes.

Je remercie mes collègues de travail pour leur soutien moral et scientifique, Judith Favier, Stéphanie Lapointe, Catherine Marchand, Katty Mallet, Pascal Bernatchez, Simon Rollin. Un merci spécial à Ricardo Maliba et Alexandre Brkovic, puisque avec eux, l'« atmosphère de travail » dans le laboratoire est « très décontractée ».

Je remercie Dr André de Léan, Dr Martin G. Sirois et Dr Artur Fernandes pour l'évaluation de mon mémoire de maîtrise.

Le plus important des merci est cependant adressé à mes parents, pour leur support financier, moral et leurs conseils qui se sont toujours avérés judicieux. Sans leur support, je n'aurais pu me rendre aussi loin.

1.0 INTRODUCTION

1.1 BIOLOGIE DU SYSTÈME VASCULAIRE

1.1.1 L'endothélium et ses fonctions physiologiques

L'endothélium, composé de cellules endothéliales (CE), tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins, constituant ainsi le seul point de contact avec le sang. Depuis sa découverte au milieu du XIX^e siècle, l'endothélium fait l'objet d'une attention particulière, puisque son rôle est davantage de maintenir une homéostasie au niveau de l'échange de nutriments que d'être seulement une barrière physique entre le sang et les tissus. Cette homéostasie se traduit par les multiples fonctions de l'endothélium. Tout d'abord l'endothélium vasculaire est une barrière de perméabilité sélective, lui permettant de filtrer les substances nocives pour l'organisme. Ensuite, c'est une barrière hémocompatible composée d'un tissu synthétique, métabolique et sécrétoire. L'endothélium joue aussi un grand rôle dans le maintien de l'équilibre des propriétés thrombogénique et anti-thrombogénique, conférant au sang sa viscosité optimale. Le tonus vasculaire est aussi un élément qui est finement régulé par les cellules endothéliales, qui peuvent moduler la vasoconstriction ou la vasodilatation en envoyant des messages appropriés aux cellules musculaires lisses. Les CE sont les premières à participer dans le processus d'angiogenèse, qui permet entre autres, la vascularisation des régions tissulaires lésées, favorisant ainsi la réparation tissulaire. Ces rôles combinés assurent un fonctionnement optimal du système vasculaire et contribuent ainsi à l'homéostasie.

1.1.2 Les fonctions physiologiques de l'endothélium

L'angiogenèse se définit comme le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, la distinguant de la vasculogenèse, qui est une formation de vaisseaux *de novo*, à partir des hémangioblastes [1]. Ce dernier processus, permet notamment la formation d'un plexus vasculaire primitif dans l'embryon, premier signe de développement du système cardiovasculaire [2, 3]. L'angiogenèse permet à ce plexus vasculaire de prendre de l'expansion et d'avoir une meilleure organisation avec, comme finalité, le système cardiovasculaire [4]. L'angiogenèse peut être tant un processus physiologique, que pathologique. Durant les changements cycliques de l'endomètre [5, 6], lors de la guérison d'une blessure profonde [7], ou en conditions ischémiques, nous sommes en présence de phénomènes physiologiques durant lesquels, l'angiogenèse joue un rôle positif.

Le premier facteur proangiogénique découvert fut le *basic Fibroblast Growth Factor* [8], qui jusqu'à aujourd'hui, est considéré comme le principal facteur angiogénique. Cependant, la découverte d'autres facteurs angiogéniques, tels le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) et les angiopoïétines, a permis de mieux comprendre le fonctionnement de l'angiogenèse. Toutefois, il a été démontré que le VEGF est le seul facteur proangiogénique ayant des activités proinflammatoires, cette dernière observation a suscité un engouement particulier, expliquant ainsi pourquoi le VEGF est l'un des facteurs de croissance les plus étudiés dans le système vasculaire.

1.1.3 Les fonctions pathologiques de l'endothélium

Les pathologies vasculaires et les tumeurs sont régulées par l'hypoxie, l'inflammation et l'angiogenèse. En effet, l'angiogenèse pathologique est souvent une réponse de l'organisme aux effets de l'hypoxie due à l'éloignement du site pathologique des vaisseaux sanguins existants. L'inflammation est un processus de défense contre une agression invasive des tissus. Elle se caractérise par un changement des propriétés de l'endothélium, qui devient plus perméable et entraîne éventuellement la formation d'œdème et de rougeur. Les néovaisseaux sanguins tumoraux sont caractérisés par leur désorganisation et leur nombreuses fenestrations. Ces conditions entraînent un état hypoxique dans certaines parties de la tumeur, qui, couplée à une surexpression des facteurs proangiogéniques, induit des nouveaux processus angiogéniques. De plus, la perméabilité vasculaire élevée, un indicateur de la réponse inflammatoire, est prédominante dans ces néovaisseaux tumoraux et entraîne, également à son tour, la relâche des facteurs de croissance tumoraux et vasculaires. Les pathologies vasculaires non tumorales, comme la plaque athérosclérotique ou l'arthrite rhumatoïde, sont aussi régulées par l'hypoxie et l'inflammation, mais possèdent des vaisseaux sanguins plus structurés et moins fenestrés. Le remodelage vasculaire fait partie du processus angiogénique induit par l'inflammation. En effet, lors de la réponse inflammatoire, les cellules du système immunitaire relâchent plusieurs facteurs angiogéniques, qui vont procéder à une réorganisation des vaisseaux sanguins existants et même en former de nouveaux. Ce phénomène, appelé le *switch* angiogénique, est difficilement détectable au niveau temporel, ce qui explique la difficulté de traiter ces pathologies [4].

1.2 LE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

1.2.1 Origines et fonctions générales du VEGF

Le VEGF a été découvert au début des années 80, comme une molécule de 34 à 42 kDa sous le nom de *Vascular Permeability Factor (VPF)*. Cette molécule était secrétée par des cellules tumorales et induisait la perméabilité microvasculaire chez les rats et les hamsters [9]. En 1989, Ferrara et coll. ont purifié une molécule par des techniques de combinaison d'affinité à l'héparine, chromatographie d'affinité à l'héparine-sépharose et HPLC. Ils ont trouvé que cette molécule possédait les mêmes propriétés et la même structure que le VPF, ses effets étant spécifiques aux cellules endothéliales, ils la nommèrent donc, le *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* [10]. Au cours des années, il a été possible de démontrer la capacité du VEGF à induire plusieurs activités biologiques, notamment dans la formation du plexus vasculaire à partir d'angioblastes, dans la vasculogénèse, et dans la formation du système vasculaire mature à partir du plexus vasculaire primaire, par l'entremise de l'angiogénèse [4]. En induisant un influx de calcium, le VEGF augmente aussi la conductivité hydraulique des vaisseaux sanguins [11]. Cette induction de la perméabilité vasculaire est nécessaire dans les premières étapes de l'angiogénèse [12]. Le VEGF est une molécule multifonctionnelle, capable de promouvoir la migration et la prolifération des CE ainsi que l'angiogénèse. Toutefois, le VEGF se distingue des autres facteurs de croissance tels le EGF et le bFGF par sa capacité d'induire l'inflammation [13, 14]. En effet, le VEGF est le seul facteur de croissance proangiogénique ayant une activité proinflammatoire, ce dernier effet étant médié par sa capacité d'induire la

synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF), qui augmente la perméabilité vasculaire et contribue ainsi à l'angiogenèse pathologique [15-17].

1.2.2 Isoformes et analogues du VEGF

Le gène du VEGF-A est finement régulé par épissage alternatif, ce qui lui permet d'être sécrété sous plusieurs isoformes comportant 121, 145, 165, 189, ou 206 acides aminés (120, 144, 164, 188 et 205 chez la souris) [18-20]. Le VEGF-A₁₆₅ est l'isoforme le plus abondamment retrouvé dans la circulation sanguine, pouvant induire tous les effets biologiques associés au VEGF, ce qui en fait l'isoforme le plus étudié jusqu'à présent. Les exons 6 et 7 du gène du VEGF confèrent des propriétés différentes concernant la sécrétion et la liaison membranaire du VEGF. En effet, l'isoforme 121 du VEGF ne possède pas ces exons, ce qui en fait l'isoforme le plus soluble dans la circulation libre, ne possédant aucune affinité envers la matrice extracellulaire (MEC) contenant de l'héparan sulfate [21]. L'isoforme 165 possède le transcrite de l'exon 7, lui conférant la possibilité de liaison à la neuropiline. Les isoformes 189 et 206, qui possèdent l'exon 6 et 7, se retrouvent complètement séquestrés au niveau de la matrice extracellulaire [20] et ne peuvent être relâchés que par clivage enzymatique [22, 23]. Les autres isoformes du VEGF possèdent des affinités variables envers la MEC, le résultat étant un équilibre entre la forme soluble et la forme liée [21]. Même s'il a été démontré que certains isoformes sont à eux seuls capables de développer un réseau vasculaire chez la souris [24, 25], l'organisation de ce réseau est fortement influencée par le type d'isoforme présent pendant son développement. Ainsi, l'organisation adéquate de ce réseau n'est accomplie que par la présence de tous ces isoformes [26]. Le VEGF-A a

plusieurs analogues : *Placental Growth Factor* (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Le PlGF a 53% d'homologie avec le VEGF-A₁₆₅ et présente aussi les mêmes sites de glycosylation que ce dernier [27] alors que le VEGF-B a 43% d'homologie avec le VEGF-A₁₆₅ et seulement 30% avec le PlGF, ne présentant pas de site de glycosylation [28]. Le VEGF-C est identique à seulement 30% avec le domaine d'homologie du VEGF-A₁₆₅, étant encodé seulement par les exons 3 et 4 du gène [29], alors que le VEGF-D présente 61% d'homologie avec le VEGF-C, mais seulement 11,8% d'homologie avec le VEGF-A₁₆₅ [30]. Finalement, le VEGF-E est un homologue du virus *Orf* qui présente de 17 à 27% d'homologie protéique avec le VEGF-A₁₆₅ [31].

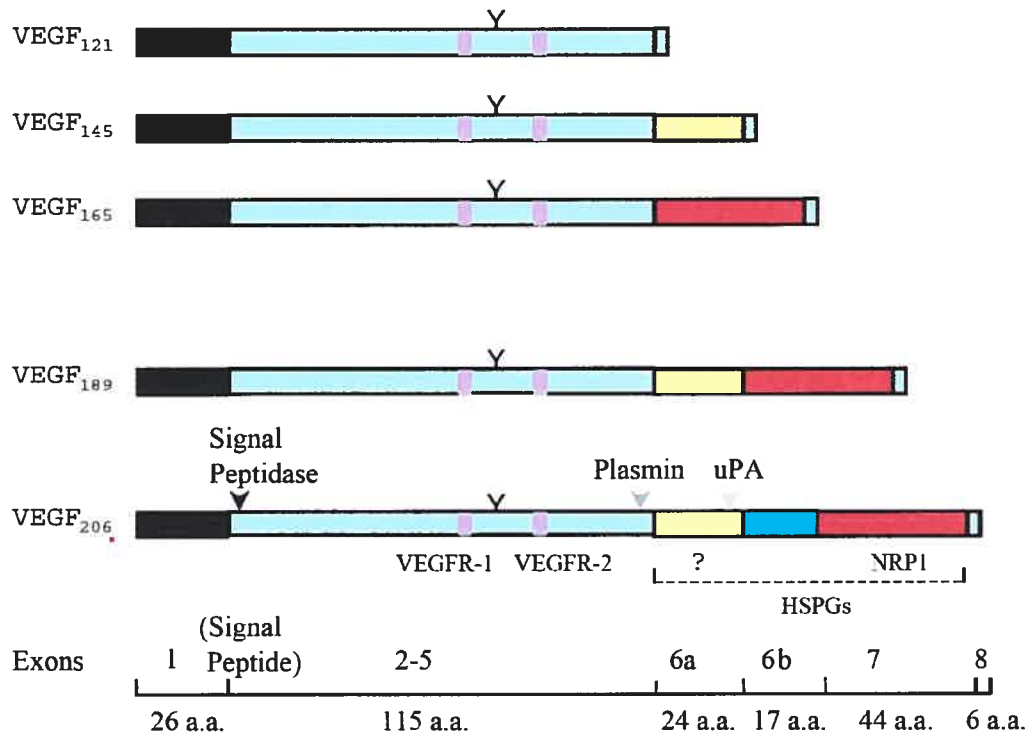


Figure 1 : Les isoformes du VEGF

Le gène du VEGF produit plusieurs isoformes par épissage alternatif. Le VEGF₂₀₆ est le seul à contenir la totalité des exons, et plus spécifiquement, les exons 6 et 7 en totalité, lui conférant ainsi une séquestration complète à la matrice extracellulaire. Le VEGF₁₆₅ possède l'exon 7, lui permettant ainsi de se lier à la neuropiline-1, tandis que le VEGF₁₂₁ manque les exons 6 et 7 étant incapable de lier le corécepteur NRP-1. (Stringer et coll. , *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*, Journal of Cell Science, 2001. 114 : 853-865)

1.2.3 Généralités sur les récepteurs du VEGF

Les analogues du VEGF peuvent lier trois récepteurs différents, soit le VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1 ou KDR) ou VEGFR-3 (Flt-4). Ces récepteurs sont de type tyrosine kinase et forment une sous-famille caractérisée par sept domaines extracellulaires ressemblant à l'immunoglobuline, une seule région transmembranaire et un double domaine tyrosine kinase (Figure 1). Les trois types de récepteurs ont été localisés à la surface des cellules endothéliales de vaisseaux sanguins [32], mais le VEGFR-3 est surtout localisé sur la surface des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques [33]. Ces récepteurs, sont présents sous forme de monomère à la surface cellulaire mais ils se dimérisent en présence du ligand. Les différents analogues du VEGF peuvent recruter des homodimères, ce qui signifie le recrutement de deux récepteurs semblables, mais il a aussi été démontré que certains ligands peuvent recruter des hétérodimères formés de VEGFR-1 et VEGFR-2 [34, 35], ou de VEGFR-2 et VEGFR-3 [36].

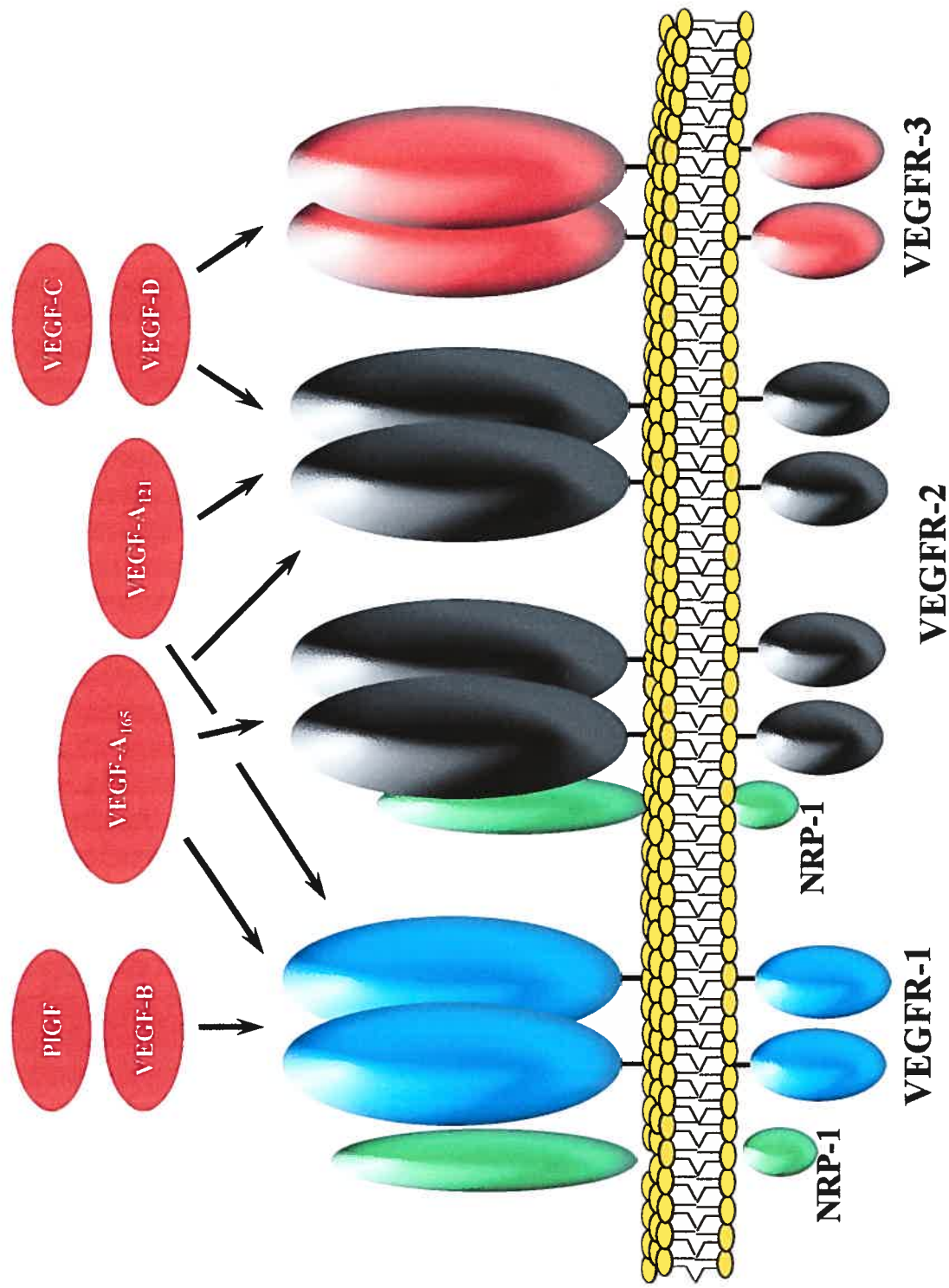


Figure 1 : Les récepteurs du VEGF et leurs analogues respectifs

Il existe trois récepteurs du VEGF, le VEGFR-1, VEGFR-2 et le VEGFR-3. Le co-récepteur neuropiline-1 (NRP-1) peut être associé au récepteur VEGFR-1 ou VEGFR-2. Le VEGF-A₁₆₅ peut lier des homodimères des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 ainsi que l'hétérodimère VEGFR-1/VEGFR-2 et le corécepteur NRP-1, tandis que son homologue, le VEGF-A₁₂₁, ne peut se lier au corécepteur NRP-1. Les analogues du VEGFR-1, le VEGF-B et le PlGF, peuvent lier seulement les homodimères du VEGFR-1, tandis que les analogues du VEGFR-2, le VEGF-C et le VEGF-D, effectuent la liaison avec les homodimères du VEGFR-2.

1.2.4 Le VEGFR-1, récepteur de clairance

Le VEGFR-1 (Flt-1) a été identifié et cloné en 1992 par le groupe de Williams [37]. Ce récepteur a un poids moléculaire de 180 kDa et peut lier avec haute affinité ($K_d = 10$ pM) le VEGF-A, VEGF-B et le PlGF. Cependant, c'est seulement en 1995, qu'il a été possible de déterminer par l'entremise d'une souris *knockout Flt-1^{-/-}*, que ce récepteur est essentiel à l'organisation de la vasculature embryonnaire, mais n'est pas nécessaire pour la différenciation des cellules endothéliales. Par ces faits, le *knockout* était létal pour l'embryon au jour 8.5 [38]. Cependant, le VEGFR-1 a été rapidement associé à un récepteur de clairance, puisque la mutation du domaine intracellulaire tyrosine kinase du récepteur n'entraîne aucune létalité ou changement morphologique chez les souris *in utero* aux jours 8.5 et 9.5 [39]. Cette hypothèse de récepteur de séquestration a été appuyée par la découverte d'une forme soluble du VEGFR-1, composée seulement du domaine extracellulaire du VEGFR-1, qui agirait comme un antagoniste naturel du VEGF [40]. Cependant, d'autres études ont permis de conférer des rôles importants à ce récepteur dans le développement embryonnaire, soit la régulation de la migration et l'adhésion des cellules endothéliales et l'organisation des vaisseaux sanguins [38, 41, 42].

Les études de l'activation de VEGFR-1 ont été effectuées soit sur des récepteurs transfectés dans des cellules n'exprimant pas à l'origine le VEGFR-1, soit dans des cellules primaires exprimant de façon native ce récepteur. Ces études ont permis de démontrer une faible augmentation de deux fois de l'activité tyrosine

kinase dans les cellules natives, lorsque stimulées avec le VEGF-A [43]. Il est possible que la faiblesse de l'activité tyrosine kinase native soit due en partie au manque de sites sur des séquences consensus de phosphorylation. Cependant, lorsque ces récepteurs sont surexprimés dans des cellules transfectées, l'activation du VEGFR-1 a permis d'identifier les sites d'autophosphorylation dans le domaine tyrosine kinase, soit la tyrosine 1169 (Y1169) et Y1213. Seule la Y1169 joue un rôle dans l'initiation de la cascade enzymatique de signalisation permettant l'activation de la PLC γ , un des transducteurs de signaux majeurs au noyau cellulaire [44]. Une autre étude a permis d'identifier les sites Y1213 et Y1242 comme sites majeurs d'autophosphorylation ainsi que deux autres sites mineurs, Y1327 et Y1333. Les sites Y1213 et Y1333 ont démontré une capacité de lier PLC γ alors que les domaines Grb2 et SH2 ont de l'affinité pour Y1213 [45]. Le domaine SH2, faisant partie de la phospholipase C γ (PLC γ), possède une activité enzymatique, alors que le domaine Grb2 est un domaine adaptateur, qui est un transducteur de signal en régulant les interactions protéine-protéine. Il a aussi été démontré que la sous-unité p85 de la PI3K peut se lier à la Y1213 et ainsi être activée [46]. Le VEGFR-1 peut donc transmettre des signaux anti-apoptotiques, donc favoriser la survie cellulaire en activant la PI3K. En activant le PLC γ , VEGFR-1 active par le fait même la PKC et la p42/44 MAPK. Les premières activités biologiques induites par l'activation du VEGFR-1 ont été l'induction de la migration de monocytes par un effet chemotactique [47] et la production du facteur de croissance du tissu conjonctif [48]. De plus, il a récemment été démontré dans notre laboratoire que le PlGF et le VEGF-B peuvent induire la translocation de la P-sélectine endothéliale et l'adhésion

des neutrophiles à l'endothélium, en activant le VEGFR-1 [49]. Par conséquent, il n'est donc pas clair dans quelles circonstances le VEGFR-1 agit comme un récepteur de clairance ou comme un récepteur tyrosine kinase, en activant la voie de signalisation de la PLC γ et subséquemment la PKC, connue pour jouer un rôle important dans l'angiogenèse [50, 51].

