

Université de Montréal

Régulation intracellulaire du VEGFR-2 menant à l'activation d'eNOS dans les
cellules endothéliales

Par

Martine Duval

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade
de Philosophia Doctorae (Ph.D.) en pharmacologie

Juin, 2007

©, Martine Duval, 2007



W

4

258

2007

v. 111

Direction des bibliothèques

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

Cette thèse intitulée :
Régulation intracellulaire du VEGFR-2 menant à l'activation d'eNOS dans les
cellules endothéliales

présentée par :
Martine Duval

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Audrey Claing
Président-rapporteur

Dr Jean-Philippe Gratton
Directeur de recherche

Dr Christian Beauséjour
Membre du jury

Dre Josée Lavoie
Examineur externe

RÉSUMÉ

Le VEGF est un facteur essentiel lors du développement de vaisseaux sanguins en favorisant la prolifération, la survie, la différenciation, la migration et la libération du monoxyde d'azote (NO) des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont intimement impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse), le contrôle du tonus vasculaire ainsi que dans l'homéostasie vasculaire générale. L'étude de la signalisation induite par des facteurs de croissances dans les cellules endothéliales est donc un élément clé de la biologie vasculaire. Le VEGF agit via l'activation de 3 récepteurs de type tyrosine kinase (RTK); VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Le récepteur VEGFR-2 est principalement responsable des effets physiologiques du VEGF au niveau des cellules endothéliales. La régulation de la cascade des tyrosines kinases est donc une étape critique de la réponse au VEGF qui doit être hautement contrôlée. Ainsi, les objectifs de la présente étude sont d'identifier les événements moléculaires qui régulent négativement le VEGFR-2 et de déterminer quelles sont les conséquences de ce contrôle sur la signalisation endothéliale du VEGF.

Nos travaux dévoilent que le VEGFR-2 est ubiquitinilé par l'ubiquitine ligase c-Cbl et subséquemment dégradé suite à une stimulation au VEGF. c-Cbl est donc un régulateur négatif de la signalisation intracellulaire du VEGFR-2 et ceci se traduit par une baisse de la production du monoxyde d'azote stimulée par le VEGF. Par conséquent, nous avons constaté que l'inhibition de l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl, par l'expression du mutant 70Z/3-Cbl, entraîne une hausse de l'activité angiogénique du VEGF.

Par surcroît, nous démontrons que le VEGF provoque l'internalisation du VEGFR-2 sous l'activité de la dynamine. L'endocytose du récepteur est essentielle à l'activation de la kinase Akt, à la relâche de NO et la phosphorylation de la tyrosine 300 de la chaperone HSP90. Nous avons identifié la kinase c-Src comme étant responsable de cette phosphorylation. De plus, la phosphorylation de la tyrosine 300 d'HSP90 est impliquée dans l'association de celle-ci à eNOS permettant ainsi une libération adéquate de NO des cellules endothéliales en réponse à une stimulation au VEGF.

Ces résultats apportent des éléments nouveaux qui facilitent la compréhension des événements intracellulaires qui mènent à une signalisation spécifique et à la régulation négative des effets angiogéniques du VEGF. Par le fait même ces observations, ouvrent la voie à de nouvelles approches thérapeutiques anti- ou pro-angiogéniques dans le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Mots clés : cellules endothéliales, VEGF, angiogenèse, eNOS, c-Cbl, HSP90, internalisation, ubiquitination.

SUMMARY

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent proangiogenic factor implicated in endothelial cells proliferation, survival, differentiation, migration and nitric oxide (NO) release. Endothelial cells are responsible for the formation of new blood vessels and vascular tone homeostasis. Thus, growth factor signalling is a key event in vascular biology. VEGF specifically activates 3 receptor tyrosine kinases (RTK) namely, VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3. Most physiological actions of VEGF are mediated through the activation of VEGFR-2 in endothelial cells. Regulation of VEGF signalling is a critical step which must be tightly controlled. Thus, the aims of this study are to identify molecular events which negatively regulate VEGFR-2 and to determine the consequences of this regulation on VEGF signalling in endothelial cells.

Our work shows that VEGFR-2 is ubiquitinated by the ubiquitin ligase c-Cbl and this results in the degradation of the VEGFR-2 following VEGF treatment. Thus, c-Cbl is a negative regulator of VEGFR-2-mediated signalling resulting in a decrease of NO production after VEGF stimulation. We also observed that 70Z/3-Cbl mutant expression inhibits c-Cbl ubiquitin ligase activity and consequently this leads to an increase of VEGF angiogenic activity.

In addition, we demonstrate that VEGF induces a dynamin-dependent internalization of VEGFR-2. VEGFR-2 endocytosis is required for Akt activation, NO production and phosphorylation of tyrosine 300 of HSP90. We identify that VEGF-dependent activation of c-Src kinase is responsible for this phosphorylation event on HSP90. Phosphorylation of tyrosine 300 is also implicated in the binding

of HSP90 to eNOS which is essential for the proper VEGF-stimulated NO release from endothelial cells.

These results bring new elements which contribute to the understanding of intracellular events occurring for specialized signalling and negative regulation of VEGF angiogenic properties. In this regards, these observations could lead to new anti or proangiogenic approaches for the treatment of cancer or cardiovascular diseases.

Key words: endothelial cells, VEGF, angiogenesis, eNOS, c-Cbl, HSP90, internalization, ubiquitination.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
SUMMARY	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xv
CHAPITRE 1	
1. Introduction	1
1.1 Le VEGF et la formation des vaisseaux sanguins	2
1.1.1 Historique	2
1.1.2 Les vaisseaux sanguins	3
1.1.3 Structure des vaisseaux sanguins	4
1.1.4 Cellules endothéliales	6
1.1.5 Formation du réseau vasculaire	8
1.1.5.1 La vasculogénèse	8
1.1.5.2 L'angiogénèse	11
1.1.5.2.1 Modulation du processus angiogénique	14
1.1.5.2.2 L'angiogénèse et le cancer	15
1.1.5.2.3 La thérapie anti-angiogénique et l'angiogénèse thérapeutique	15
1.2 Le VEGF et ses récepteurs	17
1.2.1 Les isoformes du VEGF	18
1.2.2 Régulation de l'expression génique du VEGF	20
1.2.3 Les récepteurs du VEGF et leur signalisation	22
1.2.3.1 VEGFR-1	23

1.2.3.2 VEGFR-3	24
1.2.3.3 VEGFR-2	25
1.2.3.3.1 Modulation de l'activité du VEGFR-2	29
1.3 Monoxyde d'azote (NO)	32
1.3.1 Les synthèses du monoxyde d'azote	32
1.3.2 La synthèse endothéliale du monoxyde d'azote	33
1.3.3 La biosynthèse du NO au niveau de l'endothélium	35
1.3.4 La régulation de l'enzyme eNOS	36
1.3.4.1 La régulation de l'expression génique d'eNOS	37
1.3.4.2 Régulation de la stabilité de l'ARNm d'eNOS	37
1.3.4.3 Régulation d'eNOS par le calcium intracellulaire (complexe Ca ²⁺ /Calmoduline)	38
1.3.4.4 Régulations d'eNOS par des modifications post- traductionnelles	39
1.3.4.4.1 Régulation d'eNOS par acylation	39
1.3.4.4.2 Régulation d'eNOS par phosphorylation	40
1.3.4.5 Régulation par interactions protéine-protéine	42
1.3.4.5.1 Cavéoline-1	42
1.3.4.5.2 Récepteur couplé aux protéines G (GPCR)	44
1.3.4.5.3 Protéine interagissant avec eNOS (NOSIP)	44
1.3.4.5.4 Dynamine-2	45
1.3.4.5.5 Protéine de choc thermique 90 (HSP90)	45
1.3.4 Implication du NO dans les propriétés biologiques du VEGF	48
1.3.5.1 Rôle du NO dans la prolifération des cellules endothéliales stimulée par le VEGF	49
1.3.5.2 Rôle du NO dans la survie des cellules endothéliales stimulée par le VEGF	49
1.3.4.3 Rôle du NO dans la migration des cellules endothéliales stimulée par le VEGF	50
1.3.4.4 Rôle du NO dans la perméabilité vasculaire stimulée par le VEGF	52

1.4 Régulation de l'activité des récepteurs de type tyrosine kinase	52
1.4.1 Principes de base de l'internalisation	53
1.4.2 Principes de base de l'ubiquitination	55
1.4.2.1 Ubiquitination des récepteurs de type tyrosine kinase par l'enzyme E3 c-Cbl	60
1.5 Objectifs de la thèse	65

CHAPITRE 2

2. Article1: Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk- 1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination: consequences on nitric oxide production from endothelial cells.	68
2.1 Abstract	71
2.2 Introduction	73
2.3 Experimental procedures	75
2.4 Results	78
2.5 Discussion	85
2.6 Acknowledgements	89
2.7 References	89
2.8 Figure legends	94
2.9 Figures	98

CHAPITRE 3

3. Conséquences de l'inhibition de la fonction ubiquitine ligase de c-Cbl sur la signalisation endothéliale du VEGF	104
3.1 Résultats	105
3.2 Matériel et méthodes	113
3.3 Légendes des figures	115
3.4 Figures	118

CHAPITRE 4

4. Article 2 : Src-mediated phosphorylation of HSP90 in response to VEGF is required for VEGF receptor-2 signaling to eNOS	123
4.1 Abstract	127
4.2 Introduction	128
4.3 Materials and methods	130
4.4 Results	135
4.5 Discussion	145
4.6 Acknowledgements	150
4.7 References	151
4.8 Figure legends	157
4.9 Figures and supplementary information	161

CHAPITRE 5

5. Discussion	172
5.1 Ubiquitination des RTKs par c-Cbl	173
5.1.1 Ubiquitination du VEGFR-1 par c-Cbl	174
5.1.2 Ubiquitination du VEGFR-2 par c-Cbl	174
5.2 Régulation négative du VEGFR-2 par c-Cbl	177
5.3 Internalisation du VEGFR-2	179
5.4 c-Cbl et HSP90 collaborateurs ou adversaires?	185

CHAPITRE 6

6. Conclusion	189
---------------------	-----

RÉFÉRENCES	193
-------------------------	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

FIGURE 1: Structure du réseau vasculaire	5
FIGURE 2 : Structures des récepteurs au VEGF et leurs ligands	19
FIGURE 3 : Structures des différents isoformes du VEGFA	20
FIGURE 4 : Patron de signalisation du VEGFR-2 au niveau des cellules endothéliales	26
FIGURE 5 : Structure homodimérique d'eNOS	34
FIGURE 6 : Deuxième réaction monooygénase nécessaire à la biosynthèse de l'oxyde nitrique à partir du NOHA	36
FIGURE 7 : Structure homodimérique d'HSP90	46
FIGURE 8 : Réactions enzymatiques menant à l'ubiquitination d'un substrat	56
FIGURE 9 : Types d'ubiquitination	57
FIGURE 10 : Organisation structurale des protéines de la famille Cbl chez l'humain	61
FIGURE 11 : Ubiquitination et dégradation de l'EGFR par c-Cbl	64

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

FIGURE 1: Inhibition of eNOS activation by VEGF pretreatments of BAEC	98
FIGURE 2: VEGF stimulation of BAEC induces down-regulation of Flk-1	99

FIGURE 3: VEGF induces ubiquitination of Flk-1 and enhances association with Cbl	100
FIGURE 4: Cbl mediates VEGF-dependent ubiquitination of Flk-1	101
FIGURE 5: Cbl overexpression inhibits Flk-1-mediated NO release and enhances Flk-1 degradation	102
FIGURE 6: Cellular localization of Cbl in BAEC following VEGF stimulation	103

CHAPITRE 3

FIGURE 1: L'inhibition de l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl bloque l'ubiquitination et la dégradation du VEGFR-2	118
FIGURE 2 : L'expression de HA-70Z/3-Cbl dans les cellules endothéliales augmente l'activation d'Akt induite par le VEGF	119
FIGURE 3 : Augmentation de la production de NO stimulée par le VEGF dans les cellules endothéliales exprimant HA-70Z/3-Cbl	120
FIGURE 4 : L'expression de HA-70Z/3-Cbl régule à la hausse l'activation des voies MAPK et PLC- γ par le VEGFR-2	121
FIGURE 5 : L'expression de 70Z/3-Cbl dans les cellules endothéliales augmente le potentiel chimiotactique du VEGF	122

CHAPITRE 4 : ARTICLE 2

FIGURE 1: Dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 is required for Akt activation and NO release	161
FIGURE 2: VEGF induces tyrosine phosphorylation of HSP90 β	162

FIGURE 3: VEGFR-2 internalization is required for tyrosine phosphorylation of HSP90	163
FIGURE 4: c-Src mediates the VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90	164
FIGURE 5: Phosphorylation of Y300 of HSP90 β by c-Src mediates VEGFR-2-stimulated NO release	165
SUPPLEMENTARY FIGURE 1: Expression of HA-K44A-dynamin inhibits VEGFR-2 internalization	169
SUPPLEMENTARY FIGURE 2: Calcium-dependent, PI-3 kinase and Akt stimulated NO release are not affected by K44A-dynamin expression ...	170
SUPPLEMENTARY FIGURE 3: HSP90 β is phosphorylated on Tyr300 by c-Src	171

CHAPITRE 5

FIGURE 1: Résumé schématique des résultats	188
--	-----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

TABLEAU I: Agents pro et anti-angiogénique	7
TABLEAU II : Phénotypes des souris transgéniques déficientes pour les gènes VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2	11
TABLEAU III : Inhibiteurs des récepteurs au VEGF en développement .	17

CHAPITRE 4 : ARTICLE 2

SUPPLEMENTARY TABLE 1: MS/MS results of the proteolytic digestion	166
---	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
Akt	protéine kinase B
Ang-1/2	angiopoïétine-1/2
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
AP-1/ 2	adaptor protein 1 ou 2
CaM	calmoduline
Cbl	casitas B-lineage lymphoma
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EGF	epidermal growth factor
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fibroblast growth factor
HIF-1	hypoxya inducible factor-1
HSPG	heparan sulphate proteoglycan
IGF	insulin growth factor
KGF	keratinocyte growth factor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MMP	matrix-métalloproteinase
L-NAME	N ^G -nitro-L-argini methyl ester
NO	nitric oxide
NOHA	N ^ω -hydroxy-L-arginine
eNOS	endothelial nitric oxide synthase

iNOS	inducible nitric oxide synthase
nNOS	neuronal nitric oxide synthase
NRP-1/2	neuropilin-1/2
PDGF	platelet-derived growth factor
PI-3k	phosphoinositide-3 kinase
PLC- γ	phospholipase C- γ
PLGF	placental growth factor
RTK	receptor tyrosine kinase
TGF	transforming growth factor
TKB	tyrosine kinase binding
UBA	ubiquitin-associated domain
UIM	ubiquitin-interacting motif
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-1/2/3	vascular endothelial growth factor receptor-1/2/3

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr Jean-Philippe Gratton pour m'avoir accueilli dans son tout nouveau laboratoire et pour la confiance qu'il m'a témoignée au cours de ces dernières années. Je le remercie également pour son support financier qui fut grandement apprécié.

Je remercie aussi la Fondation de maladies du cœur du Canada, l'IRCM, Boehringer Ingelheim ainsi que le département de pharmacologie pour leur support financier au cours de mes années d'études doctorales.

Merci également à mes collègues de laboratoires avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler.

Je dois évidemment remercier ma famille pour leurs encouragements et spécialement Frédéric pour sa patience et sa compréhension.

Finalement, je remercie les membres du jury; les Drs Audrey Claing, Josée Lavoie, Christian Beauséjour ainsi que Jean-Philippe Gratton pour avoir accepté de réviser cette thèse.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1 Le VEGF et la formation des vaisseaux sanguins

1.1.1 Historique

Le système cardiovasculaire s'appuie sur un réseau aussi étendu que précis. Sous l'impulsion du cœur, les artères et les veines assurent le transport du sang qui est indispensable au bon fonctionnement de notre organisme. Cette relation fut mise en évidence très tôt dans l'histoire de l'humanité. En effet chez les Égyptiens, le sang était considéré comme source de la vie et le siège de l'âme. À partir de dissections de porc, Galien (131-201) fit une description précise du réseau des veines et des artères. C'est toutefois à Andrea Cesalpino (1519-1603) que l'on doit le terme circulation sanguine et le dévoilement du rôle du cœur.

Le système cardiovasculaire est le premier système à se développer et à fonctionner chez l'embryon. Bien qu'à ce stade la formation de vaisseaux sanguins est très active, chez l'adulte ce procédé est plutôt ralenti mais est tout de même important pour la cicatrisation d'une plaie ainsi que pour les fonctions reproductrices chez la femme. En 1787, le Dr John Hunter a été le premier à utiliser le terme angiogenèse pour décrire la formation de vaisseaux sanguins. Par la suite, on réalisa que la croissance tumorale était accompagnée d'une augmentation de la vascularisation donnant ainsi un avantage indéniable à la croissance des cellules tumorales par rapport aux cellules saines (Folkman, 1971). Il fut ultérieurement rapporté que le développement des vaisseaux sanguins était attribuable à la présence de facteurs angiogéniques. C'est en 1989 que l'un des

plus importants facteurs angiogéniques fut découvert. Celui-ci fut nommé « vascular endothelial growth factor » (VEGF) (Ferrara and Henzel, 1989).

La découverte de l'implication des facteurs angiogéniques dans l'angiogenèse tumorale mena à l'élaboration de médicaments anti-angiogéniques. En 2003, le premier médicament anti-VEGF fut utilisé pour diminuer la croissance des vaisseaux sanguins tumoraux et ainsi prolonger la vie des patients atteints d'un cancer du colon.

Le processus angiogénique est donc un mécanisme complexe qui est régi par plusieurs facteurs. Toutefois, il s'avère qu'un nombre potentiels d'évènements moléculaires impliqués dans le contrôle de ce mécanisme échappe encore à notre compréhension. C'est pourquoi, nous nous proposons d'étudier les mécanismes intracellulaires qui régulent la réponse au VEGF. L'approfondissement de nos connaissances sur le sujet devrait être bénéfique afin de discerner de nouvelles données essentielles pouvant ultimement mener à une thérapie plus efficace et spécifique.

1.1.2 Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins, le cœur et le sang forment le système cardiovasculaire. Ce système constitue donc le mode principal de transport de l'oxygène, du gaz carbonique, des nutriments et des produits du catabolisme des cellules. Ce système est également responsable du transport d'autres éléments importants tels que: les cellules immunitaires, les hormones et les facteurs de la coagulation (Stevens A and Lowe J, 1992). Les vaisseaux sanguins se divisent en

trois catégories : les artères, les capillaires et les veines. Lors d'une contraction cardiaque, le sang est chassé du cœur pour se rendre dans les grosses artères via un passage ventriculaire. Ensuite, le sang parcourt les ramifications des artères jusqu'aux plus petites, les artérioles. Le sang abouti ainsi dans les lits capillaires des organes et des tissus. Seuls les capillaires sont en contact étroit avec les cellules. Leurs parois extrêmement fines permettent de fournir aux cellules les nutriments et l'oxygène nécessaire à leur physiologie normale. À sa sortie des capillaires, le sang emprunte les veinules, les veines et finalement les grosses veines qui convergent au cœur et le cycle reprend (Marieb E, 1993).

1.1.3 Structure des vaisseaux sanguins

Les parois des veines et des artères sont composées de trois tuniques entourant un espace rempli de sang, la lumière. Premièrement, la couche externe que l'on nomme adventice est composée en grande partie de collagène, avec parfois quelques cellules musculaires lisses. Dans les artères, l'adventice est séparée de la tunique moyenne par une condensation de fibres élastiques qui forment une limitante élastique externe plus ou moins distincte. Du côté veineux, cette tunique est la plus développée. On peut également remarquer au niveau de l'adventice des vaisseaux à parois épaisses, la présence de petits vaisseaux appelés vasa vasorum qui envoient des ramifications pénétrant dans la tunique moyenne pour lui fournir du sang. Deuxièmement, la tunique moyenne est quant à elle composée principalement de cellules musculaires lisses. Cette couche est très développée au niveau artériel mais elle devient indistincte dans les veines et

pratiquement inexistante dans les petits vaisseaux tels que les capillaires. Finalement, la tunique interne aussi appelée l'intima, est composée d'un endothélium qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux sanguins (Figure 1). L'arrangement des cellules endothéliales constitue une surface lisse qui réduit au minimum la friction entre le sang et la surface interne des vaisseaux (Marieb E, 1993;Stevens A and Lowe J, 1992). Toutefois, l'endothélium est beaucoup plus qu'une simple barrière entre le sang et le muscle lisse vasculaire. Cette tunique a la capacité de libérer des substances vasoactives qui agissent sur le muscles lisse vasculaire telles que l'endothéline, le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (La and Reid, 1995;Moncada et al, 1976;Shepherd and Katusic, 1991). Par la libération de ces substances, l'endothélium joue un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire.

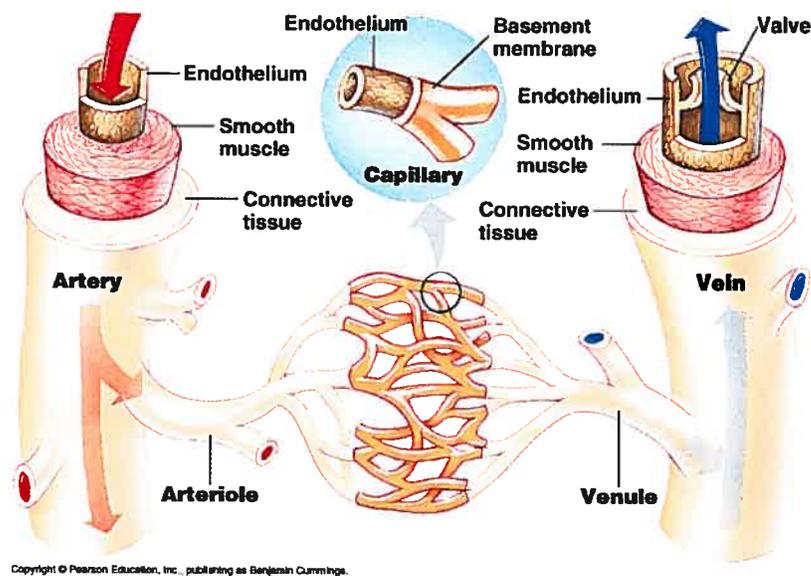


Figure 1 : Structure du réseau vasculaire (Martini FH and Bartholomew EF, 2002)

1.1.4 Cellules endothéliales

L'endothélium qui tapisse tout le réseau vasculaire est composé d'une monocouche de cellules endothéliales que l'on estime au nombre de 1×10^{13} cellules chez l'adulte. Comme mentionné plus tôt, ces cellules ont la capacité de libérer des substances vasoactives leur permettant de jouer un rôle dans l'homéostasie vasculaire. De plus, les cellules endothéliales sont intimement impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins. Cette formation est divisée en 2 étapes importantes appelées vasculogénèse et angiogénèse. Ces procédés sont régulés par une panoplie de facteurs pro et anti-angiogéniques dont le VEGF (Tableau I). Étant donné l'identification de rôles importants des cellules endothéliales dans le bon fonctionnement et le développement du réseau vasculaire, l'étude biologique des cellules endothéliales apportera d'autres informations nous permettant de mieux comprendre les mécanismes qui régulent leurs fonctions.

Agents pro-angiogéniques	Fonctions
Famille du VEGF	Stimule l'angiogénèse, la perméabilité, VEGFC : lymphangiogénèse, PlGF : rôle dans l'angiogénèse pathologique
Récepteurs du VEGF	VEGFR-2 : induction de signaux angiogéniques, VEGFR-3 : induction de signaux lymphangiogéniques
Angiopoïétine-1 (Ang-1) et récepteur Tie-2	Ang-1 : stabilisation des vaisseaux sanguins
PDGF-BB et récepteurs	Recrutement des cellules musculaires lisses
TGF- β 1, endoglin et récepteur TGF β	Stabilisation des vaisseaux sanguins en stimulant la production de matrice extracellulaire
FGF, HGF, MCP-1 Intégrines $\alpha_3\beta_5$, $\alpha_5\beta_5$	Stimulation de l'angiogénèse et artériogénèse Récepteurs pour les macromolécules et protéinases de matrice (MMP2)

Ve-cadherin, PECAM	Essentiel à la survie des cellules endothéliales
Ephrins	Spécification artérielle et veineuse
Activateurs du plasminogène, MMP	Protéinases impliquées dans la migration cellulaire et le remodelage de la matrice; libèrent le bFGF et le VEGF de la matrice; activent le TGF- β 1; génèrent l'angiostatine
Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)	Stabilise les nouveaux vaisseaux en prévenant la dissolution de la matrice
Synthèse du monoxyde d'azote, cyclooxygénase	NO et PGI2 stimule l'angiogenèse
Autres	AC133 (récepteur orphelin implique dans la Différentiation des angioblaste); Chimiokines (rôle pléiotropique dans l'angiogenèse); Inhibiteurs de différenciation
Agents anti-angiogéniques	Fonctions
VEGFR-1, VEGFR-1 et NRP-1 solubles	Séquestre le VEGF, VEGF-B et PIGF
Angiopoïétine-2 (Ang-2)	Antagoniste de l'Ang-1; induit la régression des vaisseaux en absence de signaux angiogéniques
Thrombospondin-1	Inhibe la migration, la survie, la croissance et l'adhésion des cellules endothéliales
Meth-1, Meth-2	Inhibiteurs contenant des domaines metalloprotéases, thrombospondines et disintégrines
Angiostatine, related plasminogen kringle	Inhibe la migration, la survie des cellules endothéliales
Endostatine	Inhibe la migration, la survie des cellules endothéliales
Vasostatin, calreticulin	Inhibe la croissance des cellules endothéliales
Platelet factor-4	Inhibe la liaison du bFGF et du VEGF
Inhibiteurs tissulaires des MMP, inhibiteurs des MMP, PEX	Supprime l'angiogenèse pathologique
Interférons (INF) α , β , γ ; IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Inhibe la migration des cellules endothéliales, INF α ; régule négativement bFGF
Prothrombine kringle -2; fragment anti-thrombine III	Supprime la croissance des cellules endothéliales
Autres	Prolactine : inhibe bFGF/VEGF; Canstatine, Maspine; Troponine-1; inhibe l'ATPase actomyosine, VEG1, Restine, Fragment de SPARC: inhibe la liaison et l'activité endothéliale du VEGF, Fragment de l'ostéopontine

Tableau I : Agents pro et anti-angiogéniques (adaptation d'un tableau tiré de (Conway et al, 2001).

1.1.5 Formation du réseau vasculaire

Le système cardiovasculaire est le premier système fonctionnel lors du développement embryonnaire chez les vertébrés. La croissance et la différenciation embryonnaire sont dépendantes du transport de nutriments et de déchets via cette jeune vascularisation. Tandis que chez l'adulte, le réseau vasculaire sert de système de communication entre les organes et les tissus. On distingue 2 grandes étapes à la formation des vaisseaux sanguins : la vasculogénèse et l'angiogénèse. Le terme vasculogénèse réfère à la formation de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs endothéliaux au stade embryonnaire, alors que le terme angiogénèse est utilisé pour décrire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un vaisseau préexistant, c'est-à-dire par bourgeonnement. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), connu pour ses propriétés perméabilisantes, est l'un des modulateurs le plus important impliqué dans ces deux processus. La libération de NO qui dépend du VEGF semble également jouer un rôle majeur dans le processus angiogénique car une diminution importante de l'angiogénèse stimulée par le VEGF chez des souris eNOS^{-/-} fut décrite (Fukumura et al, 2001).

1.1.5.1 La vasculogénèse

Le Dr Werner Risau (Risau and Flamme, 1995) a été le premier à utiliser le terme vasculogénèse pour décrire la formation de vaisseaux sanguins *de novo* chez l'embryon. La première étape de la vasculogénèse est la différenciation des

cellules endothéliales vasculaires. Les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques partagent un précurseur commun, l'hémangioblaste. Au niveau du mésoderme splancnique, les hémangioblastes forment des îlots sanguins où les cellules périphériques se différencient en précurseurs de cellules endothéliales que l'on nomme les angioblastes. Les cellules centrales, quant à elles, sont des précurseurs des cellules hématopoïétiques. Les angioblastes sont définis comme un type cellulaire possédant certains marqueurs caractéristiques d'une cellule endothéliale tels que le récepteur-2 du VEGF (VEGFR-2), le platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31), CD34. Ces angioblastes formeront un plexus vasculaire qui donnera naissance à l'aorte dorsale, la veine cardinale ainsi qu'aux veines et artères de la vésicule vitelline (Jain, 2003). Une fois que le plexus primaire de capillaires est formé, le nombre de cellules endothéliales générées augmente et il peut y avoir formation de nouveaux capillaires par bourgeonnement ou par division à partir de leur vaisseau d'origine, ce processus se nomme angiogenèse (Risau, 1997). Le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF-2) joue un rôle primordial au moment de la différenciation cellulaire. En effet, il a été démontré que le FGF-2 est responsable de la modulation du mésoderme conduisant à la génération des angioblastes (Cox and Poole, 2000;Krah et al, 1994). Le FGF-2 agit également de concert avec le VEGF au niveau de cette étape de différenciation. Flamme et collaborateurs (Flamme et al, 1995) ont démontré, par des études *in vitro* que l'expression du VEGFR-2 est induite de façon maximale en présence de FGF-2 dans les cellules du blastodisque de caille, après 24 heures de culture cellulaire. Ceci suggère que la stimulation des

récepteurs au FGF conduit à l'activation du gène du VEGFR-2 dans les angioblastes. L'importance du VEGF dans le développement de vaisseaux sanguins est également renforcée par la détection du VEGFR-2 comme première molécule exprimée aux cours de la différenciation des angioblastes (Risau and Flamme, 1995). Les angioblastes peuvent donc rapidement répondre au VEGF, qui lui, est exprimé au niveau de l'endoderme. Étant donné que l'endoderme est adjacent au mésoderme, une relation paracrine est possible entre ces deux couches germinales. Le VEGF sécrété de l'endoderme pourrait contribuer à la différenciation des cellules du mésoderme qui expriment le VEGFR-2, en précurseurs endothéliaux (Risau and Flamme, 1995). De plus, chez la souris, l'inactivation des gènes du VEGF et de ces récepteurs 1 et 2 entraîne la mort au stade embryonnaire. L'effet létal de cette inactivation est dû à une vasculogénèse et une angiogénèse défectueuse (Tableau II) (Carmeliet et al, 1996;Fong et al, 1999;Shalaby et al, 1995). Toutefois, les fonctions biologiques du VEGF au niveau de la vasculogénèse demeurent imprécises. Une étude a aussi démontré un rôle pour le NO dans le développement vasculaire au stade de formation du plexus capillaires (Nath et al, 2004).

GÈNE INACTIF	PHÉNOTYPE
VEGF	Mort embryonnaire avant le 11 ^e jour Défaut de vasculogénèse Absence de formation de l'aorte dorsale Défaut d'angiogénèse Différenciation endothéliale retardée
VEGFR-1	Mort embryonnaire après le 9 ^e jour Défaut de vasculogénèse Vaisseaux sanguins dilatés Désorganisation de l'assemblage des cellules endothéliales

VEGFR-2	Mort embryonnaire entre le 9.5-10.5 jour Absence d'ilôts sanguins dans la vésicule vitelline Absence de vasculogénèse Pas de différenciation endothéliale
---------	--

Tableau II : Phénotypes des souris transgéniques déficientes pour les gènes VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2 (Breier and Risau, 1996).

1.1.5.2 L'angiogénèse

Au stade embryonnaire, le processus angiogénique est très actif tandis que chez l'adulte la vascularisation est plutôt quiescente. En effet, les cellules endothéliales font partie des cellules ayant la durée de vie la plus longue à l'extérieur du système nerveux. Le renouvellement physiologique des cellules endothéliales se calcule en années dans les tissus qui ne requièrent pas d'angiogénèse continue. Or chez l'adulte, peu de tissus nécessitent ce type d'angiogénèse, mise à part l'appareil reproducteur femelle et les tissus blessés en processus de cicatrisation (Bergers and Benjamin, 2003). Il est à noter que la formation de nouveaux vaisseaux sanguins peut être observée chez l'adulte dans les cas d'arthrite rhumatoïde, de cancer et de rétinopathie. On qualifie alors cette formation d'angiogénèse pathologique.

L'angiogénèse comporte plusieurs étapes qui sont principalement sous l'influence du VEGF. Toutefois, le VEGF doit travailler de concert avec d'autres facteurs ayant eux aussi un rôle à jouer dans le processus angiogénique. Tout d'abord, l'angiogénèse débute par une vasodilatation du vaisseau préexistant et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cette étape implique la participation du monoxyde d'azote. L'augmentation de la perméabilité vasculaire entraîne la formation de fenestrations au sein de l'endothélium ainsi qu'une

redistribution des molécules d'adhésion telles que PECAM-1 et les cadhérines de l'endothélium vasculaire (VE-cadherine) (Carmeliet, 2000). À cette étape, les angiopoïétines (Ang-1 et Ang-2) semblent être les partenaires les plus importants du VEGF. Les angiopoïétines sont les ligands des récepteurs Ties. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs de type tyrosine kinase et ils sont localisés au niveau de l'endothélium vasculaire. Or, l'activation du récepteur Tie-2 par l'Ang-1 semble jouer un rôle important dans l'étape de stabilisation des vaisseaux naissants. L'Ang-1 rend les vaisseaux résistants aux fuites en contrecarrant l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF (Thurston et al, 1999; Yancopoulos et al, 2000). Le rôle de l'Ang-2 semble être contextuel. En absence de VEGF, l'Ang-2 agit comme un antagoniste de l'Ang-1 en déstabilisant les vaisseaux conduisant ultimement à leur régression. En présence de VEGF, l'Ang-2 facilite le bourgeonnement vasculaire (Lobov et al, 2002). Viennent ensuite les étapes de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales où les cellules en prolifération auront à migrer vers des sites distants. La migration requiert le détachement des cellules de la matrice extracellulaire. Ceci est possible par l'action de protéinases telles que les matrix-métalloprotéinases (MMP). Ces protéinases facilitent également le bourgeonnement des cellules endothéliales en libérant, de la matrice extracellulaire, des facteurs angiogéniques comme le VEGF (Carmeliet, 2003). Une fois formés, les vaisseaux naissants doivent acquérir une structure stable et fonctionnelle. C'est ce que l'on appelle la maturation du réseau vasculaire. La maturation de la paroi vasculaire implique le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses, le développement de la matrice

environnementale et la spécialisation des cellules endothéliales (Hellstrom et al, 1999; Benjamin et al, 1998; Hangai et al, 2002; Wang et al, 1998). Les ephrins (Eph-B1 et Eph-B2) et leurs récepteurs (Eph-B2 et Eph-B4) sont également importants dans le processus angiogénique en ce qui a trait à cette dernière étape. En effet, il a été démontré que les cellules endothéliales possédant le récepteur Eph-B2 étaient primordiales pour les vaisseaux qui deviendront des artères tandis que l'expression du récepteur Eph-B4 était nécessaire au devenir veineux (Wang et al, 1998). Chez la souris, l'implication de la famille des ephrins dans la formation du réseau vasculaire est d'autant plus renforcée par des études de délétion des gènes Eph-B2, Eph-B4 et Eph-B2/B3, où la mort au stade embryonnaire fut constatée (Wang et al, 1998; Adams et al, 1999; Gerety et al, 1999). La classe A des ligands ephrins semble aussi avoir un rôle à jouer au sein du processus angiogénique stimulé par le VEGF. En fait, il fut rapporté que le blocage du récepteur Eph-A entraîne l'inhibition de la migration, de la survie et du bourgeonnement des cellules endothéliales ainsi que l'angiogenèse in vivo suite à un traitement au VEGF (Cheng et al, 2002). Ce groupe propose deux hypothèses pouvant expliquer leurs observations. Premièrement, la signalisation du Eph-A pourrait faire partie de la cascade de signalisation du VEGF menant à l'angiogenèse. Deuxièmement, que ces deux patrons de signalisation soient distincts mais que la signalisation du Eph-A régule positivement les signaux angiogéniques stimulés par le VEGF.

1.1.5.2.1 Modulation du processus angiogénique

L'hypoxie est un stimulus important pour l'expansion d'un lit vasculaire. Initialement, les cellules sont oxygénées par une simple diffusion d'oxygène mais lorsque le tissu croît, la demande d'oxygène augmente au-delà de la limite de diffusion d'oxygène. L'hypoxie promeut la croissance des vaisseaux en signalant vers le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factors-1). HIF-1 régule à la hausse plusieurs gènes angiogéniques mais l'induction du VEGF est la plus remarquable, *i.e.* une augmentation de 30 fois en quelques minutes (Carmeliet, 2003). Hautement impliquée dans le processus angiogénique, l'hypoxie n'induit pas seulement la transcription du gène du VEGF mais aussi celle de ses récepteurs 1 et 2 ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'angiogenèse (synthèse du monoxyde d'azote, l'angiopoïétine, FGF, MMPs, etc...) (Pugh and Ratcliffe, 2003). Toutefois, la présence de facteurs angiogéniques n'est pas suffisante pour initier la croissance d'une vascularisation nouvelle. L'influence des facteurs pro-angiogéniques est contrebalancée par des agents anti-angiogéniques. Le résultat de cette opposition sur les cellules endothéliales détermine la finalité de l'hémostase angiogénique. Parmi les facteurs anti-angiogéniques on retrouve l'endostatine qui est connue pour inhiber la migration et promouvoir l'apoptose des cellules endothéliales. La thrombospondine-1 qui induit aussi l'apoptose des cellules endothéliales. L'angiostatine est également un agent anti-angiogénique qui influence la migration cellulaire en agissant sur la matrice extracellulaire (Hanai et al, 2002; Stack et al, 1999; Tonini et al, 2003).

1.1.5.2.2 L'angiogenèse et le cancer

Comme mentionné précédemment, la vascularisation est plutôt quiescente chez l'adulte. Toutefois, lorsque l'équilibre entre les agents pro et anti-angiogéniques est rompue en faveur des facteurs pro-angiogéniques, le processus angiogénique peut redémarrer. Ce phénomène est observé dans le cas d'un cancer. Pour croître, les cellules tumorales ont besoin d'être vascularisées. Le phénomène de la vasculogénèse appliqué dans le développement vasculaire au stade embryonnaire a été adapté au stade adulte par les tumeurs (Bergers and Benjamin, 2003). On nomme cette adaptation néovascularisation ou encore vasculogénèse postnatale. Un procédé où l'action du VEGF, de MMP-9 et du NO a été établi (Duda et al, 2004). Dans cette situation, les précurseurs des cellules endothéliales proviennent maintenant de la moelle osseuse et ils sont transportés par la circulation sanguine et incorporés aux vaisseaux en croissance. Toutefois le processus angiogénique par bourgeonnement est davantage utilisé. La voie HIF est également régulée à la hausse dans la plupart des cancers. En conséquence, le rôle joué par le VEGF dans l'angiogenèse pathologique est majeur. Les vaisseaux sanguins des cellules tumorales sont toutefois désorganisés, perméables et hémorragiques. Ceci étant probablement dû à la surproduction de VEGF (Bergers and Benjamin, 2003).