1.2.5 Le VEGFR-2, médiateur principal des actions du VEGF-A

Le VEGFR-2 fut découvert en 1992 et fut nommé KDR (Kinase Domain Region) [52]. Son poids moléculaire est de 200-230 kDa et son affinité pour le VEGF-A est moindre que celle du VEGFR-1, se situant entre 75 et 125 pM [53]. Le VEGFR-2 a plusieurs ligands faisant tous partie de la grande famille du VEGF. Ainsi, le VEGF-A, VEGF-E et les formes matures du VEGF-C et VEGF-D peuvent lier et activer le récepteur 2 du VEGF [54-57]. Ce récepteur est exprimé dans les cellules endothéliales du système sanguin et lymphatique [36]. Son rôle au niveau embryonnaire se situe surtout au niveau de la vasculogenèse, en stimulant la migration et la prolifération des cellules endothéliales, et subséquemment la maturation vasculaire [58, 59]. Le VEGFR-2 joue un rôle prédominant dans la médiation des processus physiologiques et pathologiques induits par le VEGF. Ainsi, suite à la phosphorylation du VEGFR-2 par son ligand, plusieurs tyrosines dans le domaine kinase intracellulaire ont été identifiées comme sites d'autophosphorylation menant à des cascades enzymatiques diverses. Ainsi, la Y1175 est responsable du recrutement et de l'activation de la PLC γ , menant à l'activation de la p42/44 MAPK [60], ainsi que le recrutement de la protéine adaptatrice Sck qui aide au couplage du VEGFR-2 avec la p42/44 MAPK [61],

menant à une augmentation de la synthèse d'ADN et subséquemment, de la prolifération cellulaire. L'autre tyrosine impliquée dans la signalisation de PLC γ est la Y951, qui active cette dernière par l'intermédiaire de VRAP (*VEGFR-associated protein*), qui participe aussi au recrutement de la PI3K [62]. Récemment, la Y1214 a été déterminée comme responsable de l'activation de la Cdc42, qui active ultérieurement la SAPK2 (*Stress-activated Protein Kinase*)/p38 MAPK, deux protéines essentielles au remodelage de l'actine dans les fibres de stress. Ces cascades enzymatiques mènent à l'activation de la MAPKAPK-2 (*MAPK activated protein kinase-2*) et Hsp27 (*Heat shock protein 27*), déclenchant ainsi un remodelage de l'actine et ainsi la motilité cellulaire [63]. Cette voie de signalisation mène à la polymérisation de l'actine et le rassemblement d'adhésions focales, convergeant vers la formation de fibres de stress et la contraction des cellules endothéliales qui est nécessaire pour induire la migration et la prolifération cellulaire. Deux autres tyrosines, la Y1054 et Y1059 participent à l'autophosphorylation suivant l'activation du récepteur, mais elles ne sont associées à aucune molécule adaptatrice [43]. Le VEGFR-2 peut donc moduler plusieurs activités biologiques comme la relâche de NO et de prostacycline via l'activation de c-Src [64] et de la PI3K [65], la translocation de la P-sélectine, l'adhésion des neutrophiles [49] et la synthèse de PAF [66].

1.2.6 La neuropiline, corécepteur du VEGFR-2

L'activité du VEGFR-2 peut être modulée par les protéoglycans semblables à l'héparine associés à la membrane cellulaire, qui peuvent agir comme corécepteurs et lier le VEGF-A, augmentant ainsi sa capacité de liaison au récepteur [67].

Cependant, le principal corécepteur du VEGFR-2 est la neuropiline (NRP). Il existe deux types de NRP, soit NRP-1 et NRP-2 [68], les deux pouvant être des récepteurs pour les sémaphorines, des molécules guidant les axones par l'effet de répulsion en liant la collapsine [69]. Dans leurs fonctions de corécepteurs pour le VEGFR-2, elles sont impliquées dans le développement vasculaire (NRP-1) et le développement lymphatique (NRP-2) [70, 71]. Le principal corécepteur est la NRP-1, que nous retrouvons exprimé sur les cellules endothéliales et tumorales. La NRP-1 a été classée comme un corécepteur dû à son manque d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire, lui conférant ainsi l'incapacité d'activer des voies de signalisation intracellulaires. Cependant, ce corécepteur aide à stabiliser la liaison entre le VEGF-A₁₆₅ et le VEGFR-2, ainsi, il augmente l'efficacité de transduction du signal [72]. Une seule étude a été capable de démontrer jusqu'à maintenant la capacité directe de la NRP-1 d'activer des voies de signalisation menant à la migration cellulaire [73].

1.2.7 Le VEGFR-3, un récepteur des vaisseaux lymphatiques

Le VEGFR-3 est un récepteur de 195 kDa retrouvé surtout dans les vaisseaux lymphatiques, il a une grande affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D [54, 57]. Il participe au remodelage vasculaire dans l'embryon, puisque son absence entraîne une accumulation de fluide et une défaillance cardiaque [74], ceci étant dû soit au manque du récepteur, soit au surplus de disponibilité du VEGF-C et VEGF-D pour le VEGFR-2 [75]. Ce récepteur participe activement au maintien et à la croissance des vaisseaux lymphatiques, la lymphangiogenèse, ce qui en fait une

cible de choix pour la suppression des métastases tumorales passant par les nodules lymphatiques [76-78].

Le VEGFR-3 est retrouvé principalement sur les cellules endothéliales vasculaires et capillaires, mais dans une proportion moindre que sur les CE lymphatiques [79]. La plupart des études sur les voies de signalisation induites par le VEGFR-3, ont été effectuées sur les vaisseaux lymphatiques. Ainsi, l'activation du VEGFR-3 dans les CE lymphatiques induit leur prolifération, migration et survie [80]. Le VEGF-C a été un des ligands les plus étudiés du VEGFR-3, possédant aussi la capacité de se lier et activer le VEGFR-2. En effet, le propeptide dimérique du VEGF-C passe par un processus de maturation peptidique, qui clive la molécule, la rendant ainsi apte à lier le VEGFR-2 et augmentant son affinité pour VEGFR-3 [56]. Les voies de signalisation induites par l'activation du VEGFR-3 dans les CE lymphatiques ressemblent à celles induites par l'activation du VEGFR-2 dans les CE des vaisseaux sanguins. Le VEGFR-3 active la voie de la PKC et subséquentement la p42/44 MAPK, ainsi que la voie de la PI3K avec l'activation subséquente de Akt/PKB, ces deux voies étant impliquées dans la transmission de signaux mitogéniques et anti-apoptotiques [80, 81].

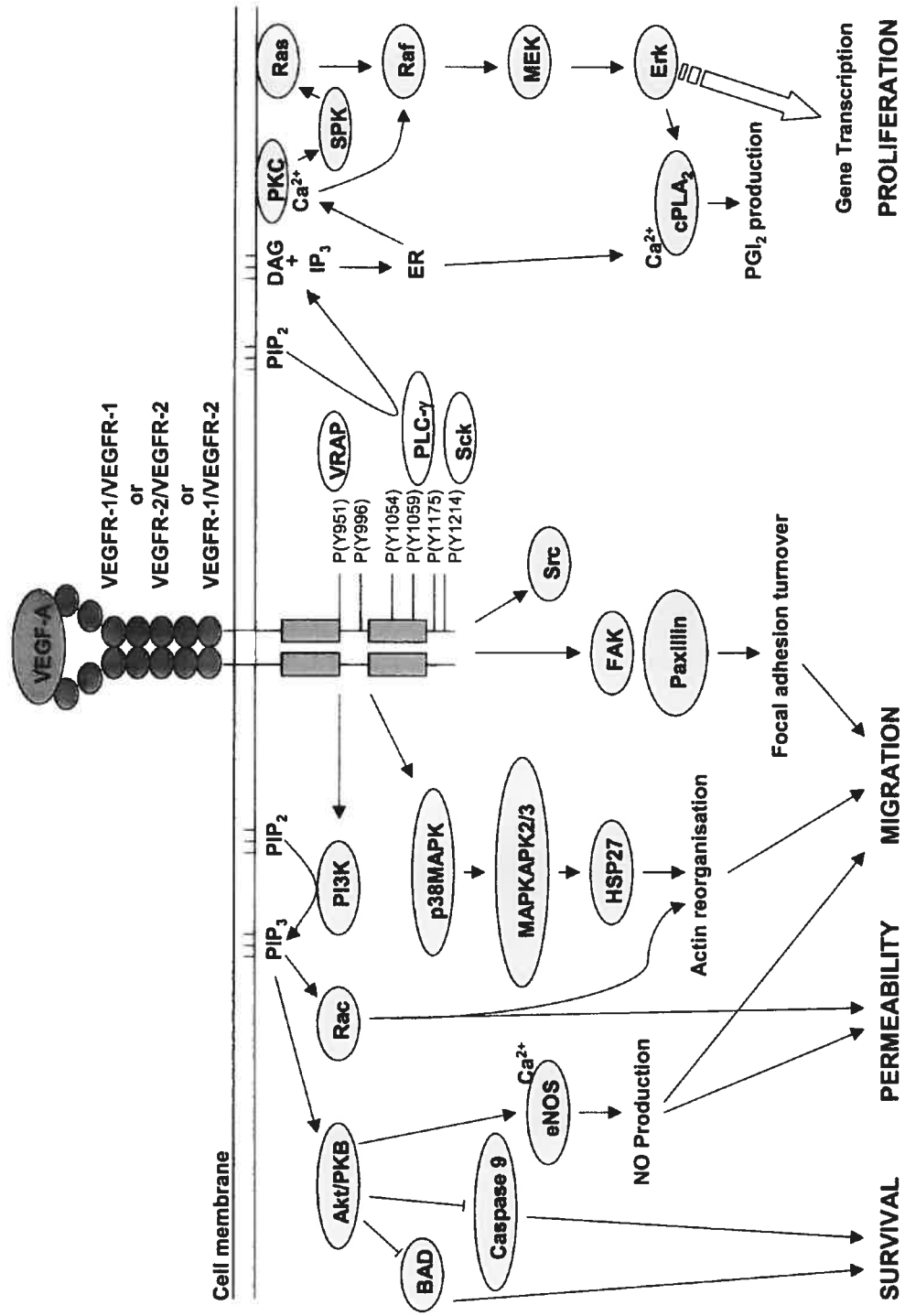


Figure 3 : Voies de signalisation induites suite à l'activation des récepteurs du VEGF
 Les récepteurs dimériques du VEGF, sont activés suite à la liaison d'un agoniste faisant partie des analogues du VEGF-A. Suite à l'activation des dimères, l'autophosphorylation des résidus spécifiques tyrosine kinase entraînent l'association avec les *VEGFR-associated protein* (VRAP), PLCγ et Sck, menant à l'activation de diverses voies de signalisation. Le dimère du VEGFR-2 a été principalement associé aux activités biologiques induites par le VEGF-A, notamment la survie, la migration, la perméabilité et la prolifération cellulaire. Cependant le VEGFR-1 peut aussi induire certaines activités biologiques mais à plus faible échelle. (Hoeben et coll. , *Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis*, Pharmacological Reviews, 2004. 56 : 549-580)

1.2.8 Dimérisation des récepteurs du VEGF

Même si l'activation du VEGFR-2 semble suffisante pour induire les voies de signalisation, et subséquemment les activités biologiques du VEGF-A₁₆₅, il demeure néanmoins que des études récentes suggèrent que le VEGFR-1 puisse réguler les activités biologiques du VEGFR-2. Premièrement, en transfectant des CE avec des récepteurs chimériques, contenant seulement les domaines transmembranaires et cytoplasmiques du VEGFR-1 et du VEGFR-2, une récente étude a démontré que le domaine cytoplasmique du VEGFR-1 peut avoir un rôle d'inhibition, contrecarrant l'augmentation de la croissance cellulaire induite par l'activation du VEGFR-2. Ainsi, en stimulant avec le ligand de la portion extracellulaire des chimères, seulement la transduction du signal engendrée par la portion cytoplasmique du récepteur a contribué à inhiber la migration cellulaire [82]. D'après cette étude les effets de l'activation du VEGFR-1 sur la croissance cellulaire sont donc à l'opposé de l'activation du VEGFR-2 dans les CE. Deuxièmement, l'hétérodimérisation de VEGFR-1 avec VEGFR-2 peut être induite en absence de ligand et elle augmente en présence d'homodimères de VEGF-A ou d'hétérodimères de VEGF-A/PlGF [83]. L'activation de VEGFR-1 induit un *cross-talk* intramoléculaire qui augmente l'efficacité de la cascade signalétique induite par le VEGFR-2, mais aucune preuve de transphosphorylation entre les récepteurs hétérodimériques du VEGF n'a été démontrée. Toutefois, l'activation des hétérodimères de VEGFR-1 et VEGFR-2 (VEGFR-1/R-2) induit une plus forte phosphorylation de la PLC γ et une plus grande migration des CE que celles induites

par les cellules exprimant uniquement le VEGFR-2, alors que les CE exprimant uniquement le VEGFR-1 n'ont démontré aucun effet [35].

1.3 TONUS VASCULAIRE ET PROSTACYCLINE (PGI₂)

1.3.1 Principaux régulateurs du tonus vasculaire : NO et PGI₂

Le tonus vasculaire est déterminé par l'état contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) de la paroi du vaisseau sanguin. Cet état est influencé par l'activité des substances vasoconstrictrices, qui augmentent la concentration calcique, ou vasodilatatrices, qui diminuent cette concentration de calcium. Parmi les substances vasoconstrictrices nous retrouvons la vasopressine, l'angiotensine II et l'endothéline, tandis que l'acétylcholine, la prostacycline et le NO sont des molécules vasodilatatrices. Le NO est relâché par les CE, lorsque les forces de cisaillement d'un tonus presseur augmentent. Le NO exerce son effet vasodilatateur de manière paracrine sur les CMLv par l'entremise de l'activation de la guanylate cyclase (GC) engendrant ainsi une augmentation de GMPc. Ce dernier permet la déphosphorylation de la chaîne légère de myosine, entraînant une relaxation des CMLv [84, 85].

La prostacycline est aussi relâchée par les cellules endothéliales en réponse à différents facteurs, agissant de façon paracrine. La PGI₂ se lie à son récepteur (IP), faisant partie de la famille des récepteurs couplés à des protéines G, situé sur la surface des CMLv. Son activation entraîne une augmentation de la production de l'AMPc et une diminution du calcium libre intracellulaire, provoquant ainsi la relaxation des CMLv [86, 87]. La prostacycline agit de façon intracrine, en induisant l'apoptose cellulaire via l'activation des récepteurs nucléaires de la famille des

PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*). Cependant les actions des prostaglandines sur les PPAR ne sont pas encore totalement élucidées [88].

1.3.2 Mécanismes de synthèse de la prostacycline

La prostacycline est dérivée de l'acide arachidonique (AA), un produit lipidique synthétisé à partir du clivage des glycérophospholipides membranaires par des phospholipases A₂. Les PLA₂ ont été classées en plusieurs groupes, soit les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) [89], les PLA₂ sécrétées (sPLA₂) [90] et les PLA₂ indépendantes du calcium (iPLA₂) [91]. Ces enzymes sont très spécifiques dans leur clivage membranaire, catalysant l'hydrolyse de la position *sn*-2 des phospholipides membranaires afin de relâcher l'AA. Ce dernier est ensuite converti en PGH₂ par des cyclooxygénases. Trois isoformes des COX ont été caractérisés jusqu'à présent, la forme constitutive, COX-1, la forme inductible, COX-2 et un troisième isoforme, la COX-3, qui est une variante provenant de l'épissage alternatif du gène de la COX-1. La COX-1 joue un rôle dans l'homéostasie vasculaire, l'isoforme COX-2 est induit par des stimuli inflammatoires, soit des endotoxines bactériennes ou des cytokines, comme le VEGF [92] et la COX-3, qui a été trouvée dans le cerveau canin, semble être impliquée dans la régulation de la douleur et de la fièvre [93-95]. La COX-1 est surtout employée par les CE dans la synthèse des prostaglandines à court terme, allant jusqu'à quelques minutes. Ses produits sont principalement la PGI₂ et la PGE₂, la dernière étant produite dans une moins grande quantité à court terme dans les CE [96]. Inversement, la COX-2 est impliquée dans la régulation du processus inflammatoire à long terme, et dépendamment du type cellulaire et des agonistes induisant sa synthèse et son activité, les produits finaux sont la PGI₂ ou la

PGE₂ [97, 98]. Appelées aussi PGH₂ synthases, les COX sont des enzymes à activité oxydoréductase. Elles catalysent l'oxydation de l'AA en PGG₂, pour ensuite le réduire sous la forme PGH₂, le précurseur de toutes les prostaglandines et thromboxanes [99]. Les différentes PG synthases et isomérases transforment le PGH₂ en prostaglandines primaires (PGI₂, PGD₂, PGE₂ et PGF_{2α}). La PGI₂ a un temps de demi-vie très court ($t_{1/2} = 2-3$ minutes), étant rapidement transformé en 6-keto PGF_{1α}, son métabolite plus stable ($t_{1/2} = 30$ minutes). La thromboxane A₂ est synthétisée par la thromboxane A synthase dans les plaquettes seulement et agit de manière contraire à la PGI₂ endothéliale en provoquant une vasoconstriction et favorisant l'agrégation plaquettaire [100]. Un débalancement de l'équilibre PGI₂/TxA₂ vers une surproduction de la TxA₂ peut avoir des conséquences néfastes sur la vasculature, pouvant déclencher des thromboses et des vasospasmes. [100, 101].

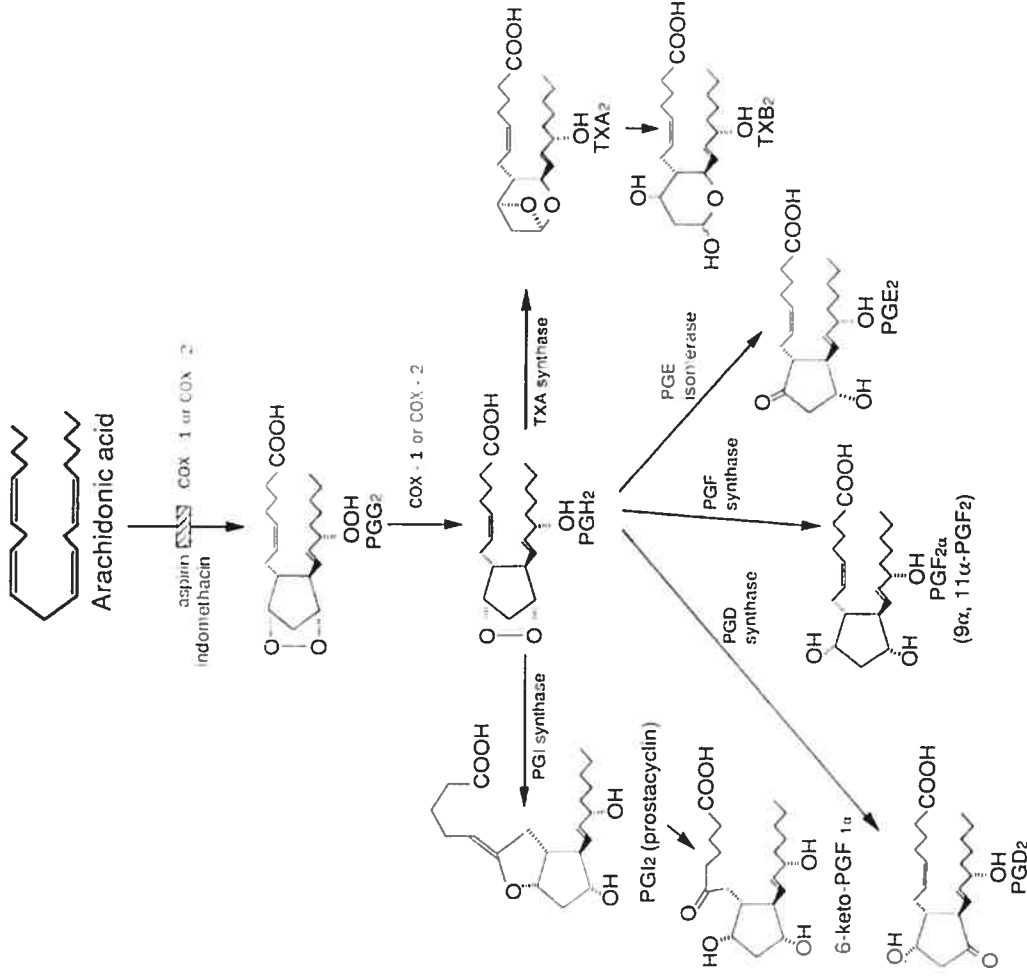


Figure 4 : Voie de synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique

La voie classique de synthèse des prostaglandines part de la libération de l'acide arachidonique (AA) par les phospholipases A₂ (PLA₂). La sPLA₂ et la cPLA₂ sont les principaux isoformes retrouvés dans les CE. La transformation de l'acide arachidonique (AA) en PGG₂ par l'action de la COX-1 ou COX-2. Ces deux enzymes catalysent ensuite la formation de la PGG₂, le précurseur des prostaglandines et des thromboxanes. La PGI₂ est synthétisée par la PGI₂ synthase à partir de la PGG₂, mais cette forme est instable et rapidement transformée dans son métabolite inactif, la 6-keto-PGF_{1 α} . La PGI₂ synthase est l'enzyme prédominante par rapport aux autres synthases dans les cellules endothéliales, ce qui signifie que la synthèse des autres prostaglandines est absente ou marginale (Vane et coll., *Cyclooxygenases 1 and 2*, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998, 38 : 97-120)

1.3.3 Rôles de la prostacycline et les inducteurs de sa synthèse

La PGI₂ est majoritairement produite et sécrétée par les cellules endothéliales [102], mais peut aussi être trouvée dans les cellules musculaires lisses [103] et les cardiomyocytes [104]. Sa durée de vie est très courte lorsque sécrétée, puisqu'elle est rapidement transformée en son métabolite stable, le 6-keto PGF_{1α}. Lorsque relâchée par les CE, la PGI₂ se lie sur son récepteur IP situé sur la surface des cellules musculaires lisses et, par l'entremise de l'AMPc, l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine est inhibée, ce qui permet la relaxation des CMLv, et son effet vasodilatateur [105]. La prostacycline est aussi un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, via leur récepteur IP, mais les voies de signalisation menant à cette inhibition ne sont pas encore claires [106]. La synthèse de PGI₂ dans les cellules endothéliales peut être induite par divers agonistes, tels la bradykinine, l'ADP, l'ATP, l'acide arachidonique exogène, l'acétylcholine, la vasopressine, l'angiotensine et le VEGF-A₁₆₅. Le VEGF-A₁₆₅ est donc un vasodilatateur indirect et ce rôle dans l'inflammation et l'angiogenèse s'ajoute à ceux mentionnés auparavant. La relâche de PGI₂ induite par le VEGF est induite, en partie via l'activation de la p42/44 MAPK et l'activation subséquente de la cPLA₂ [96]. Puisque l'activation des MAPK a été attribuée largement à la signalisation induite par le VEGFR-2, des études ont suggéré ce récepteur comme le seul responsable de la relâche de PGI₂ [64].