1.1.5.2.3 La thérapie anti-angiogénique et l'angiogenèse thérapeutique

Le concept de manipulation du lit vasculaire pour augmenter ou diminuer le nombre de vaisseaux sanguins a créé un intérêt considérable en clinique. Il est

maintenant possible d'interférer avec le processus angiogénique à divers niveaux tels que : l'inhibition du VEGF et de sa signalisation, le blocage des enzymes responsables de la dégradation de la matrice et l'utilisation d'inhibiteurs endogènes. Récemment, la venue d'un nouvel agent anti-VEGF, nommé Avastin (Genentech), reflète grandement l'intérêt et l'urgence des compagnies pharmaceutiques à concentrer leurs efforts aux développements d'agents anti-angiogéniques pour le traitement du cancer. En fait, l'Avastin fut le premier médicament anti-VEGF à être approuvé par la Food and Drug Administration. Toutefois, les effets bénéfiques de l'Avastin sont seulement observables dans les cas de cancer du colon, du sein et du poumon lorsque combiné à une chimiothérapie conventionnelle. Il est proposé que le traitement anti-VEGF assurerait une meilleure distribution du médicament cytotoxique en normalisant la structure des vaisseaux tumoraux et en diminuant la perméabilité vasculaire (Carmeliet, 2005;Jain, 2005). L'angiogenèse excessive induite par le VEGF est également rapportée dans les cas de troubles rétiens tels que la dégénérescence maculaire et la prolifération angiomateuse de la rétine. L'Avastin est maintenant à l'essai pour traiter ces troubles oculaires et jusqu'à présent, les effets de ce médicament semblent être bénéfiques (Emerson et al, 2007;Meyerle et al, 2007). Plusieurs autres compagnies pharmaceutiques s'intéressent à ce domaine, il ne serait donc pas surprenant que la venue de nouveaux inhibiteurs angiogéniques ou une nouvelle combinaison de ceux-ci, viennent modifier la face de la médecine moderne au cours de la prochaine décennie (Tableau III).

Une autre approche intéressante, cette fois-ci pour le domaine cardiovasculaire, est l'angiogénèse thérapeutique. Être capable de promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux collatéraux au niveau d'un myocarde ischémique ou d'un muscle de la jambe pourrait avoir des effets majeurs pour le traitement de certaines pathologies pour lesquelles une intervention chirurgicale est la seule option. La faisabilité de l'angiogénèse thérapeutique par l'approche de transfert de gènes angiogéniques est présentement à l'étude (Fortuin et al, 2003; Henry et al, 2003).

Compagnie	Agent	Cibles moléculaires	IC ₅₀ (µM)						Développement
			VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	PDGFR-β	c-Kit	Raf	
Novartis	Vatalanib	VEGFR-1, 2, 3; PDGFR-β; c-Kit	0.077	0.037	0.66	0.58	0.73	--	Phase III
SUGEN	Semaxanib	VEGFR-1, 2	0.008	0.20	--	0.68	0.47	--	Arrêt
Pfizer	Sunitinib	VEGFR-1, 2; PDGFR; c-kit	0.002	0.009	0.017	0.002	0.002	--	Phase III
Bayer	Sorafenib	VEGFR-2,3; Raf PDGFR; c-Kit; RET	--	0.09	0.02	0.057	0.068	0.006	Phase III
Astra Zeneca	ZD6474	VEGFR-2; EGFR FGFR-1; RET	1.6	0.04	0.11	1.1	>20	--	Phase II
SUGEN	SU6668	VEGFR-2; PDGFR-β FGFR-1, c-Kit	--	2.1	--	0.008	0.1	--	Arrêt
Astra Zeneca	AZD2171	VEGFR-1, 2, 3; PDGFR-β; c-Kit	0.005	<0.001	<0.003	0.005	0.002	--	Phase I
Novartis	AEE788	VEGFR-1, 2; EGFR	0.059	0.077	0.33	0.32	0.79	2.8	Phase I

Tableau III: Inhibiteurs des récepteurs au VEGF en développement.

Abréviations : EGFR, récepteur du facteur de croissance de l'épiderme; FGFR, récepteur du facteur de croissance des fibroblastes; PDGFR, récepteur du facteur de croissance des plaquettes; VEGFR : récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (adaptation d'un tableau tiré de (Morabito et al, 2006).

1.2 Le VEGF et ses récepteurs

Le VEGF est un élément important de la signalisation endothéliale impliqué dans le processus angiogénique. En effet, le VEGF est connu comme une cytokine multifonctionnelle pouvant stimuler la différenciation, la survie, la

migration, la relâche du monoxyde d'azote, la prolifération et la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales. Les fonctions du VEGF sont attribuables à l'activation de récepteurs spécifiques, de type tyrosine kinase (RTK), dénommés : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Les types 1 et 2 sont principalement exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire tandis que le type 3 est localisé au niveau de l'endothélium lymphatique (Zachary, 2003).

1.2.1 Les isoformes du VEGF

Les membres de la famille du VEGF sont des glycoprotéines dimériques d'environ 40 kDa. Au niveau structurel, les VEGFs ressemblent à la famille des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), avec leurs chaînes intra et inter liens disulfures entre 8 positions conservées en résidus cystéines. Il existe 5 membres de la famille du VEGF chez le mammifère; VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD et le facteur de croissance du placenta (PlGF). Ces ligands ont la capacité de se lier à plus d'un récepteur au VEGF (Figure 2) (Olsson et al, 2006).

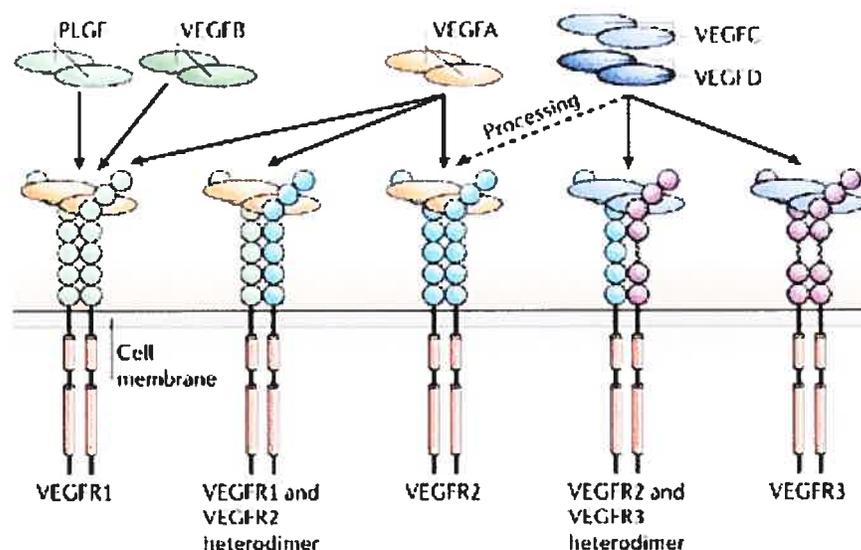


Figure 2 : Structures des récepteurs au VEGF et leurs ligands (Olsson et al, 2006).

La forme humaine du VEGF, le VEGFA, possède 8 exons. L'épissage alternatif de son ARN messager engendre au moins 4 différents isoformes de 121, 165, 189 et 206 acides aminés (Figure 3). Parmi ceux-ci, l'isoforme 165 est le plus abondant et le plus actif biologiquement. Ces isoformes diffèrent par leur capacité à lier l'héparine sulfate et la matrice extracellulaire. L'isoforme 121 se voit incapable de lier l'héparine sulfate étant donné qu'il perd ses exons 6 et 7 lors de l'épissage alternatif. Les autres isoformes peuvent lier l'héparine sulfate et la matrice extracellulaire mais à des degrés différents (Cross et al, 2003). Les isoformes du VEGF liés à la matrice extracellulaire constituent un réservoir de facteurs de croissance pouvant être libérés sous forme active par des enzymes protéolytiques (Houck et al, 1992; Plouet et al, 1997; Park et al, 1993).

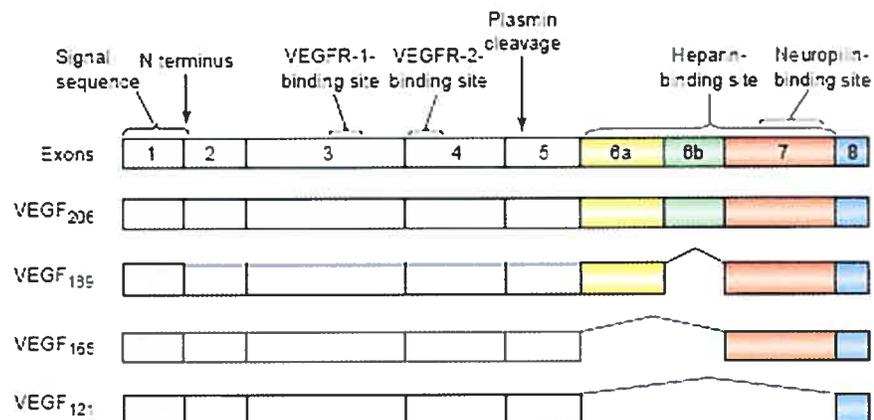


Figure 3 : Structures des différents isoformes du VEGFA.

L'épissage alternatif de l'ARNm du VEGFA produit au moins quatre isoformes. Chez l'humain, ces isoformes correspondent au VEGF 121, 165, 189 et 206 où l'isoforme 165 est la forme prédominante (Cross et al, 2003)

1.2.2 Régulation de l'expression génique du VEGF

L'expression du gène du VEGF est principalement régulée par l'hypoxie, une situation où la voie HIF est impliquée.

« Hypoxia-inducible factor-1 » (HIF-1) est un facteur de transcription qui a tout d'abord été identifié au cours d'études sur l'expression du gène de l'érythropoïétine (EPO) en réponse à l'hypoxie. Ces recherches ont démontré la présence d'une séquence spécifique de liaison pour HIF-1 soit le « hypoxia response-element » (HRE). HIF est un α,β -hétérodimère où ses sous-unités existent sous formes d'isomères. Or, le complexe HIF-1 peut se lier à l'ADN du gène cible au niveau de la séquence spécifique HRE « hypoxia response-element » et initier la transcription de ce gène. On sait maintenant que la voie HIF joue un rôle clé dans la régulation de la transcription de gènes en situation hypoxique dans d'autres processus, tel que l'angiogenèse (Maxwell et al, 1993). L'activation de la

voie HIF est aussi possible par un mécanisme indépendant à l'hypoxie. Il fut mis en évidence que la synthèse de HIF-1 peut se faire par induction hormonale. Effectivement, il a été démontré que l'angiotensine II induit et augmente de façon importante les niveaux protéiques de l'HIF-1 α au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) (Richard et al, 2000). La liaison de l'angiotensine II à son récepteur AT1 régule positivement le facteur de transcription l'HIF-1 α par au moins deux mécanismes. Tout d'abord, l'angiotensine II augmente le taux de transcription de HIF-1 α par un mécanisme qui requiert l'activation d'une PKC. Ensuite, l'angiotensine II hausse le taux de traduction de l'ARNm de HIF-1 α en activant la production de « reactive oxygen species » (ROS) et la voie de signalisation de PI-3K. Le facteur HIF-1 ainsi formé est donc en mesure d'augmenter l'expression du gène du VEGF en normoxie (Page et al, 2002).

Il est à noter que l'induction de l'expression du VEGF peut également être stimulée par des facteurs de croissances tels que : le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance transformant (TGF), le facteur de croissance des kératinocytes (KGF), le facteur de croissance de l'insuline-1 (IGF-1), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF). Ceci peut suggérer l'existence d'une coopération entre ces facteurs et une hypoxie localisée permettant de réguler la libération de VEGF dans un microenvironnement. De plus, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et IL-6 peuvent stimuler l'expression du VEGF dans plusieurs types cellulaires. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse que le VEGF

serait responsable de l'angiogenèse et de la perméabilité observée dans les cas de maladies inflammatoires (Ferrara and vis-Smyth, 1997;Neufeld et al, 1999).

1.2.3 Les récepteurs du VEGF et leur signalisation

Les récepteurs au VEGF sont des récepteurs de type tyrosine kinase dont la structure ressemble aux récepteurs de la famille des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) et des fibroblastes (FGF). L'arrangement structural est également similaire entre les trois récepteurs du VEGF (figure 1). En effet, ils possèdent un domaine extracellulaire composé d'environ 750 acides aminés, organisés en 7 domaines immunoglobulines. Par contre, le cinquième domaine immunoglobulines du VEGFR-3 est remplacé par un pont disulfure reliant le 4^e et le 6^e domaine immunoglobulines. Le domaine extracellulaire est suivi d'une région transmembranaire, d'un domaine juxta-membranaire, d'un domaine kinase scindé en deux parties par un insert kinase de 70 acides aminés et d'une queue C-terminale (Olsson et al, 2006). La liaison du VEGF à ses récepteurs entraîne la dimérisation de ceux-ci, ce qui stimule l'activité kinase des récepteurs et qui provoque l'autophosphorylation de ces derniers. Une fois phosphorylés, les récepteurs sont en mesure de recruter des partenaires moléculaires et d'induire l'activation de diverses voies de signalisation qui impliquent la participation de seconds messagers. Il est à noter que les récepteurs au VEGF peuvent former des homodimères et des hétérodimères. Toutefois, la capacité des hétérodimères à induire une réponse cellulaire comparable à celle provoquée par les homodimères, reste à prouver (Olsson et al, 2006).

1.2.3.1 VEGFR-1

VEGFR-1, aussi connu sous le nom Flt-1, est une glycoprotéine de 180 kDa possédant un très haut niveau d'affinité pour le VEGFA, VEGFB et le PlGF. Il est entre autre exprimé au niveau des cellules endothéliales, des cellules souches hématopoïétiques, des macrophages et des monocytes. Ce récepteur est nécessaire au développement embryonnaire des vaisseaux sanguins, étant donné que l'absence du gène VEGFR-1 (VEGFR-1 $-/-$) est létale au stade embryonnaire E8,5-9 chez la souris. La mort de l'embryon est causée par une malformation sévère de son réseau vasculaire caractérisée par une obstruction des vaisseaux due à la surcroissance des cellules endothéliales (Fong et al, 1995). L'augmentation du nombre de progéniteurs endothéliaux en absence du VEGFR-1, implique que ce récepteur aurait un rôle comme régulateur négatif au cours du développement vasculaire. En fait, ce rôle semble être joué par une forme soluble du VEGFR-1 (sVEGFR-1). Le sVEGFR-1 ne possède pas de domaine transmembranaire ni tyrosine kinase. Il est donc dépourvu de toute capacité à induire des signaux intracellulaires, c'est pourquoi, il est plutôt considéré comme un récepteur appât pour le VEGF (Cross et al, 2003).

Le VEGFR-1 possède très peu d'activité kinase comparativement au VEGFR-2, ceci pouvant s'expliquer par la présence d'un motif répresseur au niveau du domaine juxtamembranaire du VEGFR-1. Étant donné le faible niveau de phosphorylation de ce récepteur, seules les études utilisant des modèles de surexpression du VEGFR-1 ont permis de démontrer l'activation de certaines molécules de signalisation par ce récepteur. Parmi celles-ci, on compte la sous-

unité p85 de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3k), la phospholipase C- γ (PLC- γ), SHP2, Grb2 et Nck. Malgré ces interactions, la signalisation intracellulaire qui devrait s'ensuivre est très peu caractérisée. En effet, l'activation du VEGFR-1 au niveau endothélial induit seulement de faibles effets prolifératifs et migratoires. Une récente étude a toutefois démontré l'importance de la phosphorylation de la tyrosine 794 du VEGFR-1 en ce qui a trait aux propriétés angiogéniques du monoxyde d'azote (Ahmad et al, 2006). D'autres fonctions du VEGFR-1 sont connues et même mieux décrites qu'au niveau endothélial, telles que la migration et la différenciation des monocytes, le recrutement des cellules endothéliales progénitrices à partir de la moelle osseuse et l'adhésion de cellules NK aux cellules endothéliales (Barleon et al, 1996;Chen et al, 2002;Hattori et al, 2002).

1.2.3.2 VEGFR-3

VEGFR-3, connu également sous le nom Flt-4, est un récepteur de 195 kDa ayant une forte affinité pour les VEGFs C et D. L'expression du VEGFR-3 débute au jour 8,5 de développement chez la souris et ce au niveau de la totalité des cellules endothéliales embryonnaires. Plus tard dans le développement, l'expression du récepteur devient observable uniquement au niveau des vaisseaux lymphatiques. On observe chez la souris déficiente pour le gène du VEGFR-3 (VEGFR-3 $-/-$) une désorganisation des vaisseaux larges conduisant à une accumulation de fluide dans la cavité péricardique et la mort au stade E9,5 du développement embryonnaire (Dumont et al, 1998).

L'activité kinase du VEGFR-3 est régulée par la phosphorylation de résidus tyrosines conservés au niveau de son domaine kinase (Tyr¹⁰⁶³ et Tyr¹⁰⁶⁸). Le VEGFR-3 promeut la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques en induisant l'activation de la MAPK, un procédé qui requiert la participation de la PKC ainsi que l'activation de la voie PI-3k/Akt (Makinen et al, 2001). Il est également connu que le VEGFR-3 peut former un hétérodimère avec le VEGFR-2 au niveau de l'endothélium lymphatique (Dixelius et al, 2003). Ceci élargit donc le répertoire potentiel d'activation des voies de signalisation par ce type de récepteur.

1.2.3.3 VEGFR-2

VEGFR-2, aussi appelé Flk-1, est un récepteur de 200-230 kDa qui possède une haute affinité pour le VEGFA et les formes modifiées du VEGFC et D. Il est exprimé au niveau des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques mais aussi au niveau des mégakaryocytes et des cellules souches hématopoïétiques. Ce récepteur est lui aussi impliqué de façon importante dans la formation du réseau vasculaire au stade embryonnaire. Ceci a été démontré par la génération de souris déficientes pour le gène du VEGFR-2 (VEGFR-2^{-/-}) où une absence de vasculogénèse et une incapacité à développer des îlots sanguins et des vaisseaux correctement structurés furent observées. Dans ces conditions, l'embryon ne peut survivre et il meurt *in utero* entre les jours 8,5 et 9,5 (Shalaby et al, 1995).

La liaison du VEGFA aux deuxième et troisième boucles du domaine immunoglobuline du VEGFR-2 entraîne la phosphorylation de résidus tyrosines au sein du domaine intracellulaire du récepteur. Parmi les 19 résidus tyrosines présents dans ce domaine, 7 (Tyr⁸⁰¹, Tyr⁹⁵¹, Tyr⁹⁹⁶, Tyr¹⁰⁵⁴, Tyr¹⁰⁵⁹, Tyr¹¹⁷⁵ et Tyr¹²¹⁴) sont reconnus comme étant des sites d'autophosphorylation importants pour la signalisation du VEGFR-2 (Dougher-Vermazen et al, 1994; Cunningham et al, 1997; Meyer et al, 2002). Le VEGFR-2 est responsable de la majorité des effets biologiques du VEGF au niveau de l'endothélium vasculaire. On compte parmi ceux-ci la prolifération cellulaire, la relâche du monoxyde d'azote (NO), la migration et la survie des cellules endothéliales (Figure 4).

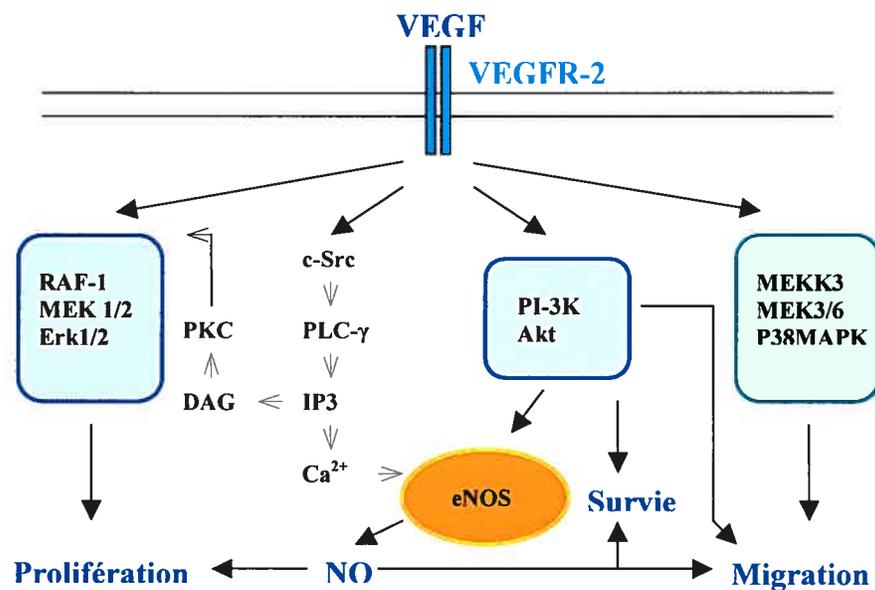


Figure 4: Patron de signalisation du VEGFR-2 au niveau des cellules endothéliales.

VEGFR-2 induit la prolifération des cellules endothéliales par l'activation de la voie des MAPKs qui dépend de Ras conduisant ainsi à la transcription des gènes (Meadows et al, 2001). Il est également connu que le VEGFR-2 peut promouvoir la prolifération des cellules endothéliales par une voie de signalisation qui ne requiert pas la participation de Ras. En effet, la stimulation du VEGFR-2 entraîne la phosphorylation de son résidu Tyr¹¹⁷⁵ et le recrutement de la PLC- γ . Une fois active, la PLC- γ stimule à son tour la PKC par la génération de diacylglycérol et l'augmentation de calcium intracellulaire. Ces dernières étapes permettent l'activation de la voie Raf-MEK-MAPK menant ainsi à la prolifération cellulaire (Takahashi et al, 2001).

VEGFR-2 active également le PI-3k qui résulte en une augmentation de phosphatidylinostol (3, 4, 5) triphosphate et l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt. La voie de signalisation de PI-3k/Akt régule la survie des cellules endothéliales en inhibant les voies pro-apoptotiques telles que BAD et Caspase 9 (Gerber et al, 1998). Les signaux de survie envoyés par le VEGFR-2 et PI-3k/Akt dépendent de l'intégrité des jonctions d'adhérence formées par VEGFR-2, PI-3k, la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine) et la β -caténine (Carmeliet et al, 1999). La rupture de ce complexe bloque la transmission des signaux de survie et provoque l'apoptose des cellules endothéliales. L'inhibition de cette voie par le LY294002 ou le wortmannin, a en plus reliée l'activation de PI-3k/Akt à la migration des cellules endothéliales induite par le VEGFR-2 (Dimmeler et al, 2000; Morales-Ruiz et al, 2000). La stimulation de la voie PI-3k/Akt entraîne aussi l'activation de la synthèse endothéliale du monoxyde

d'azote (eNOS) qui génère NO (voir détails section 1.3). L'implication de la Tyr⁸⁰¹ du récepteur au niveau de cette voie de signalisation a récemment été démontrée par des membres de notre laboratoire (Garcia-Blanes et al, 2007) . Il est à noter que le NO apporte une contribution essentielle aux actions biologiques du VEGF stimulées par le VEGFR-2.

La promotion de la migration des cellules endothéliales traduit par le VEGFR-2 implique la participation de plusieurs molécules de signalisation. Parmi celles-ci on compte FAK et son substrat, paxillin, qui sont impliquées dans le renouvellement des points focaux d'adhésion au cours de la migration cellulaire (Abedi and Zachary, 1997; Le Boeuf F. et al, 2004). L'activation séquentielle de Cdc42 et de p38 MAPK fut démontrée comme étant responsable du remodelage de l'actine induit par le VEGF. De plus, la phosphorylation du résidu tyrosine 1214 du VEGFR-2 est reconnue pour être impliquée dans ce procédé (Lamallice et al, 2004). p38 MAPK stimule également la phosphorylation de la protéine de choc thermique 27 (HSP27), une chaperone moléculaire qui régule positivement la réorganisation de l'actine et la migration des cellules endothéliales, stimulées par le VEGF (Rousseau et al, 1997).

La motilité des cellules endothéliales semble en plus être régulée par la protéine IQGAP1 « IQ motif containing GTPase activating protein 1 », un effecteur de Rac1. Rac 1 est un membre de la famille des Rho GTPase connu pour être impliqué dans la migration cellulaire. Il a donc été rapporté que cette protéine pouvait se lier au VEGFR-2 phosphorylé ainsi qu'à Rac1. De plus, la co-

localisation de VEGFR-2 actif et d'IQGAP1 a été détectée au niveau de la pointe des cellules endothéliales en migration (Yamaoka-Tojo et al, 2004).

Plusieurs autres molécules de signalisation peuvent être activées par le VEGFR-2 dont la protéine Src. Bien que les interactions entre le VEGFR-2 et Src ne sont pas tout à fait claires, l'importance du rôle de Src dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF fut prouvée par le biais de souris déficientes pour les gènes Src et Yes, deux membres de la famille Src, où une altération de leur perméabilité endothéliale a été observée (Eliceiri et al, 1999). Malgré tout, le mécanisme par lequel le VEGF stimule la perméabilité vasculaire est toujours inconnu. Toutefois, une récente étude a également démontré un rôle pour la β -arrestine 2 dans l'internalisation de la VE-cadhérine. Ce résultat dévoile une étape de l'initiation de la perméabilité vasculaire qui requiert en plus, l'activation séquentielle du VEGFR-2/Src/Vav2/Rac/Pak (Gavard and Gutkind, 2006).

1.2.3.3.1 Modulation de l'activité du VEGFR-2

L'activité du VEGFR-2 est modulée par des corécepteurs pouvant modifier la distribution du VEGF dans les tissus ainsi que la stabilité du complexe de signalisation. Parmi ces corécepteurs, on dénombre les protéoglycans héparines sulfates (HSPGs) et la neuropiline 1 (NRP1).

Les HSPGs sont des lipides transmembranaires ou des protéines sécrétées qui interagissent avec le VEGF et d'autres protéines, par leurs chaînes héparines sulfates. Or, la trans-présentation du VEGFA165 au VEGFR-2 par des HSPGs

exprimés sur des péricytes avoisinants, entraîne une nette augmentation de l'amplitude et de la durée du signal (Jakobsson et al, 2006).

La NRP1 est une glycoprotéine transmembranaire exprimée au niveau des cellules endothéliales, de plusieurs types de cellules tumorales et de certains neurones. Elle est dépourvue d'activité catalytique intrinsèque et a tout d'abord été identifiée comme récepteur de la famille collapsine/sémaphorine ainsi qu'impliquée dans le guidage axonal (Neufeld et al, 2002). D'autres études, menées sur des embryons de souris, ont suggéré que le NRP1 joue aussi un rôle dans l'angiogenèse et la vasculogénèse. Ces travaux ont en premier lieu révélé que la surexpression de la NRP1 entraînait une augmentation de la densité de vaisseaux sanguins qui en plus étaient dilatés et hémorragiques, causant ainsi la mort des embryons au jour 17,5 (Kitsukawa et al, 1995). Par la suite, des recherches menées sur des souris déficientes pour le gène NRP1 (NRP1 $-/-$) ont rapporté le décès de ces souris aux jours embryonnaires 10,5-12,5 causé par des anomalies au niveau cardiovasculaire (Kawasaki et al, 1999). Mise à part le fait que la NRP-1 soit essentielle au développement vasculaire normal, son rôle dans les fonctions endothéliales du VEGF demeure incompris. Toutefois, il fut démontré que la co-expression de NRP1 et du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales augmente le degré de liaison du VEGF165 au VEGFR-2 de 4 fois. Ceci a pour effet d'optimiser les effets chimiotactiques et mitogènes du VEGF165 (Soker et al, 1998). Par conséquent, cette même étude propose que la NRP-1 a la capacité de présenter le VEGF165 au VEGFR-2 de façon particulière, se traduisant par une signalisation intracellulaire plus efficace. À la lumière de ces

informations et par le fait que la NRP-1 est incapable d'induire des signaux, il va de soit que la NRP-1 n'est pas un récepteur fonctionnel mais agit plutôt comme corécepteur du VEGFR-2.

Il est à noter que l'activité du VEGFR-2 peut également être modulée par d'autres effecteurs n'agissant pas comme corécepteurs. Par exemple, le flot sanguin et les forces de cisaillement influencent le développement et le remodelage vasculaire, en partie par la création d'un complexe mécano-sensoriel impliquant le VEGFR-2, PECAM1 et la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine) (Tzima et al, 2005). VE-cadhérine peut aussi modifier l'activité du VEGFR-2 lorsque les cellules endothéliales sont à un degré de densité élevé. En fait, VE-cadhérine est connue pour s'associer à la phosphatase DEP1 qui déphosphoryle les résidus tyrosine du VEGFR-2 ce qui a pour effet d'atténuer la réponse intracellulaire (Grazia et al, 2003; La and Reid, 1995). Les intégrines jouent aussi un rôle important dans la signalisation cellulaire en faisant le lien entre les signaux intracellulaires activés par des facteurs solubles et les interactions cellulaires avec la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes. Certaines intégrines sont connues pour lier le domaine extracellulaire du VEGFR-2 ce qui potentialise l'activité du récepteur suite à une stimulation au VEGF (Soldi et al, 1999).

La modulation de l'activité du VEGFR-2 est donc un évènement complexe nécessitant la participation d'un bon nombre de partenaires.

1.3 Monoxyde d'azote (NO)

En 1987, le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) connu pour ses propriétés vasorelaxantes, fut identifié comme étant le NO. Le NO est donc le stimulateur endogène de la guanylate cyclase soluble (sGC) provoquant une augmentation des taux de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et par conséquent, la relaxation du muscle lisse vasculaire (Moncada et al, 1991). Or, ce concept révolutionnaire suggérant qu'un gaz puisse agir comme molécule de signalisation *in vivo*, mérita le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1998. Le NO joue d'importants rôles au niveau du système cardiovasculaire. Il est non seulement impliqué dans la régulation du tonus vasculaire mais aussi dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des cellules à l'endothélium, la prolifération des cellules musculaires lisses ainsi que dans le processus angiogénique.

1.3.1 Les synthèses du monoxyde d'azote

La synthèse du NO est catalysée par des enzymes nommés synthéses du monoxyde d'azote (NOS) qui utilisent le β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH) et l'oxygène (O_2) pour oxyder la L-arginine en citrulline et en NO. On distingue trois isoformes de NOS : nNOS (NOS I) pour NOS neuronale, iNOS (NOSII) pour NOS inductible et eNOS (NOS III) pour NOS endothéliale. Le nNOS est non seulement exprimé dans les neurones des systèmes nerveux central et périphérique mais aussi au niveau du muscle squelettique, de l'adventice de certains vaisseaux, l'épithélium pulmonaire, le système gastro-intestinal et le

système génito-urinaire. L'enzyme iNOS fut tout d'abord isolée des macrophages activés mais on en retrouve également dans plusieurs autres types cellulaires activés tels que; les monocytes, les neutrophiles, les éosinophiles, les hépatocytes, les cellules du muscle lisse vasculaire, les myocytes, les ostéoblastes, les fibroblastes, l'épithélium et l'endothélium. La forme eNOS est quant à elle exprimée au niveau des cardiomyocytes, des plaquettes et de l'endothélium vasculaire. Les trois isoformes sont le produit de gènes distincts mais 50-60% de leur séquence est identique. Bien que ces isoformes partagent des propriétés chimiques et enzymatiques similaires, chaque enzyme possède des fonctions catalytiques et régulatrices qui lui sont propres (Dudzinski et al, 2006).

Comme nous étudions principalement les effets du NO stimulés par le VEGF au niveau de l'endothélium vasculaire, seules les caractéristiques concernant l'enzyme eNOS seront décrites.

1.3.2 La synthèse endothéliale du monoxyde d'azote

eNOS est une hémoprotéine de 133 kDa qui est responsable de la production de NO dans les cellules endothéliales en réponse à des agonistes tels que la bradykinine, l'acétylcholine ou le VEGF ainsi qu'aux forces de cisaillement. eNOS est formé de deux domaines structuraux (Figure 5). Premièrement, le domaine oxygénase (en position N-terminale) qui possède les sites de liaisons pour l'hème, le tétrahydrobioptérine (BH₄), l'oxygène moléculaire et pour la L-arginine. Ce domaine comporte également les sites de myristoylation sur la glycine en position 2 et de palmitoylation sur les cystéines en positions 15 et

26 qui sont déterminants pour l'activation d'eNOS en spécifiant sa localisation intracellulaire (voir section 1.3.4.3.1) (Liu et al, 1995; Sessa et al, 1993). Deuxièmement, le domaine réductase (en position C-terminale) qui comporte les sites de liaisons pour la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et le β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADPH). Les domaines oxygénase et réductase sont liés entre eux par le site de liaison à la calmoduline (CaM). On note également la présence de deux boucles d'auto-inhibition qui gênent à l'activité enzymatique ainsi qu'à la sensibilité de la CaM pour eNOS (Lane and Gross, 2002; Salerno et al, 1997).

C'est sous forme d'homodimère que l'enzyme eNOS est actif. La formation du dimère est réalisée par l'association des régions de chaque monomère comportant les sites de liaison pour l'hème, la L-arginine et le BH_4 . De plus, la présence d'un centre zinc ayant pour fonction de stabiliser la structure dimérique en interagissant avec les résidus cystéines 96 et 101 des monomères, a été découverte (Raman et al, 1998).

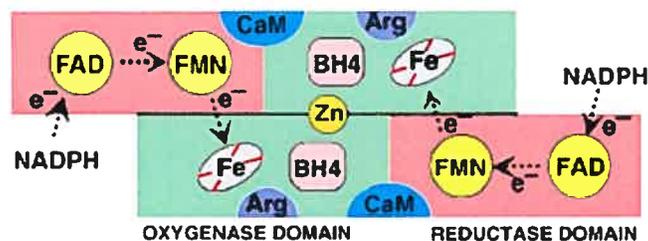


Figure 5 : Structure homodimérique d'eNOS.

Cette représentation schématique inclut les cofacteurs d'eNOS et le patron de transfert des électrons fournis par le NADPH (Gorren and Mayer, 2007).

1.3.3 La biosynthèse du NO au niveau de l'endothélium

Il est proposé que la synthèse du NO se fait en deux réactions monooxygénases comportant plusieurs étapes. Les deux cycles monooxygénases consomment une molécule d'oxygène et requiert des électrons qui seront fournis par le NADPH. Ces électrons sont livrés par le domaine réductase d'où ils seront transférés du NADPH à l'hème en passant par les cofacteurs flavines. Il est à noter que la liaison de la calmoduline à son site, en présence de calcium, permet ce transfert d'électrons entre les deux domaines. La FAD peut accepter 2 électrons à la fois provenant du NADPH et la FMN est responsable du transfert d'un électron à la fois vers l'hème. Ceci permettra à un oxygène moléculaire de se fixer au fer de l'hème afin de servir de site de liaison pour un substrat, la L-arginine (Gorren and Mayer, 2007). De cette façon, l'oxygène moléculaire pourra être oxydé et ira ensuite réagir avec la L-arginine liée pour libérer une molécule d'eau et former le N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA). Le NOHA est le substrat pour la seconde réaction monooxygénase menant à la génération de NO. Dans cette étape, 1 électron (ou 0,5 équivalent de NADPH) est requis pour former un second équivalent d'un oxygène moléculaire réduit qui ira attaquer le carbone de la guanidine du NOHA pour former un intermédiaire tétravalent. Cet intermédiaire subira ensuite un réarrangement pour former le groupement carbonyle de la citrulline ce qui entraînera également la formation de NO (Figure 6). Pour résumer, la biosynthèse du NO consomme 1 mole de L-arginine, 1,5 moles de NADPH et 2 moles d'oxygène moléculaire pour générer 1 mole de NO, 1 mole de L-citrulline et 2 moles d'eau (Dudzinski et al, 2006).

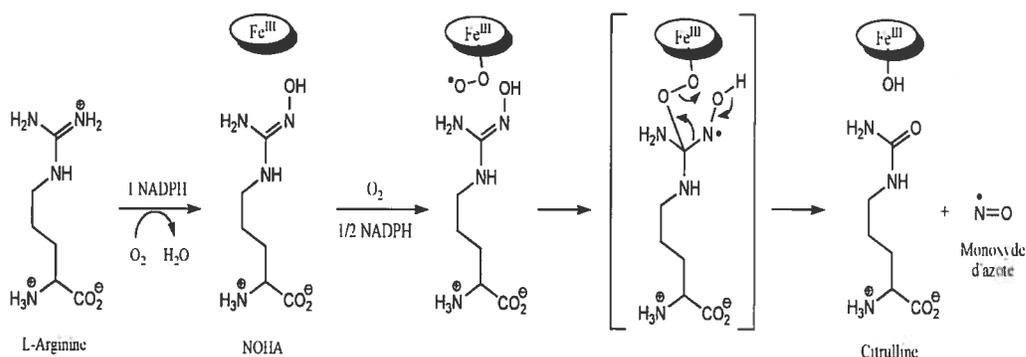


Figure 6 : Deuxième réaction monoxygénase nécessaire à la biosynthèse du monoxyde d'azote à partir du NOHA. L'atome de fer héminique est réduit par un électron provenant du NADPH avant de fixer une molécule d'oxygène. Le peroxyde de fer formé, qui possède le degré d'oxydation compatible avec la formation de NO, réagit avec le NOHA pour former un intermédiaire qui se décompose par la suite en citrulline, NO et en fer héminique au degré d'oxydation initial.

1.3.4 La régulation de l'enzyme eNOS

Étant donné que le NO est un radical libre relativement instable et que sa demi-vie *in vivo* ne dépasse pas 5 secondes, le NO ne peut pas être emmagasiné sous sa forme libre, il doit plutôt être synthétisé sur demande. Par conséquent, l'activité d'eNOS est sujette à un contrôle étroit de son activation et de son inactivation par de multiples mécanismes de régulation.

1.3.4.1 La régulation de l'expression génique d'eNOS

eNOS est exprimé de façon constitutive au niveau de l'endothélium vasculaire. De nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription ont été identifiés sur le promoteur de cet enzyme. On dénombre parmi ceux-ci, Sp-1, GATA, les protéines activatrices AP-1 et AP-2, les membres de la famille Ets, des facteurs nucléaires comme NF κ B, p53, etc... En plus, une étude a démontré l'existence d'une coopération protéine/protéine impliquée dans la modulation de la transcription d'eNOS. Cette équipe de recherche propose donc que la régulation d'eNOS au niveau de l'activité de son promoteur est hautement compliquée et est déterminée par la liaison de complexes protéiques aux sites de reconnaissance des activateurs (Karantzoulis-Fegaras et al, 1999).

1.3.4.2 Régulation de la stabilité de l'ARNm d'eNOS

Les niveaux d'eNOS dans les cellules endothéliales peuvent être efficacement régulés en modifiant la stabilité de son ARNm. Même si l'ARNm d'eNOS est relativement stable en situation physiologique, certaines conditions peuvent déstabiliser celui-ci. Par exemple, le TNF, l'hypoxie, le lipopolysaccharide et la thrombine abaissent les niveaux d'ARNm d'eNOS en diminuant sa demi-vie (Eto et al, 2001; Lu et al, 1996; McQuillan et al, 1994; Yoshizumi et al, 1993). Par opposition, un traitement au VEGF provoque l'augmentation des niveaux d'ARNm d'eNOS en le rendant plus stable ce qui entraîne aussi une hausse de l'expression de la protéine dans les cellules

endothéliales (Bouloumie et al, 1999). Le taux d'ARNm d'eNOS est également haussé dans les cellules endothéliales en prolifération (Arnal et al, 1994).

1.3.4.3 Régulation d'eNOS par le calcium intracellulaire (complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$)

La CaM fut la première protéine identifiée jouant un rôle dans la régulation d'eNOS. C'est au début des années 90 (Pollock et al, 1991) qu'il fut rapporté que l'activation d'eNOS nécessitait une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Effectivement, la stimulation des cellules endothéliales par un autacoïde tels que le VEGF, la bradykinine et la substance P, provoque la mobilisation du calcium intracellulaire entraînant ainsi la libération de NO. Or au point de vu mécanistique, il fut proposé que le calcium ainsi libéré irait se lier à la CaM. Par la suite, le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ s'associerait à l'enzyme dans le but de promouvoir la synthèse de NO (Dedkova and Blatter, 2002; Michel et al, 1997). L'association de la CaM à eNOS est aussi régulée par la kinase CK2. Cette kinase est responsable de la phosphorylation de la CaM ce qui prévient sa liaison à eNOS et par conséquent entraîne une diminution de la production de NO (Greif et al, 2004).

Ceci traçait toutefois un portrait bien simple de la situation. On sait maintenant que la régulation post-traductionnelle d'eNOS implique aussi des interactions protéine-protéine et la phosphorylation de l'enzyme à divers sites, nécessitant la participation de kinases et de phosphatases.

1.3.4.4 Régulations d'eNOS par des modifications post-traductionnelles

Le bon fonctionnement d'eNOS requiert un certain nombre de modifications post-traductionnelles dont l'acylation et la phosphorylation.

1.3.4.4.1 Régulation d'eNOS par acylation

Il est maintenant connu que la localisation cellulaire où tiendra place l'activation d'un enzyme ou la stimulation d'un complexe de signalisation, influencera l'efficacité de celui-ci. Comme mentionné précédemment, eNOS subi une myristoylation irréversible de sa glycine 2 et par la suite une double palmitoylation réversible des cystéines 15 et 26 (Liu et al, 1995; Sessa et al, 1993). Ces modifications permettent de diriger eNOS vers des sites membranaires où sont concentrées des molécules de signalisation et ainsi permettre sa phosphorylation et son activation en réponse à un stimulus, tel que le VEGF. Ceci fut démontré par l'utilisation de formes mutantes d'eNOS pour ces sites de myristoylation/palmitoylation où une localisation cellulaire altérée de ces mutants accompagne une diminution de la production de NO. Toutefois, ces mutants gardent une activité enzymatique *in vitro* inchangée, démontrant que seule la localisation intracellulaire, et non l'acylation de l'enzyme, influence l'activité catalytique d'eNOS (Liu et al, 1996; Sessa et al, 1995; Shaul et al, 1996). La présence d'eNOS fonctionnelle a été détectée au sein de trois localisations membranaires : à la membrane plasmique, au niveau des cavéoles et du Golgi (Garcia-Cardena et al, 1996; Liu et al, 1996; Shaul et al, 1996). La co-localisation des molécules de signalisation et des protéines formant le complexe de

signalisation d'eNOS au niveau de ces différents sites membranaires, facilite la production de NO et l'activation en aval des voies de signalisation qui s'en suit.

1.3.4.4.2 Régulation d'eNOS par phosphorylation

eNOS peut être phosphorylée au niveau de certains résidus sérines (Ser), thréonines (Thr) et jusqu'à maintenant au niveau d'un résidu tyrosine (Tyr). La phosphorylation de ces sites est grandement responsable du contrôle de la production de NO.

Le résidu Ser¹¹⁷⁷ qui est localisé dans le domaine réductase, est le site de phosphorylation d'eNOS qui a suscité le plus d'intérêt. Dans les cellules endothéliales en culture, la Ser¹¹⁷⁷ devient rapidement phosphorylée suite à un traitement au VEGF, à l'insuline, à l'estrogène, à la bradykinine ou encore par les forces de cisaillement (Dimmeler et al, 1999;Kim et al, 2001;Lantin-Hermoso et al, 1997;Fleming et al, 2001b;Gallis et al, 1999). Les kinases impliquées dans ce processus dépendent du stimulus appliqué. Par exemple, les forces de cisaillement induisent la phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁷ par l'activation d'Akt et de PKA (Boo et al, 2002b;Fisslthaler et al, 2000). Alors qu'une stimulation au VEGF entraîne la phosphorylation de cette sérine par l'activation de la voie PI3-k/Akt (Fulton et al, 1999). La protéine phosphatase 2A (PP2A) est aussi impliquée dans la régulation de la phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁹ (la forme bovine de la Ser¹¹⁷⁷) (Greif et al, 2002). Cette équipe a réussi à démontrer cette implication en prétraitant des cellules endothéliales avec des inhibiteurs de la PP2A et en utilisant un anticorps phospho-spécifique pour le site Ser¹¹⁷⁹.

L'activité d'eNOS est atténuée lorsque son résidu Thr⁴⁹⁵, situé dans le domaine de liaison de la CaM, est phosphorylé. Il apparaît que cette phosphorylation interfère avec la liaison du complexe Ca²⁺/CaM à eNOS ce qui expliquerait l'effet inhibiteur de cette phosphorylation sur la synthèse de NO (Fleming et al, 2001a). De plus, le niveau de phosphorylation basal de ce résidu est élevé dans les cellules endothéliales en culture. La déphosphorylation de ce résidu a toutefois été observée en réponse à des agonistes de la synthèse de NO, tels que la bradykinine, le VEGF et l'ionomycine (Harris et al, 2001;Lin et al, 2003). La protéine kinase C est responsable de la phosphorylation de la Thr⁴⁹⁵, alors que les phosphatases 1 et 2A et la calcineurine s'occupent de sa déphosphorylation (Harris et al, 2001;Matsubara et al, 2003;Michell et al, 2001;Thomas et al, 2002).

L'activité d'eNOS est aussi haussée par la phosphorylation de son résidu Ser⁶³³ qui est localisé au niveau du domaine de liaison de la FMN. La PKA semble être responsable de la phosphorylation de ce résidu (Boo et al, 2002a). Plusieurs agents qui induisent la phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁷, phosphorylent également la Ser⁶³³ tels que l'ATP, la bradykinine et le VEGF (Michell et al, 2001). L'initiation de la phosphorylation de la Ser⁶³³, induite par divers agents comme le VEGF, est plus lente que celle observée pour le résidu Ser¹¹⁷⁷. Il fut également rapporté que la stimulation de la phosphorylation de la Ser⁶³³ augmente la production de NO sans nécessiter une hausse de calcium intracellulaire (Boo et al, 2003). Ces découvertes suggèrent que la phosphorylation de la Ser⁶³³ est importante pour

maintenir eNOS active suite à sa stimulation initiale induite par le calcium et/ou la phosphorylation du résidu Ser¹¹⁷⁷.

La phosphorylation des résidus Ser⁶¹⁵ et Ser¹¹⁴ fut aussi identifiée. Par contre la fonction de ces phosphorylations sur l'activité d'eNOS reste à déterminer (Mount et al, 2007).

La phosphorylation de la Tyr⁸³ d'eNOS par des oxydants fut aussi rapportée. Cette étude démontre l'implication de la kinase Src dans ce procédé qui mène à l'activation de l'enzyme (Fulton et al, 2005).

1.3.4.5 Régulation par interactions protéine-protéine

Depuis un bon nombre d'années nous savons que l'activité d'eNOS est modulée par des interactions protéine-protéine, spécialement entre la CaM et eNOS. L'avancement de la science a toutefois permis d'identifier plusieurs autres protéines régulatrices associées à eNOS.

1.3.4.5.1 Cavéoline-1

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmiques ayant la forme d'un flacon. Elles sont riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Ces microdomaines de la membrane plasmique servent de plateformes de signalisation (Minshall et al, 2003). La protéine cavéoline-1 est essentielle à l'assemblage des cavéoles. Elle peut être phosphorylée au niveau de son résidu tyrosine 14 en réponse au stress oxydatif et aux forces de cisaillement via la kinase Src (Vepa et al, 1997;Volonte et al, 2001). La croyance est que ce site de

phosphorylation peut servir de site de liaison pour le recrutement de protéine à domaine SH2 (Li et al, 1996).

Une importante quantité d'eNOS est localisée au niveau des cavéoles où il est associé à la cavéoline-1. Cette liaison de la cavéoline-1 à eNOS a lieu au sein des acides aminés 350-358 de l'enzyme. Cette interaction avec la cavéoline, maintient eNOS dans un état inactif et assure sa localisation dans les cavéoles. En effet, il fut démontré que la coexpression d'eNOS et de la cavéoline-1 entraîne une inhibition importante de l'activité d'eNOS et par conséquent, une réduction de la production de NO (Garcia-Cardena et al, 1997; Michel et al, 1997; Vepa et al, 1997; Volonte et al, 2001). Il fut également suggéré que la CaM serait responsable de la dissociation d'eNOS à la cavéoline-1 bloquant ainsi la régulation négative exercée par la cavéoline-1 sur l'activité d'eNOS (Michel et al, 1997). Les souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1 (CAV1 -/-) ont un taux plasmatique de NO 5 fois plus élevé que la moyenne (Zhao et al, 2002). Cette découverte est en accord avec les observations ci-haut mentionnées, rapportant que la cavéoline-1 régule négativement l'activité enzymatique d'eNOS. De plus, les acides aminés 82-101 de la cavéoline-1, formant le domaine d'échafaudage de cette protéine, inhibent l'activité d'eNOS en interférant avec le transfert d'électrons allant du domaine réductase au domaine oxygénase de l'enzyme ce qui empêche la relâche de NO (Garcia-Cardena et al, 1997; Ghosh et al, 1998; Ju et al, 1997; Michel et al, 1997). L'utilisation d'un peptide formé des acides aminés 82-101 de la cavéoline-1 pour des études *in vivo*, a permis de mettre en évidence le rôle de ce peptide en tant que régulateur négatif de l'activité d'eNOS dans plusieurs conditions dont

l'inflammation, la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse et la croissance tumorale (Bucci et al, 2000; Gratton et al, 2003; Zhu et al, 2004).

1.3.4.5.2 Récepteur couplé aux protéines G (GPCR)

Des études ont démontré que l'enzyme eNOS s'associe directement avec certains GPCR, tels que le récepteur 2 de la bradykinine (B2) spécifiquement au niveau du domaine intracellulaire 4, le récepteur AT₁ de l'angiotensine II et le récepteur ET_B de l'endothéline (Ju et al, 1998; Marrero et al, 1999). C'est en 1996, qu'il fut rapporté que le domaine intracellulaire 4 du récepteur 2 de la bradykinine (B2) avait la capacité d'inhiber l'activité d'eNOS *in vitro*. En ce qui concerne ce mécanisme d'inhibition de l'enzyme, il apparaît que cette liaison pourrait interférer avec le transfert d'électrons entre la flavine et l'hème de l'enzyme (Golser et al, 2000).

1.3.4.5.3 Protéine interagissant avec eNOS (NOSIP)

NOSIP « NOS interacting protein » est une protéine de 34kDa qui se lie à eNOS au niveau des acides aminés 366-486 de l'enzyme. NOSIP inhibe la libération de NO stimulée par l'ionomycine lorsqu'elle est exprimée en présence d'eNOS. Toutefois NOSIP a aucun effet sur l'activité d'eNOS lorsque testé *in vitro*. La capacité de NOSIP à inhiber la production de NO dans les cellules intactes, est causée par une redistribution d'eNOS entre les compartiments intracellulaires et la membrane plasmique (Dedio et al, 2001; Fulton et al, 2001).

1.3.4.5.4 Dynamine-2

La dynamine-2 est une protéine de 100kDa qui est entre autre impliquée dans le mécanisme d'internalisation des récepteurs activés. La dynamine-2 comporte plusieurs domaines; GTPase, PHD « plecktrin homology domain », GED « GTPase effector domain » et PRD « prolin-rich domain ». En 2001, un groupe a démontré que la dynamine-2 pouvait s'associer à eNOS et entraîner une augmentation de son activité catalytique (Cao et al, 2001). Quelques années plus tard, on identifia que l'association de la dynamine-2 à eNOS se fait via le domaine PRD de la dynamine-2 et le domaine réductase d'eNOS. Cette interaction a pour effet d'accroître le transfert d'électrons au niveau du FAD et FMN au sein du domaine réductase d'eNOS (Cao et al, 2003).

1.3.4.5.5 Protéine de choc thermique 90 (HSP90)

HSP90 est une chaperonne moléculaire de 90 kDa exprimée de façon ubiquitaire et représente 1-2 % du contenu cellulaire protéique. Cette chaperonne est essentielle au bon repliement des protéines lors de leurs synthèses, à la translocation des protéines à travers les membranes, au contrôle de qualité au niveau du réticulum endoplasmique ainsi qu'au renouvellement protéique normal (Whitesell and Lindquist, 2005). HSP90 est aussi nécessaire à la survie des eucaryotes.

Il existe 2 isoformes chez les vertébrés, un isoforme inductible et un constitutivement exprimé; HSP90 α et HSP90 β , respectivement. HSP90 réside principalement dans le cytoplasme sous forme d'homodimère. Chaque monomère

est composé de trois principaux domaines; un domaine N-terminal, un domaine milieu (M) et un domaine C-terminal. Le domaine N-terminal comporte le site de liaison à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP est essentielle au rôle d'HSP90 comme chaperonne. Le domaine N-terminal est relié au domaine milieu par une région dite chargée qui apporte une certaine flexibilité entre ces deux domaines. Le domaine M sert de site de liaison pour les protéines dites clientes d'HSP90. Le domaine C-terminal sert quant à lui de site de dimérisation entre les 2 monomères (Whitesell and Lindquist, 2005) (Figure 7).

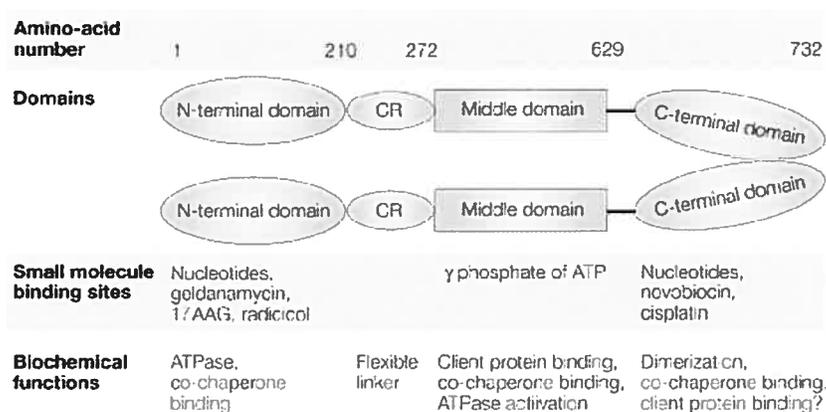


Figure 7: Structure homodimérique d'HSP90.

Les chiffres 1-732 indiquent la position approximative des acides aminés de la séquence humaine et définissent les domaines fonctionnels. CR réfère à la région chargée qui sert de liaison flexible entre les domaines N-terminal et milieu. Le site de liaison de diverses molécules et une liste des fonctions biologiques sont indiqués (Whitesell and Lindquist, 2005).

L'activité d'HSP90 peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de résidus sérine, thréonine ainsi que

l'acétylation d'un résidu lysine régulent négativement ses fonctions (Mimnaugh et al, 1995; Scroggins et al, 2007; Zhao et al, 2001).

HSP90 est associé à eNOS dans les cellules endothéliales au repos et cette association devient plus importante lorsque ces cellules sont stimulées au VEGF, à l'histamine, aux estrogènes ou encore par les forces de cisaillement (Garcia-Cardena et al, 1998; Russell et al, 2000). HSP90 lie eNOS par son domaine M au niveau des acides aminés 442-600 de l'enzyme. De façon intéressante, ce site de liaison entrecoupe le site de liaison de la cavéoline-1 sur eNOS. Une étude a d'ailleurs démontré que la cavéoline-1, eNOS et HSP90 existe sous forme d'hétérocomplexe dans les cellules endothéliales. En plus, la chaperonne HSP90 lie plus efficacement eNOS en présence de la calmoduline ce qui diminue l'effet inhibiteur de la cavéoline-1 sur l'activité d'eNOS (Gratton et al, 2000). Cette équipe suggère que la présence de cet hétérocomplexe pourrait moduler le faible niveau d'activité d'eNOS dans des cellules au repos. Toutefois, lorsque survient une élévation du calcium intracellulaire, la Ca^{2+}/CaM permettrait un recrutement plus efficace d'HSP90 au complexe et faciliterait la libération d'eNOS de l'emprise de la cavéoline-1 (Gratton et al, 2000). HSP90 lie aussi par son domaine M, la protéine Akt au niveau des acides aminés 229-309. Comme rapporté précédemment, la kinase Akt active eNOS en phosphorylant son résidu Ser¹¹⁷⁷. Une étude a démontré, par des essais kinase *in vitro*, que la phosphorylation d'eNOS par Akt était facilitée en présence d'HSP90 suggérant que la chaperonne pourrait servir d'échafaudage pour ces deux protéines. Ce groupe propose également que l'association d'Akt à HSP90 protégerait la kinase

contre la déphosphorylation par la phosphatase PP2A (Sato et al, 2000). Récemment, une étude a identifié un rôle pour la kinase PDK1 dans l'activation d'eNOS gouvernée par HSP90. PDK1 est la kinase responsable de l'activation d'Akt. Or, cette équipe a fait la démonstration que la chaperonne HSP90 est en mesure d'empêcher la dégradation de PDK1 et ainsi permettre à Akt d'avoir une activité plus soutenue, donc d'activer eNOS plus efficacement (Wei and Xia, 2005).

1.3.5 Implication du NO dans les propriétés biologiques du VEGF

Le facteur angiogénique VEGF stimule, via l'activation de son récepteur-2, plusieurs voies de signalisation et la production de NO au niveau des cellules endothéliales. L'utilisation de souris déficientes pour le gène eNOS (eNOS $-/-$) a permis de démontrer l'importance du NO dans les activités biologiques du VEGF. En effet, une diminution importante de l'angiogenèse stimulée par le VEGF chez ces souris fut observée. Ceci suggère donc que la libération de NO qui dépend du VEGF soit grandement impliquée dans ce processus.

Comme mentionné plus tôt, le VEGFR-2 peut stimuler la production de NO par l'activation de deux voies de signalisation. Tout d'abord, en stimulant la voie PI-3k/Akt. Une fois active, la kinase Akt est en mesure de phosphoryler le résidu S¹¹⁷⁷ de l'enzyme eNOS et ainsi promouvoir la relâche de NO. Deuxièmement, en activant la voie de la PLC- γ qui conduit à l'augmentation de calcium intracellulaire et donc à la production de NO par la liaison de la Ca²⁺/CaM à eNOS.

1.3.5.1 Rôle du NO dans la prolifération des cellules endothéliales stimulée par le VEGF

Comme décrit plus tôt, la prolifération des cellules endothéliales stimulée par le VEGF, provoque la stimulation de la PLC- γ qui à son tour stimule la PKC par la génération de diacylglycérol et l'augmentation de calcium intracellulaire afin de permettre l'activation de la voie Raf-MEK-MAPK. Les travaux menés sur la PKC dans la prolifération des cellules endothéliales ont permis d'établir que les isoformes α et ζ jouent un rôle crucial dans les effets mitogéniques du VEGF (Wellner et al, 1999). Dans cette même direction, il fut observé que le NO régule négativement l'activité de la PKC δ favorisant la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF (Shizukuda et al, 1999). L'implication du NO dans la prolifération des cellules endothéliales a une autre fois été reconnue par le biais d'un inhibiteur de l'enzyme eNOS, le L-NAME. Le prétraitement des cellules endothéliales au L-NAME inhibe de façon significative la prolifération, stimulée par le VEGF, de ces cellules (Papapetropoulos et al, 1997).

1.3.5.2 Rôle du NO dans la survie des cellules endothéliales stimulée par le VEGF

Le rôle du NO dans ce cas-ci semble être relié à ses effets anti-apoptotiques, principalement en inhibant l'activité des caspases. Des études *in vitro* et *in vivo* ont fait la preuve que le NO a la capacité d'interférer avec le processus apoptotique en nitrosylant des résidus cystéines essentiels à l'activité des caspases (Li et al, 1997; Rossig et al, 1999). D'autre part, l'activation de

Erk1/2 permet de maintenir la phosphorylation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 de manière à bloquer sa protéolyse. La MAP kinase phosphatase-3 (MKP-3) est responsable de la déphosphorylation de Erk1/2 et par corrélation joue un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Or, il fut rapporté que le NO exerce un effet anti-apoptotique en déstabilisant l'ARNm de la MKP-3 ce qui permet de maintenir Erk1/2 active et d'inhiber l'apoptose des cellules endothéliales en prévenant la dégradation de Bcl-2 (Rossig et al, 2000). Une étude récente a également indiqué l'implication du NO dans la survie des cellules endothéliales en démontrant son action sur la dynamine-2 (Kang-Decker et al, 2007). En exprimant un dominant négatif de la dynamine dans des cellules endothéliales, ce groupe montre une hausse de l'apoptose de ces cellules en réponse à un traitement au TNF- α . Il propose donc que l'endocytose qui dépend de la dynamine promeut des signaux de survie cellulaire. De plus, les résultats de cette équipe dévoilent que le NO peut nitrosyler des résidus cystéines spécifiques de la dynamine-2 ce qui a pour effet d'initier l'endocytose et de permettre l'activation des signaux de survie.

1.3.5.3 Rôle du NO dans la migration des cellules endothéliales stimulée par le VEGF

L'implication du NO dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF, fut dévoilée par diverses études. Pour débiter, le NO est impliqué dans le mouvement scalaire des cellules endothéliales et agit comme agent permissif de la migration cellulaire stimulée par le VEGF. Ceci fut prouvé par des

tests d'impédance démontrant que le NO induit des mouvements oscillatoires spontanés des cellules endothéliales stationnaires (Noiri et al, 1998). Par la suite, ces mouvements deviennent vectoriels par l'ajout de VEGF. L'inhibition de l'enzyme eNOS par le L-NAME ou un anti-sens a également servi à identifier le rôle important du NO dans la migration des cellules endothéliales qui dépend du VEGF (Noiri et al, 1998).

La migration des cellules endothéliales promue par le VEGF requiert également la participation de la kinase FAK. Une étude a fait la preuve que le NO joue aussi un rôle à ce niveau. Effectivement, il fut rapporté que le NO agit comme régulateur de la formation du complexe d'adhésion, la formation de fibre de stress et de la phosphorylation de FAK (Y¹²⁵) (Goligorsky et al, 1999).

Le rôle indéniable du NO dans la migration des cellules endothéliales stimulée par le VEGF fut une fois de plus prouvé par une étude rapportant que la phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁷ d'eNOS par Akt, est essentielle à la migration cellulaire induite par le VEGF (Dimmeler et al, 2000). Pour ce faire, ce groupe a prétraité des cellules endothéliales aux inhibiteurs de la PI-3k soit le LY294002 ou le wortmannin et a constaté que le prétraitement causait une inhibition de la migration cellulaire provoquée par le VEGF. Afin de démontrer l'importance de la phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁷ dans cette fonction biologique, cette équipe a utilisé un mutant d'eNOS où la Ser¹¹⁷⁷ a été remplacée par une alanine, rendant ainsi l'enzyme non-phosphorylable à cette position. Or, l'expression de ce mutant empêcha la migration des cellules endothéliales stimulées au VEGF.

1.3.5.4 Rôle du NO dans la perméabilité vasculaire stimulée par le VEGF

L'implication du NO dans la perméabilité vasculaire fut proposée étant donné que le fait d'inhiber l'enzyme eNOS par le L-NAME ou encore par le cavtratin, bloque l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF (Gratton et al, 2003;Murohara et al, 1998). Une équipe a toutefois démontré que le NO est en mesure de rompre le complexe d'adhésion VE-cadhérine/caténine en utilisant des donneurs de NO comme le SIN-1 et le SNAP. De tels traitements causent une diminution dans l'expression de VE-cadhérine ainsi qu'une baisse du nombre de complexe VE-cadhérines/caténines cytoplasmiques. De plus, cette diminution des VE-cadhérines corrèle avec une augmentation de la perméabilité vasculaire tant *in vitro* qu'*in vivo* (Gonzalez et al, 2003). Ces observations démontrent une fois de plus l'influence du NO dans cette fonction.

1.4 Régulation de l'activité des récepteurs de type tyrosine kinase

Afin de fournir une réponse cellulaire adéquate, l'activité des RTKs doit être étroitement régulée. L'internalisation et l'ubiquitination menant à la dégradation des RTKs activés, occupent une place importante dans la régulation négative et la spécificité de la signalisation intracellulaire initiée par ces récepteurs. En effet, ces deux mécanismes permettent de restreindre le nombre de récepteurs à la membrane plasmique et favorise l'arrêt ou le prolongement de certains signaux intracellulaires.

1.4.1 Principes de base de l'internalisation

Le mécanisme de base de l'internalisation, aussi appelé endocytose, permet la prise de nutriments et la destruction de pathogènes par les cellules. Ce mécanisme a également évolué afin de stopper les signaux intracellulaires en favorisant la dégradation des protéines responsables de ces signaux. Toutefois, il ne faudrait pas croire que l'internalisation des RTKs sert d'interrupteur (ouvert/fermé) pour la signalisation par la destruction de protéines. Il faudrait plutôt voir ce mécanisme comme un fin ajustement qui assure la bonne finalité de l'action biologique initiée, en modulant l'intensité et la durée du signal (Marmor and Yarden, 2004).

L'internalisation des récepteurs suite à leur activation peut se faire via deux voies principales; la voie des clathrines et la voie des cavéoles. Les vésicules de clathrines sont des invaginations de la membrane plasmique composée de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères assemblées en panier. Des protéines adaptatrices telle que AP2, sont aussi présentes au niveau de ces invaginations de membranaires. Ces protéines sont des composantes majeures de cette voie qui lient directement les clathrines et d'autres molécules qui régulent l'endocytose et l'assemblage protéique à être internalisé dans le but d'induire la formation de vésicules couvertes de clathrines (Le Roy C. and Wrana, 2005). Tel que décrit précédemment, les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique ayant la forme d'un flacon qui sont très abondantes dans les cellules endothéliales vasculaires et riches en cholestérol et en glycosphingolipides. La structure et la fonction des cavéoles dans la signalisation et dans l'internalisation dépendent de la présence de la cavéoline-1 et du cholestérol (Mukherjee et al, 2006). En plus,

l'endocytose par les cavéoles demande la contribution de protéines de transport vésiculaires nommées : VAMP, NSF, SNAP, annexines et des protéines liant le GTP (Schnitzer et al, 1995). Le détachement de la membrane plasmique des vésicules de transport néoformées par l'une ou l'autre de ces voies d'internalisation, nécessite l'activité GTPasique de la dynamine-2.

Une fois détachée, la vésicule couverte de clathrines se fusionne à une vésicule interne pour former l'endosome précoce qui cheminera jusqu'à l'endosome tardif. Les termes précoce et tardif sont utilisés pour distinguer les deux types d'endosomes selon la cinétique d'entrée des molécules internalisées, leurs morphologies et leurs localisations (Marmor and Yarden, 2004). Les molécules internalisées peuvent être recyclées à la membrane à partir des endosomes et par conséquent subir plusieurs rondes d'internalisation. Au sein de l'endosome tardif, la retenue des récepteurs internalisés entraîne la formation de vésicules internes nommées corps multivésiculaires qui entoureront le domaine cytoplasmique des récepteurs dans le but d'arrêter la signalisation. Ces compartiments fusionneront par la suite au lysosome où leurs contenus seront dégradés. Ce transport vésiculaire est accompagné d'une baisse de pH soit de 6,0-6,5 dans les endosomes précoces à 4,5-5,5 dans les endosomes tardifs et dans les lysosomes (Sorkin and Von Zastrow M., 2002).

L'internalisation des RTKs par les cavéoles entraîne la formation des cavécules qui permettent le transport de leur chargement jusqu'aux cavéosomes. À partir de là, les molécules internalisées peuvent être conduites soit au Golgi, au réticulum endoplasmique, au noyau ou bien au lysosome afin d'être dégradées.

Deux types de modifications post-traductionnelles influencent l'endocytose des récepteurs : la phosphorylation et l'ubiquitination. Ces modifications peuvent être renversées par des phosphatases et des enzymes de déubiquitination. Il est à noter que les protéines recrutées en conséquence de ces modifications, sont également impliquées dans la régulation négative des récepteurs en ce qui concerne le mécanisme d'internalisation (Marmor and Yarden, 2004).

1.4.2 Principes de base de l'ubiquitination

L'ubiquitination est un procédé qui requiert la conjugaison de l'ubiquitine à une protéine. L'ubiquitine est une protéine de 8,5kDa possédant 76 acides aminés. Sa séquence est hautement conservée au sein des eucaryotes. On dénote 96 % d'homologie entre les séquences humaine et la levure. Traditionnellement, l'ubiquitination fait référence au processus de dégradation des protéines ubiquitinilées par le protéasome 26S. Toutefois, de nouvelles données ont démontré que les ubiquitines ont aussi un rôle dans des fonctions non-protéolytiques telles que dans la réparation d'ADN, l'exocytose et l'endocytose (Hicke, 2001).

Le mécanisme d'ubiquitination est dirigé par une série de réactions enzymatiques (Figure 8). Tout d'abord, par un procédé qui requiert de l'ATP, un enzyme appelé E1 forme un lien thiol-esther avec la glycine 76 (G^{76}) en position C-terminale de l'ubiquitine. Ensuite, l'enzyme E2 accepte l'ubiquitine de l'enzyme E1 par une réaction de trans-thiolation. Finalement l'enzyme E3, aussi nommé ubiquitine ligase, catalyse le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E2 au

groupement ϵ -amine sur un résidu lysine du substrat. Il existe deux familles d'enzymes E3 : les protéines possédant un domaine HECT et les protéines ayant un domaine « RING finger ». Les protéines HECT forment un intermédiaire thiol-ester avec l'ubiquitine pour permettre son transfert au substrat. En contraste, les membres de la famille « RING finger », ont la capacité de lier simultanément l'enzyme E2 et le substrat permettant ainsi le transfert direct de l'ubiquitine de l'enzyme E2 au substrat.

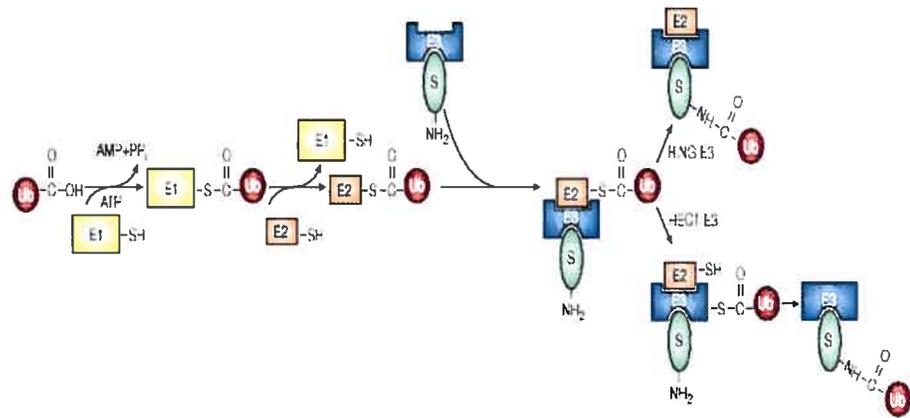


Figure 8 : Réactions enzymatiques menant à l'ubiquitination d'un substrat. Formation d'un lien thiol-ester entre l'enzyme E1 et l'ubiquitine. L'ubiquitine est ensuite transférée à l'enzyme E2 qui apporte l'ubiquitine à l'enzyme E3. Pour les ubiquitines ligases à domaine HECT, il y a formation d'un intermédiaire avant le transfert de l'ubiquitine au substrat. Pour les ubiquitine ligase à domaine « RING finger », le transfert de l'ubiquitine se fait directement par l'enzyme E2 lié à l'ubiquitine ligase (Weissman, 2001).

Il existe trois types d'ubiquitination incluant la mono-ubiquitination (ajout d'une seule ubiquitine), la multi-ubiquitination (ajout d'une ubiquitine sur plusieurs lysines) et la poly-ubiquitination (ajout de chaînes d'ubiquitines) (Figure 9). La formation de chaînes d'ubiquitines est possible grâce à la conjugaison de la

G⁷⁶ en C-terminale de l'ubiquitine et d'un résidu lysine au sein de l'ubiquitine elle-même. Une chaîne comportant seulement 4 ubiquitines liées à la lysine 48 (K⁴⁸) de la première ubiquitine est suffisante pour entraîner la dégradation de la protéine ciblée par le protéasome 26S (Chau et al, 1989). Alors que la poly-ubiquitination à la K⁶³ est impliquée dans la réparation de l'ADN (Spence et al, 1995). La mono-ubiquitination, semble quant à elle être suffisante pour induire des signaux menant à l'internalisation de la protéine ubiquitinilée. Ceci est possible par la reconnaissance de la mono-ubiquitination par des protéines possédant un domaine de liaison pour les ubiquitines telles que les UIM («ubiquitin-interacting motif»), les UBA (« ubiquitin-associated motif») et les enzymes E2. De telles protéines sont en mesure d'aider au rassemblement, à l'internalisation et aux mouvements intracellulaires des protéines ciblées (d'Azzo et al, 2005). La multi-ubiquitination des RTKs est aussi impliquée dans les processus d'internalisation et de dégradation de ces récepteurs (Haglund et al, 2003).

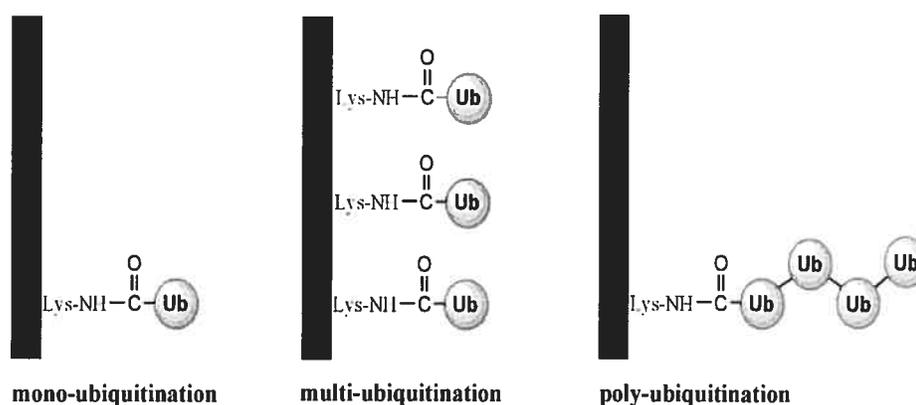


Figure 9 : Types d'ubiquitination.

Mono-ubiquitination (ajout d'une seule ubiquitine), multi-ubiquitination (ajout d'une ubiquitine sur plusieurs lysines) et poly-ubiquitination (ajout de chaîne d'ubiquitines sur un même résidu lysine).

Comme mentionné plus tôt, les enzymes E3 sont classés en deux familles : la famille à domaine HECT et la famille à domaine « RING finger ». La majorité des membres de la famille HECT ont un domaine C2 en position N-terminale qui est un site de liaison pour les phospholipides. Ils possèdent aussi un domaine multiple (2 à 4) WW au niveau de la portion centrale de la protéine. Ces motifs tryptophanes permettent l'interaction entre la protéine et son substrat. L'ubiquitine ligase E6 AP a été la première protéine HECT à être identifiée. E6 AP est responsable de l'ubiquitination du facteur de transcription p53 dans les cellules exprimant la forme oncogénique du papillomavirus humain (HPV) (Scheffner et al, 1990). Les protéines de la famille Nedd4 sont aussi des ubiquitines ligases de type HECT et sont hautement impliquées dans la régulation de la dégradation de diverses protéines transmembranaires. Par exemple, Nedd4 est responsable de l'ubiquitination des canaux sodiques épithéliaux sensibles à l'amiloride (ENaC). Cette ubiquitination mène à l'internalisation et à la dégradation de ces canaux (Rotin et al, 2001). Nedd4 joue aussi un rôle dans la régulation négative de la signalisation des récepteurs Notch. En effet, il fut rapporté que l'ubiquitine ligase Itch, un membre de la famille Nedd4, peut s'associer à Notch-1 via l'adaptateur Numb et induire l'ubiquitination du récepteur qui sera par la suite dégradé (McGill and McGlade, 2003). Grâce à son interaction avec la protéine Grb10, Nedd4 est également responsable de l'ubiquitination du récepteur au facteur de croissance homologue à l'insuline (IGF-1R) suite à son activation. L'IGF-1R ubiquitinilé est subséquemment internalisé et dégradé par le protéasome (Vecchione et al, 2003).

La signalisation du TGF- β est un autre exemple où des membres de la famille Nedd4 exercent un contrôle négatif (Kavsak et al, 2000).

Les ubiquitines ligases à domaine « RING finger » sont regroupées en 2 sous-groupes. Premièrement, les E3 à sous-unité multiple dont le site de liaison du substrat et le domaine « RING finger » résident au sein de protéines différentes. Ces complexes sont habituellement formés d'une protéine à domaine « RING finger » telle que Rbx1 et d'au moins trois autres protéines telles que la Cullin (1-7), d'un adaptateur comme Skip1 et d'une protéine comportant un domaine de liaison pour le substrat telle que F-box (d'Azzo et al, 2005). Les substrats des E3 à sous-unité « RING » multiple sont nombreux et diversifiés. On compte parmi ceux-ci les histones (Dai and Wang, 2006), p27 (Ungermannova et al, 2005), HIF-1 α (Cockman et al, 2000) et I κ B α (Strack et al, 2000). Deuxièmement, les E3 à sous-unité simple qui sont composés d'un site de liaison pour le substrat et d'un domaine « RING finger » sur le même polypeptide. Dans cette catégorie, on retrouve l'oncoprotéine Mdm2 qui tout comme E6 AP, est responsable de l'ubiquitination du facteur de transcription p53. La fonction de p53 dans des cellules exposées à un stress est d'induire l'apoptose ou d'inhiber la progression du cycle cellulaire. En situation normale, très peu de p53 est présent au noyau due à son ubiquitination par Mdm2 ce qui entraîne le facteur de transcription vers la voie de dégradation protéasomale (Shirangi et al, 2002). Mdm2 est aussi impliquée dans l'endocytose de certains récepteurs activés. En effet, une étude a rapporté que Mdm2 joue un rôle dans l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique en ubiquitinilant la β -arrestin-2 (Shenoy et al, 2001). En plus, il

semble que la β -arrestin soit impliquée dans l'internalisation du récepteur IGF-1R en servant de molécule adaptatrice entre la ligase Mdm2 et le récepteur. De cette façon, Mdm2 est en mesure d'ubiquitiner le récepteur activé qui sera par la suite dégradé par le protéasome (Girnita et al, 2003; Girnita et al, 2005).