1.3.4 La nitrosylation : un phénomène nouveau et opposé à la phosphorylation

La phosphorylation et la nitrosylation sont deux mécanismes régulant les protéines dans la cellule. Le premier mécanisme nous a permis de comprendre les voies de signalisation cellulaire, alors que le deuxième a été moins exploré. Cependant, depuis quelques années, la découverte des mécanismes de régulation du NO a permis d'approfondir nos connaissances sur la nitrosylation, dont l'action a été spécifiquement étudiée sur deux enzymes impliquées dans la synthèse de facteurs vasodilatateurs, soit la eNOS et la PGI₂ synthase [107]. Ces études ont permis de distinguer la nitrosylation de la phosphorylation en deux points : (1) la nitrosylation est effectuée sur des résidus spécifiques de cystéine ou tyrosine alors que la phosphorylation est souvent retrouvée sur des résidus tyrosine, sérine ou thréonine et (2) la nitrosylation inhibe l'activité de ces deux enzymes, contrairement à l'effet le plus rencontré de la phosphorylation, l'activation protéique [108, 109]. La eNOS est une enzyme limitante dans la production de NO à partir de la L-arginine et donc, la production de NO en grande quantité amènerait une boucle de régulation négative, puisque le NO et ses dérivés oxydés participeraient à l'inactivation de la eNOS et ainsi diminuerait la production de NO. Dans le cas de la PGI₂ synthase, la nitrosylation est effectuée sur les résidus tyrosines, mais la raison de cette nitrosylation de l'enzyme limitante de la production de PGI₂ est encore inconnue.

1.4. Problématique et but de l'étude

Au cours des dernières années nous avons démontré que le VEGF-A₁₆₅ augmente la perméabilité vasculaire, la translocation de la P-sélectine endothéliale et l'adhésion des neutrophiles suite à la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF) [17, 49]. Nous avons déterminé que les homodimères du récepteur VEGFR-2 induisent un effet maximal de ces activités biologiques. De plus, il a été démontré que le VEGF-A₁₆₅ est capable d'induire la synthèse de PGI₂ dans les cellules endothéliales. Cependant, les récepteurs du VEGF et les voies de signalisation subséquentes participant à la synthèse de PGI₂ ne sont pas encore claires. Conséquemment, nous avons voulu investiguer le rôle des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1 dans la synthèse de PGI₂. Pour ce faire, le modèle des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) a été choisi pour plusieurs raisons : la présence des récepteurs du VEGF, la grande concentration de PGI₂ synthétisée et le modèle de cellules endothéliales artérielles. En utilisant des approches pharmacologiques, comme l'activation des récepteurs du VEGF par des agonistes spécifiques et l'utilisation d'inhibiteurs, nous avons voulu déterminer la contribution des récepteurs du VEGF dans la synthèse de PGI₂. Nous avons par la suite confirmé cette contribution par un traitement par antisens afin de bloquer la synthèse protéique. Nous avons aussi voulu étudier les différentes voies de signalisation menant à la synthèse de la PGI₂, ceci dans le but ultérieur de pouvoir déterminer la contribution de la PGI₂ dans les processus inflammatoires et angiogéniques induits par le VEGF-A₁₆₅. Nous avons utilisé des techniques d'immunobuvardage de type Western, ainsi que le dosage du métabolite stable de la PGI₂, la 6-ketp PGF_{1α} par ELISA.

2.0 ARTICLE

Identification des auteurs**1. Identification**

Paul-Eduard Neagoe
Département de pharmacologie, Faculté de médecine

2. Description de l'article

Titre : VEGF-A₁₆₅-induced prostacyclin synthesis requires the heterodimerization of VEGFR-1 and VEGFR-2

Liste des auteurs : Neagoe Paul-Eduard, Caroline Lemieux, Martin G. Sirois

Soumission à la revue : « Journal of Biological Chemistry », Octobre 2004

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Paul-Eduard Neagoe inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre La synthèse de prostacycline induite par le VEGF-A₁₆₅ requiert l'hétérodimerisation des récepteurs du VEGF

Caroline Lemieux
Coauteur

26/10/04
Date

Martin G. Sirois
Coauteur

26/10/04
Date



[REDACTED]
[REDACTED]
cc :
Objet : From the JBC re: Manuscript M4:12017

06/01/05 08:20

M4:12017

Dear Dr. Sirois:

Your manuscript entitled "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer" has been accepted for publication and is tentatively scheduled for an April issue. Your paper will first be published online on the day it was accepted as a JBC Papers in Press and can be seen at www.jbc.org. This date is considered the formal date of publication. All structures/coordinates referenced in an accepted manuscript must be deposited and the data released BEFORE final publication of the manuscript. If the data has not been released, please contact PDB for its immediate release.

Now that your manuscript has been accepted for publication, the redactory office at our printer, CADMUS Professional Communications, requires source files including a separate Word file for text and graphic TIFF or EPS files for the figures. Please go to this web site to upload your source files directly to the redactory office: <http://rapidsubmission.cadmus.com/jbc>. Publication of the print version of your manuscript will be delayed until we receive these materials. If you have any questions, please contact Cadmus at: [REDACTED] Thank you in advance for your quick response.

You will receive page proofs in approximately six weeks after submission of the source files; please return promptly to expedite publication. You will be billed after publication for page charges, reprints you order, half-tone, electron micrographs and authors' alterations as applicable. The current charge for half-tone figures is \$25.00 each plus \$120.00 if you order special paper. Color Figures, if any, will be charged at a rate of \$300.00 per Figure.

JBC publishes a colored illustration relevant to an article in the same issue. The cover illustration should be scientifically interesting and visually attractive and should NOT be a complex, data laden figure. The illustration submitted need not be a figure in the paper but should be closely related to the subject of the paper. To submit an illustration for consideration please send a high quality color PRINT (we cannot accept electronic figures). The print must be at least 7 inches wide by 6 inches tall to be considered. The figure can be larger but must be in the same proportion as 7 inches wide by 6 inches tall or it will not be considered.

Include also an explanatory caption of 50-60 words as well as the manuscript number. Send to: Elyse Pierson, Department of Biological Sciences, 371 Serra Mall, Stanford University, Stanford CA, 94305-5020 (650-725 4819).

Sincerely yours,

Richard W. Hanson
Associate Editor

RWH/yc

-

**Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A₁₆₅-
induced prostacyclin synthesis requires the
activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer**

Paul-Eduard Neagoe, Caroline Lemieux and Martin G. Sirois*

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

Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and this work was supported by grants from CIHR (MOP-43919), Heart and Stroke Foundation of Quebec and Birks Family Foundation to Dr. Sirois.

Running Title: VEGF-mediated PGI₂ synthesis

Key words: PGI₂, VEGF analogs, VEGF receptors, neuropilin-1, phospholipase A₂

*Correspondence should be addressed to:

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

SUMMARY

We previously reported that vascular endothelial growth factor (VEGF)-A₁₆₅ inflammatory effect is mediated by acute platelet-activating factor (PAF) synthesis from endothelial cells (ECs) upon the activation of VEGF receptor-2 (VEGFR-2) and its coreceptor, neuropilin-1 (NRP-1). In addition, VEGF-A₁₆₅ promotes the release of other endothelial mediators including nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂). However, it is unknown whether VEGF-A₁₆₅ is mediating PGI₂ synthesis through VEGF receptor-1 (VEGFR-1) and/or VEGF receptor-2 (VEGFR-2) activation, and whether the coreceptor neuropilin-1 (NRP-1) potentiates VEGF-A₁₆₅ activity.

In this study, PGI₂ synthesis in bovine aortic endothelial cells (BAEC) was assessed by quantifying its stable metabolite (6-keto-prostaglandin F_{1α}; 6-keto-PGF_{1α}) by ELISA. Treatment of BAEC with VEGF analogs, VEGF-A₁₆₅ (VEGFR-1, VEGFR-2 and NRP-1 agonist) and VEGF-A₁₂₁ (VEGFR-1 and VEGFR-2 agonist) (up to 10⁻⁹ M) increased PGI₂ synthesis by 70- and 40-fold, within 15 minutes. Treatment with VEGFR-1 (PlGF, and VEGF-B) or VEGFR-2 (VEGF-C) agonist did not increase PGI₂ synthesis. Combination of VEGFR-1 and VEGFR-2 agonists did not increase PGI₂ release. Pretreatment with a VEGFR-2 inhibitor, abrogated PGI₂ release mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁, and pretreatment of BAEC with antisense oligomers (AS) targeting VEGFR-1 or VEGFR-2 mRNA reduced PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ up to 79%. In summary, our data demonstrate that the activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 heterodimer (VEGFR-1/R-2) is essential for PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁,

which cannot be reproduced by parallel activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 homodimers with corresponding agonists. In addition, the binding of VEGF-A₁₆₅ to NRP-1 potentiates its capacity to promote PGI₂ synthesis.

INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) is known as an inflammatory cytokine participating in the wound healing, tissue regeneration and physiological angiogenesis, but also for its capacity to promote pathological angiogenesis in tumor growth, atherosclerosis and proliferative retinopathies (1,2). There are five different VEGF-A isoforms, of 206, 189, 165, 145 and 121 amino acids and also several VEGF analogs : placental growth factor (PlGF-1 and -2), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, and a viral homolog, VEGF-E (2). The actions of VEGF family members are mediated by the activation of selective tyrosine kinase receptors including VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR), which are almost exclusively expressed on endothelial cells (ECs), and VEGFR-3 (Flt-4), which is mainly limited to the lymphatic endothelium (2). VEGF-A binds to VEGFR-1 and VEGFR-2; PlGF-1, PlGF-2 and VEGF-B bind to VEGFR-1; VEGF-C and D bind to VEGFR-2 and R-3; whereas VEGF-E interacts only with VEGFR-2 (2,3). Recent studies also reported that neuropilin-1 (NRP-1), a transmembrane receptor, acts as a coreceptor by enhancing the binding of VEGF-A₁₆₅ to VEGFR-2 and potentiates various VEGF-A₁₆₅ biological activities (3-6). Such selectivity is attributable to the presence of VEGF-A exon 7 in VEGF-A₁₆₅, a domain that is lacking in VEGF-A₁₂₁, VEGF-C , VEGF-D and PlGF-1 (4,7).

Stimulation of ECs with VEGF-A₁₆₅ can promote prostacyclin (PGI₂) synthesis which is a potent vasodilator and an inhibitor of platelet aggregation (8-10). Consequently, imbalance in PGI₂ production can be involved in the pathophysiology

of many thrombotic and cardiovascular disorders. The induction of PGI₂ can be mediated upon the activation of different phospholipase A₂ enzymes that catalyse the cleavage of arachidonic acid (AA) from membrane glycerophospholipids. Subsequently, AA is converted in PGH₂ by the action of two cyclooxygenase (COX) isoforms, either the constitutive form, COX-1, or the inducible form, COX-2. The newly formed PGH₂ is then transformed into PGI₂ by the action of the PGI₂ synthase (11-14). However, it is unknown whether the members of the VEGF superfamily are mediating PGI₂ synthesis either through VEGFR-1 and/or VEGFR-2 activation, and if NRP-1 is contributing to potentiate VEGF-A₁₆₅-mediated PGI₂ synthesis.

During last years we have shown that VEGF-A₁₆₅ increases vascular permeability, endothelial P-selectin translocation and neutrophil adhesion upon the synthesis of platelet-activating factor (PAF) by ECs (5,15). We subsequently investigated the contribution of VEGF receptors and assessed that all these biological activities are mediated through the activation of VEGFR-2, and that these effects are potentiated by the presence of NRP-1 (4,5,16). Consequently, by using VEGF analogs and by regulating VEGF receptor activity either with selective inhibitors or by antisense treatment, we investigated the contribution of VEGF members and their corresponding receptors on their capacity to promote endothelial PGI₂ synthesis.

METHODOLOGY

Cell Culture

Endothelial cells were harvested from bovine aortas (BAEC), cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Life Technologies, Inc., Burlington, ON, Canada) containing 5% fetal bovine serum (FBS; Medicorp, Inc., Montreal, QC, Canada) and antibiotics (Sigma, St-Louis, MO), BAEC were characterized as described previously (16) and used between passages 3 to 5.

Endothelial PGI₂ Synthesis

BAEC were seeded in 6-well plates and cultured up to 3 days post-confluence. Culture medium was removed and cells were rinsed with HBSS (Hank's balanced salt solution) / HEPES (10 mM; pH 7.4) (Sigma). Cells were stimulated in HBSS/HEPES plus CaCl₂ (5 mM) with phosphate buffered saline (PBS) solution or VEGF analogs, VEGF-A₁₆₅ (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ), VEGF-A₁₂₁, PlGF, VEGF-B, VEGF-C (R & D Systems, Minneapolis, MN) at various concentrations (10⁻¹¹ - 10⁻⁸ M) and up to 30 minutes. In another set of experiments, BAEC were pretreated with selective inhibitors of: VEGFR-1 and VEGFR-2 (VTK), VEGFR-2 (SU1498) p38 MAPK (SB203580), MEK (PD98059), cytosolic phospholipase A₂; cPLA₂ (AACOCF₃), secreted phospholipase A₂; sPLA₂ (scalaradial) (Calbiochem, La Jolla, CA), cyclooxygenase-1 and -2; COX-1 and -2 (indomethacin) or PGI₂ synthase (tranylcypramine) (Sigma) 15 minutes prior to stimulation with VEGF-A isoforms. Upon stimulation, the supernatant was collected and PGI₂ synthesis was

assessed by quantifying its stable metabolite (6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$) accordingly to manufacturer's instructions (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI).

Antisense Oligonucleotide Therapy

We also used an antisense oligonucleotide therapy approach to discriminate the contribution of VEGFR-1 and VEGFR-2 on PGI_2 synthesis mediated by VEGF-A isoforms. BAEC were treated with antisense oligonucleotide sequences complementary to bovine VEGFR-1 or VEGFR-2 mRNA (GenBank Accession Numbers X94263 and 94298). Antisense oligonucleotide phosphorothioate backbone sequences targeting bovine VEGFR-1 mRNA (AS-R1: 5'-CAA AGA TGG ACT CGG GAG-3'), and VEGFR-2 mRNA (AS-R2: 5'-GCT GCT CTG ATT GTT GGG-3'), or a scrambled phosphorothioate sequence (AS-Scr: 5'-TGC TGG CAT GTG CGT TGT-3') (AlphaDNA, Montreal, QC, Canada) were used. The antisense oligomers were chosen based on their capacity to selectively abrogate the protein expression of the genes targeted as previously described (16). Briefly, BAEC were seeded at 5×10^5 cells/well in 6-well plates, in DMEM, 5% FBS, and antibiotics with or without oligomers (5×10^{-7} M/daily) up to 3 days post-confluence. Culture medium was removed, cells were rinsed, stimulated in HBSS/HEPES + CaCl_2 (5 mM) with PBS or VEGF-A isoforms, and PGI_2 synthesis quantified as described above.

Preparation of GST-VEGF-A₁₆₅ Exon 7 Fusion Protein

In order to evaluate the possible potentiating effect of NRP-1 on VEGF-A₁₆₅-induced PGI₂ synthesis, we produced a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein encoding exon 7 of human VEGF-A₁₆₅ (GST-Ex7) (The construct of GST fusion protein-Exon 7 was generously provided by Dr. Shay Soker, Wake Forest University, Winston-Salem, NC). *Escherichia coli* (DH5 α) were transformed with pGEX-2TK or p2TK-exon 7 vectors to produce GST and GST-Exon 7 proteins. The recombinant proteins were purified from bacterial lysates using glutathione and heparin affinity chromatographies, as described previously (5,6).

Western Blot Analyses of VEGF Receptors Expression and Phosphorylation

BAEC were cultured up to 3 days postconfluence, cells were rinsed, incubated on ice, and stimulated in HBSS/HEPES + CaCl₂ (5 mM) plus 1 mg/ml bovine serum albumin. In some experiments, BAEC were pretreated with PBS or VEGF receptor inhibitors (SU1498 or VTK) 15 minutes prior to the addition of VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁, the cells were kept on ice for an additional 15 minutes. Then, cells were stimulated for 7.5 minutes at 37°C, and brought back on ice. In another set of experiments, BAEC were stimulated as above with VEGF analogs only. Upon stimulation, the media was removed, cells were washed, and lysates prepared. Western blot analyses were performed as described previously (4,5,16). Primary antibodies used were mouse monoclonal anti-human VEGFR-1 (clone Flt-11; Sigma), polyclonal rabbit anti-mouse VEGFR-2 and goat anti-human NRP-1 IgG antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA). Membranes were

stripped using Re-Blot Plus Strong stripping solution (Chemicon International, Temecula, CA) for 20 minutes, and reprobbed with a mouse monoclonal anti-phosphotyrosine IgG (clone 4G10; 1:4000 dilution; Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, NY) to determine VEGFR-1 and VEGFR-2 phosphorylation. Kaleidoscope molecular weight markers (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) were used as molecular mass standards for SDS-PAGE immunoblotting experiments. Immunoreactive bands for were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL), digitized using a 2-dimensional gel scanner and quantified using Quantity One software (Bio Rad).

In another set of experiments we assessed by Western blot analyses the expression and activation of selective enzymes involved in the cell signaling pathway leading to PGI₂ synthesis. Studies were performed as described above. Primary antibodies used for immunoprecipitations and Western blot analyses were the followings: rabbit polyclonal anti-human phospho-p42/44 MAPK and anti-human phospho-cPLA₂ (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA), mouse monoclonal anti-ovine COX-1 and mouse monoclonal anti-human COX-2 (Cayman Chemicals) IgGs. Then the membranes were stripped and reprobbed with rabbit anti-rat p42/44 MAPK (Cell Signaling), mouse monoclonal anti-human cPLA₂ (Santa Cruz).à

Western Blot Analysis of PGI₂ Synthase S-nitrosylation, Cyclooxygenase-1 and -2

BAEC were cultured up to 3 days postconfluence and treated prior to stimulation as described above. Cells were incubated on ice for 30 minutes with either VEGF-A₁₆₅

or VEGF-C (10^{-9} M), then stimulated for 5 to 15 minutes at 37°C, and brought back on ice. Upon stimulation, the media was removed, cells washed, and lysates prepared. Immunoprecipitation of cell lysate was performed with a rabbit polyclonal anti-bovine PGI₂ synthase IgG (Cayman Chemicals). Samples were separated on a 10% SDS-PAGE, and Western blot analyses performed as described previously (4,5,16). A mouse monoclonal anti-nitrotyrosine IgG (Cayman Chemicals) was used to assess S-nitrosylation level of PGI₂ synthase. Then, membranes were stripped and reprobed with rabbit polyclonal anti-bovine PGI₂ synthase IgG as described above.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm s.e. mean. Statistical comparisons were made by analysis of variance, followed by a Bonferroni's *t*-test for multiple comparisons. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of VEGF Analogs and Corresponding Receptors on Prostacyclin Synthesis

Prostacyclin (PGI₂) synthesis in postconfluent BAEC was quantified by measuring its stable metabolite 6-keto PGF_{1α} by ELISA. First, we performed a time- (5 to 30 minutes) and concentration- (10⁻¹¹ - 10⁻⁸ M) dependent assay to assess how VEGF-A₁₆₅ mediates PGI₂ synthesis. In control PBS-treated cells, the production of 6-keto PGF_{1α} did not change in function of time, at 15 minutes post-treatment the concentration of 6-keto PGF_{1α} was 0.657 ± 0.056 ng/10⁶ cells. Treatment with VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) induced a rapid and transient PGI₂ synthesis, within 5 minutes, we observed a 48-fold increase, which reached a plateau within 10 minutes (70-fold increase). In addition, VEGF-A₁₆₅ (10⁻¹¹ - 10⁻⁹ M) increased PGI₂ synthesis by 5-, 30- and 70-fold, respectively. Interestingly, at the highest concentration (10⁻⁸ M), VEGF-A₁₆₅ was less efficient (33-fold increase) to mediate PGI₂ synthesis (Figure 1A and B).

To determine which VEGF receptors are involved in PGI₂ synthesis, we used selective VEGF analogs. Treatment with VEGF-A₁₂₁ isoform (10⁻¹¹ - 10⁻⁸ M), which like VEGF-A₁₆₅ binds to VEGFR-1 and VEGFR-2 but not to NRP-1 coreceptor induced as well a significant but reduced PGI₂ synthesis (40-fold increase; at 10⁻⁹ M) as compared to VEGF-A₁₆₅ (Figure 1C). These latter data suggest that NRP-1 coreceptor might contribute to potentiate VEGF-A₁₆₅ capacity to promote PGI₂ synthesis. To support this hypothesis, we treated BAEC with PBS, VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ and confirmed by Western blot analysis the capacity of VEGF-A₁₆₅ as

opposed to VEGF-A₁₂₁ or PBS-treated cells to promote VEGFR-2/NRP-1 complex formation (Figure 2A). Then, BAEC were pretreated with a GST fusion protein containing exon 7 of human VEGF-A₁₆₅ (GST-Ex7) to block the interaction of VEGF-A₁₆₅ with NRP-1. Exon 7 encodes a domain not present in VEGF-A₁₂₁ that is responsible for the binding of VEGF-A₁₆₅ to NRP-1(3,5). Pretreatment of BAEC with GST-Exon7 (up to 10⁻⁷ M) 15 minutes prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) reduced PGI₂ synthesis to the level induced by VEGF-A₁₂₁ (Figure 2B). Pretreatment with GST (up to 10⁻⁷ M), without the exon 7 insert, did not alter VEGF-A₁₆₅-induced PGI₂ synthesis and neither GST-Ex7 nor GST (up to 10⁻⁷ M) altered significantly the basal level of PGI₂ synthesis or VEGF-A₁₂₁-induced PGI₂ synthesis (Figure 2B).

Since VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ are both capable to activate VEGFR-1 and VEGFR-2, we then treated BAEC with selective analogs for VEGFR-1 (PlGF and VEGF-B) and VEGFR-2 (VEGF-C) to verify the contribution of each receptor under their homodimeric conformations on PGI₂ synthesis. Treatment with PlGF, VEGF-B or VEGF-C (10⁻¹¹ - 10⁻⁸ M) for 15 minutes did not promote the release of PGI₂ (Figure 3A-C). In order to assess if a parallel activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 homodimers may induce PGI₂ release, BAEC were treated with the combination of VEGFR-1 analogs (PlGF or VEGF-B) with VEGFR-2 analog (VEGF-C) at 10⁻⁹ M and for 15 minutes. Such combination did not increase PGI₂ synthesis (Figure 3D).

Phosphorylation of VEGF Receptors by Corresponding VEGF Analogs

Since VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ were the only VEGF analogs capable to mediate endothelial PGI₂ synthesis, we performed Western blot analyses to confirm the expression of VEGFR-1 and VEGFR-2, and the capacity of VEGF analogs to activate them. BAEC were treated for 7.5 minutes with VEGF analogs which is the suitable time to detect the phosphorylation of VEGF receptors as previously described (16). Cell lysates were immunoprecipitated either with anti-VEGFR-1 or anti-VEGFR-2 IgGs. VEGFR-1 and VEGFR-2 protein expression in BAEC was detected by immunoblotting, which is in agreement with previous reports (Figure 4A and B; upper bands) (17). The membranes were stripped and the detection of VEGFR-1 and VEGFR-2 phosphorylation was performed by reprobating the membranes with anti-phosphotyrosine IgG. Treatment with VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ (10^{-9} M) increased the phosphorylation of VEGFR-1 by 10.6- and 7.3-fold as compared to PBS-treated cells, whereas equivalent treatment with PlGF or VEGF-B did not increase VEGFR-1 phosphorylation (Figure 4A; lower panel). Although, we could not detect the phosphorylation of VEGFR-1-mediated by PlGF or VEGF-B, they were nevertheless not deprived of biological activities since they were capable to promote endothelial P-selectin translocation (data not shown, and as previously described) (5). Secondly, we assessed the capacity of VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁ and VEGF-C (10^{-9} M) to mediate VEGFR-2 phosphorylation. Such treatment increased by 57.8-, 24.7- and 5.8-fold the phosphorylation of VEGFR-2 as compared to PBS-treated cells (Figure 4B; lower panel).

PGI₂ Synthesis Requires VEGFR-1 and VEGFR-2 Heterodimerization

Our data demonstrate that the activation of VEGFR-1 or VEGFR-2 homodimers alone or in parallel with selective VEGFR-1 or VEGFR-2 analogs did not promote PGI₂ synthesis. Consequently, we speculated that VEGF-A isoforms induce PGI₂ synthesis through the activation of VEGFR-1/R-2 heterodimer. By Western blot analysis, we observed in PBS-treated cells that VEGFR-1 and VEGFR-2 subunits can constitutively be present under heterodimeric (VEGFR-1/R-2) state, and that a treatment either with VEGF-A₁₆₅ or VEGF-C did not modulate VEGFR-1/R-2 dimerization (Figure 5). Secondly, in order to demonstrate that PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ is driven through the activation of VEGFR-1/R-2 heterodimer, BAEC were treated with selective antisense oligomers targeting VEGFR-1 or VEGFR-2 mRNA. We showed previously that such approach at the concentration used (5×10^{-7} M / daily) abrogated selectively by over 90% the protein expression of VEGFR-1 or VEGFR-2 and the biological activities investigated by 80 to 100% (16). Treatment with selective antisense oligomers targeting VEGFR-1 (AS-R1) or VEGFR-2 (AS-R2) mRNA reduced by 79 and 71% the synthesis of PGI₂ mediated by VEGF-A₁₆₅, and by 73 and 62% the synthesis of PGI₂ mediated by VEGF-A₁₂₁ respectively (Figure 6A). As negative control, BAEC were treated with a scrambled oligomer sequence, which did not decrease significantly the level of PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁. In addition, treatment of BAEC with antisense or scrambled oligomers did not affect the basal level of PGI₂ synthesis in PBS-treated cells (Figure 6A).

To support the latter study, we used as well a pharmacological approach. Pretreatment of ECs with a selective VEGFR-1 and VEGFR-2 inhibitor (VTK; 10^{-5} M; $IC_{50} = 2.0$ and 0.1×10^{-6} M respectively) (18), abrogated by 100 and 90% the synthesis of PGI_2 mediated by VEGF- A_{165} and VEGF- A_{121} respectively. Similarly, the blockade of VEGFR-2 activity with SU1498 (selective VEGFR-2 inhibitor; 5×10^{-6} M; $IC_{50} = 7 \times 10^{-7}$ M) (5,19) was sufficient as well to abrogate by 96 and 95% the synthesis of PGI_2 mediated by VEGF- A_{165} and VEGF- A_{121} , respectively (Figure 6B).

In order to verify the selectivity of VEGF receptor inhibitors, we assessed their corresponding inhibitory effect on VEGFR-1 and VEGFR-2 phosphorylation mediated by VEGF- A_{165} . Pretreatment of BAEC with SU1498 (5×10^{-6} M), 15 minutes prior to stimulation with VEGF- A_{165} (10^{-9} M; 7.5 minutes) did not affect the phosphorylation of VEGFR-1 but prevented the phosphorylation of VEGFR-2. Pretreatment with VTK prevented by 100 and 83%, the phosphorylation of VEGFR-1 and VEGFR-2 mediated by VEGF- A_{165} (Figure 7).

Cell Signaling Pathways by Which VEGF- A_{165} Induces PGI_2 Synthesis

In previous studies we have shown that VEGF- A_{165} induces PAF synthesis upon the activation of VEGFR-2/R-2/NRP-1 complex, and requires the activation of both p38 and p42/44 MAPKs, and subsequent activation of secreted phospholipase A_2 type V (sPLA $_2$ -V) (20,21). Since VEGF- A_{165} induces PGI_2 synthesis upon VEGFR-1/R-2 activation, which is also potentiated by NRP-1 coexpression, we wanted to assess

the similarities in the cell signaling pathways involved in PAF and PGI₂ synthesis. Pretreatment of BAEC with p38 MAPK inhibitor (SB203580; 10⁻⁵ M; IC₅₀ = 6 x 10⁻⁷ M) (22) did not prevent PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M). However, pretreatment with MEK inhibitor (PD98059; 10⁻⁵ M; IC₅₀ = 10⁻⁶ M) (23) which prevents p42/44 MAPK phosphorylation, abrogated the synthesis of PGI₂ mediated by VEGF-A₁₆₅ (Figure 8). Then, BAEC were pretreated with PLA₂ inhibitors, pretreatment with a broad range inhibitor of sPLA₂ (Scalaradial; 10⁻⁵ M) (21), which is capable to prevent VEGF-A₁₆₅-mediated PAF synthesis, did not reduce significantly the release of PGI₂, whereas a pretreatment with a cytosolic cPLA₂ (cPLA₂) inhibitor (AACOCF₃; 5x10⁻⁵ M, IC₅₀ = 10⁻⁷ M) (24) inhibited by 86% the release of PGI₂ mediated by VEGF-A₁₆₅ (Figure 8). Finally, a pretreatment of BAEC either with a non-selective inhibitor of cyclooxygenase-1 and -2 (indomethacin; 10⁻⁵ M, IC₅₀ = 0.1 and 6x10⁻⁶ M respectively) (25) or with a selective inhibitor of PGI₂ synthase (tranylcypromine; 3x10⁻³ M) (26) abrogated completely the synthesis of PGI₂ mediated by VEGF-A₁₆₅ (Figure 8). To assess if inducible COX-2 might be present and contribute to constitutive COX-1 activity, we performed Western blot analyses and detected only the protein expression of COX-1 (data not shown).

Denitrosylation of Prostacyclin Synthase is Required to Promote PGI₂

Under quiescent state PGI₂ synthase is S-nitrosylated, thus preventing its capacity to convert its substrate (PGH₂) into PGI₂ (27). In a previous study, we have shown that VEGF-A₁₆₅ and VEGF-C are capable to mediate PAF synthesis upon VEGFR-2

homodimer activation (4,16). In the current study, we observed as well that VEGF-A₁₆₅ and VEGF-C are both capable to promote the phosphorylation p42/44 MAPK and cPLA₂ (data not shown), which are essential to promote arachidonic acid release (8,28). However, VEGF-C as opposed to VEGF-A₁₆₅ cannot induce PGI₂ synthesis. Consequently, we hypothesized that VEGF-C may not be capable to promote the S-denitrosylation of PGI₂ synthase which is required for PGI₂ production (27,29).

Thus, we assessed by Western blot analysis the capacity of VEGF-A₁₆₅ and VEGF-C to regulate the level of PGI₂ synthase nitrosylation. Treatment with VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) induced a rapid/immediate S-denitrosylation of PGI₂ synthase by 30%, which returned to its basal nitrosylated state after 15 minutes of treatment. At the opposite, treatment with VEGF-C (10⁻⁹ M) had no such effect (Figure 9).

DISCUSSION

Previous studies reported the capacity of VEGF-A₁₆₅ to promote PGI₂ synthesis, however, there was no data defining the contribution VEGF receptor(s) (8,30,31). In the current study, we observed that only VEGF-A isoforms (VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁) were able to promote an acute endothelial PGI₂ synthesis, whereas the stimulation of BAEC with selective VEGFR-1 (PlGF or VEGF-B) or VEGFR-2 (VEGF-C) agonists, alone or combined had no such effect. In addition, VEGF-A₁₆₅ was about twice potent as VEGF-A₁₂₁ to promote PGI₂ synthesis. Pretreatment of ECs with a GST-Ex7 fusion protein which prevents the binding of VEGF-A₁₆₅ to NRP-1 reduced the capacity of VEGF-A₁₆₅ to promote PGI₂ synthesis to the level mediated by VEGF-A₁₂₁, which does not bind to NRP-1. Together, these data suggest that the activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 homodimers by their corresponding analogs is not sufficient to promote PGI₂ synthesis and depends on the activation of VEGFR-1/R-2 heterodimer. Furthermore, NRP-1 potentiates the capacity of VEGF-A₁₆₅ to promote PGI₂ synthesis.

To assess the requirement of VEGFR-1/R-2 activation for promoting PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A isoforms, we used antisense gene therapy and pharmacological approaches to regulate the expression and the activation of VEGF receptors. In a first series of experiments, BAEC were treated with antisense oligomers targeting selectively VEGFR-1 or VEGFR-2 mRNA, that we previously defined for their capacity to downregulate selectively their corresponding protein expression by over 90% and related biological activities (16). Such treatment with

antisenses for VEGFR-1 or VEGFR-2 mRNA abrogated by over 70% the synthesis of PGI₂ mediated by VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ (Figure 6). In another set of experiments, BAEC were pretreated with selective VEGF receptor inhibitors. Pretreatment of BAEC with a VEGFR-2 inhibitor, SU1498, prevented VEGFR-2 activation by VEGF-A isoforms and PGI₂ synthesis. Together, these data demonstrate that the activation of both receptors under heterodimeric state (VEGFR-1/R-2) is required for PGI₂ synthesis. Indeed, it cannot be due either to an independent or parallel activation of VEGFR-1 and/or VEGFR-2 homodimers by VEGF-A isoforms since the blockade of VEGFR-1 or VEGFR-2 expression and corresponding activation was sufficient to prevent PGI₂ synthesis. Furthermore, parallel activation of VEGFR-1/R-1 and VEGFR-2/R-2 by selective agonists did not promote PGI₂ synthesis.

Although, we detected the phosphorylation of VEGFR-1 mediated by VEGF-A isoforms, we could not detect its phosphorylation upon a treatment with PlGF and VEGF-B. Consequently, one might argue that this could explain why PlGF and VEGF-B were unable to promote PGI₂ synthesis. However, this hypothesis does not stand, since we observed in a different study that PlGF and VEGF-B at the same concentrations, and within the same time period were both capable to promote a significant increase of endothelial P-selectin translocation, despite our incapacity to detect VEGFR-1 phosphorylation (5). Our data are also in agreement with previous reports which have shown that PlGF and VEGF-B were capable to promote specific biological activities namely on endothelial and monocyte tissue factor production

and migration of monocytes, despite the fact that VEGFR-1 phosphorylation was undetectable (32-36). This could also be explained by the fact that the tyrosine kinase activity of VEGFR-1 is one order of magnitude lower than that of VEGFR-2, and that in function of the ligands used, VEGFR-1 can autophosphorylate differently, rendering difficult the detection of its autophosphorylation (37,38).

The lack of PGI₂ synthesis upon stimulation with VEGF-C was also not due to its incapacity to activate VEGFR-2 since VEGF-C was capable to promote VEGFR-2 phosphorylation (Figure 4), and selective biological activities, including endothelial P-selectin translocation, endothelial cell migration and proliferation, and PAF synthesis (4,5,16,39). Together, these observations strengthened our hypothesis that VEGF-A isoforms require the activation of VEGFR-1/R-2 heterodimer to support PGI₂ synthesis.

Our observations are also supported by recent studies which have demonstrated that in native unstimulated and VEGF-A₁₆₅-treated ECs, VEGFR-1 was consistently detected in anti-VEGFR-2 immunoprecipitates, indicating that both receptors spontaneously form heterodimer (38). Porcine aortic endothelial cells (PAEC) transfected with VEGFR-1 and VEGFR-2 provided as well the heterodimerization of VEGFR-1/R-2. Stimulation of all three PAEC transfected cell lines expressing VEGFR-1, R-2 and R-1/R-2 with VEGF-A₁₆₅ resulted in signal transduction with different efficiencies and biological activities (40). For instance, migration of PAEC co-expressing VEGFR-1/R-2 towards VEGF-A₁₆₅ was more efficient than migration

of PAEC expressing VEGFR-2 alone, even though similar number of VEGFR-2 subunits were expressed in transfected PAEC (40). These data suggest that the signal transduction properties of VEGFR-2 are affected by its dimerization with VEGFR-1 and its transphosphorylation. This is in agreement with a recent study reporting that VEGF-A₁₆₅ can induce a strong phosphorylation of VEGFR-1 tyrosine residue Tyr1213 and to lesser extent Tyr1242 and Tyr1333, whereas PlGF induced the phosphorylation of Tyr1309 but not Tyr1213 (38). Such differences in the activation of VEGF receptors by various agonists termed “agonist trafficking”, might explain the distinct biologic activities of VEGF-A₁₆₅ and its analogs. Since VEGF-A₁₆₅ and VEGF-A₁₂₁ are the only VEGF analogs capable to bind VEGFR-1/R-2 heterodimer, they might provide an exclusive transphosphorylation of VEGFR-1 and VEGFR-2 subunits which appears to be essential to govern cell signaling leading to PGI₂ synthesis.

In previous studies we have shown that VEGF-A₁₆₅ induces PAF synthesis upon the activation of VEGFR-2/R-2 homodimer, which is potentiated by the presence of NRP-1 coreceptor (4,16). Furthermore, the synthesis of PAF requires the activation of both p38 and p42/44 MAPKs, and subsequent activation of secreted phospholipase A₂ type V (sPLA₂-V) (20,21). Interestingly, the stimulation of VEGFR-1 did not promote PAF synthesis and was not required to support VEGF-A₁₆₅-mediated PAF synthesis through VEGFR-2 activation (4,16).

In order to assess the different contribution of VEGF receptors for the induction of PAF and PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅, we investigated the cell signaling

pathways involved in PGI₂ synthesis. Previous studies highlighted the contribution of p42/44 and/or p38 MAPK on PGI₂ synthesis (8,41-45). In order to discriminate the potential role played by both MAPKs, we used specific inhibitors, namely, PD98059 that inhibits MEK, the enzyme upstream and responsible for p42/44 MAPK activation, and SB203580, a specific inhibitor of p38 MAPK activation (20). In our study, the blockade of p42/44 MAPK activation prevented the induction PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅, whereas the blockade of p38 MAPK activity had no such effect. We previously reported that PAF synthesis mediated by VEGF-A₁₆₅ requires the activation of sPLA₂ as opposed to cPLA₂. However, since it is well established that p42/44 MAPK can promote the phosphorylation of cPLA₂ (8,46) and that p42/44 MAPK activation is essential for PAF synthesis (20), we then assessed the contribution of both PLA₂ on PGI₂ synthesis. The blockade of cPLA₂ prevented completely the synthesis of PGI₂, whereas the inhibition of sPLA₂ induced a non-significant decrease of PGI₂ synthesis.

Since VEGF-C is also capable to promote VEGFR-2 activation and PAF synthesis but not PGI₂ synthesis, we then investigated by Western blot analyses its capacity to induce the phosphorylation p42/44 MAPK and cPLA₂, in both cases VEGF-C promoted the activation of these enzymes, suggesting that the activation of these enzymes is not the rate limiting step for the incapacity of VEGF-C to mediate PGI₂ synthesis. The activation of cPLA₂ catalyzes the cleavage of arachidonic acid (AA) from the sn-2 position of phospholipids, which is then converted into PGH₂ by COX-1 and/or COX-2, newly formed PGH₂ which serves as substrate for PGI₂

synthase and PGI₂ production (11-13,41). By Western blot analysis, we confirmed the presence of constitutive COX-1 whereas COX-2 was not present. This is in agreement with previous reports which have shown in quiescent and unstimulated ECs that COX-2 isoform is not present, and that its upregulation by diverse cytokines, including VEGF is achieved at least two hours after stimulation (12,14,47-49). Therefore, only COX-1 isoform was involved, and its contribution was essential, since its blockade with indomethacin abrogated PGI₂ synthesis. Furthermore, since COX-1 activity is not repressed by VEGF isoforms (14), and that there is no alternative pathway for PGI₂ synthesis, this brings us to suggest that COX-1 activation cannot be responsible for the difference between VEGF-C and VEGF-A₁₆₅ to promote PGI₂ synthesis. Thus, the rate limiting step can be due to a possible difference in their capacity to promote PGI₂ synthase activity. Recently, a new post-translational modification was found for the different isoforms of nitric oxide synthase (NOS), and that the nitrosylation of NOS provides a negative regulatory mechanism on NO production (50,51). The same nitrosylation mechanism is also observed for the regulation of PGI₂ synthase activity upon the S-nitrosylation of the tyrosine 430 residue (52). In our study, we observed in quiescent non-stimulated EC, that the PGI₂ synthase was constitutively nitrosylated, which is concordant with the very low concentration of prostacyclin in BAEC. Treatment with VEGF-A₁₆₅ induced a parallel rapid and transient denitrosylation of PGI₂ synthase and PGI₂ synthesis, whereas a treatment with VEGF-C induced neither PGI₂ synthase denitrosylation nor PGI₂ synthesis. The specific mechanism by which PGI₂ synthase denitrosylation occurs, remains to be identified. However,

recent studies proposed the existence of a nitrase-denitrase tyrosine activity which is regulating the nitrosylation-denitrosylation equilibrium of selective proteins such as PGI₂ synthase (53,54). Consequently, our data suggest that the only difference in the signaling pathways leading to PGI₂ synthesis between VEGF-A₁₆₅ as opposed to VEGF-C, is the capacity of VEGF-A₁₆₅ to promote upon the activation of VEGFR-1/R-2 heterodimer a rapid and transient of PGI₂ synthase denitrosylation and PGI₂ release (Figure 10).

In conclusion, we observed for the first time the necessity for VEGFR-1/R-2 heterodimer activation to promote a selective biological activity, in occurrence PGI₂ synthesis. We have also observed that even if VEGF-C and VEGF-A₁₆₅ are capable to activate the same signaling pathways leading to endothelial arachidonic acid release, they showed a different capacity to promote PGI₂ synthase denitrosylation, and therefore, PGI₂ synthesis. Such difference would be attributable to the exclusive capacity of VEGF-A isoforms to activate VEGFR-1/R-2 heterodimer. These findings provide novel informative data leading to a better comprehension of the selective roles played by VEGF family members and their corresponding receptors on the regulation and maintenance of vascular tone and integrity.