L'ubiquitine ligase c-Cbl est une protéine importante du sous-groupe à sous-unité simple. Cette protéine est connue pour jouer un rôle majeur dans la régulation négative des RTKs. Étant donné qu'un des objectifs de la présente thèse était de déterminer le rôle de c-Cbl sur la signalisation endothéliale du VEGF, la dernière portion de l'introduction offre une description plus détaillée de la structure et de la fonction de cette ubiquitine ligase.

1.4.2.1 Ubiquitination des récepteurs de type tyrosine kinase par l'enzyme E3 c-Cbl

c-Cbl est une protéine ubiquitaire de 120 kDa dont la forme humaine possède 906 acides aminés. La famille des Cbl comporte trois membres chez le mammifère : c-Cbl, Cbl-b et cbl-c/cbl-3 (Figure 10). Ces trois membres possèdent un domaine de liaison pour les tyrosines kinases (TKB). Ce domaine est composé de 4 hélices empaquetées (4H), d'un site de liaison pour le calcium de type « EF hand » et d'un domaine de liaison pour les protéines à domaine SH2. Le domaine TKB est suivi du domaine « RING finger » qui est responsable de l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl. Jusqu'à ce stade la structure des membres de la famille Cbl est quasi identique. C'est en C-terminal que les différences se manifestent. c-Cbl et Cbl-b possèdent une grande région riche en proline tandis que celle du Cbl-

c/Cbl-3 est très courte. Il est donc possible pour c-Cbl et Cbl-b de lier des protéines à domaine SH2 et SH3. La portion C-terminale des c-Cbl et Cbl-b comporte des sites majeurs de phosphorylation ce qui leurs permettent là aussi d'avoir une interaction avec les protéines possédant un domaine SH2. La présence d'un motif « leucine zipper » et d'un domaine UBA caractérise également la portion C-terminale des c-Cbl et Cbl-b (Swaminathan and Tsygankov, 2006).

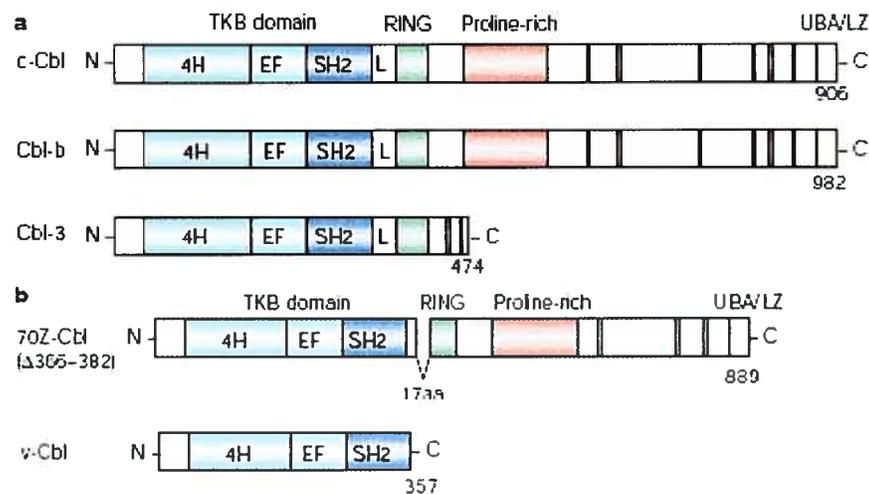


Figure 10: Organisation structurale des protéines de la famille Cbl chez l'humain. a) La portion N-terminale comporte le domaine TKB et « RING finger ». La portion C-terminale comporte une région riche en proline. Cette portion comprend aussi les sites de tyrosine phosphorylation pour les protéines c-Cbl et Cbl-b. On note également la présence d'une région UBA et « leucine zipper ». b) Les formes oncogéniques de c-Cbl. On note l'absence du domaine « RING finger » pour le 70Z/3-Cbl. v-Cbl comporte uniquement le domaine TKB. (adaptation d'une figure tirée de (Thien and Langdon, 2001))

c-Cbl est connu pour réguler à la baisse les RTKs activés, c'est-à-dire de diminuer la quantité de récepteur, ce qui lui permet de fournir un moyen par

lequel la signalisation intracellulaire est régulée négativement. Parmi les RTKs, l'étude portant sur la régulation de l'activité de l'EGFR est la plus complète et peut servir de modèle pour la compréhension de ce mécanisme pour d'autres RTKs (Figure 11). À titre d'exemple une description de ce concept sera rapportée. Premièrement, une stimulation à l'EGF provoque le recrutement de c-Cbl à la phosphotyrosine 1045 (Y¹⁰⁴⁵) de l'EGFR. Subséquemment, c-Cbl subit une phosphorylation de son résidu tyrosine 371 par l'EGFR, stimulant ainsi son activité ubiquitine ligase. Ceci entraîne donc la multi-ubiquitination de l'EGFR par c-Cbl à la membrane plasmique (Levkowitz et al, 1999; de Melker et al, 2001; Haglund et al, 2003). Suite à cette étape, il est probable que l'EGFR soit recruté aux vésicules de clathrine par des adaptateurs tel que Eps15 qui possède un domaine de liaison pour l'ubiquitine et par l'adaptateur AP2 qui est aussi en mesure de lier les clathrines (de Melker et al, 2004b; de Melker et al, 2004a). c-Cbl peut également ubiquitiner le récepteur à l'EGF en y étant recruté par la protéine Grb2. En effet, Grb2 est en mesure de lier l'EGFR par son domaine SH2 ainsi que c-Cbl par son domaine SH3, facilitant ainsi les processus d'ubiquitination et de régulation à la baisse du récepteur régis par c-Cbl (Waterman et al, 2002). De plus, des études ont démontré que la rupture de l'interaction EGFR-Grb2-Cbl, en utilisant des mutants de ces protéines ou en diminuant l'expression endogène de Grb2, inhibe le recrutement de c-Cbl au récepteur, le déplacement de l'EGFR vers les vésicules de clathrines ainsi que son internalisation via cette voie (Jiang and Sorkin, 2003; Jiang et al, 2003). Il fut de même suggéré que le recrutement de c-Cbl au récepteur par la phosphorylation de la Y¹⁰⁴⁵ ou via Grb2, qui peut se

produire de manière indépendante, entraîne l'ubiquitination de résidus lysines distincts au sein de l'EGFR (Grovdal et al, 2004). Ceci sous-entend que l'ubiquitination de lysines spécifiques aurait différentes conséquences pour le récepteur. De cette façon, l'ubiquitination de certaines lysines pourrait être essentielle au recrutement de l'EGFR à la machinerie endocytaire, alors que l'ubiquitination d'autres résidus lysine serait impliqué dans la répartition des récepteurs à l'EGF à être dégradés (Grovdal et al, 2004).

Un bon nombre de données suggèrent l'existence d'un second mécanisme impliqué dans la régulation à la baisse de l'EGFR par c-Cbl. Ce mécanisme dépend de la protéine à domaine SH3, nommée CIN85. CIN85 est exprimée de façon ubiquitaire et lie c-Cbl par sa portion C-terminale. c-Cbl sert en fait de lien entre l'EGFR activé et le complexe CIN85/endofilline. Ce complexe, associé aux vésicules de clathrines, induit la courbure négative de la membrane plasmique nécessaire à l'invagination durant le processus d'internalisation (Marmor and Yarden, 2004). Or, la rupture de l'interaction entre c-Cbl et CIN85 inhibe l'internalisation et la dégradation du récepteur à l'EGF sans toutefois perturber le mécanisme d'ubiquitination réalisé par c-Cbl (Soubeyran et al, 2002). De plus, la mutation du site de liaison pour CIN85 sur c-Cbl inhibe la dégradation de l'EGFR provoquée par c-Cbl (Kowanetz et al, 2003). Ce résultat vient donc renforcer l'hypothèse impliquant la participation de CIN85 dans la régulation à la baisse de l'EGFR faite par c-Cbl.

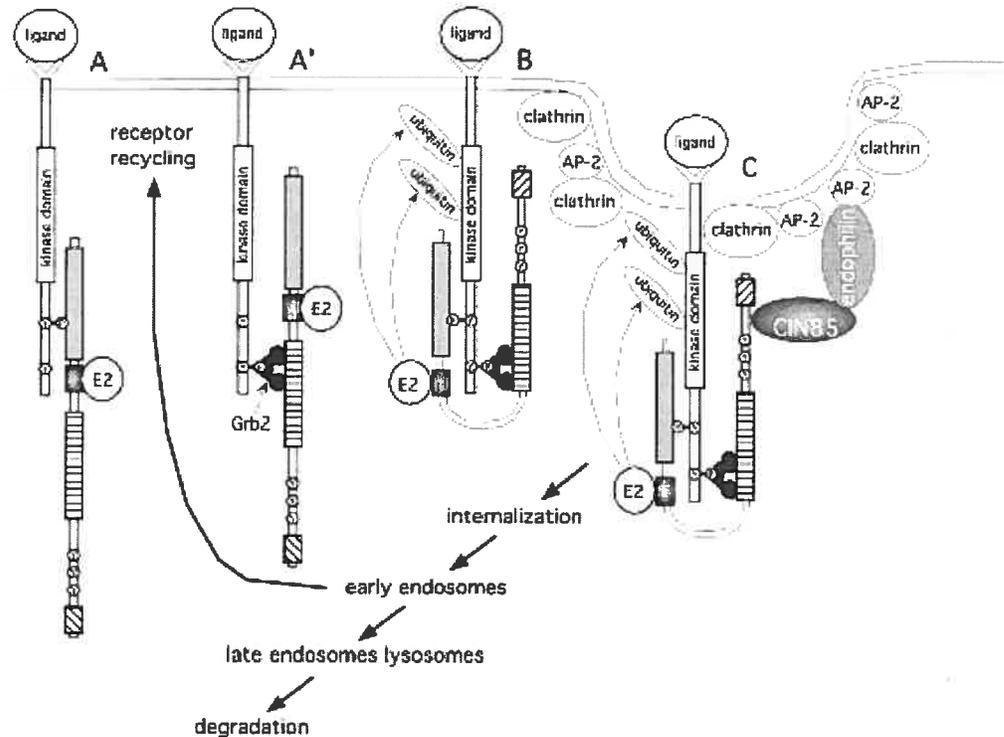


Figure 11 : Ubiquitination et dégradation de l'EGFR par c-Cbl.

L'activation de l'EGFR induit le recrutement de c-Cbl de façon directe (A) ou par l'adaptateur Grb2 (A'). Ensuite c-Cbl est phosphorylé et stimule l'ubiquitination du récepteur (B). Ceci a pour effet de diriger le récepteur vers les vésicules de clathrines sous la direction de CIN85 (C). Le récepteur est ensuite internalisé et sera ultérieurement dégradé (Swaminathan and Tsygankov, 2006).

L'activité de c-Cbl est aussi finement régulée par divers moyens. Parmi ceux-ci, c-Cbl peut être ubiquitinilé par lui-même ou par d'autres enzymes E3 tel que Nedd4, en vue d'être dégradé (Yokouchi et al, 2001a;Magnifico et al, 2003). La liaison de c-Cbl à un RTK activé peut aussi être restreinte par son interaction avec d'autres protéines comme Sprouty2 et Cdc42, interférant ainsi avec la capacité de c-Cbl à faire son action sur le récepteur ciblé (Wong et al, 2002b;Feng et al, 2006). De plus, le clivage des ubiquitines, liées au substrat, par des enzymes de déubiquitination contrecarre l'activité de c-Cbl en diminuant la dégradation de

ces protéines (Weissman, 2001). c-Cbl fut d'abord identifié sous sa forme oncogénique, v-Cbl. Au niveau structural, v-Cbl possède seulement le domaine TKB (Blake et al, 1991). Une autre forme oncogénique de c-Cbl, le 70Z/3-Cbl porte quant à lui une délétion de 17 acides aminés au sein de son domaine « RING finger » (Andoniou et al, 1994) (Figure 10). La régulation négative des RTKs par c-Cbl ainsi que la caractérisation de c-Cbl en tant qu'enzyme E3, mène à croire que les formes mutantes de c-Cbl agissent en opposition avec l'activité ubiquitine ligase normale de c-Cbl. Cette hypothèse est en accord avec les données rapportant que v-Cbl et 70Z/3-Cbl promeuvent la signalisation des RTKs et contrecarre donc l'activité de c-Cbl (Bonita et al, 1997; Thien and Langdon, 1997).

1.5 Objectifs de la thèse

Tel que décrit plus tôt, une panoplie d'études prouvent que l'activation du VEGFR-2 mène aux effets biologiques du VEGF. En effet, une stimulation au VEGF entraîne l'autophosphorylation du VEGFR-2 qui est ensuite en mesure d'induire l'activation de multiples voies de signalisation qui conduisent à la prolifération, la migration, la relâche de NO et la survie des cellules endothéliales. Par opposition, les événements intracellulaires qui contrôlent la réponse au VEGF sont peu connus. Toutefois, des mécanismes pouvant réguler négativement les RTKs furent proposés, tels que la déphosphorylation par des phosphatases, l'ubiquitination et l'internalisation du récepteur actif dans le but d'être dégradé. Les objectifs généraux de cette thèse consistent donc à déterminer quels sont les

événements moléculaires qui régulent négativement l'activité angiogénique du VEGF par l'activation du VEGFR-2 au niveau des cellules endothéliales.

Les objectifs spécifiques du projet de recherche sont:

- 1) Identifier des nouveaux partenaires moléculaires qui régulent les mouvements cellulaires du VEGFR-2. Nous nous sommes tout d'abord intéressés au rôle de l'ubiquitine ligase c-Cbl sur le récepteur VEGFR-2.
- 2) Déterminer quelles sont les résultantes d'une inhibition de la fonction ubiquitine ligase de c-Cbl sur les propriétés angiogéniques du VEGF.
- 3) Étudier l'influence de l'internalisation du VEGFR-2 sur les mécanismes de signalisations intracellulaires du VEGF.

En répondant à ces questions, nous croyons que les résultats obtenus apporteront des informations originales et nouvelles sur la biologie cellulaire des récepteurs au VEGF ainsi que sur l'importance des mouvements cellulaires du VEGFR-2 dans la signalisation intracellulaire du VEGF.

CHAPITRE 2

**ARTICLE 1 : VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR-
DEPENDENT DOWN-REGULATION OF Flk-1/KDR INVOLVES Cbl-
MEDIATED UBIQUITINATION: CONSEQUENCES ON NITRIC OXIDE
PRODUCTION FROM ENDOTHELIAL CELLS.**

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Martine Duval

Département de pharmacologie, faculté de médecine

Ph.D. pharmacologie

2. Description de l'article

Titre: Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination: Consequences on nitric oxide production from endothelial cells.

Ordre des auteurs : Duval, M. Bédard-Goulet, S. Delisle, C. and Gratton, J-P.

Revue de soumission proposées : *J Biol Chem.* 2003 May 30;278(22):20091-7.

État actuel de l'article : Publié

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis en accord pour que Martine Duval inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Régulation intracellulaire du VEGFR-2 menant à l'activation d'eNOS dans les cellules endothéliales.

Sara Bédard-Goulet		21/08/2007
Coauteur		Date
Chantal Delisle		21/08/2007
Coauteur		Date
Jean-Philippe Gratton		24/09/2007
Coauteur		Date

Contribution des auteurs

Afin d'étudier le rôle de c-Cbl dans la régulation négative du VEGFR-2 suite à un traitement au VEGF, nous avons partagé la tâche comme suit :

Sara Bédard-Goulet fut responsable des mesures d'oxyde nitrique libérées des cellules endothéliales suite à une double stimulation au VEGF (Figures 1A et 1B).

Chantal Delisle avait pour charge de démontrer l'effet d'un double traitement au VEGF sur sa signalisation endothéliale (Figure 1C). De plus, elle apporta sa contribution à l'étude de la dégradation du VEGFR-2 induite par le VEGF au niveau des cellules endothéliales (Figures 2C et 5B).

Jean-Philippe Gratton effectua des essais d'ubiquitination du VEGFR-2 et des expériences d'immunofluorescence (Figures 3A, 3B et 6).

Pour ma part, je fus responsable des expériences concernant la dégradation du VEGFR-2 suite à un traitement au VEGF (Figures 2A et B). J'ai travaillé sur les essais d'ubiquitination du VEGFR-2 dans les cellules COS-7 et endothéliales (Figures 3 A et C) et mis en évidence le rôle de c-Cbl dans ce procédé (Figures 3C, 4A et 4B). J'ai aussi effectué les travaux menant à analyser l'effet d'une surexpression de c-Cbl sur la relâche de NO induite par le VEGFR-2 dans des cellules COS-7 (Figure 5A). J'ai également apporté ma contribution aux expériences d'immunofluorescence (Figure 6).

La tâche de l'écriture du manuscrit fut partagée entre mon directeur de recherche et moi.

Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination: consequences on nitric oxide production from endothelial cells.

Martine Duval^{1,2}, Sara Bédard-Goulet¹, Chantal Delisle¹ and Jean-Philippe Gratton^{1,2,3,*}

¹Laboratory of endothelial cell biology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7.

Departments of ²Pharmacology and ³Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Running title: **Cbl-mediated ubiquitination of Flk-1**

*To whom correspondence should be addressed: IRCM, 110 des Pins Avenue West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7, Email: [REDACTED], [REDACTED], Phone: 514-987-5610, Fax: 514-987-5676

2.1 ABSTRACT

Ligand-stimulated degradation of receptor tyrosine kinase (RTK) is an important regulatory step of signal transduction. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is responsible for the VEGF-stimulated nitric oxide (NO) production from endothelial cells. Cellular mechanisms mediating the negative regulation of Flk-1 signaling in endothelial cell have not been investigated. Here we show that Flk-1 is rapidly down-regulated following VEGF stimulation of bovine aortic endothelial cells (BAEC). Consequently, VEGF pretreatment of endothelial cells prevents any further stimulation of Flk-1, resulting in decreased NO production from subsequent VEGF challenges. Ubiquitination of RTKs targets them for degradation; we demonstrate that activation of Flk-1 by VEGF leads to its polyubiquitination in BAEC. Furthermore, VEGF stimulation of BAEC or of COS-7 cells transiently transfected with Flk-1, results in the phosphorylation of the ubiquitin ligase Cbl, in the enhanced association of Cbl with Flk-1 and in the relocalization of Cbl to vesicular structures in BAEC. Overexpression of Cbl in COS-7 cells enhances VEGF-induced ubiquitination of Flk-1 whereas, a Cbl mutant lacking the ubiquitin ligase RING finger domain, 70Z/3-Cbl does not. Moreover, expression of Cbl in contrast to 70Z/3-Cbl inhibits the Flk-1-dependent activation of eNOS and thus NO release. In BAEC overexpressing Cbl, the degradation of Flk-1 upon VEGF stimulation is accelerated compared to cells transfected with a control vector (GFP). Our findings demonstrate that Flk-1 is rapidly down-regulated following sustained VEGF stimulation and identify Cbl as a negative regulator of Flk-1 signaling to eNOS. Cbl thus plays a role in the regulation of VEGF signaling by

mediating the stimulated ubiquitination and consequently, degradation of Flk-1 in endothelial cells.

2.2 INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a multifunctional cytokine essential for vascular development and maintenance (1). VEGF activates specific receptor tyrosine kinases namely Flt-1 (VEGFR-1), Flk-1 (VEGFR-2, KDR) and Flt-4 (VEGFR-3) (2-4). VEGF dependent endothelial cell proliferation, migration, survival and nitric oxide (NO) release are mediated via the activation of Flk-1 through a plethora of downstream signaling mechanisms (5). These signaling pathways include the classic Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway (MAPK), p38 MAPK, phospholipase C (PLC), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) /Akt (6-9). In particular, concomitant activation of PLC γ and the PI3-kinase/Akt pathways by VEGF leads to an increase in intracellular calcium and in phosphorylation of Ser¹¹⁷⁹ of the bovine form of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by Akt (Ser¹¹⁷⁷ in the human form). This results in a rapid and transient activation of eNOS leading to NO production (10-12).

Flk-1 follows the classical scheme of receptor tyrosine kinase (RTK) activation (13). Following VEGF-mediated Flk-1 autophosphorylation, several SH2 bearing proteins such as PLC- γ , Shc, Grb2 and Sck, are recruited to Flk-1 resulting in the activation of some of the above-mentioned signaling pathways (14-17). Substantial amounts of data describe the receptorial components necessary for VEGF-mediated activation of Flk-1 however, little is known about factors mediating down-regulation or negative regulation of Flk-1 signaling.

One of the mechanisms by which growth factor responses are negatively regulated is through ligand-stimulated degradation of the receptors. Several RTKs, such as EGFR, PDGFR and the colony-stimulating factor-1 (CSF-1) are actively

degraded following sustained exposure to their respective ligand. Degradation of RTKs is mainly initiated by the addition of ubiquitin moieties following receptor engagement, which has been shown to target them to the lysosomal/proteasomal machinery for degradation (18-21). Ubiquitination of substrates requires three concerted steps for the conjugation of ubiquitin molecules to a substrate protein. Initially the ubiquitin-activating enzyme (E1) forms a thiol ester bond with the carboxy-terminal glycine of ubiquitin. Then the ubiquitin molecule is transferred to an ubiquitin-conjugating enzyme (also known as ubiquitin-carrier enzyme or E2), again involving the carboxyl terminus of ubiquitin. The final step involves an ubiquitin ligase (E3) enzyme that complexes with the substrate and catalyses the transfer from E2 to the ϵ -amino group of a lysine residue on the target protein (22).

The multi-adaptor protein Cbl has been shown to possess E3 ligase activity and thus has been implicated in the ubiquitination of activated EGFR, PDGFR and other RTKs (19,23). The demonstration of prominent and inducible association of Cbl with the EGF receptor coupled to the observation that Cbl overexpression induced EGF and PDGF receptor ubiquitination confirmed Cbl as a regulatory component of RTK function.

The Flk-1 receptor has been shown to internalize upon VEGF stimulation (24). However, the regulation of VEGF dependent down-regulation of this important and essential component of vascular integrity has never been investigated. In this study, we demonstrate that sustained VEGF stimulation of endothelial cells results in Flk-1 protein down-regulation. This results in impaired eNOS activation and NO release during subsequent VEGF challenges. Consistent with the VEGF-stimulated degradation of Flk-1, we demonstrate that VEGF

stimulates ubiquitination of Flk-1 and that Cbl mediates this effect through its ubiquitin ligase activity. Finally, we also demonstrate that Cbl negatively regulates Flk-1 signaling and VEGF-induced NO release. Our results identify Cbl as a novel component in the negative regulation of VEGF signaling.

2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell culture--Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS (HyClone, Logan, UT), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cells were used between passages 5 and 8. Recombinant human VEGF obtained from the BRB Preclinical Repository of the NCI-Frederick Cancer Research and Development Center was used for cell stimulation throughout this study.

Constructs and transfections-- The bovine eNOS (pcDNA3), human Flk-1 (pRK7) and β -galactosidase (pcDNA3) cDNAs were described previously (12,25). Mouse Cbl (pxM139) and the mutant 70Z-Cbl (pxM139) were obtained from Dr. A. Veillette (IRCM) and HA-ubiquitin (pcMV) was obtained from Dr. S. Meloche (IRCM). COS-7 were transfected in either 6 wells plates or 60 mm dishes and transfected using lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). BAEC were transfected in 60mm dishes using Fugene 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) as described previously (26). The pEGFP-N3 expression plasmid (Clontech) was

used for the assessment of transfection efficiency as well as for plasmid control in BAEC transfections. Cell stimulations were done 48 h following transfections and protein expression was confirmed (60 μ g of total cell lysate) by SDS-PAGE and western blot analysis.

Nitric oxide release-- BAEC were serum starved for 12 h and processed for the measurement of nitrite (NO_2^-), the stable breakdown product of NO in aqueous solution, by NO-specific chemiluminescence as described previously (27). Briefly, samples containing NO_2^- were refluxed in glacial acetic acid containing sodium iodide. Under these conditions, NO_2^- is quantitatively reduced to NO, which was quantified by a chemiluminescence detector after reaction with ozone in a NO analyser (Sievers, Boulder, CO). Transfected COS-7 cells were also processed for the measurement of nitrite. 48h after transfection, cells were stimulated with VEGF for 2 h and NO was quantified as described above.

Antibodies, immunoprecipitations and immunoblotting-- Flk-1 (mAb), Cbl (pAb) and ubiquitin (pAB) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-eNOS antibody was purchased from BD Transduction Lab. HA-tag, phospho-Akt (Ser⁴⁷³), total Akt and phospho-eNOS (Ser¹¹⁷⁹) antibody were purchased from Cell Signaling and phospho-Tyrosine (4G10) was purchased from Update Biotech. Serum starved BAEC (16 h) were washed twice with cold PBS following VEGF stimulation. Total cells lysates were prepared in some cases by directly adding to the dishes boiling SDS sample buffer. For immunoprecipitations, cells were solubilized with a lysis buffer containing 1%

Triton X-100, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 20mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM Pefabloc and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Insoluble proteins were precipitated by centrifugation at 13000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants were then incubated for 2 h with the primary antibody (2 µg) at 4°C. Protein A-Sepharose (Sigma) (50 µl of a 50% slurry) was then added and incubated for an additional hour. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed 3 times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer and separated by SDS-PAGE onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham) and western blotted as described (28). Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL, Amersham).

Ubiquitination assay-- COS-7 cells were transfected with a maximum of 1.6µg total DNA encoding for Flk-1, HA-tagged ubiquitin, Cbl and 70Z-Cbl. Unstimulated and VEGF-stimulated cells were washed twice in cold PBS. Cells were lysed for 30 minutes in buffer containing 50 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 1 % Nonidet P-40, 125 mM NaCl, 10 mM N-ethyl maleimide, 20 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM Pefabloc and protease inhibitor cocktail. Immunoprecipitation and western blotting were done as described above.

Immunofluorescence-- BAEC were cultured on 0.1% gelatin-coated cover slips. Serum starved cells were stimulated for 30 min with VEGF (50 ng/mL). Cells

were then briefly washed with cold PBS and fixed for 15 min in PBS containing 3% paraformaldehyde. Cells were rinsed with PBS and permeabilized with 0.2% triton in PBS for 5 min. Fixed cells were blocked with 1% BSA and then incubated for 1h with the primary antibodies in 0.1% BSA in PBS (mouse anti-flk-1 (1:200) and rabbit anti-Cbl (1:200)). Bound primary antibodies were visualized following 1 h incubation using Alexa Fluor 488 labelled goat anti-mouse (1:600) and Alexa Fluor 568 labelled goat anti-rabbit (1:600) (Molecular Probes). Mounted cover slips were observed using a Zeiss LSM 510 imaging system.

2.4 RESULTS

VEGF pre-treatment inhibits subsequent VEGF signaling to eNOS

Ligand-dependent down-regulation of receptors has been previously shown for several RTKs; interestingly VEGF-dependent down-regulation of Flk-1 signaling has not been investigated. In order to study VEGF-dependent desensitization of Flk-1 receptor signaling in endothelial cells, we studied the effect of VEGF (50 ng/ml) pretreatment on subsequent VEGF (50ng/ml) stimulated NO release from bovine aortic endothelial cells (BAEC). Figure 1A shows that VEGF pretreatment resulted in a time-dependent reduction of VEGF-stimulated NO production. The 30 and 60 min pretreatments completely abolished any subsequent VEGF-stimulated NO production from BAEC (Fig. 1A). In order to demonstrate the specificity of this VEGF pretreatment, ATP (10 μ M) or ionomycin (1 μ M) were used as stimuli for NO production (Fig. 1B). A 30 min pre-treatment with VEGF (50 ng/ml) did not affect stimulated NO release by either

agonists. These results indicate that the reduced responses of BAEC to VEGF are specific to the down-regulation of the Flk-1 receptor.

To further document the VEGF inhibition of NO production, we monitored the impact of a 30 min VEGF pretreatment on Akt phosphorylation at Ser⁴⁷³ and on eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁹ stimulated by a second VEGF stimulation (Fig. 1C). As expected, the 30 min pretreatment with VEGF abolished any further increase in Akt and eNOS phosphorylation following a 10 min VEGF stimulation of cells. Serum (10% FBS) dependent activation of Akt was not affected by VEGF pretreatment (data not shown). Interestingly, in these experiments, Flk-1 protein levels were monitored and VEGF pretreatment significantly down-regulated the expression levels of Flk-1, which could be responsible for the impaired response to further VEGF stimulation.

VEGF-dependent down-regulation of Flk-1 in endothelial cells

To further investigate the VEGF-dependent down-regulation of Flk-1 shown in figure 1C, we monitored by Western blotting on total cell lysates from BAEC, the effect of a VEGF treatment on total Flk-1 protein levels. Firstly, when cells were lysed in 1% Triton X-100 based buffer, VEGF (50 ng/ml) stimulation induced a significant decrease in Flk-1 protein levels (Fig. 2A). Similar results were obtained when cells were lysed directly in SDS sample buffer (2% SDS) indicating that changes in detergent solubility of Flk-1 following stimulation cannot account for the observed down-regulation (Fig. 2B). This reduction, under both lysing conditions, was clearly noticeable after 15 min of stimulation and maximal after 30 to 60 min (Fig. 2A and B). Stimulation of BAEC for 30 min

with increasing concentrations of VEGF (1 –50 ng/ml) showed that this effect was dose-dependent and maximal at 25 ng/ml (Fig. 2C). In all cases, the cellular levels of Akt, used as a control for protein loading, were not affected by VEGF treatment (Fig. 2). These results indicate that VEGF stimulation induces specific degradation of Flk-1, which contributes to the reduced VEGF-dependent eNOS activation following a prior VEGF pretreatment of endothelial cells.

VEGF stimulates ubiquitination of Flk-1

Ubiquitination of cellular protein targets them for the degradative pathways. We investigated the ability of VEGF to induce the addition of ubiquitin moieties on the activated Flk-1 receptor. BAEC were stimulated with low concentrations of VEGF (10 ng/ml) in order to activate Flk-1 however maintaining its degradation to a minimum. Immunoblotting against ubiquitin on the Flk-1 immunoprecipitates showed that Flk-1 is ubiquitinated in response to VEGF treatment of BAEC (Fig. 3A). The anti-ubiquitin immunoblot reveals that the ubiquitination machinery adds multiple and variable numbers of ubiquitin moieties to Flk-1 since the polyubiquitinated form of Flk-1 is detected as a smear (Fig. 3A). Reprobing of the immunoprecipitates with anti-phosphotyrosine antibodies revealed that Flk-1 is rapidly and transiently tyrosine phosphorylated in response to VEGF treatment and that ubiquitination kinetically follows the VEGF-induced autophosphorylation of Flk-1 (Fig. 3A).

VEGF stimulates Cbl activation and association to Flk-1

Since Cbl has been shown to mediate several RTK ligand-mediated down-regulation through its ubiquitin ligase activity, we investigated the ability of VEGF to activate Cbl and promote its association to Flk-1 upon activation. As seen in figure 3B, activation of Flk-1 resulted in a rapid and transient phosphorylation (maximal at 5 min) of Flk-1 (Fig. 3B; top panels). Secondly, the BAEC lysates were immunoprecipitated with antibodies against Cbl and tyrosine phosphorylation levels of Cbl and its association with Flk-1 were monitored. Immunoblotting analysis of the Cbl immunoprecipitates confirmed that VEGF stimulation of BAEC led to a rapid and sustained phosphorylation of Cbl on tyrosine residues (Fig. 3B; middle panels). Furthermore, blotting with anti-Flk-1 antibodies revealed that VEGF stimulation of BAEC increased the presence of Flk-1 in the Cbl immunoprecipitates (Fig. 3B; lower panel).

In order to confirm the VEGF-dependent association of Cbl with Flk-1, we transiently cotransfected COS-7 cells with plasmids coding for Flk-1 and either β -Gal or Cbl (Fig. 3C). Overexpression of Cbl in COS-7 resulted in increased detection of Cbl associated with the transfected Flk-1 receptor (Fig. 3C middle panel; compare lanes 1 and 2). Moreover, in Cbl overexpressed COS-7 cells, VEGF stimulation resulted in enhanced association of Cbl with Flk-1 (Fig. 3C middle panel; compare lanes 2 and 3). Cbl was strongly detected only when Flk-1 immunoprecipitates were performed on COS-7 overexpressing both Flk-1 and Cbl indicating the co-immunoprecipitation was specific for the presence of Flk-1 (Fig. 3C middle panel; compare lanes 2 and 4). Overall, these results suggest that stimulation of Flk-1 activates Cbl and also promotes its recruitment to the activated Flk-1 receptor.

Cbl mediates stimulus-dependent ubiquitination of Flk-1

In order to demonstrate that Cbl has the capacity to mediate ubiquitination of Flk-1; we monitored the impact of Cbl overexpression on Flk-1-stimulated ubiquitination. We thus transfected COS-7 cells with Flk-1 and HA-tagged ubiquitin in presence or in absence of Cbl or the mutant form 70Z/3-Cbl. 70Z/3-Cbl has been shown to be an oncogenic form of Cbl that lacks part of the ubiquitin ligase RING domain ($\Delta 366-382$) (21). Addition of HA-ubiquitin on Flk-1 was monitored in transfected COS-7 cells lysates immunoprecipitated for Flk-1. VEGF stimulation of Cbl overexpressing COS-7 cell resulted in increased detection of HA-ubiquitin in the Flk-1 immunoprecipitates (Fig. 4A; top panel). The anti-HA-immunoblot is again detected as a smear rather than a distinct band as Flk-1 is polyubiquitinated in response to VEGF (Fig. 4A, anti-HA immunoblot). By contrast, overexpression of the mutant 70Z/3-Cbl did not enhance VEGF-induced ubiquitination of the transfected Flk-1 (Fig. 4B; top panel). Moreover, the addition of HA-ubiquitin in our assay was specific for Flk-1 since no HA was detected in Flk-1 immunoprecipitates from cells transfected with HA-ubiquitin and Cbl only (Fig. 4B; lane 7). These findings demonstrate that Cbl can mediate Flk-1 ubiquitination and that the RING finger motif of Cbl is necessary for this effect.

Cbl overexpression abrogates Flk-1-dependent nitric oxide production

In order to investigate the effect of Cbl on VEGF-mediated NO release, we thus transfected COS-7 cells with Flk-1 and eNOS expression vectors and

monitored the effect of overexpression of Cbl and 70Z/3-Cbl on VEGF-dependent NO release (Fig. 5A). Nitric oxide accumulation in the tissue culture media, measured as nitrite by specific chemiluminescence, was monitored for 2 h in presence of 50 ng/ml of VEGF. As expected, higher levels of NO in the media were detected from COS-7 cells expressing eNOS compared to β -Gal expressing cells (data not shown) (12). Coexpression of Flk-1 with eNOS in presence of VEGF increased significantly NO production when compared to eNOS coexpressed with β -Gal. This indicates that Flk-1 activation has the capacity to stimulate eNOS-dependent NO release in transfected COS-7 cells (Fig. 5A). Interestingly, coexpression of Cbl with Flk-1 and eNOS inhibited the Flk-1-dependent NO release from VEGF stimulated cells (Fig. 5A, compare lanes 2 and 4). In contrast, Cbl did not exert any inhibiting effects on eNOS alone (compare lanes 1 and 3). This indicates that the effects of Cbl on NO release are specific to Flk-1-dependent stimulations and not on eNOS activity *per se*. Finally, 70Z/3-Cbl expression, in marked contrast to Cbl, did not affect Flk-1-stimulated NO release. Interestingly, 70Z/3-Cbl showed a tendency, which however did not reach significance, to increase NO release induced by stimulation of Flk-1 (compare lanes 2 and 5). These results show that Cbl negatively modulates Flk-1-dependent eNOS activation and that the RING finger motif is essential for the down-regulatory effects of Cbl on Flk-1-mediated NO production.

Enhanced VEGF-dependent degradation of Flk-1 in BAEC overexpressing Cbl

In order to ascertain the regulatory role of Cbl in endothelial cell responses, we transiently transfected BAEC with expression vectors that code either for Cbl or for GFP as a control. Transient transfections in BAEC are relatively inefficient ($\approx 30\%$) however our results showed that BAEC transfected with Cbl showed a significant overexpression of Cbl when compared to control cells transfected with GFP vector (Fig. 5B). Interestingly, VEGF stimulation of BAEC overexpressing Cbl resulted in a more rapid kinetic of Flk-1 degradation when compared to GFP transfected cells. While levels of Flk-1 in unstimulated GFP or Cbl transfected BAEC were equivalent, BAEC overexpressing Cbl showed, at 5 and 15 min of VEGF (25 ng/ml) stimulation, a marked decrease in the receptor band when compared to GFP expressing cells who showed only a slight decrease in band intensity at 15 min of VEGF stimulation. These results confirm a role for Cbl in VEGF dependent degradation of Flk-1 in endothelial cells.

VEGF stimulation of endothelial cells induces relocalization of Cbl to vesicular structures

Finally, we examined cellular localization of Flk-1 and Cbl by immunofluorescence confocal microscopy in fixed and permeabilized BAEC following VEGF stimulation. Figure 6 shows that, in control-unstimulated conditions, Flk-1 staining is prominent in the cytoplasm as punctated membrane-associated structures as well as at the surface of cells. Cbl staining in control conditions showed a light and relatively uniform cytoplasmic staining. In VEGF-stimulated cells, Flk-1 plasma membrane staining disappeared and the cytoplasmic

stain became more uniform. VEGF stimulation of BAEC promoted a marked relocalization of Cbl into vesicular structures, which in part colocalized with Flk-1. No staining was observed when cells were incubated with non-immune serum as well as secondary antibody alone (data not shown).

2.5 DISCUSSION

The results presented herein show that 1) Flk-1 is rapidly down-regulated following sustained VEGF stimulation of endothelial cells, that 2) VEGF stimulation promotes Cbl activation and enhances its association to Flk-1 and that 3) Cbl is responsible for the VEGF-stimulated ubiquitination and consequently degradation of Flk-1. We thus provide evidences that Cbl-dependent negative regulation of the Flk-1 receptor is a novel mechanism to down-regulate VEGF-stimulated NO production from endothelial cells. Nitric oxide release from endothelial cells is centrally involved in multiple aspects of VEGF physiological effects. Indeed, as demonstrated in eNOS null mice, NO release has been shown to be essential for VEGF-mediated increase in vascular permeability, angiogenesis and endothelial cell migration (29-31). Thus regulation of VEGF cellular signals, including NO production, is tightly controlled.

Our study shows that VEGF pretreatment of BAEC prevents any further activation of the Akt/eNOS signaling pathway from a second VEGF stimulation. Our results demonstrated that VEGF-dependent degradation of Flk-1 is involved in this desensitization of cells to VEGF stimulation. The degradation of Flk-1 actively participates in the regulation of VEGF responses in endothelial cells through rapid inhibition of VEGF-stimulated eNOS activation and NO release

(Fig. 1 and 2). One can also assume that rapid degradation of Flk-1 may also participate in the regulation of other components of VEGF signaling. However the consequences on long term effects of VEGF such as endothelial cell migration, proliferation and survival have not yet been investigated.