REFERENCES

1. Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987) *Science* **235**, 442-447
2. Jussila, L., and Alitalo, K. (2002) *Physiol Rev* **82**, 673-700
3. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998) *Cell* **92**, 735-745
4. Bernatchez, P. N., Rollin, S., Soker, S., and Sirois, M. G. (2002) *J Cell Biochem* **85**, 629-639
5. Rollin, S., Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Villeneuve, L. R., Allen, B. G., Soker, S., Bazan, N. G., Merhi, Y., and Sirois, M. G. (2004) *Blood* **103**, 3789-3797
6. Soker, S., Gollamudi-Payne, S., Fidder, H., Charmahelli, H., and Klagsbrun, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 31582-31588
7. Neufeld, G., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Poltorak, Z., Tessler, S., Sharon, R., Gengrinovitch, S., and Levi, B. Z. (1996) *Cancer Metastasis Rev* **15**, 153-158
8. Wheeler-Jones, C., Abu-Ghazaleh, R., Cospedal, R., Houlston, R. A., Martin, J., and Zachary, I. (1997) *FEBS Lett* **420**, 28-32
9. DeWitt, D. L., Day, J. S., Sonnenburg, W. K., and Smith, W. L. (1983) *J Clin Invest* **72**, 1882-1888
10. Bunting, S., Moncada, S., and Vane, J. R. (1983) *Br Med Bull* **39**, 271-276
11. Leslie, C. C. (1997) *J Biol Chem* **272**, 16709-16712
12. Hla, T., and Neilson, K. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7384-7388

13. Marcus, A. J., Weksler, B. B., and Jaffe, E. A. (1978) *J Biol Chem* **253**, 7138-7141
14. Bryant, C. E., Appleton, I., and Mitchell, J. A. (1998) *Life Sci* **62**, 2195-2201
15. Sirois, M. G., and Edelman, E. R. (1997) *Am J Physiol* **272**, H2746-2756
16. Bernatchez, P. N., Soker, S., and Sirois, M. G. (1999) *J Biol Chem* **274**, 31047-31054
17. Witmer, A. N., Dai, J., Weich, H. A., Vrensen, G. F., and Schlingemann, R. O. (2002) *J Histochem Cytochem* **50**, 767-777
18. Hennequin, L. F., Thomas, A. P., Johnstone, C., Stokes, E. S., Pl inverted question marke, P. A., Lohmann, J. J., Ogilvie, D. J., Dukes, M., Wedge, S. R., Curwen, J. O., Kendrew, J., and Lambert-van der Brempt, C. (1999) *J Med Chem* **42**, 5369-5389
19. Arbiser, J. L., Larsson, H., Claesson-Welsh, L., Bai, X., LaMontagne, K., Weiss, S. W., Soker, S., Flynn, E., and Brown, L. F. (2000) *Am J Pathol* **156**, 1469-1476
20. Bernatchez, P. N., Allen, B. G., Gelinas, D. S., Guillemette, G., and Sirois, M. G. (2001) *Br J Pharmacol* **134**, 1253-1262
21. Bernatchez, P. N., Winstead, M. V., Dennis, E. A., and Sirois, M. G. (2001) *Br J Pharmacol* **134**, 197-205
22. Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., and Lee, J. C. (1995) *FEBS Lett* **364**, 229-233
23. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., and Saltiel, A. R. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7686-7689

24. Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K., and Dennis, E. A. (1995) *J Biol Chem* **270**, 445-450
25. Johnson, J. L., Wimsatt, J., Buckel, S. D., Dyer, R. D., and Maddipati, K. R. (1995) *Arch Biochem Biophys* **324**, 26-34
26. Merhi-Soussi, F., Dominguez, Z., Macovschi, O., Dubois, M., Savany, A., Lagarde, M., and Prigent, A. F. (2000) *J Leukoc Biol* **68**, 881-889
27. Hink, U., Oelze, M., Kolb, P., Bachschmid, M., Zou, M. H., Daiber, A., Mollnau, H., August, M., Baldus, S., Tsilimingas, N., Walter, U., Ullrich, V., and Munzel, T. (2003) *J Am Coll Cardiol* **42**, 1826-1834
28. Sa, G., Murugesan, G., Jaye, M., Ivashchenko, Y., and Fox, P. L. (1995) *J Biol Chem* **270**, 2360-2366
29. Zou, M. H., Daiber, A., Peterson, J. A., Shoun, H., and Ullrich, V. (2000) *Arch Biochem Biophys* **376**, 149-155
30. Gliki, G., Abu-Ghazaleh, R., Jezequel, S., Wheeler-Jones, C., and Zachary, I. (2001) *Biochem J* **353**, 503-512
31. He, H., Venema, V. J., Gu, X., Venema, R. C., Marrero, M. B., and Caldwell, R. B. (1999) *J Biol Chem* **274**, 25130-25135
32. Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A., and Marme, D. (1996) *Blood* **87**, 3336-3343
33. Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., and Risau, W. (1996) *J Biol Chem* **271**, 17629-17634
34. Rahimi, N., Dayanir, V., and Lashkari, K. (2000) *J Biol Chem* **275**, 16986-16992

35. Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. (1995) *Oncogene* **10**, 135-147
36. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C. H. (1994) *J Biol Chem* **269**, 26988-26995
37. Shibuya, M. (2001) *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 409-420
38. Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., Kliche, S., Fellbrich, G., Ballmer-Hofer, K., Maglione, D., Mayr-Beyrle, U., Dewerchin, M., Dombrowski, S., Stanimirovic, D., Van Hummelen, P., Dehio, C., Hicklin, D. J., Persico, G., Herbert, J. M., Communi, D., Shibuya, M., Collen, D., Conway, E. M., and Carmeliet, P. (2003) *Nat Med* **9**, 936-943
39. Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1997) *Embo J* **16**, 3898-3911
40. Huang, K., Andersson, C., Roomans, G. M., Ito, N., and Claesson-Welsh, L. (2001) *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 315-324
41. Houliston, R. A., Pearson, J. D., and Wheeler-Jones, C. P. (2001) *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1266-1276
42. Martinez-Gonzalez, J., Escudero, I., and Badimon, L. (2004) *Atherosclerosis* **174**, 305-313
43. Merhi-Soussi, F., Dominguez, Z., Macovschi, O., Dubois, M., Nemoz, G., Lagarde, M., and Prigent, A. F. (2003) *Br J Pharmacol* **139**, 321-328
44. Norata, G. D., Callegari, E., Inoue, H., and Catapano, A. L. (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 871-877

45. Rebsamen, M. C., Capoccia, R., Vallotton, M. B., and Lang, U. (2003) *J Mol Cell Cardiol* **35**, 81-89
46. van Rossum, G. S., Klooster, R., van den Bosch, H., Verkleij, A. J., and Boonstra, J. (2001) *J Biol Chem* **276**, 28976-28983
47. Spisni, E., Manica, F., and Tomasi, V. (1992) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **47**, 111-115
48. Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., and Vane, J. R. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11693-11697
49. Gross, S. S., Jaffe, E. A., Levi, R., and Kilbourn, R. G. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **178**, 823-829
50. Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., and Snyder, S. H. (2001) *Nat Cell Biol* **3**, 193-197
51. Stamler, J. S., Lamas, S., and Fang, F. C. (2001) *Cell* **106**, 675-683
52. Schmidt, P., Youhnovski, N., Daiber, A., Balan, A., Arsic, M., Bachschmid, M., Przybylski, M., and Ullrich, V. (2003) *J Biol Chem* **278**, 12813-12819
53. Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y. C., and Murad, F. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11584-11589
54. Bian, K., and Murad, F. (2001) *Free Radic Biol Med* **31**, 421-429

FIGURE LEGENDS

Figure 1. PGI₂ synthesis mediated by VEGF-A isoforms

Postconfluent BAEC were stimulated either with control PBS solution or with VEGF-A₁₆₅ (10⁻⁹ M) up to 30 minutes (A), or concentration-dependently (10⁻¹¹ - 10⁻⁸ M) with VEGF-A₁₆₅ (B) or VEGF-A₁₂₁ (C) for 15 minutes. Synthesized PGI₂ was assessed by quantifying its stable metabolite (6-keto PGF_{1α}) by ELISA. ***P < 0.001 vs. PBS-treated cells.

Figure 2. NRP-1 coreceptor potentiates PGI₂ synthesis induced by VEGF-A₁₆₅

A. Postconfluent BAEC were stimulated with PBS, VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁ (10⁻⁹ M each) for 7.5 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-NRP-1 IgG. NRP-1 protein expression in BAEC was detected by immunoblotting. The membranes were stripped and the detection of VEGFR-2 protein expression was performed by reprobing the membranes with anti-VEGFR-2 IgG. **B.** Postconfluent BAEC were pretreated with the NRP-1 antagonist GST-Exon 7 (10⁻⁷ M) or its carrier GST (10⁻⁷ M), 15 minutes prior to stimulation with PBS, VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁ (10⁻⁹ M) for 15 minutes. ***P < 0.001 vs. PBS, and \$\$\$P < 0.001 vs. VEGF-A₁₆₅.

Figure 3. Effect of VEGFR-1 and VEGFR-2 agonists on PGI₂ synthesis

Postconfluent BAEC were stimulated with PBS, VEGFR-1 (VEGF-B, PlGF) or VEGFR-2 (VEGF-C) agonists (10^{-11} - 10^{-8} M) alone or combined for 15 minutes. BAEC were treated as well with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) as positive control. ***P < 0.001 vs. PBS-treated cells.

Figure 4. Expression and regulation of VEGF receptors by corresponding agonists

Postconfluent BAEC were stimulated with PBS, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₂₁, PlGF, VEGF-B or VEGF-C (10^{-9} M) for 7.5 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with VEGFR-1 IgG (A; 3 mg total proteins), or VEGFR-2 IgG (B; 1 mg total proteins). VEGFR-1 and VEGFR-2 protein expression in BAEC was detected by immunoblotting (upper bands). Membranes were subsequently stripped using Re-Blot Plus Strong stripping solution and the detection of VEGFR-1 (A), and VEGFR-2 (B) phosphorylation was performed with an anti-phosphotyrosine IgG (lower bands). The phosphorylation level of each receptor was expressed in function of the protein expression level of VEGFR-1 and VEGFR-2, and normalized with VEGF-A₁₆₅-treated cells.

Figure 5. Heterodimerization capacity of VEGFR-1 and VEGFR-2 subunits

Postconfluent BAEC were stimulated with PBS, VEGF-A₁₆₅ or VEGF-C (10^{-9} M) for 7.5 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with VEGFR-1 IgG (3 mg total proteins). VEGFR-1 protein expression in BAEC was detected by

immunoblotting. The membranes were stripped and the detection of VEGFR-2 protein expression was performed by reprobing the membranes with anti-VEGFR-2 IgG.

Figure 6. Contribution of VEGF receptors on PGI₂ synthesis induced by VEGF-A isoforms

A. BAEC were plated at 5×10^5 cells/well in 6-well plates. Antisense oligomers targeting VEGFR-1 (AS-R1) or VEGFR-2 (AS-R2) mRNA, or a scrambled oligomer (As-Scr) were added daily (5×10^{-7} M) up to 3 days postconfluence. Cells were stimulated with PBS, VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁ (10^{-9} M) for 15 minutes. **B.** Postconfluent BAEC were pretreated with a VEGFR-1 and VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitor, VTK (10^{-5} M), or a VEGFR-2 inhibitor, SU1498 (5×10^{-6} M) 15 minutes prior to stimulation with PBS, VEGF-A₁₆₅ or VEGF-A₁₂₁ (10^{-9} M) for 15 minutes. PGI₂ synthesis was assessed by quantifying its stable metabolite (6-keto PGF_{1 α}) by ELISA. ***P < 0.001 vs. PBS-treated cells. §§P < 0.01 and §§§P < 0.001 vs. cells treated with VEGF-A isoforms.

Figure 7. Regulation of VEGF receptors phosphorylation by selective inhibitors

Postconfluent BAEC were pretreated with VTK (10^{-5} M), or SU1498 (5×10^{-6} M) 15 minutes prior to stimulation with PBS, VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) for 7.5 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with VEGFR-1 (A) or VEGFR-2 (B) IgG. Western blot analyses for VEGFR-1 (A) or VEGFR-2 (B) protein expression were

performed (upper bands), then the membranes were stripped and the detection of VEGFR-1 (A), and VEGFR-2 (B) phosphorylation was performed with an anti-phosphotyrosine IgG (lower bands).

Figure 8. Cell signaling pathway by which VEGF-A₁₆₅ promotes PGI₂ synthesis

Postconfluent BAEC were pretreated with selective inhibitors of p38 MAPK (SB203580; SB, 10^{-5} M), MEK inhibitor PD98059; PD, 10^{-5} M), sPLA₂-V (scalaradial; Scal, 10^{-5} M) or cPLA₂ (AACOCF₃; AA, 5×10^{-5} M), COX-1/-2 (indomethacin; Indo, 10^{-5} M) or PGI₂ synthase (tranylcypromine; TC, 3×10^{-3} M) 15 minutes prior to stimulation with VEGF-A₁₆₅ (10^{-9} M) for 15 minutes. Synthesized PGI₂ was assessed by quantifying its stable metabolite (6-keto PGF_{1 α}) by ELISA. ***P < 0.001 vs. PBS-treated cells. §§§P < 0.001 vs. VEGF-A₁₆₅-treated cells.

Figure 9. S-Nitrosylation of PGI₂ synthase in presence of VEGF-A₁₆₅ and VEGF-C

Postconfluent BAEC were stimulated time-dependently with PBS, VEGF-A₁₆₅ or VEGF-C (10^{-9} M). Cell lysates (500 μ g of total proteins) were immunoprecipitated with PGI₂ synthase IgG. Western blot analyses were performed with an antinitrotyrosine IgG to assess S-nitrosylation level of PGI₂ synthase, then the membranes were stripped and reprobed with an anti-PGI₂ synthase IgG as described above. The nitrosylation level of PGI₂ synthase upon stimulation with VEGF-A₁₆₅ or VEGF-C was expressed in function of the protein expression level of PGI₂ synthase, and the results normalized to PBS-treated cells.

Figure 10. Proposed signaling pathway by which VEGF-A₁₆₅ mediates PGI₂ synthesis

PGI₂ synthesis induced by VEGF-A₁₆₅ requires the heterodimerization of VEGFR-1/R-2 subunits and is potentiated by the contribution of NRP-1 coreceptor, such complex which can activate downstream effectors (namely p42/44 MAPK and cPLA₂), provides the release of arachidonic acid which can be converted upon the activation of COX-1 and PGI₂ synthase into PGI₂. On the other hand, the activation of VEGFR-2/R-2 homodimer by VEGF-C can promote similar cell signaling up to the release of arachidonic acid, however, VEGF-C is unable to promote S-nitrosylation of PGI₂ synthase which is essential for PGI₂ synthesis.

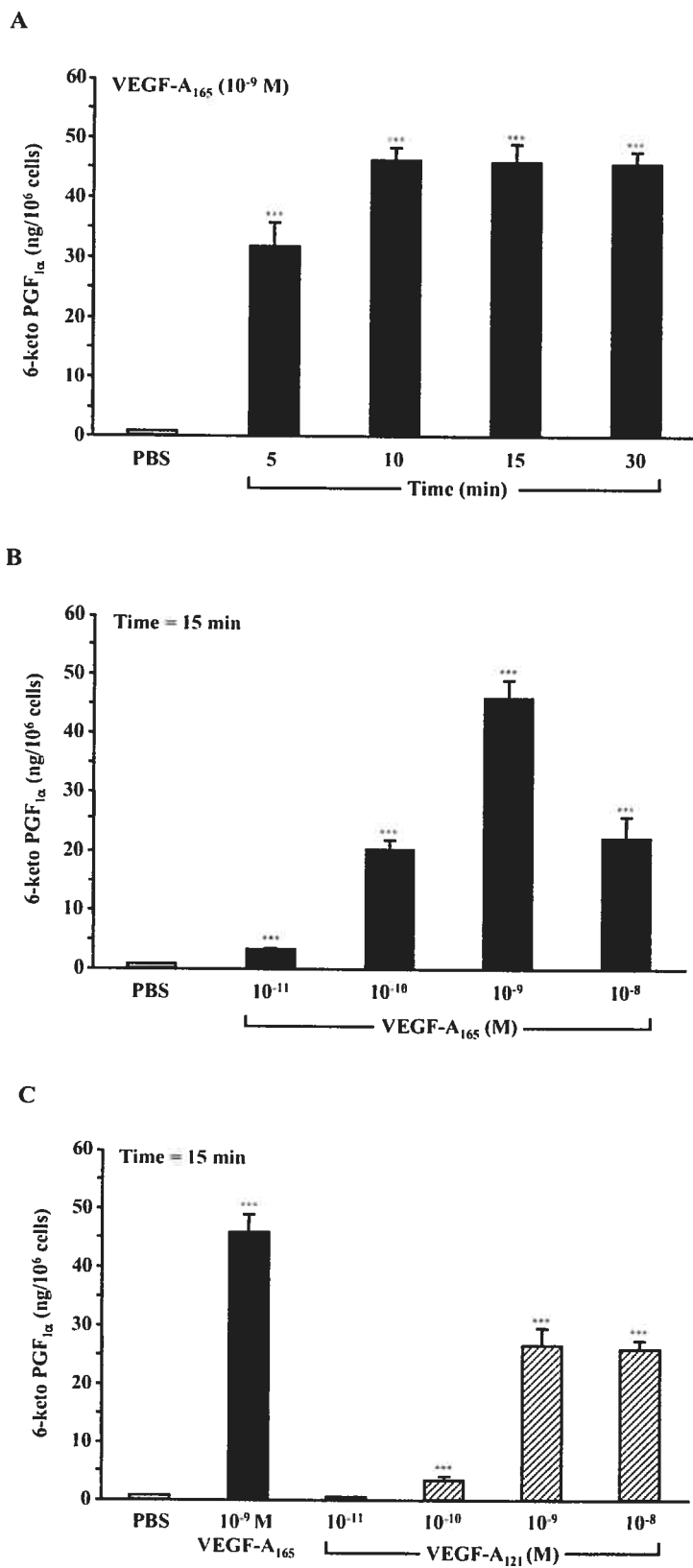


FIGURE 1

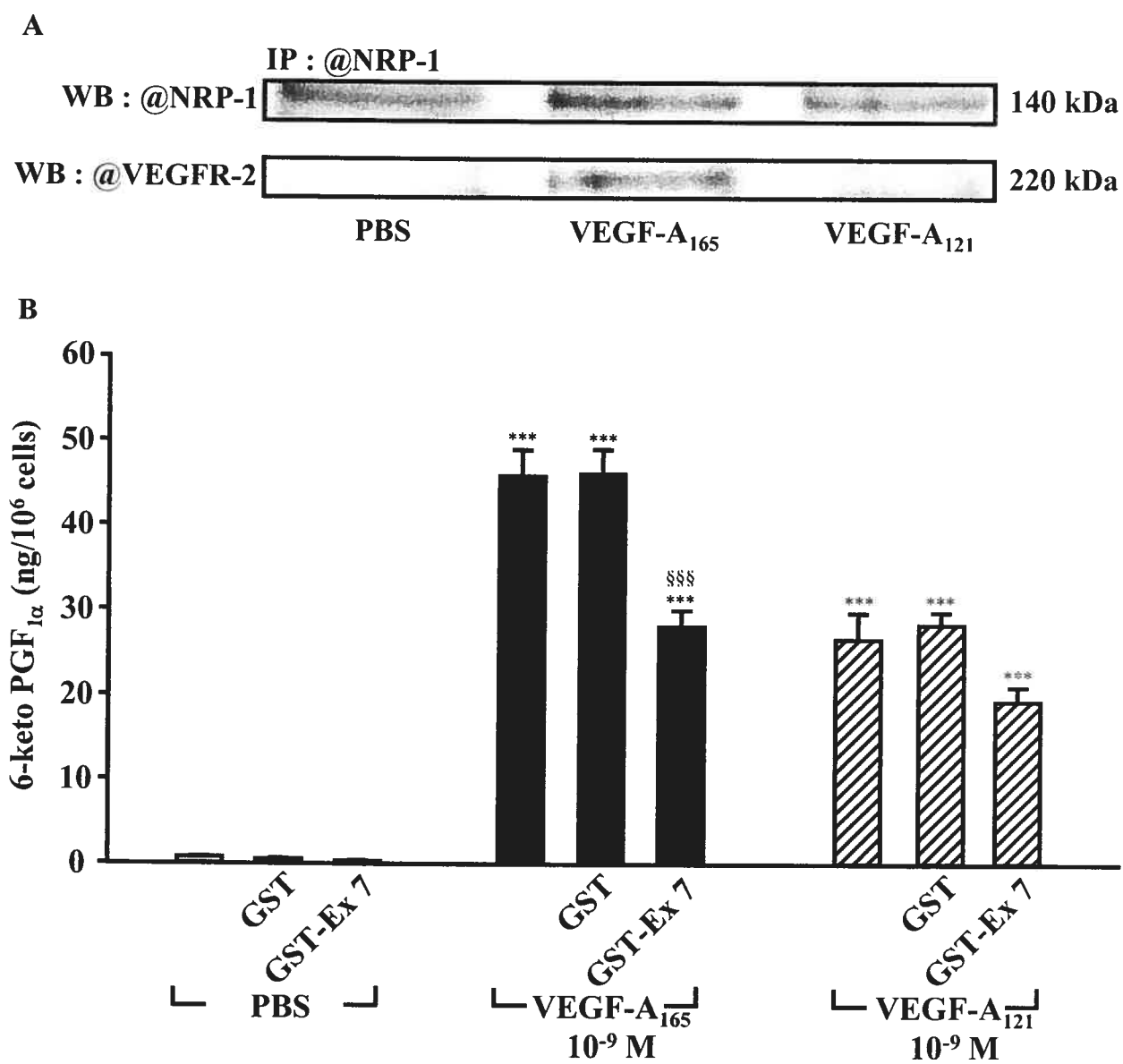


FIGURE 2

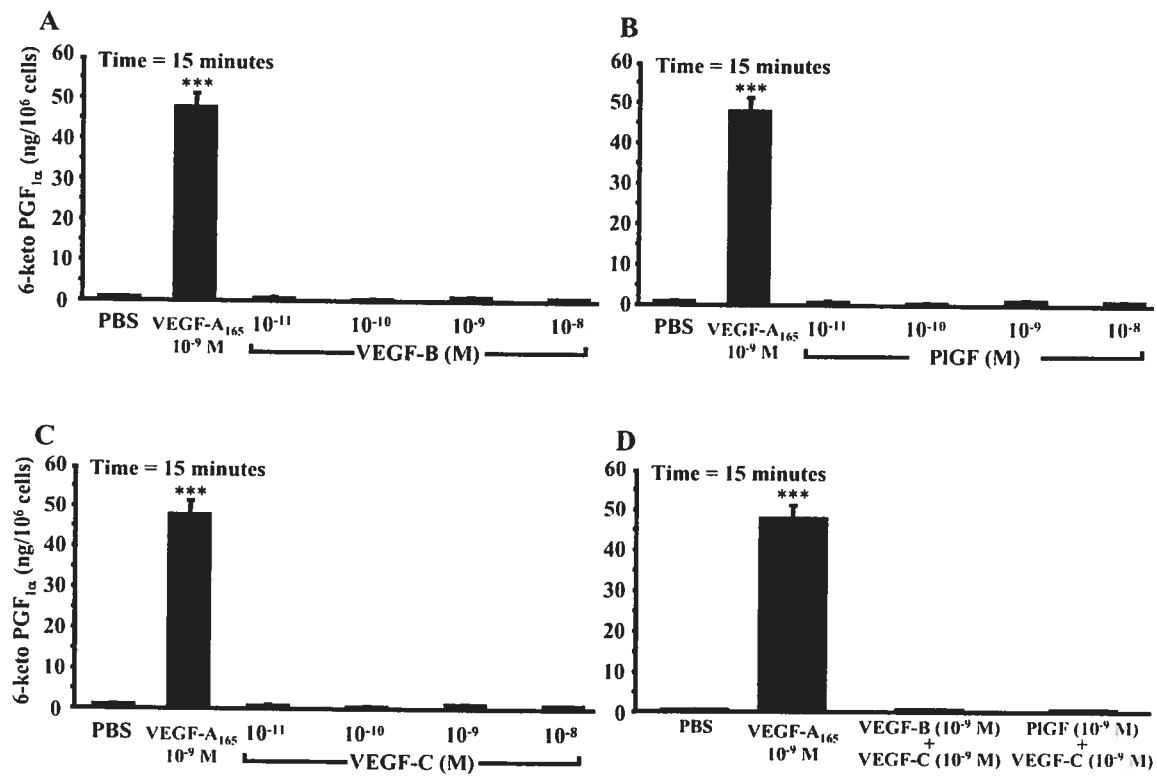


FIGURE 3

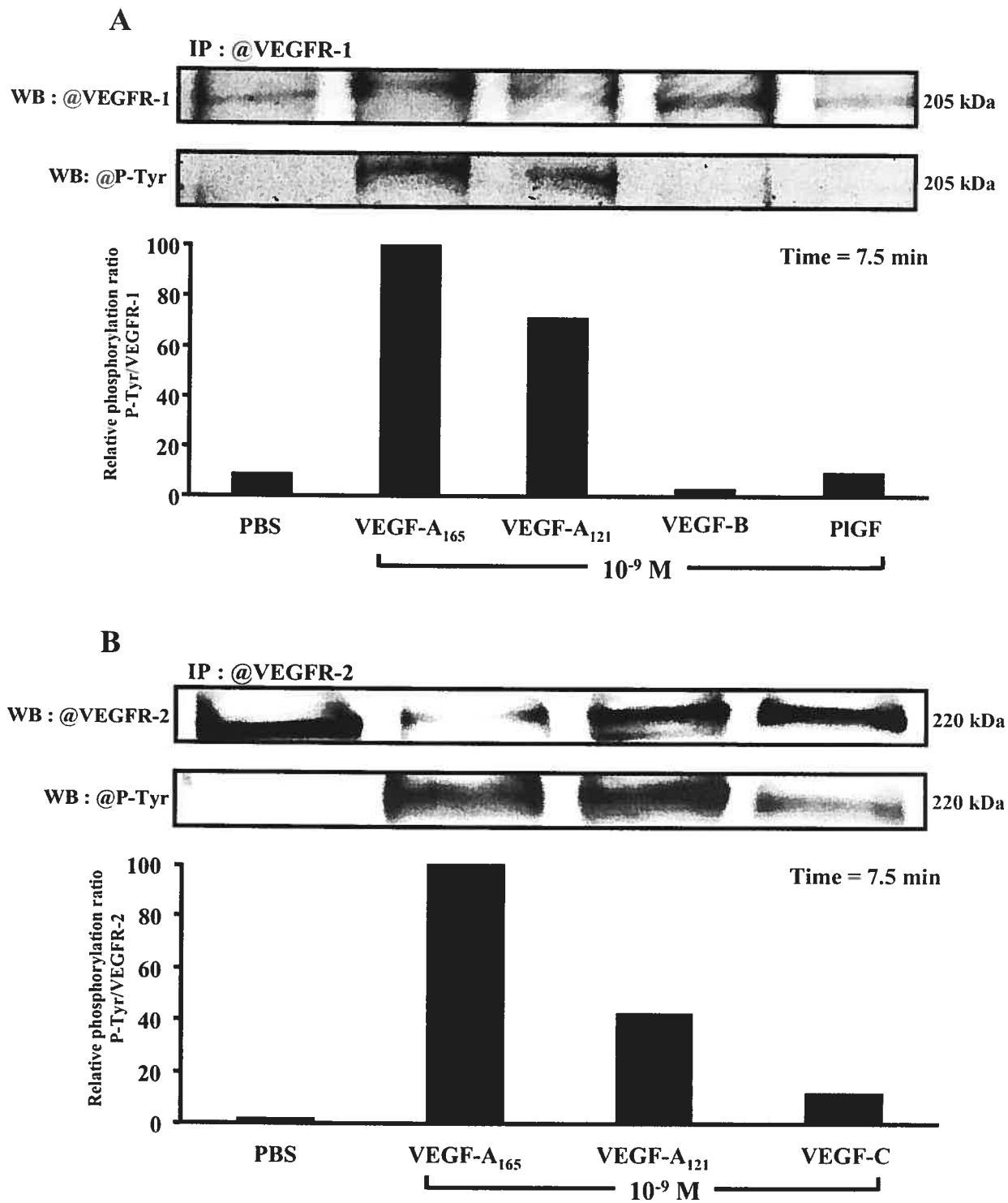


FIGURE 4

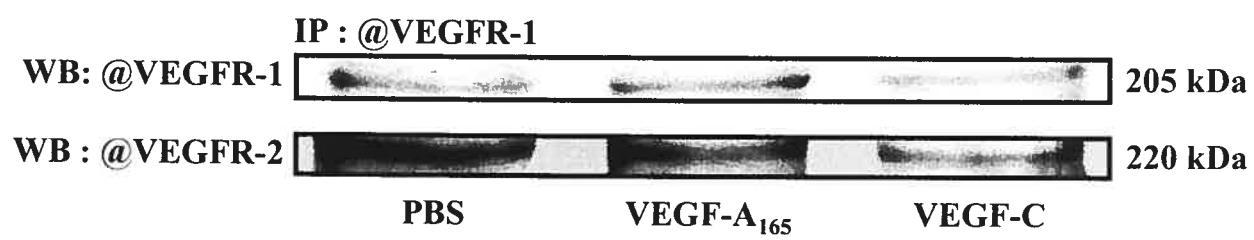


FIGURE 5

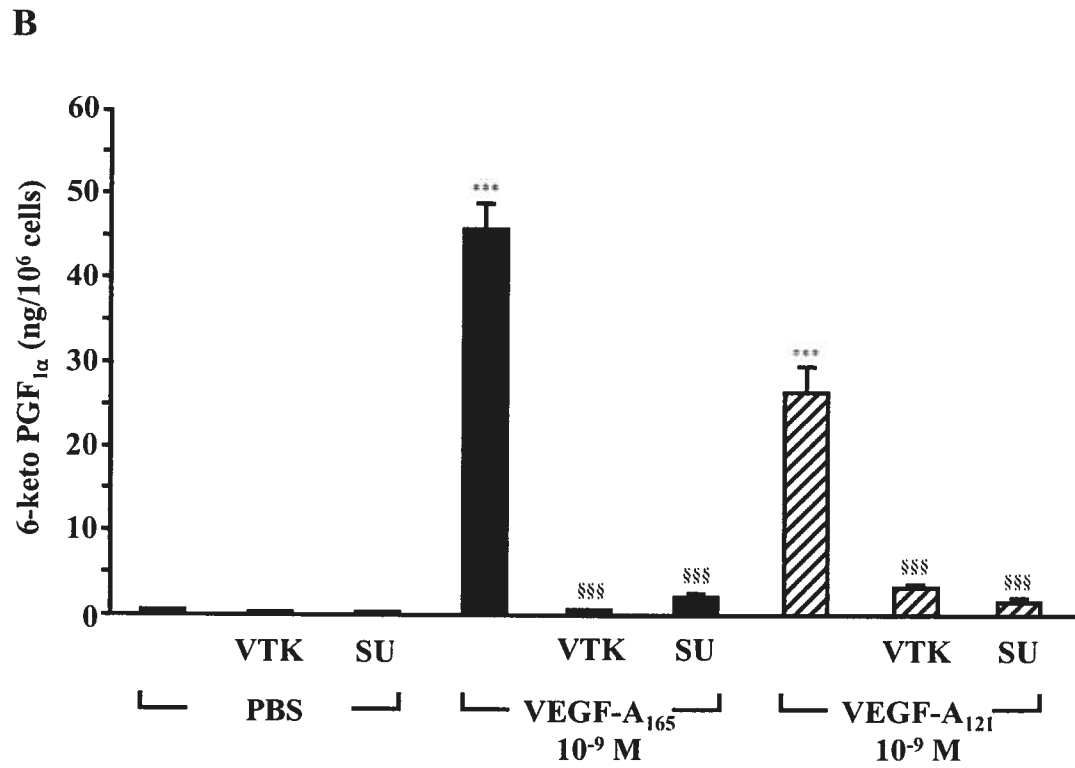
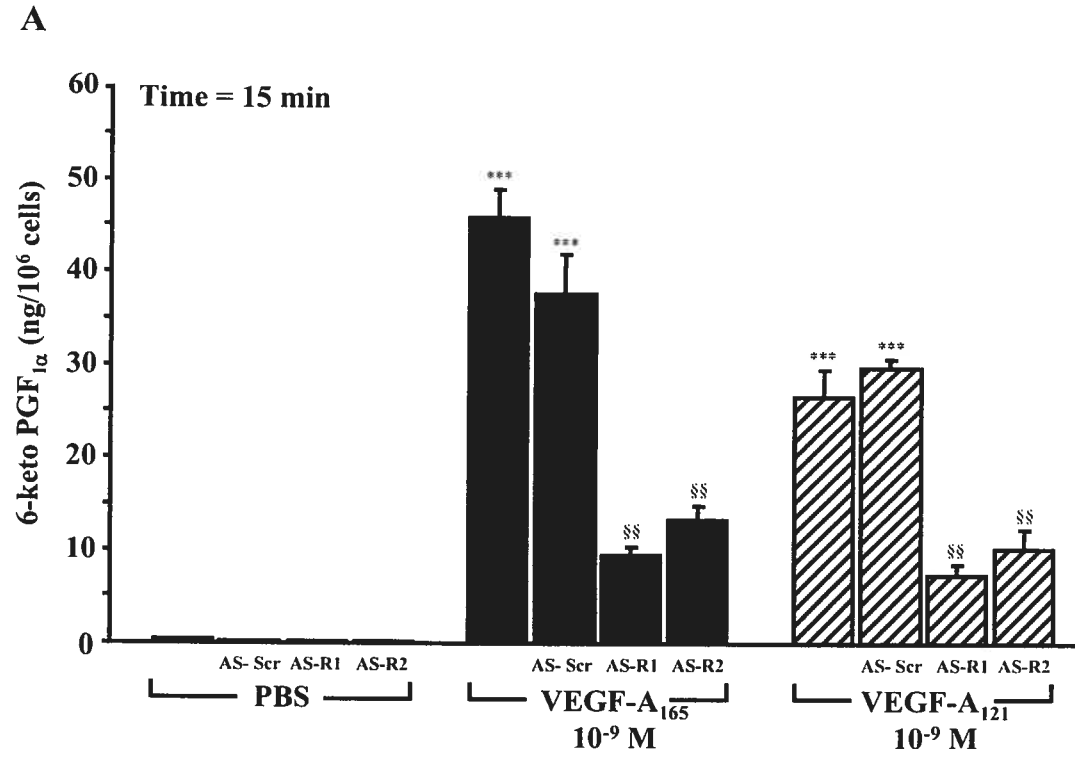
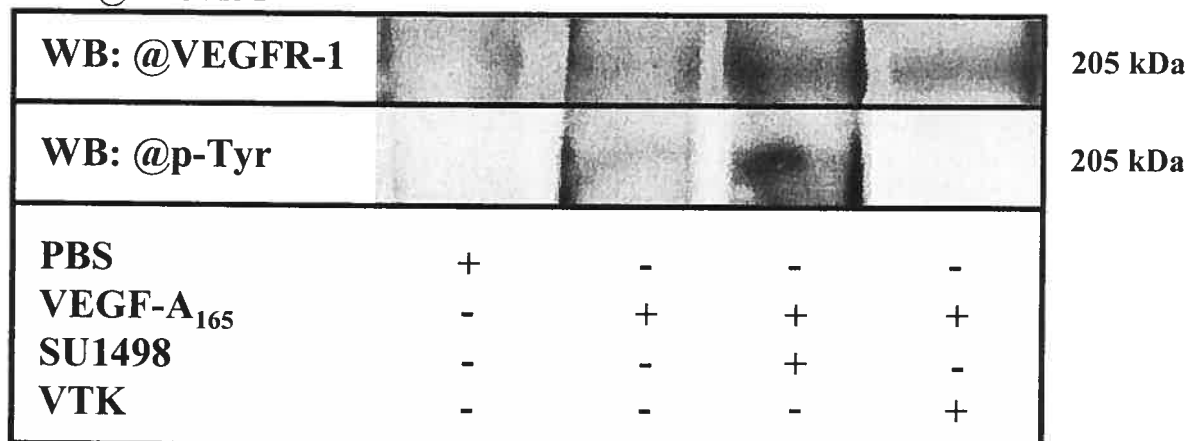