Ubiquitination of RTK is known to target them to the lysosomal and proteasomal machineries (21). Indeed, consistent with these findings we demonstrate that following VEGF stimulation, Flk-1 is multi-ubiquitinated both in BAEC and in Flk-1 transfected COS-7 cells (Figs. 3 and 4). Polyubiquitination of cellular proteins including RTKs has emerged as a posttranslational modification that controls the cellular levels of proteins that are regulated either constitutively or in response to the cellular environment (22). We now show that polyubiquitination is involved in the regulation of membrane Flk-1 receptor levels.

Our results also demonstrate that Cbl is tyrosine phosphorylated and recruited to Flk-1 following VEGF stimulation of BAEC (Fig. 3). Cbl has initially been identified as a multi-adaptor protein involved in the recruitment of signaling complexes. Tyrosine phosphorylation of Cbl upon stimulation results in its association to SH2 domain containing proteins such as the p85 subunit of PI3-kinase, the nucleotide exchange factor VAV and src-like kinases Fyn and Lyn (32-35). Furthermore, Cbl contains a proline-rich domain that is involved in SH3-domain interactions. The demonstration of an involvement of Cbl in the negative regulation of RTKs came from studies in *Caenorhabditis elegans* that showed that a loss of function of the Cbl homologue Sli-1 compensated for Let-23 (EGF-R) signaling (36,37). Recent studies revealed that Cbl could function as an ubiquitin ligase that recruits ubiquitin-loaded E2 enzymes to ligand-activated receptor (38).

Our results show that the association of Cbl with Flk-1 is enhanced in response to VEGF stimulation of BAEC and in transfected COS-7 cells. This association of Cbl to activated RTKs is most likely mediated by the N-terminal phosphotyrosine-binding domain of Cbl. However, we cannot exclude that a tyrosine-phosphorylated accessory protein may act as an intermediate in the docking of Cbl to Flk-1. Nonetheless the two proteins need to be in proximity in order for the flanking RING finger motif of Cbl to transfer the ubiquitin group onto the target receptor. Indeed, we demonstrate that overexpression of Cbl strongly enhances ubiquitination and degradation of Flk-1 and that a Cbl mutant lacking the RING finger domain, 70Z/3-Cbl cannot mediate ligand-dependent Flk-1 ubiquitination (38).

Our report also demonstrates that Cbl regulates VEGF stimulated NO release from cells. The coexpression of Cbl with Flk-1 and eNOS inhibits specifically VEGF stimulated NO release. Furthermore, the mutant form of Cbl, 70Z/3-Cbl failed to inhibit NO release and interestingly seemed to have a dominant negative effect on endogenous Cbl function by significantly enhancing NO release as well as inhibiting VEGF stimulated Flk-1 ubiquitination (Figs. 4 and 5). These results are in line with those showing that oncogenic forms of Cbl, such as v-Cbl and 70Z/3-Cbl, led to enhanced signaling from RTKs and in some cases to hyperproliferation and tumorigenesis (39-41).

The VEGF-stimulated association of Cbl with Flk-1 is rapid, sustained and is consistent within the timeframe of Flk-1 degradation. Interestingly, we demonstrate that overexpression of Cbl in BAEC accelerates VEGF stimulated degradation of Flk-1. This confirms that in endothelial cells, Cbl mediates Flk-1

degradation and that the levels of expression of Cbl can affect Flk-1 responses by regulating receptor levels following stimulation of cells. In unstimulated conditions, our results indicate that Cbl expression does not alter basal levels of the Flk-1 protein however upon stimulation of cells, Cbl influences the rate of its degradation.

The precise subcellular localization where Cbl acts on RTKs is still unclear as some studies show that receptor ubiquitination might occur in endosomal compartments whereas other indicate that this occurs at the plasma membrane before the internalization route (23,42). Moreover, our immunofluorescence data shows that following a 30 min VEGF stimulation of endothelial cells, Cbl is located in vesicular-like structures (Fig. 6). This seems to be in agreement with previous studies reporting that Cbl associates with EGF receptor and remains receptor-associated throughout endocytosis (42).

Our results show that negative regulation of Flk-1 by Cbl results in impaired NO release and that ubiquitination of Flk-1 through Cbl is involved in the desensitization of the cellular response to rapid VEGF signaling. Cbl has been shown to be activated in response to endothelial cells submitted to fluid shear stress and also to participate in the activation of PI3-kinase following shear (43,44). Knowing that Cbl functions as an adaptor-signaling molecule as well as an E3 ligase, it is tempting to speculate that prolonged shear stress on endothelial cells results in decreased Flk-1 protein expression.

In summary, our report demonstrates that polyubiquitination of the VEGF receptor Flk-1, by the ubiquitin ligase adaptor protein Cbl, mediates VEGF-dependent degradation of Flk-1. Importantly, our study provides evidences that

Cbl-mediated effects lead to important biological consequences in endothelial cells such as the inhibition of VEGF-mediated NO release and enhanced Flk-1 degradation. Further studies will likely demonstrate the involvement of this novel mode of biological control of Flk-1 signaling in other physiological effects of VEGF.

2.6 ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Ms. Dior Cissé for secretarial assistance, Mr. Christian Charbonneau for assistance with confocal microscopy, Dr. Sylvain Meloche for reagents and to Dr. André Veillette for reagents and critical reading of the manuscript. This work is supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and an establishment grant from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) to JPG. JPG is a scholar of the CIHR (New Investigator Award).

2.7 REFERENCES

1. Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001) *Sci STKE* **2001**, RE21.
2. de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L. T. (1992) *Science* **255**, 989-991.
3. Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., and Bohlen, P. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 1579-1586.

4. Galland, F., Karamysheva, A., Pebusque, M. J., Borg, J. P., Rottapel, R., Dubreuil, P., Rosnet, O., and Birnbaum, D. (1993) *Oncogene* **8**, 1233-1240.
5. Zachary, I., and Glikli, G. (2001) *Cardiovasc Res* **49**, 568-581.
6. Doanes, A. M., Hegland, D. D., Sethi, R., Kovesdi, I., Bruder, J. T., and Finkel, T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 545-548.
7. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997) *Oncogene* **15**, 2169-2177.
8. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001) *Embo J* **20**, 2768-2778.
9. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) *J Biol Chem* **273**, 30336-30343.
10. He, H., Venema, V. J., Gu, X., Venema, R. C., Marrero, M. B., and Caldwell, R. B. (1999) *J Biol Chem* **274**, 25130-25135.
11. Gelinas, D. S., Bernatchez, P. N., Rollin, S., Bazan, N. G., and Sirois, M. G. (2002) *Br J Pharmacol* **137**, 1021-1030.
12. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1999) *Nature* **399**, 597-601.
13. Schlessinger, J. (2000) *Cell* **103**, 211-225.
14. Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Baerwald, M. R., Jaffe, E. A., Wang, D., Warren, R. S., and Donner, D. B. (2000) *J Biol Chem* **275**, 5096-5103.
15. Kroll, J., and Waltenberger, J. (1997) *J Biol Chem* **272**, 32521-32527.

16. D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J., and Weiner, R. I. (1999) *Mol Endocrinol* **13**, 692-704.
17. Ratcliffe, K. E., Tao, Q., Yavuz, B., Stoletov, K. V., Spring, S. C., and Terman, B. I. (2002) *Oncogene* **21**, 6307-6316.
18. Ettenberg, S. A., Rubinstein, Y. R., Banerjee, P., Nau, M. M., Keane, M. M., and Lipkowitz, S. (1999) *Mol Cell Biol Res Commun* **2**, 111-118.
19. Miyake, S., Lupher, M. L., Jr., Druker, B., and Band, H. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7927-7932.
20. Kallies, A., Rosenbauer, F., Scheller, M., Knobloch, K. P., and Horak, I. (2002) *Blood* **99**, 3213-3219.
21. Thien, C. B., and Langdon, W. Y. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 294-307.
22. Weissman, A. M. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169-178.
23. Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998) *Genes Dev* **12**, 3663-3674.
24. Dougher, M., and Terman, B. I. (1999) *Oncogene* **18**, 1619-1627.
25. Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T. A., McCabe, T. J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W. C. (2002) *Circ Res* **90**, 866-873.
26. Kovals, A. T., Harvey, K. A., McGlynn, P., Boguslawski, G., Garcia, J. G., and English, D. (2000) *Faseb J* **14**, 2486-2494.
27. Sessa, W. C., Garcia-Cardena, G., Liu, J., Keh, A., Pollock, J. S., Bradley, J., Thiru, S., Braverman, I. M., and Desai, K. M. (1995) *J Biol Chem* **270**, 17641-17644.

28. Gratton, J. P., Morales-Ruiz, M., Kureishi, Y., Fulton, D., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2001) *J Biol Chem* **276**, 30359-30365.
29. Cross, M. J., and Claesson-Welsh, L. (2001) *Trends Pharmacol Sci* **22**, 201-207.
30. Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L., and Jain, R. K. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2604-2609.
31. Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2000) *Circ Res* **86**, 892-896.
32. Panchamoorthy, G., Fukazawa, T., Miyake, S., Soltoff, S., Reedquist, K., Druker, B., Shoelson, S., Cantley, L., and Band, H. (1996) *J Biol Chem* **271**, 3187-3194.
33. Marengere, L. E., Mirtsos, C., Kozieradzki, I., Veillette, A., Mak, T. W., and Penninger, J. M. (1997) *J Immunol* **159**, 70-76.
34. Rao, N., Dodge, I., and Band, H. (2002) *J Leukoc Biol* **71**, 753-763.
35. Dombrosky-Ferlan, P. M., and Corey, S. J. (1997) *Oncogene* **14**, 2019-2024.
36. Yoon, C. H., Lee, J., Jongeward, G. D., and Sternberg, P. W. (1995) *Science* **269**, 1102-1105.
37. Jongeward, G. D., Clandinin, T. R., and Sternberg, P. W. (1995) *Genetics* **139**, 1553-1566.
38. Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W. C., Zhang, H., Yoshimura, A., and Baron, R. (1999) *J Biol Chem* **274**, 31707-31712.

39. Thien, C. B., and Langdon, W. Y. (1997) *Oncogene* **15**, 2909-2919.
40. Andoniou, C. E., Thien, C. B., and Langdon, W. Y. (1994) *Embo J* **13**, 4515-4523.
41. Bonita, D. P., Miyake, S., Lupher, M. L., Jr., Langdon, W. Y., and Band, H. (1997) *Mol Cell Biol* **17**, 4597-4610.
42. de Melker, A. A., van der Horst, G., Calafat, J., Jansen, H., and Borst, J. (2001) *J Cell Sci* **114**, 2167-2178.
43. Wang, Y., Miao, H., Li, S., Chen, K. D., Li, Y. S., Yuan, S., Shyy, J. Y., and Chien, S. (2002) *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1540-1547.
44. Miao, H., Yuan, S., Wang, Y., Tsygankov, A., and Chien, S. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 892-899.

2.8 FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Inhibition of eNOS activation by VEGF pretreatments of BAEC.

A, BAEC were pretreated with VEGF (50 ng/ml) for the indicated time prior to 30 min stimulation with media containing either vehicle (CT) or 50 ng/ml of VEGF. Following the incubation, cell media were processed for the measurement of NO as described in experimental procedures. † $P < 0.05$ compared to CT; * $P < 0.05$ compared to time 0 min. *B*, BAEC were pretreated with VEGF (50 ng/ml) for 30 min incubation with media alone (CT) or containing either ATP (10 μ M) or ionomycin (1 μ M). *C*, Serum starved BAEC were pretreated with VEGF (50 ng/ml) for 30 min prior to a 10 min stimulation of VEGF (50 ng/ml). Cells were then lysed and protein levels were determined as described in Fig. 1. Cell lysates were separated on SDS-PAGE and immunoblotted using antibodies against phospho-Akt, Akt, phospho-eNOS, eNOS and Flk-1. *A* and *B* are presented as mean \pm SEM ($n = 4$). Experiments were repeated 3 times with similar results.

Fig. 2. VEGF stimulation of BAEC induces down-regulation of Flk-1.

A, Serum starved BAEC were incubated with 50 ng/ml VEGF for the times indicated and cells were lysed in 1% Triton X-100 buffer (Tx-100). Protein levels were determined by the DC protein assay (Bio-Rad) and 60 μ g of each samples were separated by SDS-PAGE. *B*, Cells were stimulated as in *A* and were lysed directly in 2% SDS sample buffer and equal volumes of total cell lysates (TCL) were separated by SDS-PAGE. *C*, Cells were incubated for 30 min with different concentration of VEGF (1 – 50 ng/ml) and cell lysates were prepared as in *A*.

Western blot were done using anti-Flk-1 antibodies and Akt was probed as a control for loading. Panels are representative blots from 3 other experiments.

Fig. 3. VEGF induces ubiquitination of Flk-1 and enhances association with Cbl.

A, Serum starved BAEC were stimulated with VEGF for the indicated time. Cells were lysed and equal amounts of lysates were incubated with anti-Flk-1 antibodies or non-immune serum (NI) for immunoprecipitation (IP). Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE, transferred and subjected to western blot analysis (wb) using anti-ubiquitin, anti-pTyr and anti-Flk-1 antibodies. *B*, Following VEGF stimulations, cell lysates were immunoprecipitated using anti-Flk-1, anti-Cbl or non-immune serum as indicated. The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred and subjected to western blot analysis (wb) using anti-Cbl, anti-pTyr and anti-Flk-1 antibodies. *C*, COS-7 cells were transfected with Flk-1 and Cbl expressing vector as indicated and stimulated for 10 min with VEGF (50 ng/ml). Cell lysates were immunoprecipitated as in *A*. Immunoprecipitates were immunoblotted with anti-Cbl antibody to detect the association of Cbl with Flk-1 and to control for transfections in total cell lysates (TCL). Anti-Flk-1 antibodies were used as controls for equal transfection and immunoprecipitation. These results are representative of at least 3 experiments.

Fig. 4. Cbl mediates VEGF-dependent ubiquitination of Flk-1.

COS-7 cells were transfected with Flk-1, HA-ubiquitin and Cbl (*A*) or with Flk-1, HA-ubiquitin, Cbl and 70Z/3-Cbl (*B*) expression construct as indicated. Cells were stimulated with VEGF (50ng/ml) for the indicated time. Cells were lysed as

described in experimental procedures and incubated with monoclonal Flk-1 antibodies for immunoprecipitation. Complexes were resolved on 7 % SDS-PAGE gel electrophoresis. Immunoprecipitates were immunoblotted with anti-HA antibodies to detect Flk-1 ubiquitination. Anti-Flk-1 antibodies were used to control for equal transfection and immunoprecipitation, anti-Cbl antibodies were used to document Cbl and 70Z/3-Cbl transfections in total cell lysates (TCL). These experiments are representative of at least 3 others.

Fig. 5. Cbl overexpression inhibits Flk-1-mediated NO release and enhances Flk-1 degradation.

A, COS-7 cells were transfected with Flk-1, eNOS, Cbl and 70Z/3-Cbl expression vectors as indicated. β -Gal expression vectors were used to balance the amount of transfected DNA throughout. Overnight serum starved cells were incubated with VEGF (50ng/ml) for 2 h. Cell media were then processed for the measurement of NO as described in experimental procedures. Cell lysates were separated on SDS-PAGE and immunoblotted. Anti-Flk-1, anti-eNOS and anti-Cbl antibodies were used as control for equal transfection. These results are expressed as NO released above the amounts released by cells transfected with eNOS and β -Gal and are representative of at least 3 experiments. *B*, BAEC were transfected, as detailed in experimental procedures, with Cbl or GFP expression vector. Overnight serum starved cells were VEGF-stimulated (25 ng/ml) for the time indicated. BAEC lysates were separated on SDS-PAGE and immunoblotted with anti-Flk-1 antibodies and with anti-Cbl for the assessment of the transfections levels. Equal

protein loading was confirmed by immunoblotting against Akt. The results were repeated three times with essentially identical results.

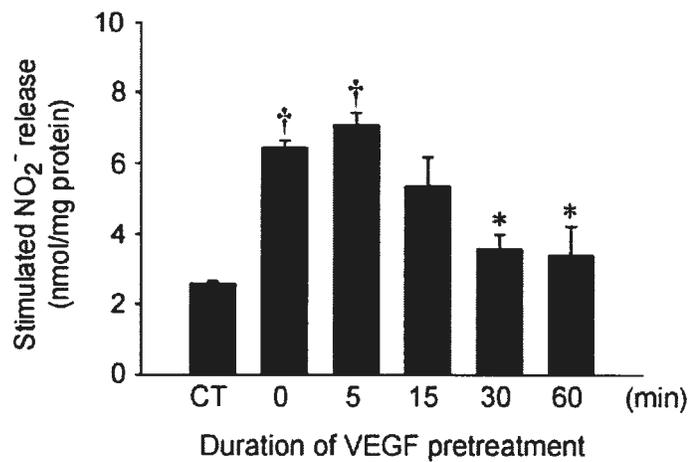
Fig. 6. Cellular localization of Cbl in BAEC following VEGF stimulation.

BAEC were cultured on 0.1% gelatin-coated cover slips. Serum starved cells were either untreated or treated with 50 ng/ml VEGF for 30 min. Cells were fixed, permeabilized and incubated with anti-Flk-1 and anti-Cbl primary antibodies. Immunofluorescent staining was performed as described in experimental procedures and observed by confocal microscopy.

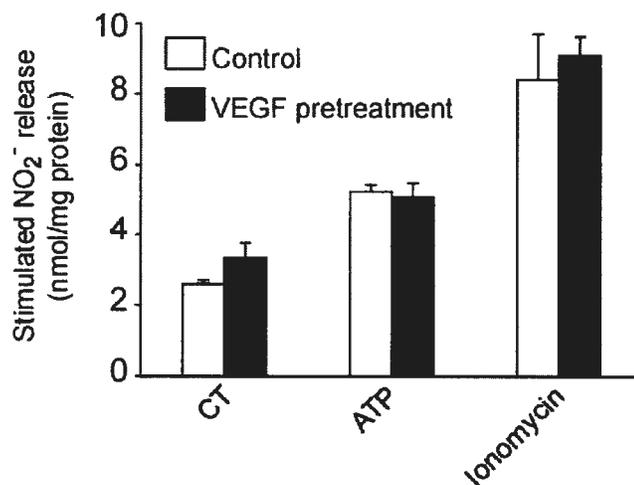
2.9 FIGURES

Figure 1

A



B



C

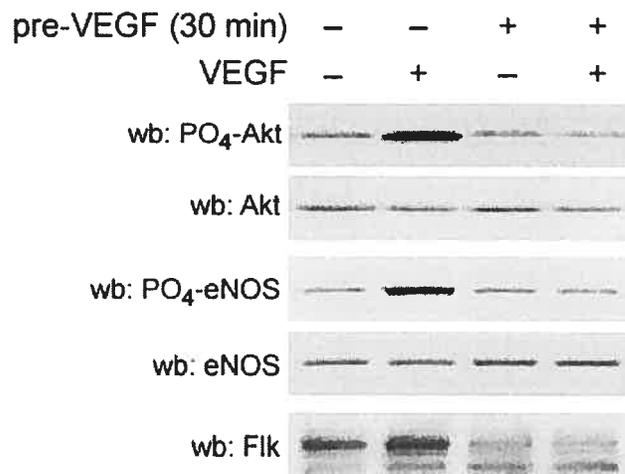
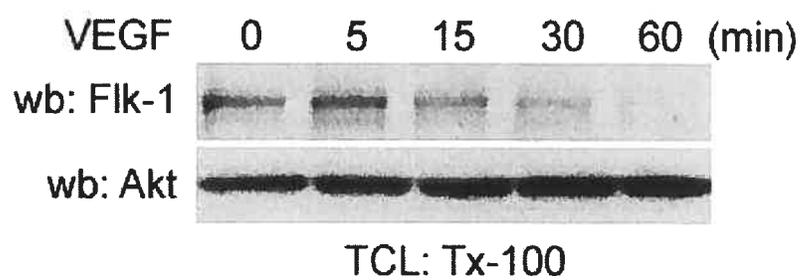
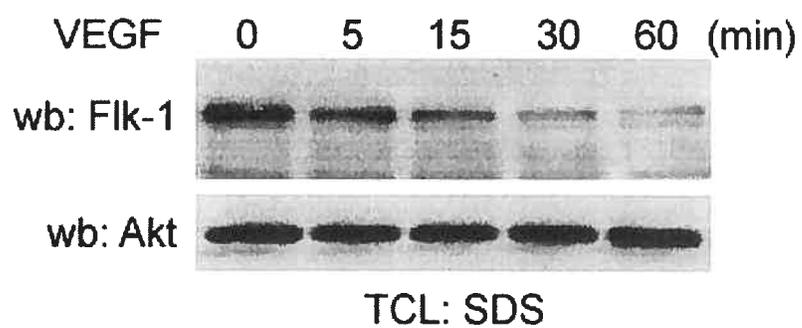


Figure 2

A



B



C

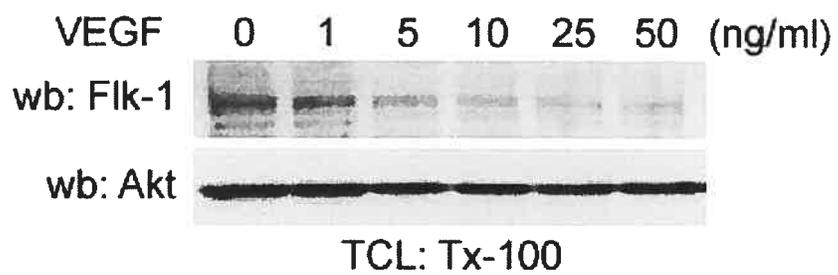


Figure 3

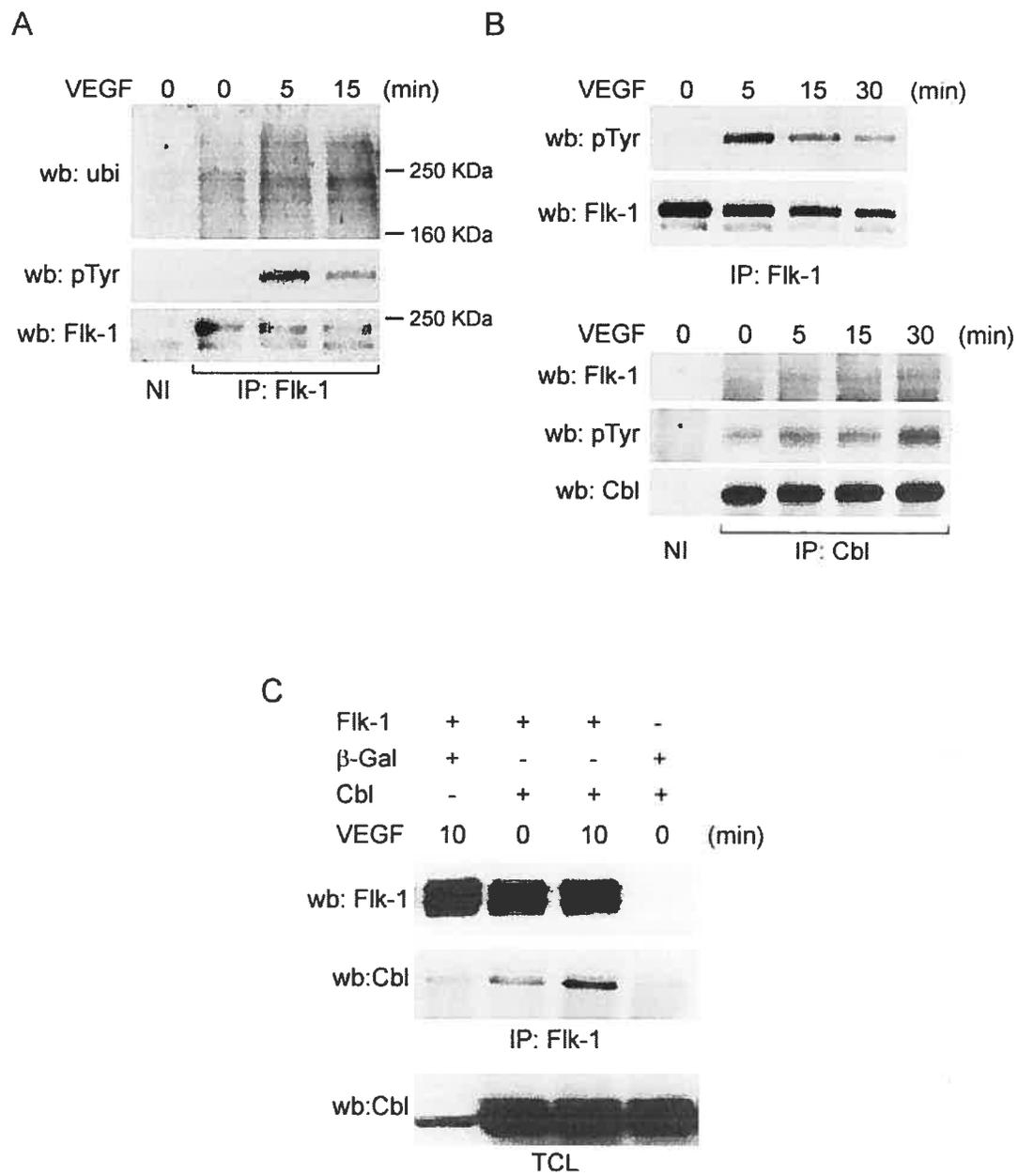
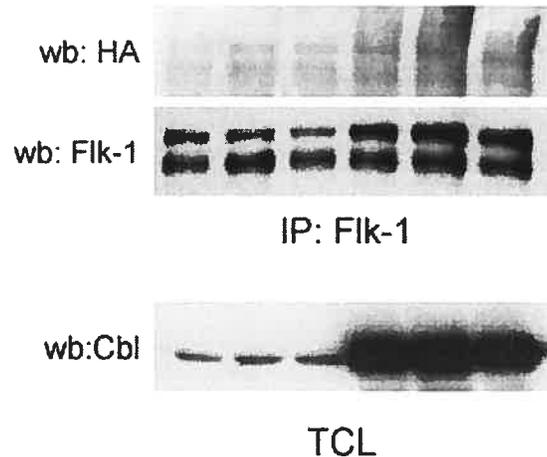


Figure 4

A

HA-ubi	+	+	+	+	+	+
Flk-1	+	+	+	+	+	+
Cbl	-	-	-	+	+	+
VEGF	0	10	30	0	10	30 (min)



B

HA-ubi	+	+	+	+	+	+	+
Flk-1	+	+	+	+	+	+	-
Cbl	-	+	+	+	-	-	+
70Z/3-Cbl	-	-	-	-	+	+	-
VEGF	0	0	10	30	0	30	0 (min)

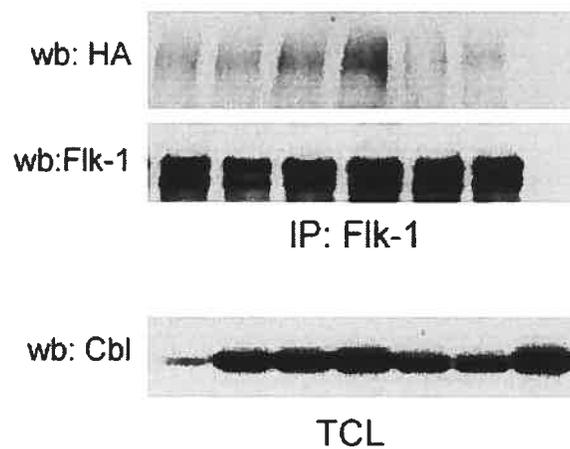
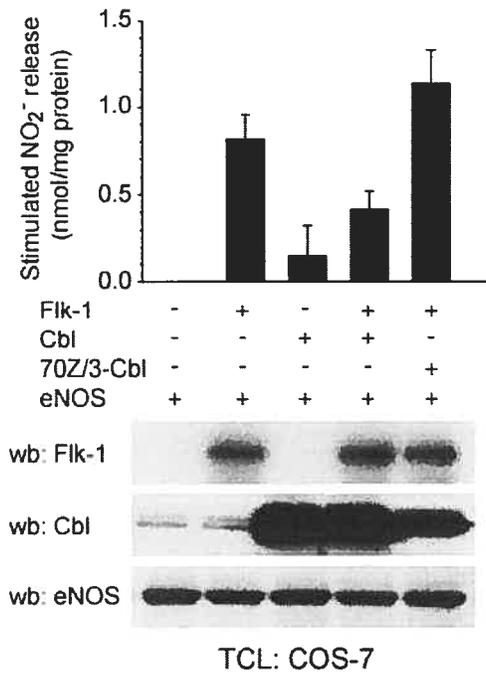


Figure 5

A



B

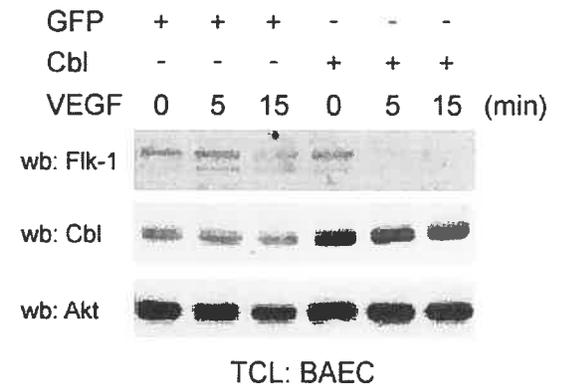
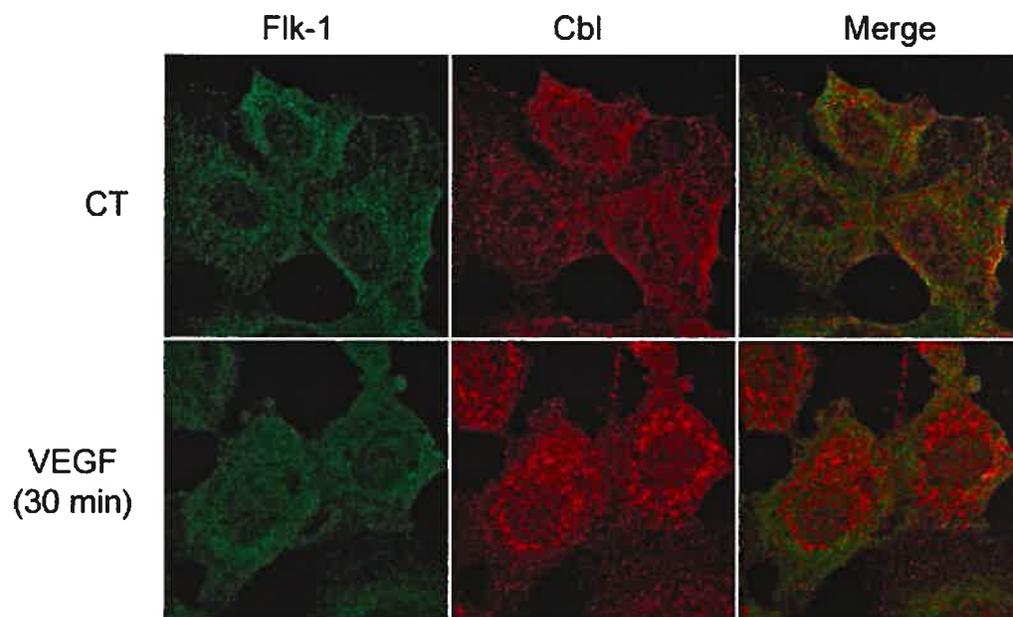


Figure 6



CHAPITRE 3

**CONSÉQUENCES DE L'INHIBITION DE LA FONCTION UBIQUITINE
LIGASE DE c-CBL SUR LA SIGNALISATION ENDOTHÉLIALE DU
VEGF**

3.1 Résultats

Afin de mieux caractériser l'effet d'une inhibition de l'ubiquitination par c-Cbl sur la signalisation du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales, nous avons généré un adénovirus codant pour le mutant 70Z/3-Cbl afin d'acquérir plus de données concernant l'activité de c-Cbl dans les cellules endothéliales. Tel qu'indiqué à la section 1.4.2.1, cette forme oncogénique agit comme dominant négatif de la fonction ubiquitine ligase normale de c-Cbl. La séquence codante du mutant ainsi que l'épitope hemagglutinine (HA) furent insérés dans un vecteur adénoviral dans le but d'obtenir une expression efficace du 70Z/3-Cbl dans les cellules endothéliales. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules endothéliales en culture ayant une confluence de 80% et nous les avons mis en présence de l'adénovirus à raison de 50 particules infectieuses par cellule (50 MOI) pour une période de 16h.

3.1.1 HA-70Z/3Cbl inhibe les processus d'ubiquitination et de dégradation du VEGFR-2 induit par le VEGF dans les cellules endothéliales

Au chapitre précédent, nous avons démontré qu'une transfection du mutant 70Z/3-Cbl bloquait l'ubiquitination du VEGFR-2 dans des cellules COS-7 (Figure 4B). Pour confirmer que l'inhibition de c-Cbl provoque cet effet dans des cellules endothéliales stimulées au VEGF, nous avons infecté de telles cellules provenant d'aortes de bœufs (BAEC) avec un adénovirus codant pour la protéine GFP (Ad-GFP) à titre de témoins et une autre série avec l'adénovirus codant pour HA-70Z/3-Cbl (Ad-HA-70Z/3-Cbl). Ces cellules ont ensuite été stimulées au VEGF

(40ng/ml) pour les temps indiqués et les lysats de ces cellules furent immunoprécipités avec un anticorps contre le VEGFR-2. Suite à la séparation et au transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, celle-ci fut incubée avec un anticorps reconnaissant la présence d'ubiquitine. Comme le dévoile la figure 1, une stimulation au VEGF provoque une augmentation des niveaux d'ubiquitination du VEGFR-2 (planche du haut) qui est accompagnée d'une baisse rapide des niveaux du récepteur (planche du milieu) dans les cellules témoins. Par opposition, l'expression de l'Ad-HA-70Z/3-Cbl contrecarre le procédé d'ubiquitination et bloque la dégradation du récepteur (planches du haut et du milieu).

Ces résultats confirment que la surexpression d'une forme oncogénique de c-Cbl inhibe l'ubiquitination et de la dégradation du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF.

3.1.2 L'expression de 70Z/3-Cbl augmente l'activation d'Akt stimulée par le VEGF dans les cellules endothéliales.

Nous avons par la suite étudié les conséquences de l'expression de 70Z/3-Cbl sur l'activation d'Akt par le VEGF chez les BAEC. Ces cellules ont donc été infectées avec les adénovirus codant pour GFP ou HA-70Z/3-Cbl. Ces BAEC furent subséquemment stimulées pour 5 minutes avec des concentrations croissantes de VEGF (0-100 ng/ml). Suite à l'immuno-buvardage de type western, nous avons mesuré les niveaux de phosphorylation d'Akt et établie un ratio de phosphorylation en fonction de l'expression de la protéine totale. La figure 2

décrit une augmentation des niveaux de phosphorylation d'Akt dans les cellules exprimant le HA-70Z/3-Cbl comparativement aux cellules exprimant le GFP et ce pour chaque concentration de VEGF utilisée.

Ainsi, ces résultats confirment le rôle de c-Cbl en tant que régulateur négatif de la réponse au VEGF et ce même à de faibles concentrations.

3.1.3 L'inhibition de l'activité de c-Cbl provoque une hausse de la production de NO stimulée par le VEGF

Comme l'activité d'Akt induite par le VEGF est connue pour promouvoir la relâche de NO et que l'activation de cette sérine/thréonine kinase par une stimulation au VEGF semble être augmentée en présence du mutant 70Z/3-Cbl, nous avons évalué si la relâche de NO pouvait être modifiée par l'expression du HA-70Z/3-Cbl. Pour être en mesure de répondre à cette question, nous avons infecté des BAEC aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl. Ces cellules furent stimulées avec différentes concentrations de VEGF et leurs milieux de culture récoltés après 30 minutes de traitement pour analyser leur teneur en monoxyde d'azote. Tel qu'attendu, le VEGF stimule la production de NO dans les deux groupes de cellules à l'étude. Par contre, la quantité de NO libérée par les cellules infectées au HA-70Z/3-Cbl était plus importante que celle relâché par les cellules exprimant GFP (Figure 3A). De façon intéressante, la production de NO provenant des cellules infectées avec le mutant semble suivre un patron qui dépend de la concentration, alors que ce n'est pas le cas dans les cellules témoins. Vu que l'expression du HA-70Z/3-Cbl entraîne une augmentation de la production

de NO, nous avons vérifié si les niveaux de phosphorylation d'eNOS étaient aussi modifiés par ce mutant. Or, on observe à la figure 3B une augmentation plus importante des niveaux de phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁹ d'eNOS dans les cellules exprimant le mutant 70Z/3-Cbl lorsque comparée aux cellules témoins. L'augmentation de la phosphorylation d'eNOS peut donc expliquer la hausse de la production de NO observée à la figure 3A. En plus, ces nouvelles données sont en accord avec nos résultats démontrant que l'activité d'Akt est augmentée en présence du mutant 70Z/3-Cbl suite à une stimulation au VEGF et par conséquent ceci se traduit par une hausse des niveaux de phosphorylation de la Ser¹¹⁷⁹ d'eNOS.

Afin de démontrer la spécificité de nos résultats envers une activation du VEGFR-2, nous avons stimulé des BAEC préalablement infectées aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl, avec une concentration maximale d'ATP (10 μ M) et mesuré la quantité de NO relâchée. Comme l'expose la figure 3C, la production de NO stimulée par l'ATP était semblable dans les deux groupes cellulaires, démontrant ainsi que l'effet d'une inhibition de l'activité de c-Cbl sur la relâche de NO est spécifique à une stimulation au VEGF.

Ces données renforcent nos résultats initiaux de l'article 1 (Chapitre 2), rapportant que c-Cbl joue un rôle majeur dans la régulation de la production de NO par le VEGF.

3.1.4 L'expression de HA-70Z/3-Cbl accentue la réponse au VEGF dans les cellules endothéliales.

Étant donné que l'activation d'eNOS était affectée par l'expression de HA-70Z/3-Cbl, nous nous sommes ensuite intéressés aux effets de ce mutant sur l'activation de voies de signalisation connues pour être activées par le VEGF : la MAPK et la PLC- γ . Pour ce faire, nous avons infecté des BAEC aux adénovirus codant pour le GFP ou le HA-70Z/3-Cbl et stimulé ces cellules au VEGF aux temps indiqués à la figure 4. Les cellules furent ensuite lysées et leurs contenus protéiques séparés par électrophorèse de type SDS-PAGE et finalement transférés sur une membrane de nitrocellulose. Les niveaux de phosphorylation de la MAPK et la PLC- γ furent analysés en incubant la membrane avec les anticorps phospho-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴) et phospho-Tyr⁷⁸³-PLC- γ 1. Par la suite, les niveaux de phosphorylation ont été mesurés afin de dresser un portrait du ratio de phosphorylation de ces protéines en fonction de leur l'expression. Comme on peut le voir à la figure 4 aussi bien par l'immuno-buvardage que par les graphiques dressant le portrait des ratios de phosphorylation de la MAPK et de la PLC- γ , le VEGF stimule plus efficacement ces différentes voies de signalisation dans les cellules exprimant le HA-70Z/3-Cbl par rapport aux cellules témoins et ce pour chaque temps de stimulation.