FIGURE 6

A

IP: @VEGFR-1

**B**

IP: @VEGFR-2

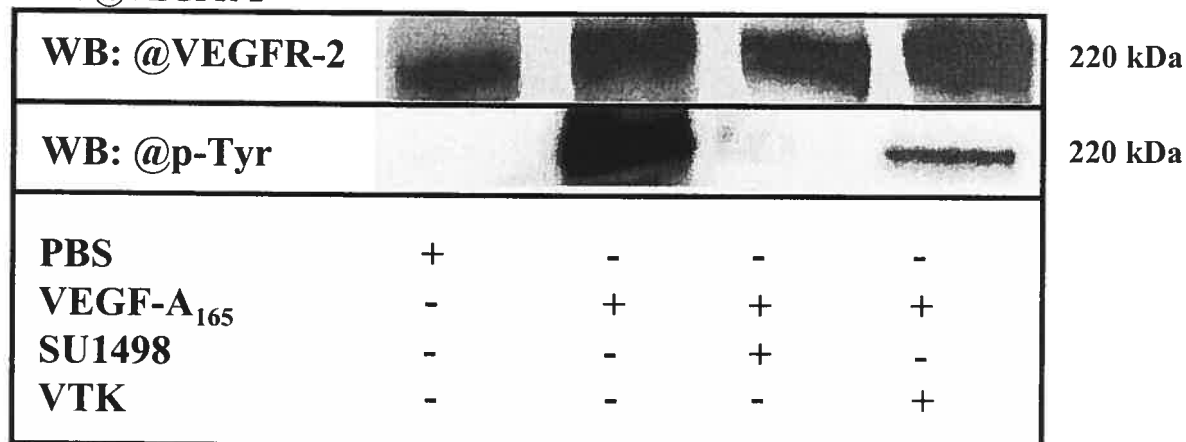


FIGURE 7

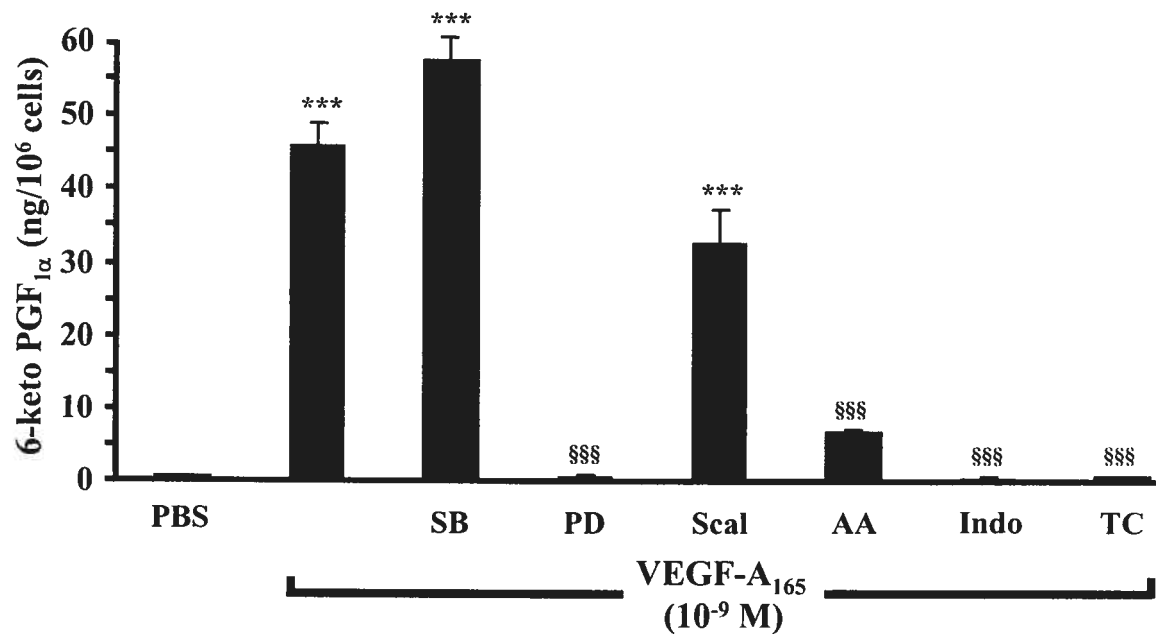


FIGURE 8

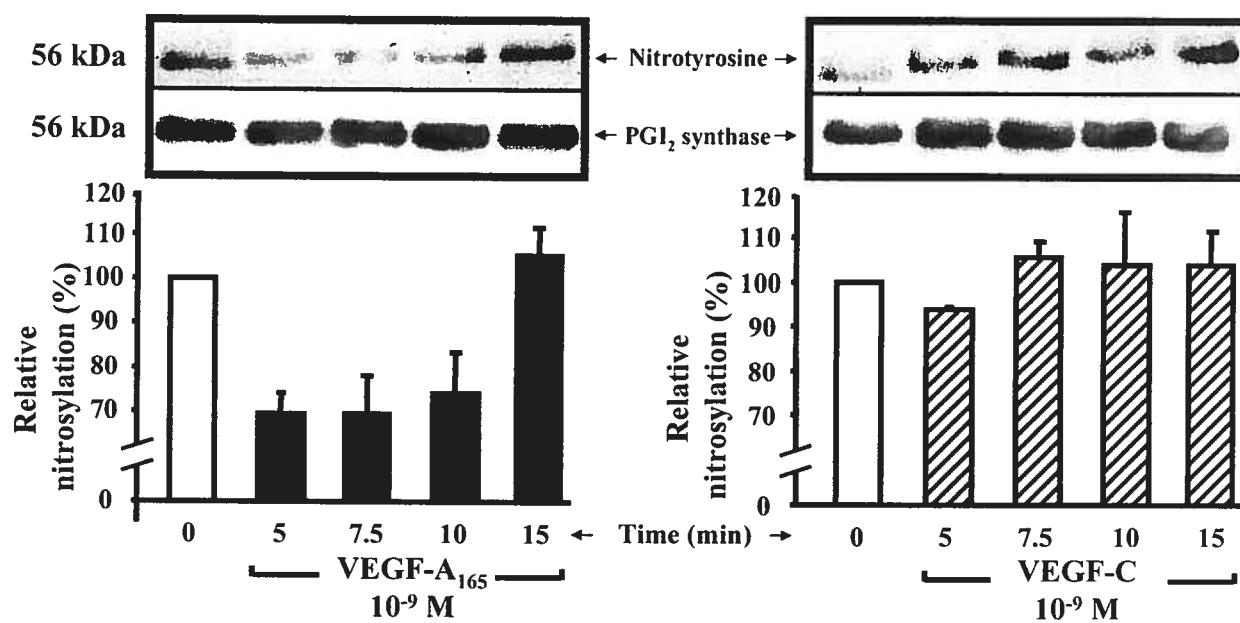


FIGURE 9

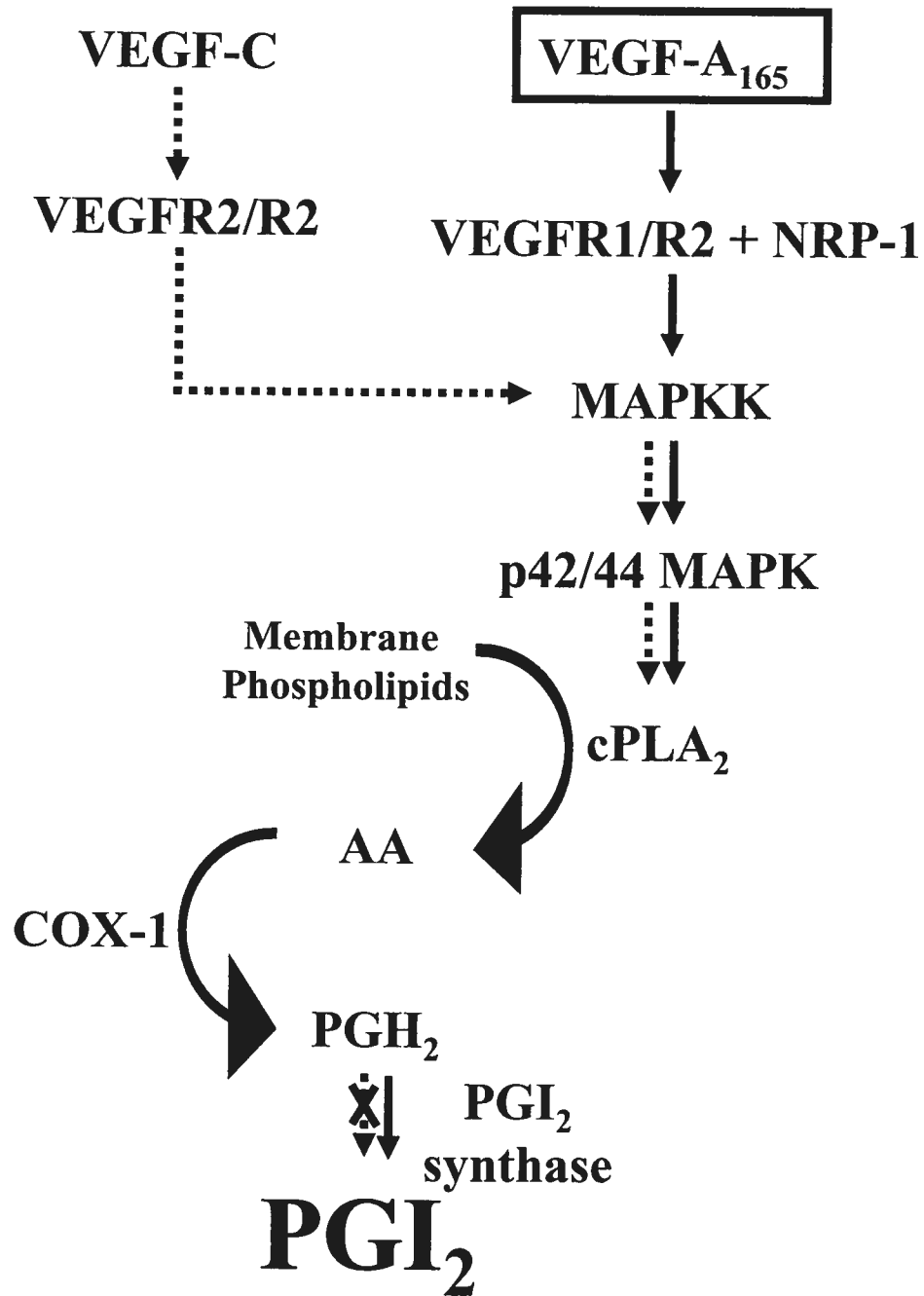


FIGURE 10

3.0 DISCUSSION

Les études antérieures effectuées dans notre laboratoire, portant sur les mécanismes par lesquels le VEGF-A₁₆₅ induit la synthèse de PAF, la migration et la prolifération des CE [66] ont permis de démontrer un rôle essentiel et majoritaire du récepteur VEGFR-2 dans la transduction des voies de signalisation menant à ces activités biologiques. Récemment, des études ont montré une implication du récepteur VEGFR-1 dans la signalisation intracellulaire [110] et des activités biologiques telles la migration des monocytes, la production du facteur de croissance du tissu conjonctif, la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles [48, 49, 111], qui sont impliquées dans l'inflammation. Toutefois, il n'y avait jusqu'à maintenant aucune information concernant la contribution des récepteurs du VEGF sur la synthèse de la prostacycline dans les CE. Notre étude a permis de démontrer pour la première fois la nécessité d'une activation des hétérodimères des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, constitutivement présents dans les BAEC, afin d'induire une activité biologique, en l'occurrence la synthèse de PGI₂. Cette démonstration a été réalisée grâce à l'utilisation d'agonistes sélectifs, de la thérapie génique par antisens, et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs du VEGF. Nous avons également déterminé que le corécepteur NRP-1 potentialise les effets du VEGF-A₁₆₅, un agoniste de VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1, sur la synthèse de PGI₂, en comparant avec la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₂₁, qui se lie seulement au VEGFR-1 et au VEGFR-2. De plus, nous avons utilisé une protéine recombinante, le GST-Exon-7, qui empêche la liaison du VEGF-A₁₆₅ à la NRP-1 [112]. Nous avons ainsi pu déterminer la contribution majeure que la NRP-1

joue dans la synthèse de la PGI₂. Finalement, nous avons déterminé, en comparant le VEGF-A₁₆₅, qui peut activer des hétérodimères VEGFR-1/R-2, avec le VEGF-C, qui active seulement des homodimères VEGFR-2/R-2, que les voies de signalisation activées par les hétérodimères sont similaires à celles des homodimères, mais lors des dernières étapes de la synthèse de prostaglandine I₂ (PGI₂), l'enzyme limitante, la PGI₂ synthase, subit une activation par dénitrosylation seulement lorsque les hétérodimères sont stimulés. Ce mécanisme de régulation est donc important pour permettre seulement au VEGF-A₁₆₅ d'effectuer la relâche de PGI₂ et donc de réguler finement la relaxation vasculaire et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.

3.1 Les récepteurs du VEGF impliqués dans la synthèse de PGI₂

Une seule étude a fait état jusqu'à présent de l'implication du VEGFR-2 dans la synthèse de PGI₂ dans les CE [96]. Cette étude démontrait que la synthèse de PGI₂ était fortement induite par le VEGF-A₁₆₅ (agoniste de VEGFR-1 et VEGFR-2), mais que le PlGF (agoniste de VEGFR-1), induisait une faible synthèse de PGI₂. Cependant, l'étude ne vérifiait pas l'implication spécifique des récepteurs VEGFR-2 ou de la NRP-1. Nous avons donc utilisé les analogues spécifiques des récepteurs du VEGF pour nous permettre de déterminer la contribution des récepteurs du VEGF sur la synthèse de PGI₂ dans les BAEC.

Tout d'abord, le VEGF-A₁₆₅ est l'analogue qui peut lier les trois types de récepteurs visés, soit le VEGFR-1, VEGFR-2 et NRP-1. En utilisant cet analogue,

nous avons donc obtenu une relâche maximale de prostacycline à 10^{-9} M dans un temps de 10 minutes. Étant donné que nous avons quantifié le métabolite stable de la PGI_2 , on s'aperçoit que la relâche de PGI_2 s'arrête après 10 minutes suivi d'un plateau jusqu'à 30 minutes, puisque le métabolite n'est pas dégradé. On constate donc, qu'après la stimulation des BAEC avec le VEGF- A_{165} , la synthèse de PGI_2 est rapide et transitoire. Lorsque nous sommes en présence d'une concentration de VEGF- A_{165} de 10^{-8} M il y a une diminution de la synthèse de prostacycline d'environ 50%. Cette diminution s'expliquerait par la saturation des récepteurs sous la forme monomérique, ce qui rend la dimérisation difficile. En effet, il est connu que pour de nombreux agonistes de récepteurs tyrosine kinase (PDGF-AB, bFGF, VEGF), leur réponse pharmacologique diminue lorsque leur concentration est supérieure à celle induisant l'effet maximal [113].

Le VEGF- A_{121} est l'isoforme du VEGF-A manquant la partie encodée par l'exon-7, appartenant au gène du VEGF. Ainsi, le VEGF- A_{121} ne recrute pas le corécepteur NRP-1 et peut uniquement se lier au VEGFR-1 et VEGFR-2. La stimulation dose-dépendante avec l'isoforme VEGF- A_{121} , nous a permis de constater une diminution de 43% de la synthèse de PGI_2 par rapport à celle induite par le VEGF- A_{165} à la concentration de 10^{-9} M, suggérant ainsi que la synthèse de PGI_2 supplémentaire induite par le VEGF- A_{165} pourrait être le résultat de sa capacité de liaison au corécepteur NRP-1. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé une protéine de fusion codant le fragment peptidique de l'exon 7, agissant ainsi comme un antagoniste de la NRP-1. Cette protéine de fusion dont la capacité

d'antagoniser la NRP-1 a déjà été démontrée [72, 112, 114], nous a permis de démontrer également la capacité de la NRP-1 à potentialiser la translocation de P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles dans les CE [49]. Dans notre étude, l'antagoniste GST-exon-7 a réduit la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅ jusqu'au niveau de synthèse induite par le VEGF-A₁₂₁. Ce résultat permet à nouveau de démontrer que la NRP-1 contribue à potentialiser l'activité biologique du VEGF-A₁₆₅, plus particulièrement dans le cas précis sur la relâche de PGI₂.

Suite à ces résultats, nous avons voulu déterminer lequel des récepteurs, VEGFR-1 ou VEGFR-2, est responsable de la synthèse de PGI₂. Afin d'effectuer cette distinction, nous avons utilisé des analogues spécifiques pour chaque récepteur. Ainsi, pour vérifier si l'activation du récepteur VEGFR-1 par ses analogues peut induire la synthèse de PGI₂, nous avons stimulé les BAEC avec les analogues spécifiques de VEGFR-1/R-1, soit le VEGF-B et le PlGF. Cependant, nous avons observé aucune augmentation significative de la synthèse de prostacycline, par rapport au niveau de base après 15 minutes. Ce résultat n'est pas inattendu, puisque le récepteur Flt (VEGFR-1) a été longuement caractérisé comme un récepteur de clairance [53, 115], n'ayant peu ou pas de capacité de signalisation intracellulaire. Cette absence de synthèse de PGI₂ suite à un traitement avec le PlGF ou le VEGF-B n'est pas attribuable à un manque de capacité d'induire des activités biologiques, puisque des études antérieures ont démontré que le PlGF et le VEGF-B peuvent induire la migration des monocytes et la relâche du facteur de croissance tissulaire

[47, 48]. De plus, nous avons démontré que le PlGF et le VEGF-B peuvent induire la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles [49].

Le VEGF-C a été utilisé comme activateur de VEGFR-2, afin de déterminer l'implication de ce récepteur dans la synthèse de PGI₂. Un traitement avec le VEGF-C pendant 15 minutes a eu le même effet que la stimulation avec les analogues de VEGFR-1. De plus, la phosphorylation du VEGFR-2 par le VEGF-C a été augmentée de 5,8 fois par rapport au niveau de base, ce qui est suffisant pour l'activation de son récepteur. Par conséquent, ce résultat était très inattendu, car le VEGFR-2 joue un rôle majeur dans la signalisation intracellulaire et implicitement, dans l'induction des activités biologiques induites par le VEGF [116, 117]. De plus, nous avons démontré dans des études antérieures la capacité du VEGF-C à induire diverses activités biologiques comme la prolifération, la migration des CE, la synthèse de PAF, la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles [49, 118]. Suite à ces résultats, nous avons essayé d'activer parallèlement le VEGFR-1 et le VEGFR-2, en combinant le PlGF ou le VEGF-B (analogues activant le VEGFR-1) avec le VEGF-C (analogue activant le VEGFR-2). Cependant, cette combinaison d'analogues a été inefficace dans l'augmentation de la synthèse de PGI₂ dans les BAEC. Ces résultats suggèrent donc, que les deux récepteurs du VEGF doivent être présents et être activés par un ligand unique, et nécessite l'activation des hétérodimères composés des sous-unités des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, ne pouvant être induite que par les isoformes du VEGF-A.

3.2 L'activation des hétérodimères des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 est nécessaire pour la synthèse de prostacycline

Nous avons observé que les récepteurs du VEGF peuvent former des hétérodimères de façon constitutive dans les BAEC, et qu'une stimulation avec des analogues du VEGF (VEGF-A ou VEGF-C) ne modifie pas la quantité de l'hétérodimère VEGFR-1/R-2 présente dans la cellule.

Afin de confirmer l'hypothèse que l'activation des hétérodimères VEGFR-1/R-2 est nécessaire pour la synthèse de PGI₂, nous avons conduit deux études, dans lesquelles nous avons vérifié l'effet de l'inhibition de chacun des récepteurs du VEGF sur la synthèse de PGI₂. Dans un premier temps, nous avons traité les CE avec des antisens dirigés contre l'ARNm des récepteurs du VEGFR-1 ou VEGFR-2. Cette approche a déjà été établie au préalable dans notre laboratoire et permet de bloquer de façon sélective l'expression protéique (>90%) des récepteurs ciblés [66]. Nous avons donc prétraité les cellules endothéliales de façon similaire avec les antisens dirigés contre l'ARNm de VEGFR-1 et VEGFR-2. De plus, un antisens avec une séquence dégénérée (*scrambled*) a été utilisé comme contrôle négatif. Les résultats ont été probants, car la synthèse de PGI₂ a été inhibée de 79% et 71% par les AS-VEGFR-1 et AS-VEGFR-2 respectivement, après stimulation avec le VEGF-A₁₆₅, alors qu'un traitement avec la séquence dégénérée n'a pas réduit de façon significative la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅.

Nous avons par la suite utilisé des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques contre l'activité tyrosine kinase du VEGFR-2 (SU1498) et de VEGFR-1 et VEGFR-

2 (VTK). Il est évident que la stimulation des CE au VEGF-A en présence du VTK a ramené la synthèse de PGI₂ au niveau basal, puisque les deux récepteurs du VEGF ont été inactivés. Cependant, un prétraitement avec le SU1498, qui bloque spécifiquement l'activité de VEGFR-2, a également permis d'inhiber de 96% la synthèse de PGI₂ induite par les isoformes du VEGF-A. Malheureusement, il n'existe pas d'inhibiteur pharmacologique spécifique contre le VEGFR-1, ce qui nous empêche de bloquer la contribution du VEGFR-1 par approche pharmacologique.

Ces résultats supportent donc notre hypothèse que l'activation de l'hétérodimère des récepteurs VEGFR-1/R-2 est nécessaire pour induire la synthèse de PGI₂ par les isoformes du VEGF-A. Notre conclusion à cet égard s'appuie sur le fait que nous avons utilisé une méthode active, en stimulant chacun des récepteurs du VEGF avec leurs ligands respectifs, et une méthode passive, en inhibant chacun des récepteurs avant de vérifier leur potentiel d'engendrer cette activité biologique. Les deux méthodes ont donné des résultats semblables, qui portent à l'évidence le besoin d'hétérodimérisation du VEGFR-1 et VEGFR-2 pour la synthèse de prostacycline dans les BAEC.

3.3 Voies de signalisation de la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅

Les voies de signalisation menant à la synthèse de la PGI₂ sont très différentes entre les types de CE et les stimuli utilisés pour son induction [96, 104,

119-121]. Une étude précédente impliquant le VEGF, a mené à la découverte de deux enzymes essentielles pour la relâche de PGI₂ : la cPLA₂ et la p42/44 MAPK [96]. Cependant, le type cellulaire utilisé était les HUVEC, qui sont des cellules endothéliales provenant du système veineux, alors que notre modèle provient du système artériel.

Afin de vérifier l'implication de différentes enzymes dans la synthèse de PGI₂ dans notre modèle, les BAEC, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques contre ces enzymes. Dans un premier temps, nous avons examiné l'implication de l'activation de la p42/44 MAPK et de la p38 MAPK. De façon similaire à l'étude publiée sur les HUVEC, la p42/44 MAPK est essentielle à la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A. Cependant, la p38 MAPK ne semble jouer aucun rôle dans la relâche de prostacycline dans les BAEC. D'autres agonistes, comme l'ET-1, l'EGF et l'Ang-II requièrent l'activation de la p38 MAPK pour la synthèse de prostacycline [104, 122]. La synthèse de PAF induite par le VEGF, qui passe par l'activation du VEGFR-2, requiert l'activation de la p42/44 MAPK ainsi que la p38 MAPK.

La synthèse de PGI₂ requiert une production nouvelle d'acide arachidonique provenant du clivage des lipides membranaires par les phospholipases A₂ [90]. La famille des PLA₂ est composée de plusieurs membres, mais dans notre cas, seulement deux isoformes des PLA₂ participent à la synthèse de PGI₂, la cPLA₂ et la sPLA₂ [119, 123, 124]. En utilisant des inhibiteurs spécifiques contre ces

phospholipases, nous avons observé, dans le cas de la cPLA₂, que son inhibition réduit de 86% la synthèse de PGI₂, alors que l'inhibition de la sPLA₂ n'a pas réduit de façon significative la relâche de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅. Ceci concorde avec l'étude précédente, dans laquelle la cPLA₂ exerçait un rôle majeur dans la synthèse de PGI₂ [96]. Nous remarquons encore une fois, que la synthèse de PGI₂ est différente de la synthèse de PAF, puisque cette dernière requiert l'activité de la sPLA₂-V, alors que l'activité de la cPLA₂ n'est pas requise [125].

3.4 Différences et similitudes entre la signalisation des récepteurs homodimères et hétérodimères du VEGF

Nous avons récemment démontré dans notre laboratoire, que la synthèse du *Platelet Activating Factor* (PAF), la migration et la prolifération des BAEC induites par le VEGF-A₁₆₅ sont dépendantes de l'activation de l'homodimère VEGFR-2/R-2, alors que l'activation de l'homodimère VEGFR-1/R-1 n'est pas impliquée et que l'hétérodimère n'est pas nécessaire [66]. Dans une étude ultérieure, nous avons démontré qu'un traitement avec le VEGF-C, un analogue du VEGFR-2, a augmenté la synthèse de PAF, la migration et la prolifération cellulaire. Il a aussi été démontré que la synthèse de PAF passe par l'activation de la p42/44 MAPK et la p38 MAPK [126], démontrant ainsi que le VEGF-C active ces deux cascades enzymatiques. Dans notre étude, nous avons confirmé la capacité du VEGF-C à induire l'activation de la p38 et p42/44 MAPK et également sa capacité d'induire la phosphorylation de la cPLA₂, et ce, en moins de 5 minutes après traitement. Toutes les voies de

signalisation menant à la relâche d'AA sont donc semblables entre les récepteurs homodimères (VEGFR-2/R-2) et hétérodimères (VEGFR-1/R-2) du VEGF.

Toutefois, la synthèse de PGI₂ est absente lors de la stimulation des BAEC avec le VEGF-C, ce qui suggère que la signalisation en aval des récepteurs hétérodimériques VEGFR-1/R-2 et des homodimères VEGFR-2/R-2 est différente lors de la transformation de l'AA en PGI₂. Deux enzymes de transformation participent à la formation de prostacycline à partir d'AA, la COX et la PGI₂ synthase. La COX a deux isoformes, dont un constitutif, COX-1, et un inductible, COX-2. La COX-2 peut seulement être induite après un minimum de deux heures de stimulation par un agoniste [92, 127], alors que la synthèse de PGI₂ dans notre étude atteint un plateau après seulement 10 minutes de stimulation au VEGF-A. De plus, nos analyses par immunobuvardage de type Western démontrent uniquement la présence de la COX-1. Par conséquent, seulement la COX-1 est impliquée dans ce processus. Nous avons donc la certitude que la COX-1 est impliquée dans la production de PGI₂ induite par le VEGF-A, mais dans le cas du VEGF-C, il est impossible de déterminer si l'activité de la COX-1 est inhibée, puisque le produit final, la PGI₂, n'est pas augmenté par rapport au niveau de base. Nous nous sommes donc intéressé à la PGI₂ synthase et à sa régulation par le VEGF-A et le VEGF-C. Récemment, un nouveau mode de régulation négative a été découvert pour la PGI₂ synthase, la S-nitrosylation, qui inhibe l'activité de cette dernière [107, 128]. Nous avons donc testé la nitrosylation de la PGI₂ synthase en présence de VEGF-A₁₆₅ et VEGF-C et nous avons observé deux phénomènes concordant avec l'hypothèse de l'implication majeure de la PGI₂ synthase dans la synthèse de prostacycline.

Premièrement, la PGI₂ synthase est nitrosylée au niveau basal, ceci pouvant expliquer le faible niveau basal de relâche de PGI₂ en absence de stimulation. Deuxièmement, le VEGF-A₁₆₅ a provoqué une baisse rapide et transitoire (5 et 10 minutes) de la S-nitrosylation de 30% par rapport au niveau de base, tandis que le VEGF-C n'a eu aucun effet sur la S-dénitrosylation de la PGI₂ synthase. Cette dénitrosylation a donc pour effet de permettre à la PGI₂ synthase d'être active suite à la stimulation au VEGF-A₁₆₅. Le VEGF-C n'a pas cette capacité, résultant en son incapacité de permettre la conversion de la PGH₂ en PGI₂.

4.0 CONCLUSION

Cette étude est la première à démontrer la nécessité de l'hétérodimérisation des récepteurs du VEGF pour engendrer une activité biologique, en l'occurrence la synthèse de PGI₂. Grâce à des techniques variées, en utilisant la thérapie génique par antisens, l'inhibition pharmacologique des récepteurs du VEGF ainsi que la stimulation avec des analogues spécifiques à chaque récepteur, nous avons été en mesure de démontrer la nécessité d'activer les hétérodimères de VEGFR-1 et VEGFR-2 pour la synthèse de PGI₂. De plus, nous avons démontré les effets de potentialisation du corécepteur NRP-1, en comparant la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅ par rapport au VEGF-A₁₂₁, mais également via l'utilisation d'un antagoniste de la NRP-1 qui a réduit la relâche de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅ au niveau de celui induit par le VEGF-A₁₂₁. Par la suite, nous avons élucidé la voie de signalisation menant à la synthèse de PGI₂. En effet, la p42/44 MAPK et la cPLA₂ jouent des rôles majeurs dans la synthèse de PGI₂ induite par le VEGF-A₁₆₅. Finalement, la distinction entre les voies de signalisation induites par les récepteurs homo- et hétérodimériques réside dans la capacité du VEGF-A₁₆₅ d'induire la dénitrosylation de la PGI₂ synthase, alors que l'activation homodimérique (VEGFR-2/R-2) par le VEGF-C n'a pu induire cette activité.