Ces résultats dénotent une fois de plus la régulation négative qu'exerce c-Cbl sur la réponse au VEGF au niveau des cellules endothéliales et ce sur diverses voix de signalisation intracellulaire.

3.1.5 HA-70Z/3-Cbl augmente la capacité migratoire des cellules endothéliales

Étant donné que la participation du NO dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF est établie (Dimmeler et al, 2000), nous avons par conséquent étudié l'effet du mutant 70Z/3-Cbl sur cette activité biologique. Or, nous avons infecté des cellules endothéliales aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl et étudié la capacité du VEGF à stimuler la migration de ces cellules. Les cellules infectées furent ensemencées dans les puits supérieurs d'une chambre de Boyden et soumises aux effets chimio-attractants du VEGF (0, 10 et 50 ng/ml) placé dans la chambre inférieure ou du milieu de culture contenant 10% de sérum à titre de contrôle. Tel qu'attendu, le VEGF a induit la migration des cellules endothéliales exprimant la protéine GFP en fonction de la concentration de VEGF employée. Ceci fut également observé chez les cellules exprimant le HA-70Z/3-Cbl. Toutefois, nous avons constaté une hausse significative de la réponse migratoire des cellules endothéliales exprimant le mutant HA-70Z/3-Cbl comparativement aux cellules exprimant la protéine GFP, lorsque la concentration de VEGF était de 50 ng/ml. La migration des cellules endothéliales induite par le sérum, était quant à elle similaire dans les deux groupes de cellules (Figure 5A).

Le réarrangement de l'actine, stimulé par le VEGF, est une étape importante de la migration des cellules endothéliales. Nous avons donc décidé d'observer par immunofluorescence, le remodelage de l'actine dans les cellules infectées à l'adénovirus HA-70Z/3-Cbl. Nous avons tout d'abord observé dans des cellules endothéliales non infectées, l'induction de la formation de fibre de stress

par un traitement au VEGF, détectée ici par la phalloïdine (marquées en vert). Par contre, chez les cellules endothéliales qui expriment le mutant HA-70Z/3-Cbl (marquées en rouge pour HA) nous n'avons pas observé d'augmentation de la formation de fibre de stress stimulée par le VEGF. Nous avons plutôt remarqué la présence de repliements membranaires chez les cellules lorsque stimulées au VEGF (Figure 5B). De telles modifications de la membrane plasmique sont rapportées comme faisant partie des étapes de la migration cellulaire. Par conséquent, ces dernières données pourraient expliquer l'augmentation de la migration des cellules endothéliales exprimant le mutant 70Z/3-Cbl, observé en figure 5A. Dans le même ordre d'idée, il serait intéressant d'étudier l'activation de la petite GTPase Rac dans les cellules endothéliales infectées à l'adénovirus HA-70Z/3-Cbl étant donné qu'il fut démontré que la formation de repliements membranaires est le résultat de l'activation cette protéine (Ridley et al, 1992).

Ces expériences suggèrent que l'inhibition de la régulation négative du VEGFR-2 par c-Cbl augmente la réponse migratoire des cellules endothéliales induite par le VEGF en tant que chimio-attractant.

Finalement, l'obtention de ces résultats nous permet de confirmer que c-Cbl joue un rôle clé dans la dégradation du VEGFR-2 et par conséquent dans la régulation négative de son activité dans les cellules endothéliales. De plus nos données révèlent qu'en conséquence d'une inhibition de l'activité de c-Cbl par l'expression du mutant 70Z/3-Cbl, on obtient une hausse qui dépend du VEGF, de la réponse intracellulaire, de la production de NO ainsi que de la réponse migratoire des cellules endothéliales. Étant donné ces observations, il serait

intéressant d'étudier les effets de l'adénovirus HA-70Z/3-Cbl sur l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* stimulée par le VEGF.

3.2 Matériel et méthodes

Adenoviruses et infection cellulaire

Les adénovirus GFP et 70Z/3-Cbl portant l'épitope HA furent produits et amplifiés au Gene Transfer Vector Core de l'Université de l'Iowa. Pour l'infection cellulaire, des BAEC à une confluence de 80 % ont été utilisées. Les cellules furent infectées aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl à une multiplicité d'infection (MOI) de 50 particules infectieuses par cellules durant 16h. Après cette période, le milieu d'infection fut remplacé pour du milieu complet et les cellules ont été maintenues en culture pour 24 à 48 heures. Le niveau de transduction des adénovirus à 50 MOI était de 80-90%.

Migration cellulaire

Des BAEC préalablement infectées et sevrées (16 heures) ont été trypsinisées et comptées afin d'introduire 50 000 cellules par puits dans les puits supérieurs d'une chambre de Boyden. Du VEGF ou du milieu de culture enrichi de 10% de sérum de fœtus bovin (FBS) ont été ajoutés aux puits inférieurs de la chambre. Les cellules ont été laissées à migrer durant 2h à 37°C au travers d'une membrane poreuse (8 µm) enduite de collagène. Après l'incubation, les cellules ayant adhéré à la membrane furent fixées avec du méthanol et colorées au Giemsa pour 1h. Les cellules sur le haut de la membrane, correspondant aux cellules n'ayant pas migré, furent enlevées à l'aide d'un coton-tige et par des lavages. Les cellules ayant migré à travers la membrane ont par la suite été comptées.

Immunofluorescence

La méthodologie générale a été exécutée tel que décrit dans Duval et al, 2003. Les BAEC ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 3.5% et les sites non-spécifiques furent bloqués avec 1% d'albumine de sérum bovin. Par la suite, ces cellules furent incubées avec l'anticorps primaire anti-HA de souris (1:100, Cell signaling). Afin de visualiser le complexe antigène/anticorps, nous avons incubé les cellules avec l'anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente (Alexa Fluor 568, 1:500, anti-souris provenant de la chèvre). Les filaments d'actine ont été visualisés à l'aide de la phalloïdine marquée d'une molécule fluorescente (Alexa Fluor 488, 1:500). Les montages sur lame de verre ont été observés par un microscope à fluorescence DMRB (Leica).

3.3 Légendes des figures

Figure 1 : L'inhibition de l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl bloque l'ubiquitination et la dégradation du VEGFR-2. Des BAEC furent infectées avec des adénovirus codant pour GFP ou HA-70Z/3-Cbl. Suite à une stimulation au VEGF (40ng/ml), les cellules ont été lysées. Le récepteur-2 du VEGF fut immunoprécipité en incubant les lysats avec un anticorps anti-VEGFR-2. L'ajout d'ubiquitine sur le récepteur ainsi que la quantité de récepteur furent analysés par immunobuvardage de type western en utilisant les anticorps anti-ubiquitine et anti-VEGFR-2. L'expression de GFP ou du mutant 70Z/3-Cbl a également été vérifiée par le biais d'anticorps reconnaissant les protéines GFP et Cbl. Cette figure est représentative de 3 expériences similaires.

Figure 2 L'expression de HA-70Z/3-Cbl dans les cellules endothéliales augmente l'activation d'Akt induite par le VEGF. Les cellules endothéliales exprimant le mutant 70Z/3-Cbl ou GFP ont été stimulées avec diverses concentrations de VEGF, tel qu'indiqué. L'activation Akt et l'expression d'Akt total furent observées par immunobuvardage de type western en utilisant les anticorps anti phospho-Akt (Ser⁴⁷³) et anti-Akt. Le graphique représente le ratio d'Akt phosphorylé sur sa quantité de protéine totale. Pour vérifier l'expression du mutant 70Z/3-Cbl et de GFP, la membrane fut incubée avec les anticorps spécifique pour Cbl et GFP. ANOVA; P < 0.05. Cette figure représente les résultats obtenus à partir de 3-6 expériences semblables.

Figure 3 : Augmentation de la production de NO stimulée par le VEGF dans les cellules endothéliales exprimant HA-70Z/3-Cbl. Des échantillons de milieu de culture provenant de BAEC infectées aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl furent récoltés suite à un traitement au VEGF (A) ou à l'ATP (C) pour mesurer leur contenu en NO. L'expression des adénovirus a été vérifiée par immunobuvardage de type western. (B) La stimulation d'eNOS induite par le VEGF (40ng/ml) a été analysée en utilisant des anticorps anti-phospho-Ser¹¹⁷⁹-eNOS. L'expression des protéines totales ont également été mesurées. Les graphiques représentent le ratio de protéine phosphorylée sur sa quantité de protéine totale. (ANOVA; P<0.05).

Figure 4 : L'expression de HA-70Z/3-Cbl régule à la hausse l'activation des voies MAPK et PLC- γ par le VEGFR-2. Suite à une infection aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl, ces cellules ont été stimulées au VEGF (40ng/ml) aux temps indiqués. L'activation de MAPK et de PLC- γ a été analysée en utilisant des anticorps phospho-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴) et phospho-Tyr⁷⁸³-PLC- γ 1. L'expression des protéines totales ont également été mesurées. Les graphiques représentent le ratio de protéine phosphorylée sur sa quantité de protéine totale. L'expression du mutant 70Z/3-Cbl et de GFP fut aussi détectée par des anticorps anti-Cbl et anti-GFP. Ces expériences furent répétées au moins 3 fois.

Figure 5 : L'expression de 70Z/3-Cbl dans les cellules endothéliales augmente le potentiel chimiotactique du VEGF. (A) Des cellules endothéliales infectées

aux adénovirus GFP ou HA-70Z/3-Cbl ont été détachées et mis en suspension à raison de 50 000 cellules par puits dans une chambre de Boyden. La migration fut stoppée 2h après l'ajout de VEGF ou de FBS 10%. Les cellules migrées ont par la suite été comptées. (B) Des BAECs infectées ou non au HA-70Z/3-Cbl ont été cultivées sur des lamelles de verre couvertes de gélatine 0,1%. Ces cellules ont été sevrées et traitées au VEGF pour 30 minutes. Elles ont ensuite été fixées, perméabilisées et incubées avec les anticorps anti- HA (rouge) pour marquer les cellules exprimant le mutant HA-70Z/3-Cbl et la phalloïdine marquée (Alexa 488, en vert) pour observer la polymérisation de l'actine. Les flèches blanches indiquent la présence de repliements membranaires.

3.4 Figures

Figure 1

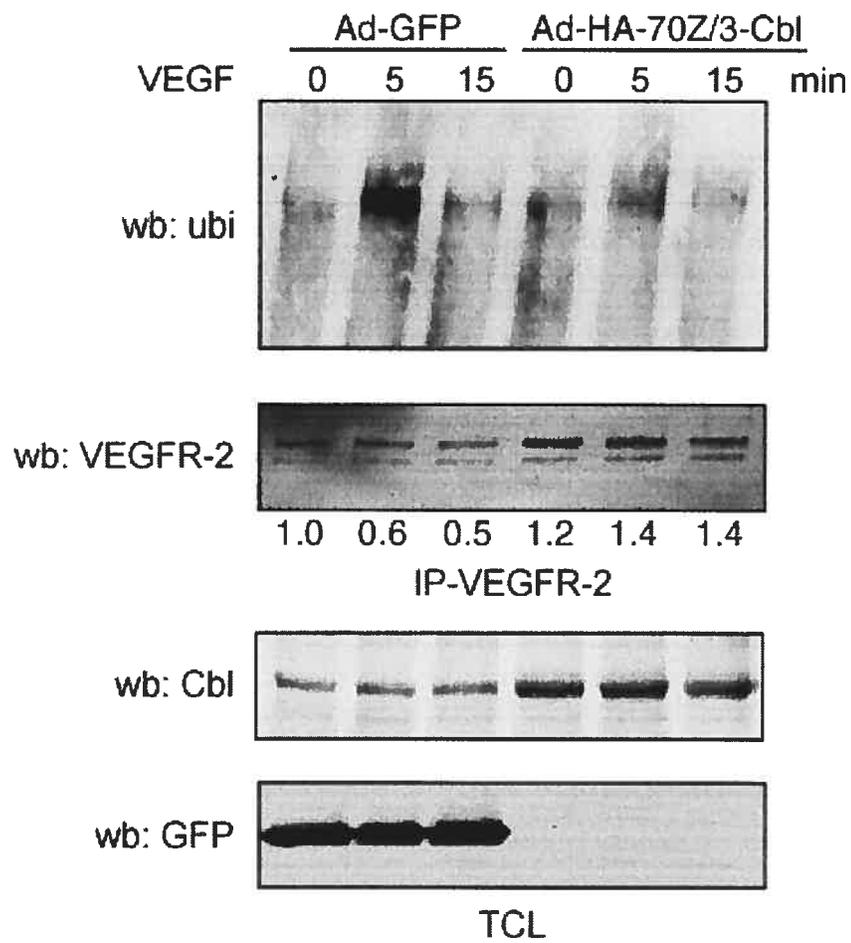


Figure 2

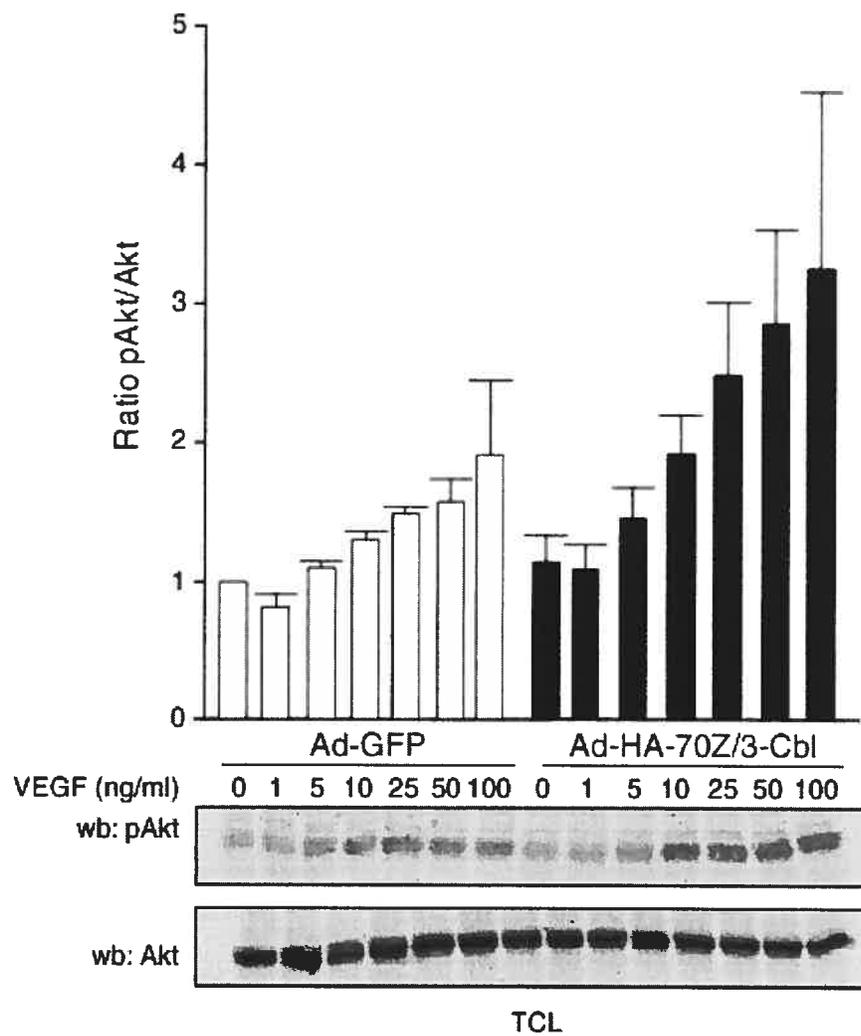


Figure 3

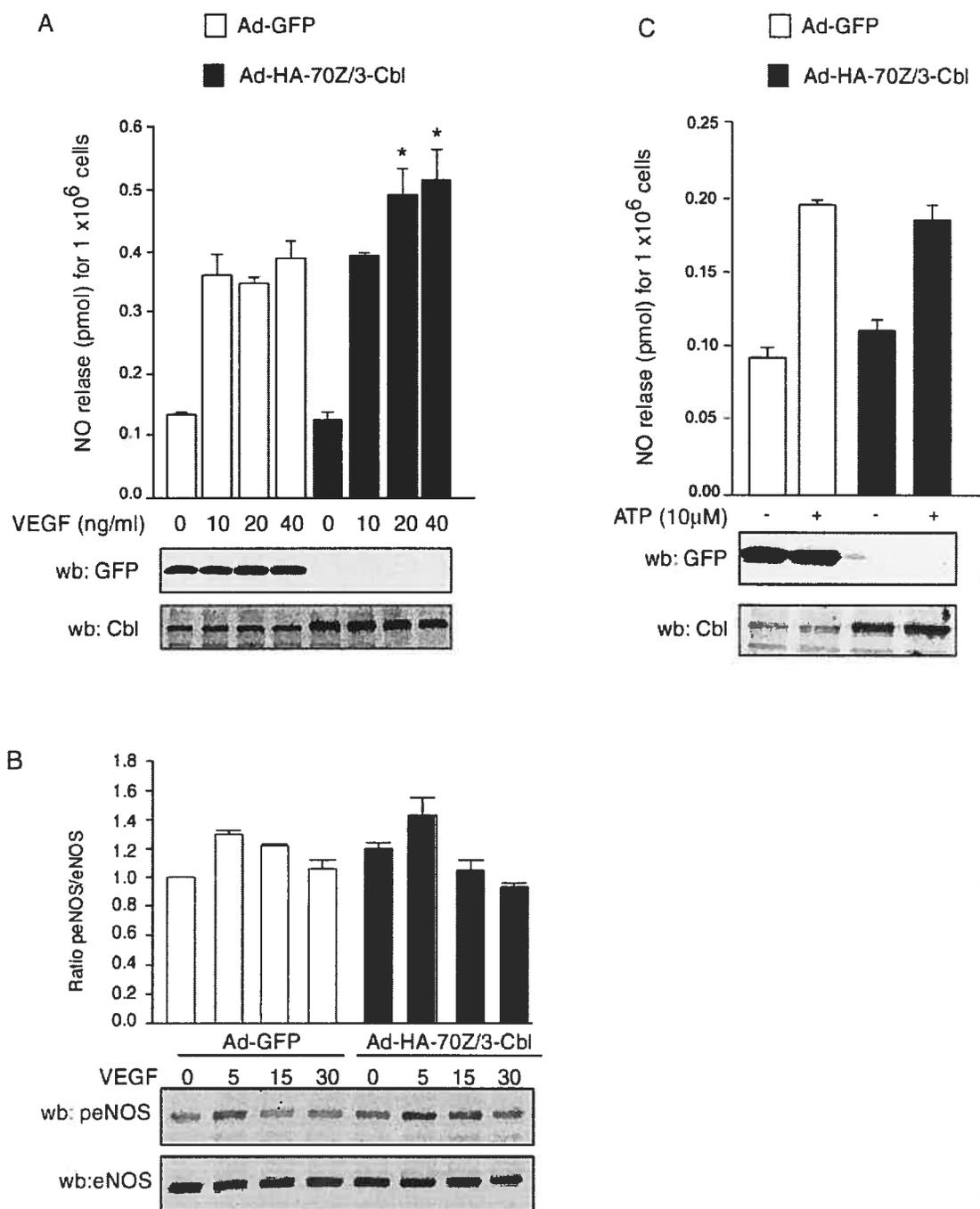


Figure 4

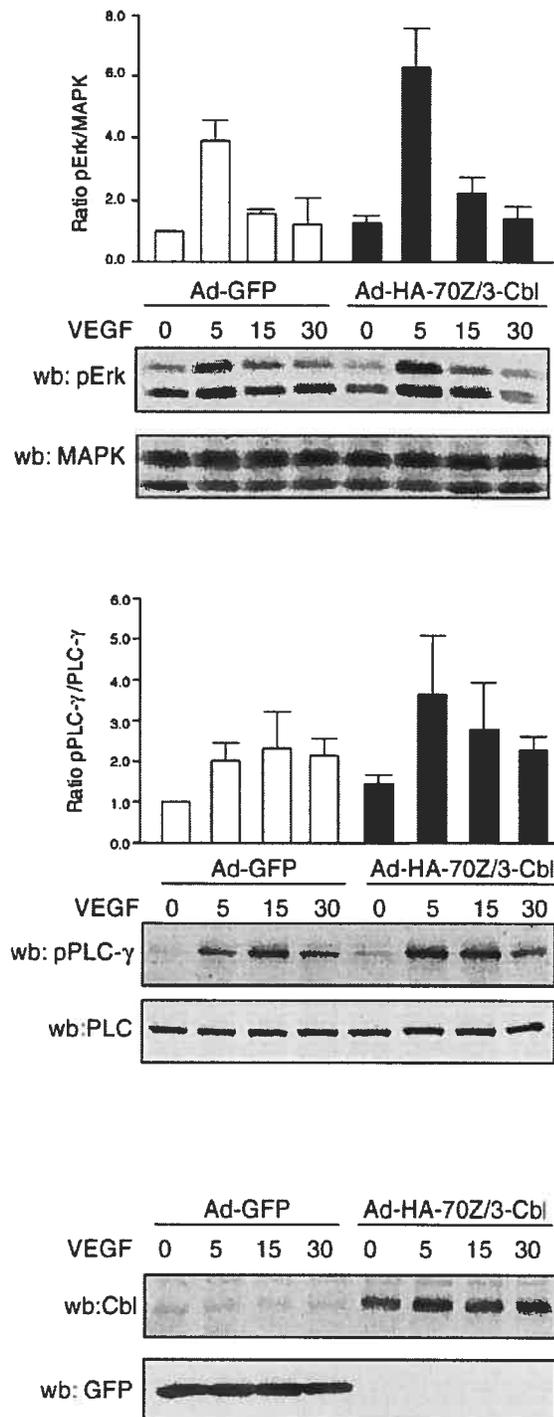
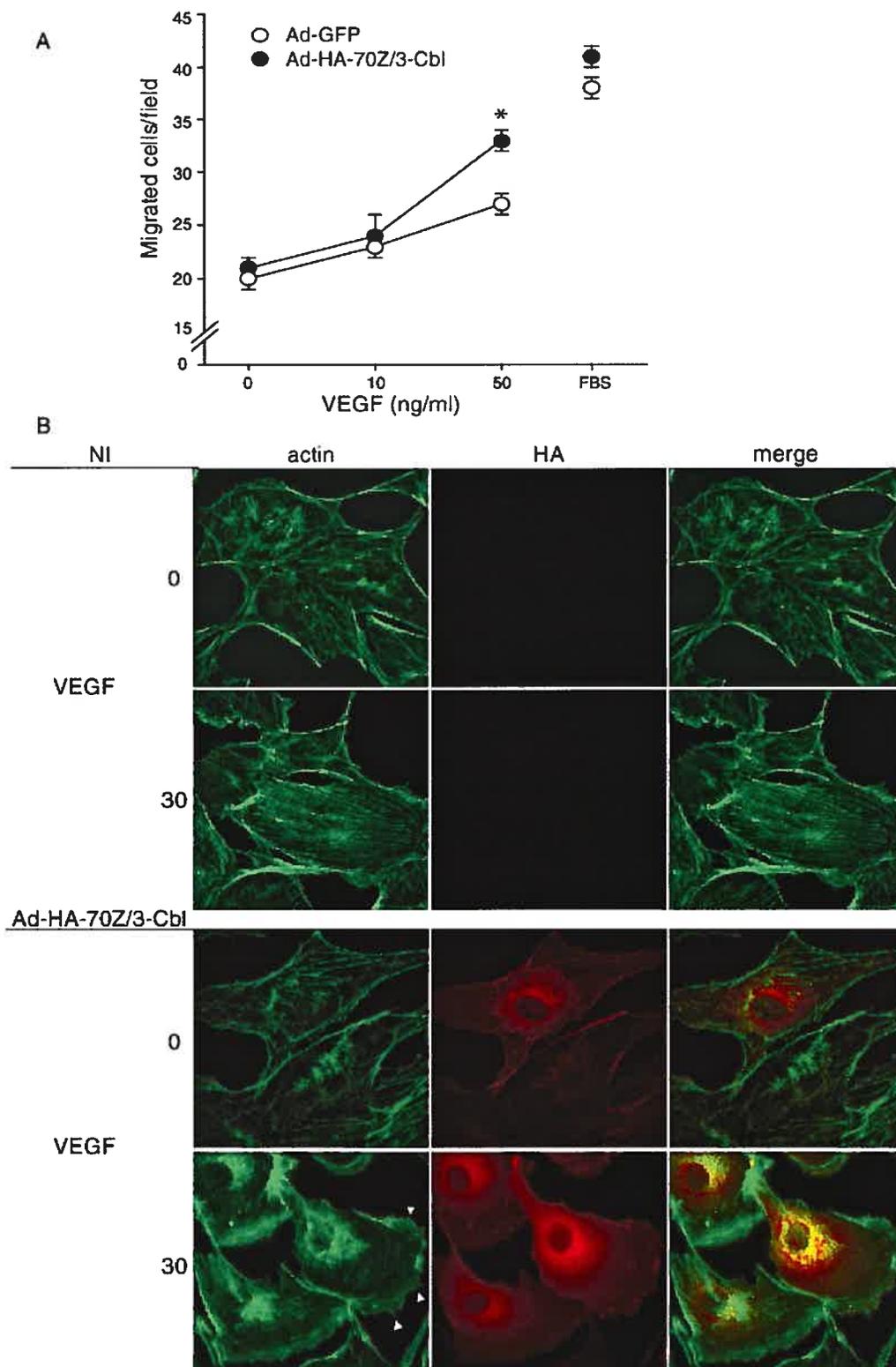


Figure 5



CHAPITRE 4

**ARTICLE 2 : Src-MEDIATED PHOSPHORYLATION OF HSP90 IN
RESPONSE TO VEGF IS REQUIRED FOR VEGF RECEPTOR-2
SIGNALING TO eNOS.**

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Martine Duval

Département de pharmacologie, faculté de médecine

Ph.D. pharmacologie

2. Description de l'article

Titre: Src-mediated phosphorylation of HSP90 in response to VEGF is required for VEGF receptor-2 signaling to eNOS.

Ordre des auteurs : Duval, M. Le Boeuf, F. Huot, J. and Gratton, J-P.

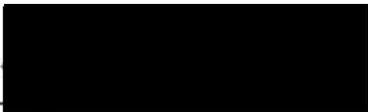
Reuves de soumission proposées : Molecular biology of the cell

État actuel de l'article : Soumis

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis en accord pour que Martine Duval inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre : Régulation intracellulaire du VEGFR-2 menant à l'activation d'eNOS dans les cellules endothéliales.

Fabrice Le Boeuf

Coauteur	Signature	Date
Jacques Huot		
Coauteur		Date
Jean-Philippe Gratton		21/08/2007
Coauteur	Signature	Date

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Martine Duval

Département de pharmacologie, faculté de médecine

Ph.D. pharmacologie

2. Description de l'article

Titre: Src-mediated phosphorylation of HSP90 in response to VEGF is required for VEGF receptor-2 signaling to eNOS.

Ordre des auteurs : Duval, M. Le Boeuf, F. Huot, J. and Gratton, J-P.

Revus de soumission proposées : Molecular biology of the cell

État actuel de l'article : Soumis

3. Déclaration de tous les coauteurs

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis en accord pour que Martine Duval inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre: Régulation intracellulaire du VEGFR-2 menant à l'activation d'eNOS dans les cellules endothéliales.

Fabrice Le Boeuf		21/08/07
Coauteur		Date
Jacques Huot		21/08/07
Coauteur		Date
Jean-Philippe Gratton		21/08/07
Coauteur		Date
	Signature	

Contribution des auteurs

Dans le but d'étudier l'internalisation du VEGFR-2 suite à une stimulation au VEGF ainsi que les conséquences de cette endocytose sur la signalisation intracellulaire, les travaux furent partagés comme suit :

Fabrice Le Boeuf s'est chargé de la démonstration de l'inhibition de la phosphorylation en tyrosine qui dépend du VEGF de la chaperone HSP90, suite à un prétraitement à la geldanamycine (Figure 3C).

En ce qui me concerne, j'ai réalisé le reste des travaux expérimentaux menant à la création de cet article.

L'apport d'idées originales et la grande partie de l'écriture de ce manuscrit furent partagés entre mon directeur de recherche et moi.

Jacques Huot est le superviseur de Fabrice Le Bœuf et a participé à l'écriture et à la révision de l'article.

Src-mediated phosphorylation of HSP90 in response to VEGF is required for VEGF receptor-2 signaling to eNOS.

Martine Duval ^{1,2}, Fabrice Le Bœuf ⁴, Jacques Huot ⁴ and Jean-Philippe Gratton ^{1,2,3,*}

¹Laboratory of Endothelial Cell Biology, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), 110 des Pins Ave West, Montréal, QC, H2W 1R7, Canada. Departments of ²Pharmacology and ³Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada. ⁴Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, 9 rue McMahan, Québec, QC, G1R 2J6, Canada.

Running title: Phosphorylation of HSP90 by Src

Key words: VEGF, VEGFR-2, eNOS, nitric oxide, HSP90, Src

*To whom correspondence should be addressed:

 Phone: 514-987-5610, Fax: 514-987-5676

Abbreviations: eNOS, endothelial nitric oxide synthase; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; BAEC, bovine aortic endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; HSP90, heat shock protein 90 kDa; NO, nitric oxide; HA, Hemagglutinin; GA, geldanamycin.

4.1 ABSTRACT

Nitric oxide (NO) release from endothelial cells, via endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation, is central to the proangiogenic actions of VEGF. VEGF signaling to eNOS is principally mediated by an Akt-dependent phosphorylation of eNOS and by increased association of eNOS to the molecular chaperone, HSP90. Herein, we report that VEGFR-2 activation induces tyrosine phosphorylation of VEGFR-2-associated HSP90 β . Tyrosine phosphorylation of HSP90 β in response to VEGF is dependent on internalization of the VEGFR-2 and on Src kinase activation. Furthermore, we demonstrate that c-Src directly phosphorylates HSP90 on tyrosine 300 residue and that this event is essential for VEGF-stimulated eNOS association to HSP90 and thus NO release from endothelial cells. Our work identifies Y300 phosphorylation of HSP90 as a novel regulated posttranslational modification of the chaperone and demonstrates its importance in the proangiogenic actions of VEGF, namely by regulating NO release from endothelial cells.

4.2 INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent proangiogenic cytokine that activates three specific receptor tyrosine kinases (RTK) namely, VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3. Gene knockout studies revealed that VEGF and VEGF receptors are essential for the development of the vasculature in mouse embryos (Shalaby *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996; Dumont *et al.*, 1998). In addition to its functional roles in vasculogenesis, VEGF plays key roles in adult physiological and pathological angiogenesis such as wound healing and tumor vascularization. VEGFR-2 mediates most of the functional and biochemical effects of VEGF in endothelial cells including proliferation, migration, survival and nitric oxide (NO) release. These effects are produced through the activation of multiple signaling pathways, such as the PI-3 kinase/Akt, p38 MAPK, PLC- γ and Erk/MAPK, following the activation of VEGFR-2 (Takahashi and Shibuya, 1997; Rousseau *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2001). VEGF-mediated activation of the Ser/Thr kinase Akt leads to phosphorylation of serine 1179 on bovine endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Ser¹¹⁷⁷ in the human form), which increases eNOS catalytic activity and results in release of NO from endothelial cells (Fulton *et al.*, 1999a; Dimmeler *et al.*, 1999b). In turn, NO released from endothelium contributes to the proangiogenic effects of VEGF. Indeed, VEGF-mediated vascular permeability, angiogenesis, and endothelial cell precursor mobilization are markedly impaired in eNOS deficient mice (Fukumura *et al.*, 2001; Aicher *et al.*, 2003).

Heat-shock protein 90 (HSP90) is a multifunctional molecular chaperone

and its role in the prevention of protein aggregation and in the refolding of denatured proteins has been studied in much detail (Whitesell and Lindquist, 2005). HSP90 is also a regulator of the activity of signaling molecules such as c-Src, Akt, and eNOS, and contributes to their activation. HSP90 is known to associate with eNOS and Akt following VEGF stimulation, which contributes to increase eNOS catalytic activity (Garcia-Cardena *et al.*, 1998a; Fontana *et al.*, 2002c). In addition to a direct allosteric effect of HSP90 on eNOS, it is thought that binding of HSP90 to Akt prevents the phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Thr³⁰⁸ of Akt, which maintains its positive functional effects on eNOS catalytic activity (Sato *et al.*, 2000b; Takahashi and Mendelsohn, 2003). Hyperphosphorylation of serine and/or threonine residues on HSP90 has been shown to negatively regulate HSP90's role in the conformational maturation of oncogenic signaling proteins, including ErbB2, c-Src, Akt, and Raf-1 (Mimnaugh *et al.*, 1995; Schulte *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Basso *et al.*, 2002). However, details in the understanding of the role of these phosphorylation sites in HSP90 function are still emerging (Ogiso *et al.*, 2004). Furthermore, evidence for a role of regulated posttranslational modifications in intracellular signaling events are lacking.

Internalization of activated RTK from plasma membrane is a critical step of signal transduction either by terminating membrane signaling or by redirecting and sustaining signaling intracellularly. Many studies, including a recent report on VEGFR-2, suggest that receptor signaling is maintained in the endosomal compartment, which may serve as a mechanism for sustaining and amplifying membrane signaling (Urbe *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2002; Lampugnani *et al.*,

2006b). In this study, we investigated the contribution of internalized VEGFR-2 on intracellular signaling pathways leading to nitric oxide release. We found that HSP90 β is a novel tyrosine phosphorylated protein associated to VEGFR-2 and have obtained evidence indicating that the phosphorylation of HSP90 β -bound to VEGFR-2 is mediated by c-Src, occurs on Y300, and is regulated by VEGFR-2 internalization. Furthermore, phosphorylation of HSP90 on Y300 following VEGFR-2 activation regulates the association of HSP90 with eNOS and thus NO release from endothelial cells in response to VEGF.

4.3 MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) and COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS (HyClone, Logan, UT), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (VEC Technologies) were plated on 0.1% gelatin-coated 60 mm dishes and cultured in M199 supplemented with 20% FBS (Invitrogen), 50 μ g/ml endothelial cell growth supplement (Sigma), 100 μ g/ml heparin (Sigma), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Recombinant human VEGF obtained from the BRB Preclinical Repository of the NCI-Frederick Cancer Research and Development Center was used for cell stimulation throughout this study.

Adenoviruses and cell infections

Hemagglutinin (HA)-tagged K44A-dynamin adenoviruses were generously

given by Dr. Jeffrey E. Pessin (SUNY Stony Brook). Expansion of the virus was done at the Animal Reproduction and Biotechnology Lab of Colorado State University. For cell infections, 80 % confluent dishes of BAEC or HUVEC were used. Cells were infected, at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 8 to 16h, with recombinant adenoviruses coding for β -galactosidase or HA-K44A-dynamin. The adenoviruses were removed and cells were left to recover for 24 to 48h in complete medium. These conditions resulted in uniform expression of the transgenes in close to 95% of the cells as determined by β -galactosidase activity staining.

Receptor internalization studies by FACS analysis

HUVEC infected with either Ad- β -gal or Ad-K44A-dynamin were trypsinized and incubated with mouse anti-human VEGFR-2 antibody (Sigma) for 30 minutes on ice. Cells were then incubated with FITC-conjugated affinity-purified goat F(ab')₂ anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research Laboratories) on ice for 30 minutes analyzed using a FACScan Cytometer as described in SI methods.

Plasmids and transfections

cDNA coding for bovine eNOS (in pcDNA3), human VEGFR-2 (in pRK7), β -galactosidase (in pcDNA3) and HA-HSP90 β (in pcDNA3) cDNAs were described previously (Fulton *et al.*, 1999c; Fontana *et al.*, 2002b). Akt and p110 expression plasmids were given by Dr. William C. Sessa (Yale University, New Haven, CT, USA). HA tagged WT-dynamin, K44A-dynamin, WT and

K298R-Src expression vectors were obtained from Dr. Stephane A. Laporte (McGill University, Montreal, QC, Canada). The Y300F, Y483F mutant myc-HSP90 β constructs were generated by site-directed mutagenesis (Stratagene) using the following primers: Y300F, 5'-CACCCAAGAGGAGTTTGGAGAATTCTACAAGAGCC-3', Y483F, 5'-CAGAAGTCCATCTTTTACATCACTGG-3' and their respective reverse complement. Each construct was sequenced to confirm the presence of the mutation. COS-7 and BAEC were transfected using Lipofectamine 2000 according to manufacturer's protocol (Invitrogen). Protein expression was confirmed (60 μ g of total cell lysate) by SDS-PAGE and western blot analysis 48h following transfections.

Nitric oxide release

Cell medium was processed for the measurement of nitrite (NO $_2^-$), the stable breakdown product of NO in aqueous solution, by NO-specific chemiluminescence using a NO analyzer (Ionics Instruments) (Sessa *et al.*, 1995). Transfected COS-7 cells were processed for the measurement of nitrite, 48h after transfection.

Antibodies, immunoprecipitations and immunoblotting

The primary antibodies used are: anti-VEGFR-2 mAb (Santa Cruz Biotechnology), Anti-eNOS, -HSP90, -HA-Tag (pAbs) (BD Transduction Lab), HA-Tag (mAb), P-Tyr⁷⁸³-PLC- δ 1, PLC- δ 1, P-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴) P-Akt (Ser⁴⁷³), Akt and P-Ser¹¹⁷⁹-eNOS (Cell Signaling) and anti-phosphotyrosine (4G10) (Upstate Biotech). For immunoprecipitations, cells were solubilized with a

lysis buffer containing 1% NP-40, 20mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 20mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Soluble proteins were incubated with the primary antibody (2 μ g) at 4°C for 2 hours. Protein A-Sepharose (Sigma) (50 μ l of a 50% slurry) was then added and incubated for an additional hour. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed 3 times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham) and western blotted. Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL, Amersham) or by a LI-COR Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using Alexa 680 and Alexa 800 labeled secondary antibodies (Invitrogen).

In vitro kinase assay

Purified human HSP90 (1 μ g; Stressgen Bioreagents) was incubated with 5.25 U of recombinant c-Src (Upstate) for 20 min at 30°C in buffer containing 20mM HEPES, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 1mM DTT and 0.05mM sodium orthovanadate with or without 100 μ M ATP (Sigma). The kinase reaction was stopped by adding SDS sample buffer. Tyrosine phosphorylation was monitored by Western blotting using anti-pTyr antibody.

Protein identification by LC/MS/MS

Immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE gel and revealed by silver staining. The band of interest was cut out from the gel and digested with trypsin (0.1 μ g) for 45 min at 4°C. Peptides were extracted from the gel at room

temperature and the supernatants were transferred into a 96 well plate and then completely dried in a vacuum centrifuge. Before the analysis, peptides were dissolved under agitation for 15 min in 13 μ L of TFA 0.1% then sonicated 5 min and centrifuged at 2000 rpm for 1 min. Analysis of the peptide mixture was done by LC/MS/MS using a Q-ToF 2 Mass Spectrometer configured with an on-line CapLC system (Waters). Protein identification was obtained from the MS/MS spectra using Mascot analysis software (Matrix Science).

Phosphopeptide enrichment and identification

Following *in vitro* kinase assay (as described above), samples were subjected to SDS-PAGE then proteins were revealed by silver staining. Protein bands were cut out and trypsinized. Peptides were reconstituted with 50 μ L of 1% n-octyl glucoside (NOG) buffer in TBS. PY99 agarose-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology) was added and incubated for 2h at 4°C in order to enrich in tyrosine phosphorylated peptides. After centrifugation, the beads were washed once with NOG buffer and three times with water. Peptides were eluted from the beads with 50 μ L of 1% formic acid/ 50% acetonitrile. Eluates were dried down and reconstituted for proteomic analysis using a LTQ Orbitrap equipped with a Surveyor LC system (Thermo Fischer).

4.4 RESULTS

Dynamin mediates VEGF-induced internalization of VEGFR-2.

Internalization of activated receptor tyrosine kinases from the plasma membrane is a critical step of signal transduction. In order to investigate VEGFR-2 endocytosis, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were infected with adenoviruses coding for β -galactosidase (β -gal) as a control or for HA-tagged K44A-dynamin, a dominant-negative form of the GTPase to inhibit internalization. Immunodetection, using anti-HA antibody, was performed on lysates from HUVEC to confirm K44A-dynamin expression and FACS analysis was used to detect the presence of VEGFR-2 at the cell surface of endothelial cells before and following VEGF stimulation (Figure 1A). In cells infected with Ad- β -gal, VEGF stimulation resulted in a loss of VEGFR-2 expression at the cell surface indicative of a VEGF-dependent internalization of VEGFR-2 (Figure 1A, right panel). Expression of K44A-dynamin completely inhibited VEGF-induced VEGFR-2 internalization (Figure 1A, left panel). Quantitatively, the percentage of mean surface fluorescence (FITC) was reduced by 40% ($P < 0.05$) following VEGF treatment of Ad- β -gal infected cells and K44A-dynamin expression completely inhibited the VEGF-stimulated reduction of VEGFR-2 surface expression (Supplementary Figure 1). Fluorescence emitted from cells incubated with the secondary antibody alone was negligible (results not shown). Additionally, Ad-K44A-dynamin infection also inhibited the uptake of fluorescently labeled transferrin, a known dynamin-dependent process (results not shown). These findings indicate that VEGF induces a dynamin-dependent internalization of

VEGFR-2 in endothelial cells.

K44A-dynamin expression inhibits VEGFR-2 signaling to Akt and nitric oxide release

To evaluate the contribution of VEGFR-2 internalization on VEGF-induced activation of intracellular signaling pathways in endothelial cells, we infected bovine aortic endothelial cells (BAEC) with Ad-K44A-dynamin or Ad- β -gal adenoviruses and monitored the activation of well-established VEGF-sensitive signaling pathways. Ad-K44A-dynamin expression, as monitored by Western blotting against HA (Figure 1B, bottom), resulted in a marked decrease of VEGF-induced activation of Akt, as monitored by Ser 473 phosphorylation levels (Figure 1B, top). Interestingly, activation of PLC- γ and MAPK pathways was unaltered by K44A-dynamin expression. These data suggest that VEGF-mediated Akt activation depends, at least in part, on internalization of VEGFR-2.

It is well established that VEGF-stimulated nitric oxide release from endothelial cells is downstream from the PI-3 kinase/Akt signaling pathway (Dimmeler *et al.*, 1999a; Fulton *et al.*, 1999b). We thus investigated the contribution of internalized VEGFR-2 on stimulated nitric oxide release. COS-7 cells were transfected with VEGFR-2 and eNOS and the effect of HA-tagged WT- and K44A-dynamin expression on NO release was monitored. Co-expression of VEGFR-2 with eNOS and WT-dynamin significantly increased NO production when compared to cells transfected with β -gal, eNOS and WT-dynamin. This confirms that VEGFR-2 stimulates eNOS-dependent NO release in transfected

COS-7 cells. Interestingly, co-expression of K44A-dynamin with VEGFR-2 and eNOS inhibited by more than 50% VEGFR-2-stimulated NO release from COS-7 cells (Figure 1C). This effect of the mutant dynamin was specific for VEGFR-2-mediated effects since stimulation of NO release by the calcium ionophore ionomycin or, via the direct activation of eNOS by PI-3 kinase or Akt (Supplementary Figure 2), was not affected by K44A-dynamin expression.

VEGFR-2 internalization promotes tyrosine phosphorylation of HSP90 β

Since K44A-dynamin expression specifically affects VEGFR-2 signaling, we evaluated if the expression of K44A-dynamin affects the autophosphorylation on tyrosine residues of VEGFR-2. COS-7 cells were co-transfected with VEGFR-2 and wild-type dynamin (WT) or K44A-dynamin. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies against VEGFR-2 and tyrosine phosphorylation levels of VEGFR-2 were monitored. Transient expression of VEGFR-2 in COS-7 cells results in constitutive autophosphorylation of the receptor; western blot analysis showed that the levels of tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 were not affected by the co-expression of K44A-dynamin, indicating that inhibition of VEGFR-2 internalization does not affect autophosphorylation and activation *per se* of the receptor (Figure 2A, top, 200 and 250 kDa bands). Interestingly, we also observed the presence of a highly tyrosine phosphorylated protein of approximately 85 kDa associated to the VEGFR-2. This phospho-protein band was absent when VEGFR-2 internalization was inhibited by K44A-dynamin and enhanced in presence of WT-dynamin (Figure 2A). We used LC-

MS/MS analysis to identify this protein. COS-7 cells were transfected with plasmids coding for VEGFR-2 or eGFP, as a control, and HA-tagged WT-dynamin. Cell lysates were immunoprecipitated for VEGFR-2, proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by silver staining (Figure 2B). The \approx 85kDa protein, present only in the immunoprecipitate from cells expressing VEGFR-2, was analyzed by tandem mass spectrometry. Protein database search using Mascot analysis (Matrix Science) revealed the presence of 7 peptides with a total Mascot score of 241 corresponding to human HSP90 β (Table S1 in the supplemental material).

We have previously reported a regulated association of HSP90 with VEGFR-2 (Le Boeuf *et al.*, 2004c). However, this is the first report of VEGFR-2-mediated tyrosine phosphorylation of the chaperone. To further confirm that HSP90 is tyrosine phosphorylated upon VEGFR-2 activation, HA-tagged HSP90 β was transfected in presence or in absence of the VEGFR-2 and anti-phosphotyrosine Western blotting of the HA-tag immunoprecipitate revealed that HSP90 β is phosphorylated on tyrosine residues when co-expressed with VEGFR-2 (Figure 2C). To investigate if tyrosine phosphorylation of HSP90 occurs in endothelial cells in response to VEGF stimulation, HSP90 was immunoprecipitated from VEGF-stimulated BAEC. Phosphotyrosine immunoblotting done on HSP90 immunoprecipitates showed a marked increase in the levels of phosphorylation of HSP90 on tyrosine residues at 15 min of VEGF stimulation and that the maximum was reached at 30 min of stimulation (Figure 2D). These results confirm that VEGFR-2 activation results in increased tyrosine

phosphorylation of HSP90 β .

Association of HSP90 to the VEGFR-2 is required for tyrosine phosphorylation

We then studied the relationship between HSP90 phosphorylation and VEGFR-2 internalization; we first looked at endogenous HSP90 association to VEGFR-2 in COS-7 cells. Cells were co-transfected with VEGFR-2 and WT-dynamin or K44A-dynamin. VEGFR-2 immunoprecipitation showed that endogenous HSP90 is associated to VEGFR-2 irrespectively of the presence of WT or K44A-dynamin. In contrast, immunoprecipitation of HSP90 from these same lysates revealed that tyrosine phosphorylation of HSP90 is increased only in cells expressing both VEGFR-2 and HA-dynamin. Conversely, K44A-dynamin expression completely abolished the VEGFR-2-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 (Figure 3A). To demonstrate in endothelial cells that internalization of VEGFR-2 is necessary for VEGF-dependent tyrosine phosphorylation of HSP90, we infected BAEC with β -gal or Ad-HA K44A-dynamin and monitored the increase in HSP90 phosphorylation levels in response to VEGF stimulation (Figure 3B). VEGF stimulation induced an increase in the tyrosine phosphorylation levels of HSP90 in cells infected with Ad- β -gal. In contrast, K44A-dynamin expression in BAEC completely inhibited the VEGF-stimulated increase in HSP90 tyrosine phosphorylation levels (Figure 3B). These findings support internalization of the VEGFR-2 as being a prerequisite for the phosphorylation of HSP90 in endothelial cells.

We previously reported that inhibition of HSP90 with geldanamycin (GA)

impairs the recruitment of HSP90 to VEGFR-2 (Le Boeuf *et al.*, 2004b). Interestingly, we now show that treatment of HUVEC with GA also results in the inhibition of the VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 (Figure 3C). However, internalization of VEGFR-2, measured by FACS analysis, was not impaired by GA pretreatment of endothelial cells (data not shown). Thus, receptor internalization is independent of HSP90 association and phosphorylation since GA abrogated recruitment of HSP90 to the VEGFR-2 but did not affect the VEGF-dependent internalization process. These results further suggest that tyrosine phosphorylation of HSP90 occurs following internalization of the receptor.

c-Src mediates in VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90

The tyrosine kinase c-Src is involved in various aspects of VEGF signaling. We thus explored the possibility of a contribution of Src kinase activity in VEGF-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90. In this context, COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for HA-tagged HSP90 β , β -gal, c-Src or the dominant negative form K298R-Src (Figure 4A). In c-Src overexpressing COS-7 cells, an important increase in tyrosine phosphorylation levels of HSP90 β was observed. Conversely, tyrosine phosphorylation of HSP90 β was barely detectable in cells expressing K298R-Src (Figure 4A). An *in vitro* kinase assay was also performed in order to confirm the ability of Src to directly phosphorylate HSP90. Purified HSP90 and recombinant c-Src were incubated in kinase buffer in the presence or absence of ATP and tyrosine phosphorylation was detected by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody. We show that

tyrosine phosphorylation levels of HSP90 are increased only when c-Src and ATP are both present in the kinase reaction (Figure 4B). We then wondered if K298R-Src might inhibit VEGFR-2-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90 in transfected COS-7 cells and in BAEC. In transfected COS-7 cells, phosphotyrosine immunodetection of the HA-HSP90 β immunoprecipitate showed that concomitant expression of K298R-Src with VEGFR-2 significantly inhibited the VEGFR-2-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 β (Figure 4C, top). Simultaneously, VEGFR-2 was immunoprecipitated from these cell extracts and a slight reduction (\approx 30% reduction, n=3) in the association of HA-HSP90 β to VEGFR-2 was observed in cells expressing the dominant negative form of c-Src (Figure 4C; middle).

We also monitored, in endothelial cells, the effect of K298R-Src expression on VEGF-stimulated increase in tyrosine phosphorylation levels of HSP90. K298R-Src was thus transfected in BAEC and HSP90 immunoprecipitation from VEGF-stimulated BAEC revealed that overexpression of the dominant negative Src inhibited the VEGF-stimulated increase tyrosine phosphorylation of HSP90 (Figure 4D). Overall, these results indicate that Src activity is essential for the tyrosine phosphorylation of HSP90.

HSP90 β is phosphorylated on tyrosine 300 by c-Src

In order to identify the target tyrosyl residue of Src phosphorylation on HSP90, we performed a Src kinase assay as above, separated the phosphorylated HSP90 by SDS-PAGE and submitted it to a tryptic digest. The tyrosine

phosphorylated tryptic peptides were enriched by PY-99 immunoprecipitation and peptide identification was done by MS/MS analysis. We identified a phosphorylated peptide, NPDDITQEEpYGEFYK, which corresponds to amino acids 291 to 305 of HSP90 β that was phosphorylated on tyrosine 300 of the HSP90 β sequence (Supplementary Figure 3). This phosphorylated peptide was only detected in enriched peptide samples originating from *in vitro* Src kinase assays performed in presence of ATP. To confirm that this residue could be a target of Src phosphorylation in cells, we generated a myc-tagged mutant of HSP90 β where the tyrosine 300 residue was substituted for phenylalanine (Y300F). Recently, analysis of the whole phosphoproteome of the anaplastic large cell lymphoma line SU-DHL1, revealed the presence of a peptide that suggested tyrosine 483 of HSP90 as basally phosphorylated in these cells (Rush *et al.*, 2005). Even though we did not detect the presence of this phosphorylated residue in our assays, we generated a mutated version (Y483F). In order to confirm that Y300 is a phosphorylation site for c-Src, wild-type, Y300F or Y483F-HSP90 β were transfected in presence of c-Src in COS-7 cells (Figure 5A). Anti-myc immunoprecipitation revealed that c-Src expression increased the levels of tyrosine phosphorylation of wild-type HSP90 β but the mutant Y300F was markedly less phosphorylated compared to wild-type HSP90 β . Mutation of the Y483 residue did not alter the increase in tyrosine phosphorylation induced by c-Src. These results strongly suggest that tyrosine 300 of HSP90 β is a major phosphorylation site for c-Src.

Y300 phosphorylation of HSP90 is necessary for VEGF signaling to eNOS.

To investigate the involvement of Y300 phosphorylation of HSP90 β in VEGFR-2 signaling to eNOS we studied the capacity of VEGFR-2 to induce HSP90 association to eNOS and stimulate NO release from cells. Immunoprecipitation of myc-WT-HSP90 β or myc-Y300F-HSP90 β in COS-7 cells co-transfected with eNOS in absence or in presence of VEGFR-2 showed that the association of eNOS to Y300F-HSP90 β is not increased in the presence of VEGFR-2, in contrast to the association of eNOS to WT-HSP90 β which is increased in the presence of VEGFR-2 (Figure 5B). The converse eNOS immunoprecipitation also revealed that Y300F-HSP90 β does not associate to eNOS in response to VEGFR-2 activation (Figure 5B). We then studied if Y300 phosphorylation influences the association of HSP90 β to the VEGFR-2. Immunoprecipitation of VEGFR-2 revealed that WT-HSP90 β is associated to the receptor and that mutation of Y300 residue did not affect the extent of association of HSP90 to VEGFR-2 in contrast to eNOS (Figure 5C).

To study the consequence of this incapacity of Y300F to associate to eNOS in a VEGFR-2-dependent manner, we performed NO release experiments in presence of the phosphorylation defective HSP90. VEGFR-2-stimulated NO release in eNOS transfected COS-7 cells is completely inhibited when cotransfected with Y300F-HSP90 in contrast to WT-HSP90 β transfected cells (Figure 5D). We also monitored the effect of myc-Y300F-HSP90 β expression on the VEGF-stimulated association of HSP90 to eNOS in endothelial cells. BAEC were transfected with myc-tagged WT or Y300F-HSP90 and stimulated with

VEGF. Anti-myc immunoprecipitation revealed that VEGF failed to promote the association of eNOS to myc-Y300F-HSP90 β in contrast to cells expressing the wild-type version of HSP90 β (Figure 5E). These results underscore the importance of HSP90 Y300 phosphorylation in the regulation of VEGF-dependent signaling to eNOS.

4.5 DISCUSSION

Herein, we delineate an intracellular VEGF signaling axis that begins with the internalization of the VEGFR-2 and culminates with the activation of eNOS and NO release from endothelial cells and in which the phosphorylation of Y300 of the chaperone HSP90 by c-Src acts as an important regulator. Our data demonstrate that VEGFR-2 bound HSP90 β is phosphorylated in response to VEGF stimulation in a c-Src-dependent manner on Y300 and that this event is necessary for VEGF-induced eNOS association to HSP90 resulting in stimulated NO production.

We have previously shown that HSP90 interacts with the VEGFR-2 and this VEGF-promoted effect contributes to signaling to FAK and actin remodeling (Rousseau *et al.*, 2000; Masson-Gadais *et al.*, 2003). Using MS/MS analysis, we have now identified HSP90 β as a tyrosine phosphorylated protein associated to the VEGFR-2. We thus provide novel data suggesting that tyrosine phosphorylation of HSP90 β is an early event in signal transduction leading to VEGF-mediated effects in endothelial cells. The phosphorylation of the chaperone is increased following VEGF stimulation of endothelial cells and is present only when the internalization of the VEGFR-2 is allowed. We have shown that HSP90 is recruited to the last 130 AA of the VEGFR-2 in response to VEGF stimulation of endothelial cells (Le Boeuf *et al.*, 2004a). Based on our current understanding, we can speculate that chronologically, following VEGFR-2 activation, a pool of non-phosphorylated HSP90 quickly associates with the last 130 AA of the receptor in response to VEGF and that, after internalization, this pool of HSP90 becomes

tyrosine phosphorylated by c-Src. We also identified phosphorylation of Y300 as a regulated posttranslational modification that alters the capacity of HSP90 to interact with eNOS and promote its activation by VEGF in endothelial cells. Interestingly, all the components of this pathway have been previously shown to interact directly; it is thus logical that they all depend on the internalization process for efficient signaling.

Phosphorylation of HSP90 on Ser and/or Thr residues has clearly been shown to be involved in its function. Hyperphosphorylation at these sites has been shown to result in the inhibition of the chaperoning function of HSP90. The Y300 residue of HSP90 β is located at the beginning of the middle domain of HSP90 and this region has previously been shown to mediate the interaction of HSP90 with eNOS and Akt (Sato *et al.*, 2000a; Fontana *et al.*, 2002a). The Y300 residue of HSP90 β corresponds to Y308 of HSP90 α ; in fact this tyrosine residue is extremely conserved from the yeast to the human form. This argues for the possibility that phosphorylation at this site may govern a wide variety of functions in multiple organisms. Also, the region encompassed by Y308 α or Y300 β has been demonstrated to be immunogenic suggesting that it is exposed to the outer surface of the molecule thus accessible to kinases (Nemoto *et al.*, 1997). Recently, the proximally located K294 of HSP90 α (K286 β) has been proposed to be acetylated and that acetylation at this site decreases its affinity for most client proteins and certain cochaperones (Scroggins *et al.*, 2007). This further suggests that posttranslational modifications in this region of the molecule contribute to the regulation of HSP90 functions as a chaperone and as a signaling intermediate by

modulating, in this case, the activity of eNOS. The direct and regulated binding of HSP90 to eNOS as been shown to increase eNOS activity in endothelial cells (Garcia-Cardena *et al.*, 1998b). It is noteworthy that prior to the identification of HSP90 as a modulator of eNOS activity, an unknown tyrosine phosphorylated protein was identified in complex with eNOS (Venema *et al.*, 1996). Further studies then suggested that this initially identified phosphorylated protein might in fact be HSP90 (Harris *et al.*, 2000). We now clearly demonstrate that tyrosine phosphorylation of HSP90 is a regulated process and that it occurs on Y300 via c-Src. The use of the non-phosphorylable Y300F-HSP90 β mutant also reveals that this might be a crucial event for the allosteric modulation of eNOS in endothelial cells following VEGFR-2 activation. It is well known that pharmacological inhibition of HSP90 by geldanamycin, attenuates Akt and eNOS activity leading to inhibition of angiogenesis (Brouet *et al.*, 2001; Sun and Liao, 2004). On the basis of our data, we now suggest that Y300 phosphorylation of HSP90, following receptor internalization, is a necessary step leading to eNOS association, activation and NO release from endothelial cells.

Our study demonstrates that internalization of the VEGFR-2 is dependent on the GTPase activity of dynamin since the overexpression of the K44A mutant of dynamin inhibits VEGF-stimulated VEGFR-2 internalization from the endothelial cell surface, tyrosine phosphorylation of HSP90 and eNOS activation. It is known that the VEGFR-2 internalizes following activation and that full kinase activity of the receptor is necessary for internalization (Dougher and Terman, 1999). Interestingly, the VEGFR-2 has previously been shown to colocalize with

dynamin-2 and expression of dominant negative dynamin regulates VEGFR-2 protein expression and VEGF-mediated survival of endothelial cells with no effect on VEGFR-2 endocytosis (Bhattacharya *et al.*, 2005). However, in line with our present study, a recent report suggests that the VEGFR-2 internalizes in a clathrin and VE-cadherin dependent manner and that the internalized receptors contribute to VEGF signaling from the endosomal compartment (Lampugnani *et al.*, 2006a). We now show that internalization of VEGFR-2, via a dynamin-dependent process, regulates intracellular signaling to HSP90, Akt and eNOS which has never been demonstrated. While we do not provide here direct evidence for endosomal signaling from internalized VEGFR-2, we demonstrate, however, that VEGFR-2 internalization is required for VEGF signaling to eNOS. In corollary, the fact that the HSP90 inhibitor, geldanamycin, inhibits the recruitment of HSP90 to VEGFR-2 but does not affect the VEGF-dependent internalization of the receptor indicates that association and phosphorylation of HSP90 are not required for the internalization process.

Finally, c-Src has been implicated in various signaling pathways downstream of the VEGFR-2 such as NO and prostacyclin release (He *et al.*, 1999). In addition, Src kinase activity is necessary for VEGF-mediated vascular permeability involved in angiogenesis, tumor cell extravasation and metastasis (Eliceiri *et al.*, 1999; Weis *et al.*, 2004). We now provide evidence that c-Src catalyzes the tyrosine phosphorylation of HSP90 on Y300 in response to VEGF stimulation. c-Src is a well known HSP90 client protein and HSP90 activity is essential for proper maturation of the tyrosine kinase (Xu *et al.*, 1999a). HSP90 is thought to direct the folding of Src kinases into the inactive conformation which

prevents their degradation (Xu and Lindquist, 1993; Xu *et al.*, 1999b). Interestingly, inhibition of HSP90 with geldanamycin rapidly disrupts Src association with HSP90 leading to transient activation of c-Src (Koga *et al.*, 2006). We now demonstrated that HSP90 is also a *bona fide* Src substrate in response to VEGFR-2 activation which results in activation of HSP90 suggesting a reciprocal influence between the two proteins that regulates both their activity in endothelial cells.

In summary, our data demonstrate that HSP90 is phosphorylated on Y300 by c-Src in response to VEGFR-2 activation and this leads to increase HSP90 and eNOS association and thus NO release from endothelial cells. These results hint toward a better understanding of the intracellular events leading to the proangiogenic signals activated by VEGF and delineate a role for a regulated posttranslational modification of HSP90. In this context, one may envision that the inhibition of HSP90 phosphorylation by geldanamycin derivatives may contribute to their antiangiogenic and anticancer effects.

4.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Denis Faubert from the IRCM proteomic core facility for protein identifications by mass spectrometry and Daniela Baggio for secretarial assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-15402 to J.H. and MOP-53295 to J.P.G.). M.D. is a recipient of a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. F.L.B. was in receipt of a studentship from Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.P.G. holds a Canada Research Chair.

4.7 References

- Aicher,A., Heeschen,C., Mildner-Rihm,C., Urbich,C., Ihling,C., Technau-Ihling,K., Zeiher,A.M., and Dimmeler,S. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med.* *9*, 1370-1376.
- Basso,A.D., Solit,D.B., Munster,P.N., and Rosen,N. (2002). Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* *21*, 1159-1166.
- Bhattacharya,R., Kang-Decker,N., Hughes,D.A., Mukherjee,P., Shah,V., McNiven,M.A., and Mukhopadhyay,D. (2005). Regulatory role of dynamin-2 in VEGFR-2/KDR-mediated endothelial signaling. *FASEB J.* *19*, 1692-1694.
- Brouet,A., Sonveaux,P., Dessy,C., Moniotte,S., Balligand,J.L., and Feron,O. (2001). Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ. Res.* *89*, 866-873.
- Carmeliet,P. *et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* *380*, 435-439.
- Dimmeler,S., Fleming,I., Fisslthaler,B., Hermann,C., Busse,R., and Zeiher,A.M. (1999b). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* *399*, 601-605.
- Dimmeler,S., Fleming,I., Fisslthaler,B., Hermann,C., Busse,R., and Zeiher,A.M. (1999a). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* *399*, 601-605.
- Dougher,M. and Terman,B.I. (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* *18*, 1619-1627.
- Dumont,D.J., Jussila,L., Taipale,J., Lymboussaki,A., Mustonen,T., Pajusola,K., Breitman,M., and Alitalo,K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* *282*, 946-949.
- Eliceiri,B.P., Paul,R., Schwartzberg,P.L., Hood,J.D., Leng,J., and Chersesh,D.A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* *4*, 915-924.
- Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M., and Breitman,M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* *376*, 66-70.

Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. (2002a). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.* 90, 866-873.

Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. (2002b). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.* 90, 866-873.

Fontana, J., Fulton, D., Chen, Y., Fairchild, T.A., McCabe, T.J., Fujita, N., Tsuruo, T., and Sessa, W.C. (2002c). Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ. Res.* 90, 866-873.

Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C.O., Buerk, D.G., Huang, P.L., and Jain, R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 2604-2609.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999a). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999c). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999b). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601.

Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1998a). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824.

Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1998b). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392, 821-824.

Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273, 30336-30343.

Harris,M.B., Ju,H., Venema,V.J., Blackstone,M., and Venema,R.C. (2000). Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen. Pharmacol.* *35*, 165-170.

Hayes,S., Chawla,A., and Corvera,S. (2002). TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J. Cell Biol.* *158*, 1239-1249.

He,H., Venema,V.J., Gu,X., Venema,R.C., Marrero,M.B., and Caldwell,R.B. (1999). Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* *274*, 25130-25135.

Koga,F., Xu,W., Karpova,T.S., McNally,J.G., Baron,R., and Neckers,L. (2006). Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 11318-11322.

Lampugnani,M.G., Orsenigo,F., Gagliani,M.C., Tacchetti,C., and Dejana,E. (2006a). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* *174*, 593-604.

Lampugnani,M.G., Orsenigo,F., Gagliani,M.C., Tacchetti,C., and Dejana,E. (2006b). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* *174*, 593-604.

Le Boeuf,F., Houle,F., and Huot,J. (2004b). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J. Biol. Chem.* *279*, 39175-39185.

Le Boeuf,F., Houle,F., and Huot,J. (2004c). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J. Biol. Chem.* *279*, 39175-39185.

Le Boeuf,F., Houle,F., and Huot,J. (2004a). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J. Biol. Chem.* *279*, 39175-39185.

Masson-Gadais,B., Houle,F., Laferriere,J., and Huot,J. (2003). Integrin alphavbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress. Chaperones.* *8*, 37-52.

Mimnaugh,E.G., Worland,P.J., Whitesell,L., and Neckers,L.M. (1995). Possible role for serine/threonine phosphorylation in the regulation of the heteroprotein complex between the hsp90 stress protein and the pp60v-src tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* *270*, 28654-28659.

- Nemoto,T., Sato,N., Iwanari,H., Yamashita,H., and Takagi,T. (1997). Domain structures and immunogenic regions of the 90-kDa heat-shock protein (HSP90). Probing with a library of anti-HSP90 monoclonal antibodies and limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* 272, 26179-26187.
- Ogiso,H., Kagi,N., Matsumoto,E., Nishimoto,M., Arai,R., Shirouzu,M., Mimura,J., Fujii-Kuriyama,Y., and Yokoyama,S. (2004). Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. *Biochemistry* 43, 15510-15519.
- Rousseau,S., Houle,F., Kotanides,H., Witte,L., Waltenberger,J., Landry,J., and Huot,J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 275, 10661-10672.
- Rousseau,S., Houle,F., Landry,J., and Huot,J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169-2177.
- Rush,J., Moritz,A., Lee,K.A., Guo,A., Goss,V.L., Spek,E.J., Zhang,H., Zha,X.M., Polakiewicz,R.D., and Comb,M.J. (2005). Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotechnol.* 23, 94-101.
- Sato,S., Fujita,N., and Tsuruo,T. (2000b). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10832-10837.
- Sato,S., Fujita,N., and Tsuruo,T. (2000a). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10832-10837.
- Schulte,T.W., Blagosklonny,M.V., Ingui,C., and Neckers,L. (1995). Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J. Biol. Chem.* 270, 24585-24588.
- Scroggins,B.T. *et al.* (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol. Cell* 25, 151-159.
- Sessa,W.C., Garcia-Cardena,G., Liu,J., Keh,A., Pollock,J.S., Bradley,J., Thiru,S., Braverman,I.M., and Desai,K.M. (1995). The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 270, 17641-17644.
- Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., and Schuh,A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.

Sun, J. and Liao, J.K. (2004). Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2238-2244.

Takahashi, S. and Mendelsohn, M.E. (2003). Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem.* 278, 30821-30827.

Takahashi, T. and Shibuya, M. (1997). The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 14, 2079-2089.

Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20, 2768-2778.

Urbe, S., Mills, I.G., Stenmark, H., Kitamura, N., and Clague, M.J. (2000). Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol. Cell Biol.* 20, 7685-7692.

Venema, V.J., Marrero, M.B., and Venema, R.C. (1996). Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 703-710.

Weis, S., Cui, J., Barnes, L., and Cheresh, D. (2004). Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J. Cell Biol.* 167, 223-229.

Whitesell, L. and Lindquist, S.L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 761-772.

Xu, W., Mimnaugh, E., Rosser, M.F., Nicchitta, C., Marcu, M., Yarden, Y., and Neckers, L. (2001). Sensitivity of mature ErbB2 to geldanamycin is conferred by its kinase domain and is mediated by the chaperone protein Hsp90. *J. Biol. Chem.* 276, 3702-3708.

Xu, Y. and Lindquist, S. (1993). Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7074-7078.

Xu, Y., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1999a). Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 109-114.

Xu, Y., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1999b). Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 109-114.

Zhao, Y.G., Gilmore, R., Leone, G., Coffey, M.C., Weber, B., and Lee, P.W. (2001). Hsp90 phosphorylation is linked to its chaperoning function. Assembly of the reovirus cell attachment protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 32822-32827.

4.8 FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 is required for Akt activation and NO release. (A) K44A-dynamin inhibits VEGFR-2 internalization. HUVEC infected with adenoviruses coding for β -galactosidase (Ad- β -gal) or HA-K44A-dynamin (Ad-HA-K44A-dyn) were serum starved and stimulated with VEGF (40 ng/ml, 30 min.). The cell surface expression of VEGFR-2 was analyzed by FACS. Inset: Cells were lysed and HA-K44A-dyn expression was monitored by Western blot (wb) against HA. (B) K44A-dynamin expression in endothelial cells inhibits Akt activation. Adenoviruses infected BAEC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for the indicated time. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using the indicated antibodies (C) K44A-dynamin inhibits VEGFR-2-stimulated NO release. COS-7 cells were transfected with VEGFR-2, eNOS, HA-dynamin (HA-dyn) and HA-K44A-dynamin (HA-K44A-dyn) as indicated. 48 hours after transfection, cell culture medium was processed for the measurement of NO. * $P < 0.05$ vs. cells expressing HA-dyn, ANOVA followed by Bonferroni.

Figure 2. VEGF induces tyrosine phosphorylation of HSP90 β . (A) COS-7 cells were co-transfected with VEGFR-2, eGFP, as a control, HA-dynamin (HA-dyn) and HA-K44A-dynamin (HA-K44A-dyn) expression vectors as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with an anti-VEGFR-2 antibody and western blotted (wb) using anti-phosphotyrosine antibodies (p-Tyr). Equal protein expression was determined by Western blotting the total cell lysates (TCL). (B)

VEGFR-2 internalization is necessary for HSP90 phosphorylation. VEGFR-2 immunoprecipitate from COS-7 cells, co-transfected as in (A), were separated by SDS-PAGE and proteins detected by silver staining. The unique ≈ 85 kDa protein present in the VEGFR-2 transfected cells (arrow) was cut, subjected to LC/MS/MS analysis and identified as HSP90 β . (C) VEGFR-2 stimulates tyrosine phosphorylation of HSP90 β . HA-HSP90 β immunoprecipitation was done in COS-7 cell lysates using and levels of tyrosine phosphorylation detected by anti-p-Tyr Western blotting. (D) VEGF stimulation of endothelial cells induces tyrosine phosphorylation of HSP90. BAEC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for the indicated time and HSP90 was immunoprecipitated from the cell extracts and western blotted using anti-p-Tyr.

Figure 3. VEGFR-2 internalization is required for tyrosine phosphorylation of HSP90. (A) Lysates from transfected COS-7 cells were immunoprecipitated (IP) using anti-VEGFR-2 or anti-HSP90 antibodies. Tyrosine phosphorylation levels of HSP90 were monitored by anti-p-Tyr immunodetection and HSP90 association to the VEGFR-2 was revealed by anti-HSP90 Western blotting (wb) on the VEGFR-2 immunoprecipitate. Anti-HA antibodies were used to control for dynamin expression in total cell lysates (TCL). (B) BAEC were infected with adenoviruses coding for HA-K44A-dynamin (HA-K44A-dyn) or β -gal. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml, 15 min). Cell lysates were immunoprecipitated for HSP90 and tyrosine phosphorylation level of HSP90 was detected with anti-phosphotyrosine antibody (p-Tyr). (C) Geldanamycin (GA)

inhibits VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90. HUVEC were pretreated with GA and stimulated with VEGF. Tyrosine phosphorylation levels of HSP90 immunoprecipitates were monitored by western blot (wb) using anti-p-Tyr antibodies.

Figure 4. c-Src mediates the VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90. (A) c-Src expression induces tyrosine phosphorylation of HSP90 β . COS-7 cells were transfected as indicated and cell extracts were immunoprecipitated (IP) using anti-HA. HA-HSP90 β tyrosine phosphorylation was determined by Western blotting using anti-p-Tyr. (B) c-Src phosphorylates HSP90 *in vitro*. Purified HSP90 was incubated with recombinant c-Src in presence or absence of ATP. The kinase reaction was then immunoblotted with anti-p-Tyr, anti-HSP90 or anti-c-Src antibodies. (C) Src activity is necessary for VEGFR-2 stimulated phosphorylation of HSP90 β . COS-7 cells were transfected with HA-HSP90 β , VEGFR-2 and K298R-Src. Lysates were immunoprecipitated with anti-HA or anti-VEGFR-2 antibodies and immunoblotted with anti-p-Tyr or anti-HA. (D) c-Src activity is necessary for VEGF-stimulated phosphorylation of HSP90 in endothelial cells. BAEC were transiently transfected with K298R-Src expressing vector. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml, 15min.) and cell lysates were immunoprecipitated using anti-HSP90 antibody and immunoblotted using anti-p-Tyr.

Figure 5. Phosphorylation of Y300 of HSP90 β by c-Src mediates VEGFR-2-

stimulated NO release. (A) COS-7 cells were transfected with c-Src, wild-type, Y300F or Y483F-Myc-HSP90 β , as indicated. Myc-HSP90 β immunoprecipitates were western blotted (wb) with an anti-p-Tyr and anti-Myc antibodies. (B) Expression of Y300F inhibits the association of HSP90 and eNOS. VEGFR-2, eNOS, myc-WT-HSP90 β and myc-Y300F-HSP90 β were expressed in COS-7 cells as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated using anti-myc or anti-eNOS antibodies. Antibodies against myc or eNOS were used to detect protein association. (C) Mutation of Y300 does not affect the binding of HSP90 to VEGFR-2. COS-7 cells were transfected with VEGFR-2, myc-WT-HSP90 β and myc-Y300F-HSP90 β . Cell extracts were immunoprecipitated using antibodies against VEGFR-2. The associated proteins were monitored by Western blotting (wb) using anti-VEGFR-2 and anti-myc antibodies. Total cell lysates (TCL). (D) Phosphorylation of Y300 of HSP90 is required for the VEGFR-2-mediated NO release. COS-7 cells were transfected with VEGFR-2, eNOS, myc-WT-HSP90 β and myc-Y300F-HSP90 β . Cell culture medium was processed for NO measurement. * $P < 0.05$, ANOVA followed by Bonferroni. (E) Reduced VEGF-stimulated association of Y300F-HSP90 and eNOS in endothelial cells. BAEC were transfected with myc-WT-HSP90 β and myc-Y300F-HSP90 β . Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml) and Myc immunoprecipitates were blotted with an anti eNOS and anti-myc antibodies.