En conclusion, cette étude ajoute un élément nouveau quant à la régulation sélective de la maintenance de l'intégrité et du tonus vasculaire par les membres de la famille du VEGF et leur récepteurs correspondants.

5.0 RÉFÉRENCES

1. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. **11**: 73-91.
2. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis*. Cancer Treat Res, 2004. **117**: 3-32.
3. Patan, S., *Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling*. J Neurooncol, 2000. **50**: 1-15.
4. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**: 671-4.
5. Rogers, P.A. and C.E. Gargett, *Endometrial angiogenesis*. Angiogenesis, 1998. **2**: 287-94.
6. Torry, D.S. and R.J. Torry, *Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta*. Am J Reprod Immunol, 1997. **37**: 21-9.
7. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. **235**: 442-7.
8. Gospodarowicz, D., *Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary*. J Biol Chem, 1975. **250**: 2515-20.
9. Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, and H.F. Dvorak, *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**: 983-5.
10. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**: 851-8.

11. Bates, D.O. and F.E. Curry, *Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway*. Am J Physiol, 1997. **273**: H687-94.
12. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**: 1650-9.
13. Connolly, D.T., D.M. Heuvelman, R. Nelson, J.V. Olander, B.L. Eppley, J.J. Delfino, N.R. Siegel, R.M. Leimgruber, and J. Feder, *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. J Clin Invest, 1989. **84**: 1470-8.
14. Unemori, E.N., N. Ferrara, E.A. Bauer, and E.P. Amento, *Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells*. J Cell Physiol, 1992. **153**: 557-62.
15. Camussi, G., G. Montrucchio, E. Lupia, A. De Martino, L. Perona, M. Arese, A. Vercellone, A. Toniolo, and F. Bussolino, *Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism*. J Immunol, 1995. **154**: 6492-501.
16. Bussolino, F. and G. Camussi, *Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties*. Eur J Biochem, 1995. **229**: 327-37.
17. Sirois, M.G. and E.R. Edelman, *VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor*. Am J Physiol, 1997. **272**: H2746-56.

18. Tischer, E., D. Gospodarowicz, R. Mitchell, M. Silva, J. Schilling, K. Lau, T. Crisp, J.C. Fiddes, and J.A. Abraham, *Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **165**: 1198-206.
19. Poltorak, Z., T. Cohen, R. Sivan, Y. Kandelis, G. Spira, I. Vlodaysky, E. Keshet, and G. Neufeld, *VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix*. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 7151-8.
20. Houck, K.A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D.W. Leung, *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*. *Mol Endocrinol*, 1991. **5**: 1806-14.
21. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**: 1317-26.
22. Houck, K.A., D.W. Leung, A.M. Rowland, J. Winer, and N. Ferrara, *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms*. *J Biol Chem*, 1992. **267**: 26031-7.
23. Plouet, J., F. Moro, S. Bertagnolli, N. Coldeboeuf, H. Mazarguil, S. Clamens, and F. Bayard, *Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect*. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 13390-6.

24. Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz, and D.T. Shima, *Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis*. Genes Dev, 2002. **16**: 2684-98.
25. Carmeliet, P., Y.S. Ng, D. Nuyens, G. Theilmeier, K. Brusselmans, I. Cornelissen, E. Ehler, V.V. Kakkar, I. Stalmans, V. Mattot, J.C. Perriard, M. Dewerchin, W. Flameng, A. Nagy, F. Lupu, L. Moons, D. Collen, P.A. D'Amore, and D.T. Shima, *Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188*. Nat Med, 1999. **5**: 495-502.
26. Grunstein, J., J.J. Masbad, R. Hickey, F. Giordano, and R.S. Johnson, *Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature*. Mol Cell Biol, 2000. **20**: 7282-91.
27. Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M.G. Persico, *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**: 9267-71.
28. Olofsson, B., K. Pajusola, A. Kaipainen, G. von Euler, V. Joukov, O. Saksela, A. Orpana, R.F. Pettersson, K. Alitalo, and U. Eriksson, *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**: 2576-81.
29. Chilov, D., E. Kukk, S. Taira, M. Jeltsch, J. Kaukonen, A. Palotie, V. Joukov, and K. Alitalo, *Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C*. J Biol Chem, 1997. **272**: 25176-83.

30. Olofsson, B., M. Jeltsch, U. Eriksson, and K. Alitalo, *Current biology of VEGF-B and VEGF-C*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999. **10**: 528-35.
31. Lyttle, D.J., K.M. Fraser, S.B. Fleming, A.A. Mercer, and A.J. Robinson, *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus*. *J Virol*, 1994. **68**: 84-92.
32. Belgore, F., A. Blann, D. Neil, A.S. Ahmed, and G.Y. Lip, *Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries*. *J Clin Pathol*, 2004. **57**: 266-72.
33. Enholm, B., L. Jussila, M. Karkkainen, and K. Alitalo, *Vascular endothelial growth factor-C; a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells*. *Trends Cardiovasc Med*, 1998. **8**: 292-7.
34. Kendall, R.L., G. Wang, and K.A. Thomas, *Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **226**: 324-8.
35. Huang, K., C. Andersson, G.M. Roomans, N. Ito, and L. Claesson-Welsh, *Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001. **33**: 315-24.
36. Dixelius, J., T. Makinen, M. Wirzenius, M.J. Karkkainen, C. Wernstedt, K. Alitalo, and L. Claesson-Welsh, *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. *J Biol Chem*, 2003. **278**: 40973-9.

37. de Vries, C., J.A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L.T. Williams, *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992. **255**: 989-91.
38. Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M.L. Breitman, *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**: 66-70.
39. Hiratsuka, S., O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya, *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**: 9349-54.
40. Clark, D.E., S.K. Smith, Y. He, K.A. Day, D.R. Licence, A.N. Corps, R. Lammoglia, and D.S. Charnock-Jones, *A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation*. Biol Reprod, 1998. **59**: 1540-8.
41. Fong, G.H., J. Klingensmith, C.R. Wood, J. Rossant, and M.L. Breitman, *Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium*. Dev Dyn, 1996. **207**: 1-10.
42. Fong, G.H., L. Zhang, D.M. Bryce, and J. Peng, *Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice*. Development, 1999. **126**: 3015-25.
43. Cross, M.J., J. Dixelius, T. Matsumoto, and L. Claesson-Welsh, *VEGF-receptor signal transduction*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**: 488-94.

44. Sawano, A., T. Takahashi, S. Yamaguchi, and M. Shibuya, *The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **238**: 487-91.
45. Ito, N., C. Wernstedt, U. Engstrom, and L. Claesson-Welsh, *Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 23410-8.
46. Cunningham, S.A., M.N. Waxham, P.M. Arrate, and T.A. Brock, *Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding*. *J Biol Chem*, 1995. **270**: 20254-7.
47. Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H.A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme, *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. *Blood*, 1996. **87**: 3336-43.
48. Suzuma, K., K. Naruse, I. Suzuma, N. Takahara, K. Ueki, L.P. Aiello, and G.L. King, *Vascular endothelial growth factor induces expression of connective tissue growth factor via KDR, Flt1, and phosphatidylinositol 3-kinase-akt-dependent pathways in retinal vascular cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**: 40725-31.

49. Rollin, S., C. Lemieux, R. Maliba, J. Favier, L.R. Villeneuve, B.G. Allen, S. Soker, N.G. Bazan, Y. Merhi, and M.G. Sirois, *VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis*. *Blood*, 2004. **103**: 3789-97.
50. Xia, P., L.P. Aiello, H. Ishii, Z.Y. Jiang, D.J. Park, G.S. Robinson, H. Takagi, W.P. Newsome, M.R. Jirousek, and G.L. King, *Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth*. *J Clin Invest*, 1996. **98**: 2018-26.
51. Huang, Q. and Y. Yuan, *Interaction of PKC and NOS in signal transduction of microvascular hyperpermeability*. *Am J Physiol*, 1997. **273**: H2442-51.
52. Terman, B.I., M. Dougher-Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, and P. Bohlen, *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **187**: 1579-86.
53. Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C.H. Heldin, *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**: 26988-95.
54. Joukov, V., K. Pajusola, A. Kaipainen, D. Chilov, I. Lahtinen, E. Kukk, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo, *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases*. *Embo J*, 1996. **15**: 1751.

55. Meyer, M., M. Clauss, A. Lepple-Wienhues, J. Waltenberger, H.G. Augustin, M. Ziche, C. Lanz, M. Buttner, H.J. Rziha, and C. Dehio, *A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases*. *Embo J*, 1999. **18**: 363-74.
56. Joukov, V., T. Sorsa, V. Kumar, M. Jeltsch, L. Claesson-Welsh, Y. Cao, O. Saksela, N. Kalkkinen, and K. Alitalo, *Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C*. *Embo J*, 1997. **16**: 3898-911.
57. Achen, M.G., M. Jeltsch, E. Kukk, T. Makinen, A. Vitali, A.F. Wilks, K. Alitalo, and S.A. Stacker, *Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4)*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**: 548-53.
58. Shalaby, F., J. Ho, W.L. Stanford, K.D. Fischer, A.C. Schuh, L. Schwartz, A. Bernstein, and J. Rossant, *A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis*. *Cell*, 1997. **89**: 981-90.
59. Hidaka, M., W.L. Stanford, and A. Bernstein, *Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the in vitro generation of early hematopoietic cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**: 7370-5.
60. Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya, *A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells*. *Embo J*, 2001. **20**: 2768-78.

61. Ratcliffe, K.E., Q. Tao, B. Yavuz, K.V. Stoletov, S.C. Spring, and B.I. Terman, *Sck is expressed in endothelial cells and participates in vascular endothelial growth factor-induced signaling*. *Oncogene*, 2002. **21**: 6307-16.
62. Wu, L.W., L.D. Mayo, J.D. Dunbar, K.M. Kessler, O.N. Ozes, R.S. Warren, and D.B. Donner, *VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**: 6059-62.
63. Lamalice, L., F. Houle, G. Jourdan, and J. Huot, *Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38*. *Oncogene*, 2004. **23**: 434-45.
64. He, H., V.J. Venema, X. Gu, R.C. Venema, M.B. Marrero, and R.B. Caldwell, *Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src*. *J Biol Chem*, 1999. **274**: 25130-5.
65. Gelinas, D.S., P.N. Bernatchez, S. Rollin, N.G. Bazan, and M.G. Sirois, *Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**: 1021-30.
66. Bernatchez, P.N., S. Soker, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent*. *J Biol Chem*, 1999. **274**: 31047-54.

67. Gitay-Goren, H., S. Soker, I. Vlodaysky, and G. Neufeld, *The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules*. J Biol Chem, 1992. **267**: 6093-8.
68. Miao, H.Q., S. Soker, L. Feiner, J.L. Alonso, J.A. Raper, and M. Klagsbrun, *Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165*. J Cell Biol, 1999. **146**: 233-42.
69. Neufeld, G., T. Cohen, N. Shraga, T. Lange, O. Kessler, and Y. Herzog, *The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis*. Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**: 13-9.
70. Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi, and H. Fujisawa, *A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation*. Development, 1999. **126**: 4895-902.
71. Yuan, L., D. Moyon, L. Pardanaud, C. Breant, M.J. Karkkainen, K. Alitalo, and A. Eichmann, *Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice*. Development, 2002. **129**: 4797-806.
72. Soker, S., S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun, *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**: 735-45.
73. Wang, L., H. Zeng, P. Wang, S. Soker, and D. Mukhopadhyay, *Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration*. J Biol Chem, 2003. **278**: 48848-60.

74. Dumont, D.J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman, and K. Alitalo, *Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3*. *Science*, 1998. **282**: 946-9.
75. Hamada, K., Y. Oike, N. Takakura, Y. Ito, L. Jussila, D.J. Dumont, K. Alitalo, and T. Suda, *VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis*. *Blood*, 2000. **96**: 3793-800.
76. He, Y., K. Kozaki, T. Karpanen, K. Koshikawa, S. Yla-Herttuala, T. Takahashi, and K. Alitalo, *Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**: 819-25.
77. Skobe, M., T. Hawighorst, D.G. Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco, L. Riccardi, K. Alitalo, K. Claffey, and M. Detmar, *Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis*. *Nat Med*, 2001. **7**: 192-8.
78. Padera, T.P., A. Kadambi, E. di Tomaso, C.M. Carreira, E.B. Brown, Y. Boucher, N.C. Choi, D. Mathisen, J. Wain, E.J. Mark, L.L. Munn, and R.K. Jain, *Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics*. *Science*, 2002. **296**: 1883-6.
79. Witmer, A.N., J. Dai, H.A. Weich, G.F. Vrensen, and R.O. Schlingemann, *Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia*. *J Histochem Cytochem*, 2002. **50**: 767-77.

80. Makinen, T., T. Veikkola, S. Mustjoki, T. Karpanen, B. Catimel, E.C. Nice, L. Wise, A. Mercer, H. Kowalski, D. Kerjaschki, S.A. Stacker, M.G. Achen, and K. Alitalo, *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. *Embo J*, 2001. **20**: 4762-73.
81. Pajusola, K., O. Aprelikova, G. Pelicci, H. Weich, L. Claesson-Welsh, and K. Alitalo, *Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors*. *Oncogene*, 1994. **9**: 3545-55.
82. Meyer, R.D. and N. Rahimi, *Comparative structure-function analysis of VEGFR-1 and VEGFR-2: What have we learned from chimeric systems?* *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **995**: 200-7.
83. Autiero, M., J. Waltenberger, D. Communi, A. Kranz, L. Moons, D. Lambrechts, J. Kroll, S. Plaisance, M. De Mol, F. Bono, S. Kliche, G. Fellbrich, K. Ballmer-Hofer, D. Maglione, U. Mayr-Beyrle, M. Dewerchin, S. Dombrowski, D. Stanimirovic, P. Van Hummelen, C. Dehio, D.J. Hicklin, G. Persico, J.M. Herbert, D. Communi, M. Shibuya, D. Collen, E.M. Conway, and P. Carmeliet, *Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1*. *Nat Med*, 2003. **9**: 936-43.
84. Lincoln, T.M., N. Dey, and H. Sellak, *Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression*. *J Appl Physiol*, 2001. **91**: 1421-30.

85. Popescu, L.M., C. Panoiu, M. Hinescu, and O. Nutu, *The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle*. Eur J Pharmacol, 1985. **107**: 393-4.
86. Spencer, A.G., J.W. Woods, T. Arakawa, Singer, II, and W.L. Smith, *Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy*. J Biol Chem, 1998. **273**: 9886-93.
87. Wise, H., *Multiple signalling options for prostacyclin*. Acta Pharmacol Sin, 2003. **24**: 625-30.
88. Hatae, T., M. Wada, C. Yokoyama, M. Shimonishi, and T. Tanabe, *Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta*. J Biol Chem, 2001. **276**: 46260-7.
89. Gijon, M.A. and C.C. Leslie, *Phospholipases A2*. Semin Cell Dev Biol, 1997. **8**: 297-303.
90. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **68-69**: 3-58.
91. Balsinde, J. and E.A. Dennis, *Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2*. J Biol Chem, 1997. **272**: 16069-72.
92. Tamura, M., S. Sebastian, B. Gurates, S. Yang, Z. Fang, and S.E. Bulun, *Vascular endothelial growth factor up-regulates cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**: 3504-7.

93. Schwab, J.M., H.J. Schluesener, R. Meyermann, and C.N. Serhan, *COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**: 339-43.
94. Simmons, D.L., *Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine.* Thromb Res, 2003. **110**: 265-8.
95. Chandrasekharan, N.V., H. Dai, K.L. Roos, N.K. Evanson, J. Tomsik, T.S. Elton, and D.L. Simmons, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**: 13926-31.
96. Wheeler-Jones, C., R. Abu-Ghazaleh, R. Cospedal, R.A. Houliston, J. Martin, and I. Zachary, *Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase.* FEBS Lett, 1997. **420**: 28-32.
97. Uracz, W., D. Uracz, R. Olszanecki, and R.J. Gryglewski, *Interleukin 1beta induces functional prostaglandin E synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells.* J Physiol Pharmacol, 2002. **53**: 643-54.
98. Camacho, M., J. Lopez-Belmonte, and L. Vila, *Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity.* Circ Res, 1998. **83**: 353-65.
99. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, *Cyclooxygenases 1 and 2.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: 97-120.

100. Bunting, S., S. Moncada, and J.R. Vane, *The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications*. Br Med Bull, 1983. **39**: 271-6.
101. Moncada, S., *Prostacyclin and arterial wall biology*. Arteriosclerosis, 1982. **2**: 193-207.
102. Gryglewski, R.J., R.M. Botting, and J.R. Vane, *Mediators produced by the endothelial cell*. Hypertension, 1988. **12**: 530-48.
103. Frias, M.A., F. Dubouloz, M.C. Rebsamen, and U. Lang, *Prostacyclin production in rat aortic smooth muscle cells: role of protein kinase C, phospholipase D and cyclooxygenase-2 expression*. Cardiovasc Res, 2003. **60**: 438-46.
104. Rebsamen, M.C., R. Capoccia, M.B. Vallotton, and U. Lang, *Role of cyclooxygenase 2, p38 and p42/44 MAPK in the secretion of prostacyclin induced by epidermal growth factor, endothelin-1 and angiotensin II in rat ventricular cardiomyocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**: 81-9.
105. Paul, B.Z., B. Ashby, and S.B. Sheth, *Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells*. Br J Haematol, 1998. **102**: 1204-11.
106. Bos, C.L., D.J. Richel, T. Ritsema, M.P. Peppelenbosch, and H.H. Versteeg, *Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**: 1187-205.
107. Stamler, J.S., S. Lamas, and F.C. Fang, *Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism*. Cell, 2001. **106**: 675-83.

108. Venugopal, S.K., S. Devaraj, and I. Jialal, *C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells*. *Circulation*, 2003. **108**: 1676-8.
109. Ravi, K., L.A. Brennan, S. Levic, P.A. Ross, and S.M. Black, *S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**: 2619-24.
110. Cai, J., S. Ahmad, W.G. Jiang, J. Huang, C.D. Kontos, M. Boulton, and A. Ahmed, *Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells*. *Diabetes*, 2003. **52**: 2959-68.
111. Clauss, M., H. Weich, G. Breier, U. Knies, W. Rockl, J. Waltenberger, and W. Risau, *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis*. *J Biol Chem*, 1996. **271**: 17629-34.
112. Soker, S., S. Gollamudi-Payne, H. Fidder, H. Charmahelli, and M. Klagsbrun, *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165*. *J Biol Chem*, 1997. **272**: 31582-8.
113. Gruber, B.L., M.J. Marchese, and R. Kew, *Angiogenic factors stimulate mast-cell migration*. *Blood*, 1995. **86**: 2488-93.

114. Soker, S., H. Fidder, G. Neufeld, and M. Klagsbrun, *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain*. J Biol Chem, 1996. **271**: 5761-7.
115. Clauss, M., *Functions of the VEGF Receptor-1 (FLT-1) in the Vasculature*. Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**: 241-5.
116. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**: 669-76.
117. Kliche, S. and J. Waltenberger, *VEGF receptor signaling and endothelial function*. IUBMB Life, 2001. **52**: 61-6.
118. Bernatchez, P.N., S. Rollin, S. Soker, and M.G. Sirois, *Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1*. J Cell Biochem, 2002. **85**: 629-39.
119. Houliston, R.A., J.D. Pearson, and C.P. Wheeler-Jones, *Agonist-specific cross talk between ERKs and p38(mapk) regulates PGI(2) synthesis in endothelium*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**: C1266-76.
120. Houliston, R.A. and C.P. Wheeler-Jones, *sPLA(2) cooperates with cPLA(2)alpha to regulate prostacyclin synthesis in human endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **287**: 881-7.
121. Merhi-Soussi, F., Z. Dominguez, O. Macovschi, M. Dubois, G. Nemoz, M. Lagarde, and A.F. Prigent, *Mechanisms involved in the stimulation of prostacyclin synthesis by human lymphocytes in human umbilical vein endothelial cells*. Br J Pharmacol, 2003. **139**: 321-8.

122. Norata, G.D., E. Callegari, H. Inoue, and A.L. Catapano, *HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**: 871-7.
123. Hara, S., I. Kudo, and K. Inoue, *Augmentation of prostaglandin E2 production by mammalian phospholipase A2 added exogenously*. *J Biochem (Tokyo)*, 1991. **110**: 163-5.
124. Hernandez, M., S.L. Burillo, M.S. Crespo, and M.L. Nieto, *Secretory phospholipase A2 activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A2 in the human astrocytoma cell line 1321N1*. *J Biol Chem*, 1998. **273**: 606-12.
125. Bernatchez, P.N., M.V. Winstead, E.A. Dennis, and M.G. Sirois, *VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**: 197-205.
126. Bernatchez, P.N., B.G. Allen, D.S. Gelinas, G. Guillemette, and M.G. Sirois, *Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways*. *Br J Pharmacol*, 2001. **134**: 1253-62.
127. Caughey, G.E., L.G. Cleland, J.R. Gamble, and M.J. James, *Up-regulation of endothelial cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. Role of thromboxane A2*. *J Biol Chem*, 2001. **276**: 37839-45.

128. Jaffrey, S.R., H. Erdjument-Bromage, C.D. Ferris, P. Tempst, and S.H. Snyder, *Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide*. Nat Cell Biol, 2001. **3**: 193-7.



Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification

Paul-Eduard Neagoe
Département de pharmacologie, Faculté de médecine

2. Description de l'article

Titre : VEGF-A₁₆₅-induced prostacyclin synthesis requires the heterodimerization of VEGFR-1 and VEGFR-2

Liste des auteurs : Neagoe Paul-Eduard, Caroline Lemieux, Martin G. Sirois

Soumission à la revue : « Journal of Biological Chemistry », Octobre 2004

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Paul-Eduard Neagoe inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre La synthèse de prostacycline induite par le VEGF-A₁₆₅ requiert l'hétérodimerisation des récepteurs du VEGF

Caroline Lemieux
Coauteur

26/10/04
Date

Martin G. Sirois
Coauteur

26/10/04
Date