4.9 Figures and supplementary information

Fig. 1

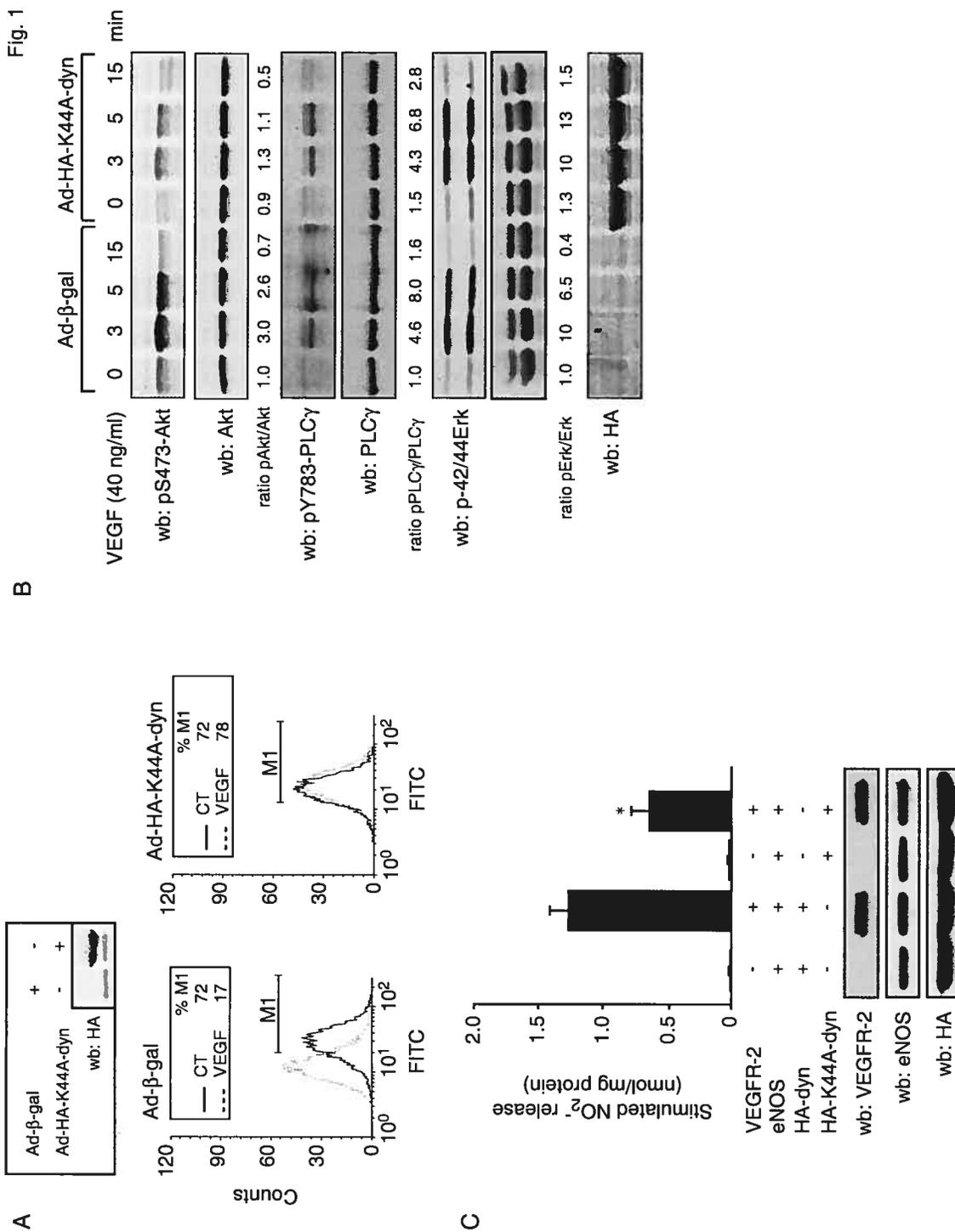


Fig. 2

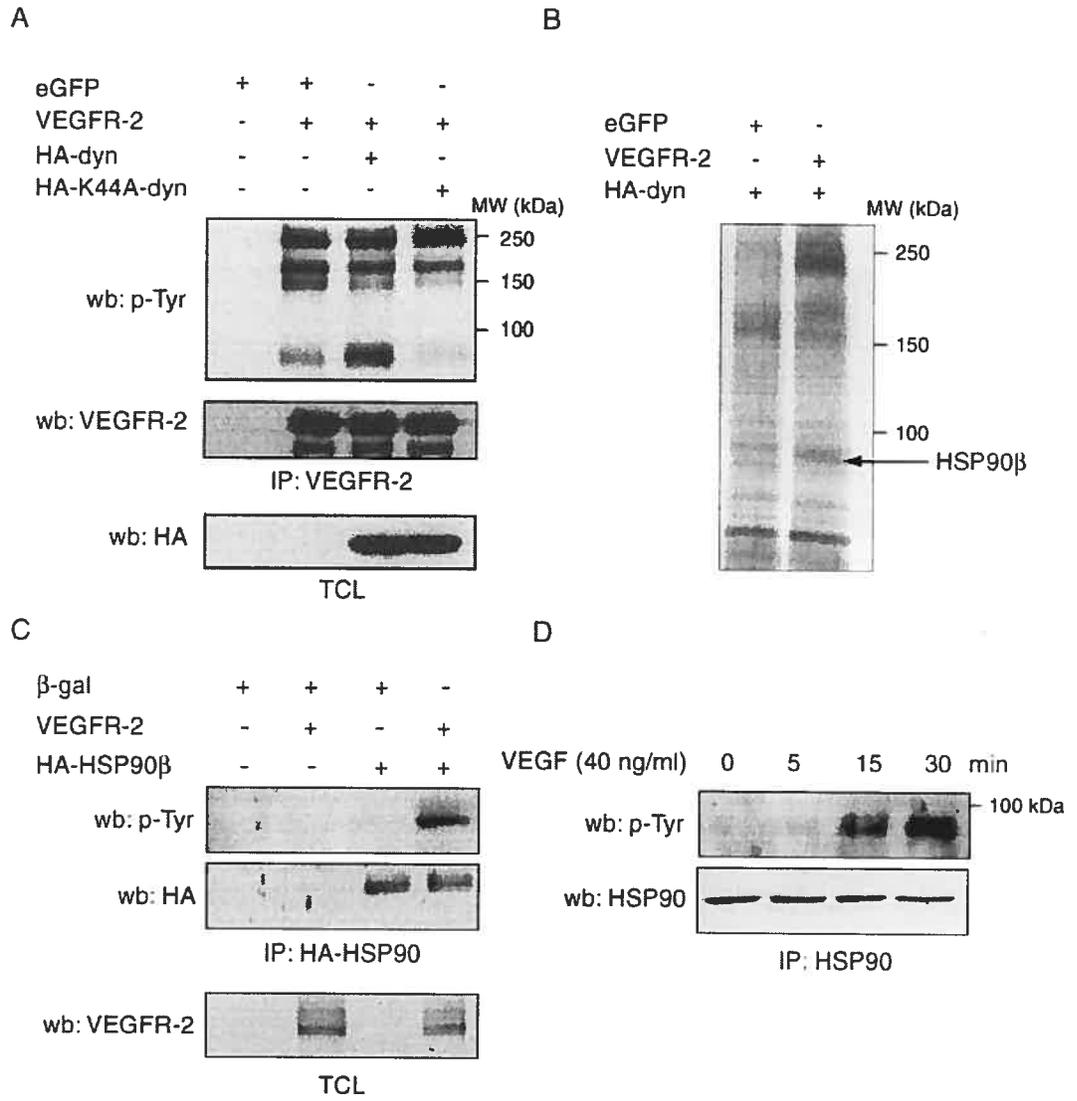


Fig. 3

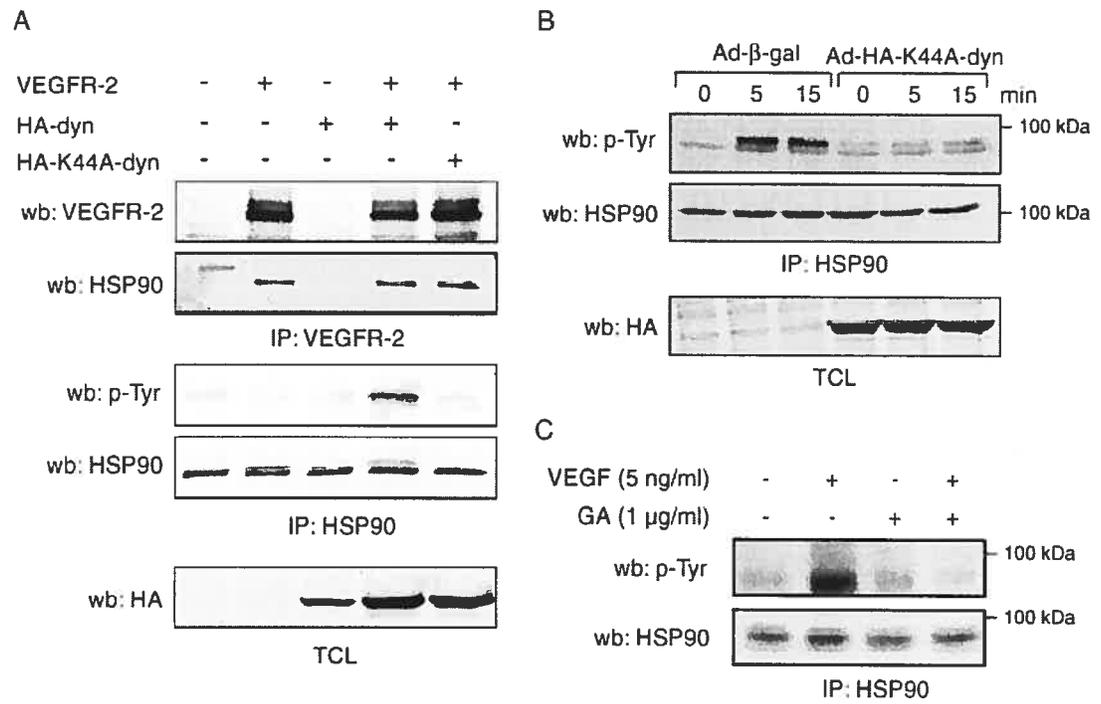


Fig. 4

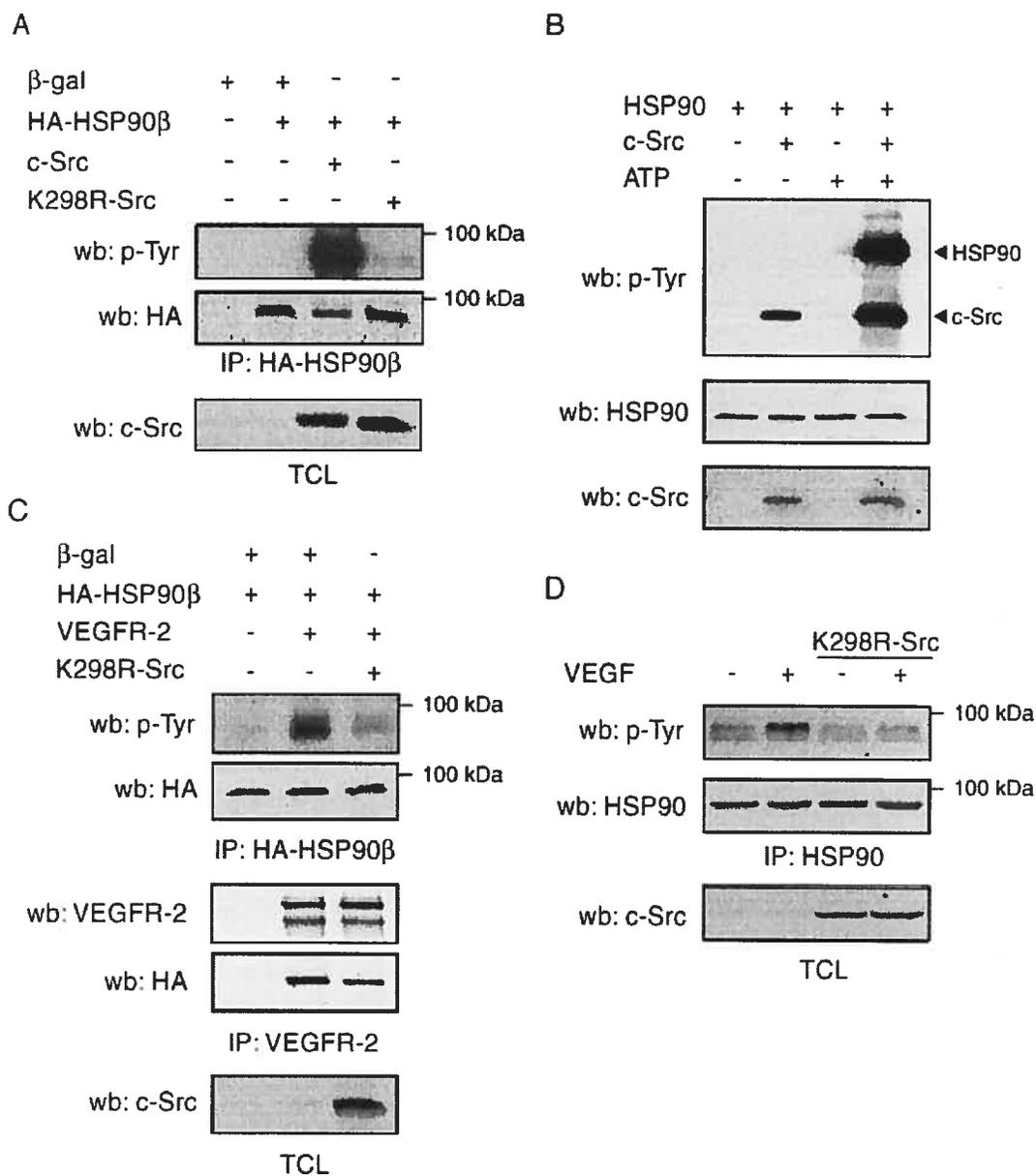
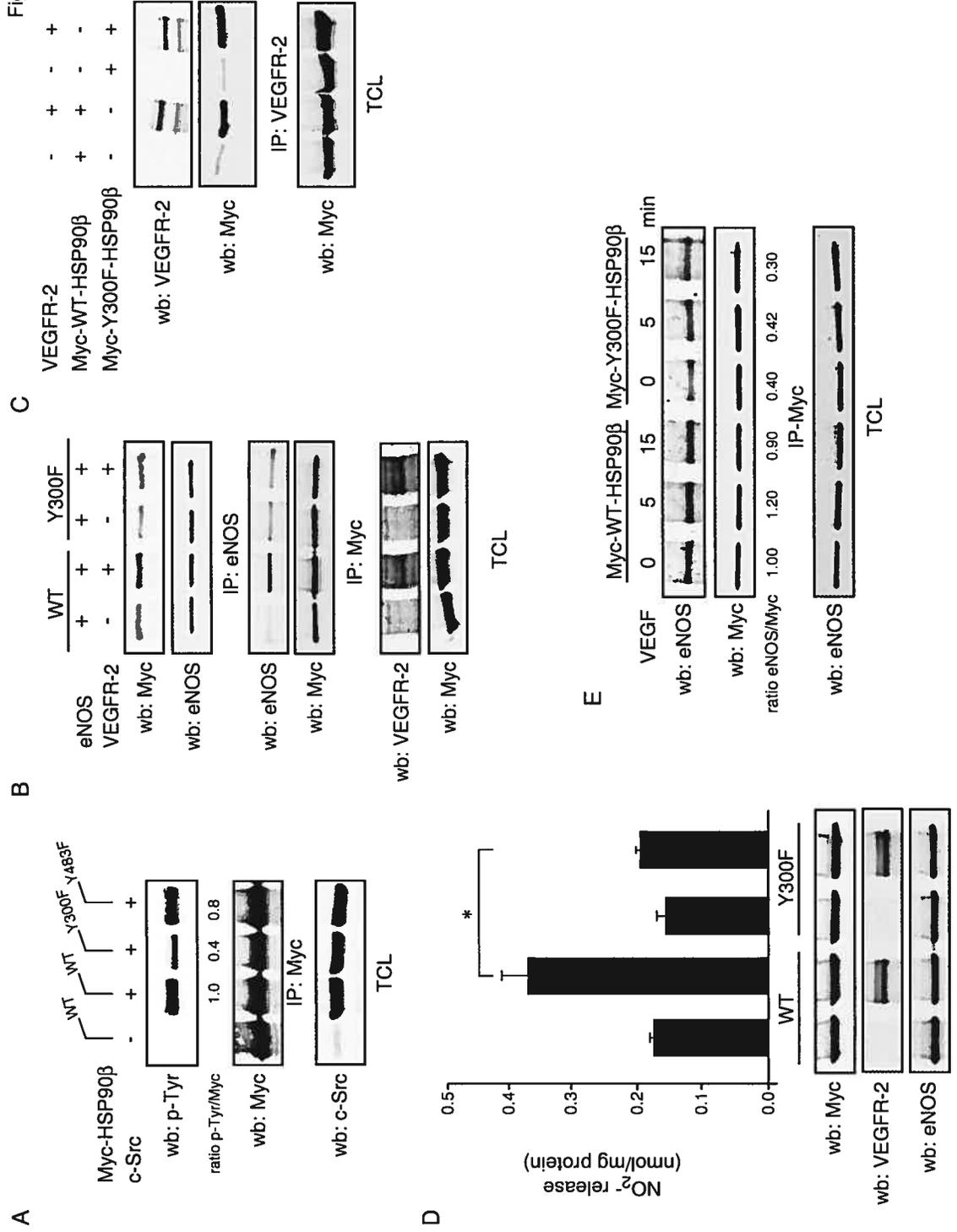


Fig. 5



SUPPLEMENTAL MATERIAL

Peptide sequence	Residues in HSP90 β	Mascot score
IDIIPNPQER	72-81	19
ADLNNLGTIK	95-106	38
ADHGEPGR	168-176	13
YIDQEELNK	275-285	45
GVVDSIDLPLNISR	378-391	81
EQVANSFVER	491-501	31
HLEINPDHPIVETLR	624-648	18

Supplementary Table 1. MS/MS results of the proteolytic digestion

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. Expression of HA-K44A-dynamin inhibits VEGFR-2 internalization.

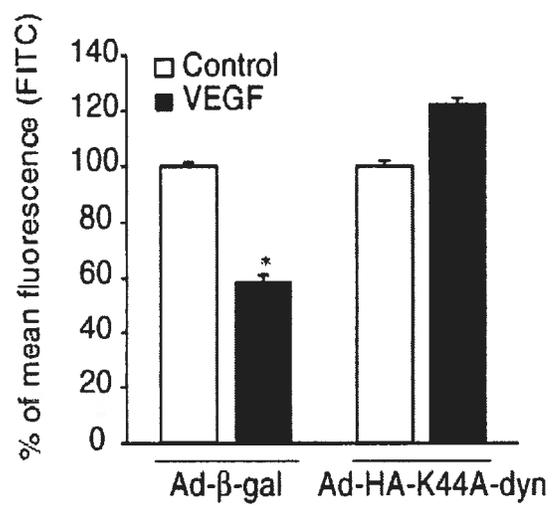
% of mean fluorescence (FITC) comparison between cells expressing β -gal and HA-K44A-dyn, before and after VEGF treatment. * $P < 0.05$ vs control cells, ANOVA followed by Bonferroni.

Supplementary Figure 2. Calcium-dependent, PI-3 kinase and Akt stimulated NO release are not affected by K44A-dynamin expression. (A) Calcium ionophore-stimulated NO production is not affected by K44A-dynamin expression. COS-7 cells were transfected with eNOS, HA-tagged WT- and K44A-dynamin. Serum starved cells were incubated with ionomycin ($3 \mu\text{M}$, 30 min). Cell culture media were collected for NO analysis. (B) K44A-dynamin does not influence PI-3 kinase and Akt stimulated NO production. COS-7 cells were transiently transfected with eNOS expression plasmid in presence of HA-WT- or HA-K44A-dynamin. In some cases, eNOS was activated by co-transfection with Akt or the constitutively active form of PI-3 kinase, p110-myr. 48 hours post-transfection, cell culture media were collected for the measurement of NO. Anti-VEGFR-2, anti-eNOS and anti-HA antibodies were used to control for equal transfection levels. wb: Western blot.

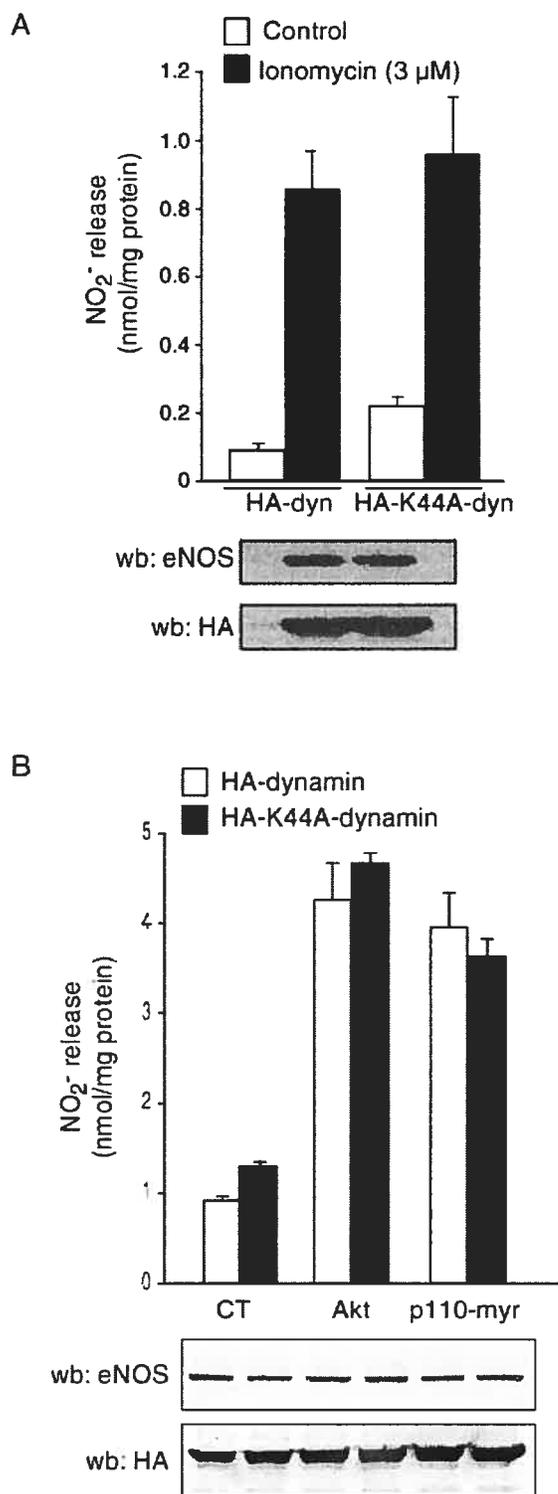
Supplementary Figure 3. HSP90 β is phosphorylated on Tyr300 by c-Src. Following the Src kinase reaction, tryptic peptides of HSP90 β were fractionated by anti-phosphotyrosine immunoprecipitation and analyzed by LC-MS/MS. The

product ion spectrum of the precursor at m/z 964.89 (2+) identified Tyr300 of HSP90 β as being phosphorylated.

Supplementary Figure 1

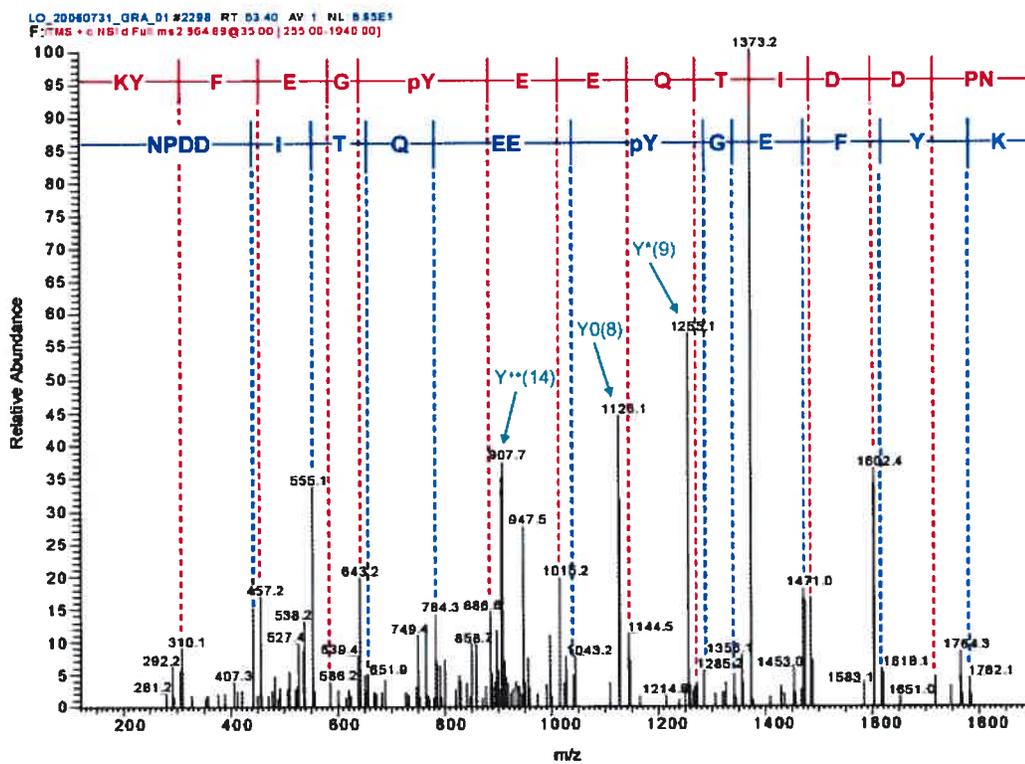


Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3

Peptide sequence: NPDDIQEEpYGEFYK, mass: 1926.7550 (error: 0.5 ppm)
Mascot peptide score: 64, Mascot expect value: 2.8e-06 (Protein score: 618)



CHAPITRE 5

DISCUSSION

Nos résultats établissent que le VEGFR-2 est négativement régulé suite à son activation par le VEGF. Nous avons identifié l'ubiquitine ligase c-Cbl comme étant responsable de ce contrôle négatif de l'activité du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales. Nos résultats dévoilent aussi qu'une stimulation au VEGF des cellules endothéliales provoque l'internalisation du VEGFR-2. Également, nous rapportons que cette endocytose est un événement important permettant l'activation d'Akt, la phosphorylation du résidu tyrosine 300 d'HSP90 et la relâche de NO (Figure 1). Bien que la majorité des résultats furent discutés aux chapitres 2 et 4, certains sujets méritent d'être approfondis ou traités à nouveau.

5.1 Ubiquitination des RTKs par c-Cbl

L'ubiquitine ligase c-Cbl a tout d'abord été reconnue pour être responsable de la régulation à la baisse du récepteur à l'EGF. Il est maintenant connu que c-Cbl joue un rôle dans la régulation de l'activité de bien d'autres récepteurs de type tyrosine kinase. Au nombre de ceux-ci, on compte le PDGFR (Miyake et al, 1999), le récepteur au CSF-1 (Lee et al, 1999), c-Met (Taher et al, 2002), le récepteur au c-Kit (Zeng et al, 2005), Ron (Penengo et al, 2003), Ret (Scott et al, 2005), FGFR (Wong et al, 2002a), récepteur à l'insuline (IR) (Ahmed et al, 2000), récepteur aux ephrins (Walker-Daniels et al, 2002), VEGFR-1 (Kobayashi et al, 2004) et VEGFR-2 (Duval et al, 2003).

5.1.1 Ubiquitination du VEGFR-1 par c-Cbl

De façon plus détaillée, suite à la publication de notre étude sur le VEGFR-2, il a été rapporté qu'une stimulation au VEGF provoque l'autophosphorylation du VEGFR-1 et le recrutement de c-Cbl au niveau de son résidu tyrosine 1333 (Y¹³³³) (Kobayashi et al, 2004). c-Cbl peut par la suite ubiquitiner ce récepteur. L'ubiquitine ligase est aussi accompagné de la protéine CD2AP, un membre de la famille CIN85. Or, une stimulation au VEGF entraîne la formation d'un complexe comportant le VEGFR-1, c-Cbl et CD2AP dont la présence fut détectée dans des vésicules endocytiques. Cette étude rapporte également que l'expression de mutants CD2AP et c-Cbl inhibe l'internalisation et l'ubiquitination du VEGFR-1 stimulées par le VEGF. Par conséquent, cette équipe suggère que la liaison de c-Cbl/CD2AP au VEGFR-1, suite à un traitement au VEGF, est grandement impliquée dans les processus d'endocytose et de dégradation du récepteur.

5.1.2 Ubiquitination du VEGFR-2 par c-Cbl

Nos résultats montrent que tout comme le VEGFR-1, le VEGFR-2 est ubiquitinilé par l'ubiquitine ligase c-Cbl suite à une stimulation au VEGF. Une autre équipe (Singh et al, 2005) a aussi démontré que le VEGFR-2 est ubiquitinilé suite à son activation, sans toutefois avoir identifié l'ubiquitine ligase responsable de cette ubiquitination. Ce groupe a tout de même proposé l'implication de PKC atypiques dans la régulation à la baisse du VEGFR-2. De notre côté, nous fûmes en mesure de faire la preuve de l'implication de c-Cbl dans l'ubiquitination du VEGFR-2 de plusieurs façons. Premièrement, par la surexpression de c-Cbl dans

les cellules COS-7 co-transfectées au VEGFR-2 et au HA-ubiquitine. Deuxièmement, par l'expression du mutant 70Z/3-Cbl tant dans les cellules COS-7 que dans les cellules endothéliales infectées, qui contrecarre l'activité ubiquitine ligase de c-Cbl sur le VEGFR-2. Ces expérimentations nous ont permis d'établir qu'une stimulation au VEGF incite c-Cbl à s'associer au VEGFR-2 et à promouvoir son ubiquitination grâce à son domaine « RING » finger.

Nous croyons que cette modification post-traductionnelle cible le récepteur pour le conduire au protéasome S26 pour être dégradé. En effet, nos résultats d'immunofluorescence montrent une co-localisation de c-Cbl et de VEGFR-2 dans des compartiments endocytiques suite à une stimulation au VEGF. En plus, un traitement des cellules endothéliales avec un inhibiteur du protéasome (MG 132) bloque la dégradation du VEGFR-2 qui dépend du VEGF (résultats non présentés). Ceci fut également rapporté par un autre groupe de recherche (Murdaca et al, 2004). Ce groupe fait aussi la preuve de l'implication de l'ubiquitine ligase à domaine HECT, Nedd4 dans le mécanisme menant à la dégradation du VEGFR-2 sans toutefois qu'elle soit en mesure d'ubiquitiner le récepteur. En plus, cette étude établie que la protéine adaptatrice Grb10 agit comme régulateur positif de la signalisation du VEGFR-2 en le protégeant contre la dégradation par sa capacité à interagir avec Nedd4 (Murdaca et al, 2004).

La poly-ubiquitination est connue pour diriger les RTKs ciblés vers le protéasome. Or, nous avons détecté la présence d'ubiquitines sous forme de traînée de haut poids moléculaire dans nos immunoprécipités de VEGFR-2, suggérant que le récepteur devient poly-ubiquitinilé suite à une stimulation au

VEGF. Ces données renforcent donc notre présomption initiale rapportant qu'une stimulation au VEGF conduit à la dégradation protéosomale du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales.

L'usage d'anticorps spécifiques pour la détection de la poly-ubiquitination a toutefois échoué pour certains RTKs suggérant que ces récepteurs soient plutôt multi-ubiquitinilés par c-Cbl (Haglund et al, 2003). Il est donc possible que le VEGFR-2 subisse une multi-ubiquitination régie par c-Cbl mais ceci reste à être démontré.

Par sa structure, c-Cbl est en mesure de lier plusieurs types de protéines. Bien que nos résultats montrent que c-Cbl semble être directement associé au VEGFR-2, il est aussi possible que c-Cbl puisse faire son action en s'associant à une protéine adaptatrice, comme c'est le cas pour l'EGFR où le complexe EGFR/Grb2/c-Cbl fut rapporté (Waterman et al, 2002). c-Cbl est aussi connu pour lier la protéine c-Src. Des résultats préliminaires nous ont permis de constater que la protéine c-Src est impliquée dans le processus d'ubiquitination du VEGFR-2 dirigé par c-Cbl. En effet, l'expression d'un dominant négative c-Src inhibe ce mécanisme (résultats non présentés). Par contre, nous sommes dans l'impossibilité de dévoiler si c-Src joue ici un rôle en tant qu'adaptateur entre le VEGFR-2 et c-Cbl ou bien à titre de kinase permettant l'activation c-Cbl. Nos observations sont toutefois en accord avec une étude antérieure rapportant que l'ubiquitination du récepteur à l'EGF est bloquée par un inhibiteur de la kinase Src, PP1 (Kassenbrock et al, 2002).

5.2 Régulation négative du VEGFR-2 par c-Cbl

Nos résultats établissent le rôle de c-Cbl en tant que régulateur négatif de l'activation du VEGFR-2. En premier lieu, notre étude montre une baisse des niveaux du VEGFR-2 suite à une stimulation au VEGF dans les cellules endothéliales. Cet effet est encore plus marquant lorsque l'on surexprime c-Cbl dans ces cellules (Figure 5B, Chapitre 2). Par surcroît, l'expression du mutant 70Z/3-Cbl bloque la dégradation du VEGFR-2 induite par le VEGF (Figure 1, Chapitre 3). Or, ces données révèlent que c-Cbl régule à la baisse les niveaux du récepteur-2 du VEGF grâce à son activité ubiquitine ligase.

La signalisation endothéliale du VEGFR-2 se voit par conséquent aussi affectée par l'action de c-Cbl. En effet, l'activation des voies de signalisation sensibles au VEGF est plus importante dans les cellules infectées à l'adénovirus HA-70Z/3-Cbl comparativement aux cellules témoins. Cet effet est observable en fonction du temps de stimulation et de la concentration de VEGF employée. Il serait tout de même intéressant d'étudier les conséquences sur la signalisation endothéliale, d'une stimulation avec un facteur de croissance agissant sur un autre RTK que le VEGFR-2 dans les cellules exprimant le mutant 70Z/3-Cbl. De cette manière, la spécificité de ces effets qui dépendent du VEGF, jusqu'à preuve du contraire, pourrait être mise à jour.

La relâche du monoxyde d'azote par les cellules endothéliales est un évènement clé impliqué dans divers aspects des fonctions biologiques du VEGF (Cross et al, 2003). Nous avons conséquemment évalué le rôle de c-Cbl dans la production de NO induite par l'activation du VEGFR-2. Par la co-expression de c-

Cbl, d'eNOS et de VEGFR-2 dans des cellules COS-7, nous avons constaté une baisse de la quantité de NO libérée par ces cellules lorsque comparée aux cellules transfectées avec le VEGFR-2 et eNOS seulement. Nous avons en plus observé une hausse importante des taux de NO produits par les cellules COS-7 exprimant le mutant 70Z/3-Cbl en comparaison aux cellules témoins (Figure 5A, Chapitre 2). Dans le même ordre d'idée, l'expression de HA-70Z/3-Cbl dans les cellules endothéliales cause une augmentation significative de la libération de NO suite à une stimulation au VEGF, alors qu'un traitement à l'ATP n'incite pas cet effet. Ceci démontre que l'effet d'un blocage de l'activité de c-Cbl sur la production de NO est spécifique à un traitement au VEGF.

Nos observations indiquent donc que c-Cbl régule également la libération de NO des cellules endothéliales lors d'une stimulation au VEGF.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'activité chimiotactique du VEGF. Nous avons constaté que l'expression du mutant 70Z/3-Cbl provoque une élévation de la capacité migratoire des cellules endothéliales qui dépend du VEGF. Nous avons toutefois observé une perturbation dans l'induction de la formation de fibres de stress par le VEGF dans les cellules exprimant le mutant 70Z/3-Cbl. Par contre en présence de VEGF, ces cellules sont dotées de repliements membranaires. Comme la formation de fibres de stress et de repliements membranaires requiert l'activation des protéines Rho et Rac respectivement (Fryer and Field, 2005), il serait intéressant de vérifier l'activation de ces protéines dans des cellules endothéliales infectées à l'adénovirus 70Z/3-Cbl suite à une stimulation au VEGF. Plus précisément, nous pourrions étudier

l'activation de la PI-3k étant donné son rôle dans l'activation de Rac. En effet, des travaux ont démontré l'implication de la PI-3k dans la formation de repliements membranaires qui dépend de l'activation de Rac, suite à un traitement à un facteur de croissance (Hawkins et al, 1995; Nobes et al, 1995; Wennstrom et al, 1994). Selon nos résultats, il semble que l'inhibition de la dégradation du VEGFR-2 entraîne une augmentation de la voie PI-3k-Rac qui se traduit par la formation de repliements membranaires lors d'une stimulation au VEGF. Il nous apparaît donc possible que l'activation de cette voie soit augmentée dans les cellules exprimant le mutant 70Z/3-Cbl. Avec ces nouvelles informations, nous pourrions déterminer si c-Cbl peut également agir comme régulateur négatif de l'activation de petites GTPases Rho et Rac induite par le VEGF.

5.3 Internalisation du VEGFR-2

Tel que mentionné auparavant, l'internalisation des RTKs ne sert pas seulement à inhiber mais aussi à avantager certains signaux intracellulaires. En effet, plusieurs récepteurs maintiennent leur activité signalitique au sein des compartiments intracellulaires tels que l'EGFR, le PDGF et les récepteurs au NGF (Oksvold et al, 2001; Sorkin et al, 1993; Howe et al, 2001). Grâce aux méthodes d'immunofluorescence et de fractionation cellulaire, ces équipes ont été en mesure de détecter la présence de récepteurs actifs, des protéines adaptatrices ainsi que des kinases toujours actives telles qu'Erk 1 et 2 au sein de compartiments endosomaux. Or, ce nouveau concept a intrigué plus d'une équipe de recherche, dont la nôtre. C'est en 1999 qu'il fut démontré pour la première fois qu'un

traitement au VEGF occasionne l'internalisation du VEGFR-2 possédant une activité kinase intacte (Dougher and Terman, 1999). Nos résultats supportent cette observation et nous permettent d'ajouter que le VEGFR-2 internalise selon un mécanisme qui requiert l'activité de la dynamine. En effet, l'expression d'un dominant négatif de la dynamine (K44A) bloque l'internalisation du VEGFR-2 induite par le VEGF (Figure 1A, Chapitre 4). Comme la dynamine est impliquée dans le détachement de la membrane plasmique des vésicules endocytiques formées par les clathrines ou les cavéoles (Henley et al, 1998; Oh et al, 1998), il nous est impossible de révéler par quelles voies endocytiques l'internalisation du VEGFR-2 a lieu. On retrouve par ailleurs une controverse à ce sujet dans la littérature. Certains groupes de recherches ont démontré une absence du VEGFR-2 dans les vésicules couvertes de clathrines mais un enrichissement significatif de ce dernier dans les cavéoles ainsi qu'une association du récepteur à la cavéoline-1 (Feng et al, 2000; Labrecque et al, 2003). Une autre étude a aussi rapporté la présence de la protéine ARF6 au niveau des cavéoles. ARF6 est un membre de la famille Ras des petites GTPases qui est entre autre impliquée dans les déplacements membranaires. Or, ce travail suggère que ARF6 pourrait agir positivement sur l'activité du VEGFR-2 en aidant à la dissociation de la cavéoline-1 au récepteur, permettant ainsi au VEGFR-2 d'internaliser via la voie des cavéoles (Ikeda et al, 2005).

Par opposition, il fut rapporté qu'une stimulation au VEGF entraîne une co-localisation marquée du VEGFR-2 avec le EEA-1 (un marqueur des endosomes précoces) mais une très faible co-localisation avec la cavéoline-1. Ce

groupe a par conséquent proposé que le VEGFR-2 internalise de façon préférentielle via la voie des clathrines. Afin de contrôler leur hypothèse, cette équipe a utilisé la méthode de siRNA contre les chaînes lourdes de clathrines dans des cellules endothéliales. Leurs résultats montrent un blocage de l'endocytose du VEGFR-2 et de sa signalisation alors qu'un traitement interférant avec les cavéoles, n'occasionne pas d'effet sur l'internalisation du récepteur (Lampugnani et al, 2006). Une étude récente dévoila des informations supplémentaires concernant les mouvements intracellulaires du VEGFR-2 induits par le VEGF. Cette étude rapporte en fait que le VEGFR-2 actif et ubiquitinilé co-localise avec le complexe endosomal HRS/STAM « hepatocyte growth factor-related tyrosine kinase substrate/signal-transducing adaptor molecule » qui est connu pour diriger les récepteurs actifs et ubiquinilés vers des compartiments de dégradation. De plus en utilisant le tyrphostin A23, un inhibiteur de l'endocytose par la voie des clathrines, cette équipe observa une accumulation au niveau de la membrane du VEGFR-2. Pour cette raison, ce groupe suggère en plus que l'internalisation du VEGFR-2 suite à un traitement au VEGF, s'exécute principalement par la voie des clathrines (Ewan et al, 2006).

Nos données rapportent également que l'ubiquitination du VEGFR-2 par c-Cbl conduit à l'internalisation du récepteur dans le but d'être dégradé. Il fut démontré que c-Cbl possède comme partenaire de liaison la protéine CIN85 et que cette association permet à c-Cbl de conduire sa cible, comme l'EGFR dans les vésicules couvertes de clathrines d'où il sera internalisé (Soubeyran et al, 2002). La formation d'un complexe VEGFR-2/Cbl/CIN85, qui dépend du VEGF, n'a

jamais été établie. Néanmoins, l'exploration de ce sujet pourrait toujours apporter de nouvelles informations nous permettant d'établir par quelle route endocytaire le VEGFR-2 est principalement internalisé suite à un traitement au VEGF. En plus, il serait intéressant d'étudier le mécanisme endocytaire du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales infectées à l'Ad-HA-70Z/3-Cbl. À première vue, il semblerait que l'internalisation du récepteur ne soit pas affectée par son manque d'ubiquitination étant donné que la réponse au VEGF est plus importante dans ces cellules, notamment pour Akt. Ces résultats vont donc dans la même direction que nos données rapportant que l'activation d'Akt requiert l'internalisation du VEGFR-2. Aussi, étant donné que la dégradation du VEGFR-2 est bloquée dans les cellules endothéliales exprimant le mutant 70Z/3-Cbl, il ne serait pas étonnant que le récepteur soit maintenu actif plus longtemps dans les endosomes ou encore que son recyclage à la membrane soit favorisé. Ceci pourrait donner une explication à l'amplification de la réponse au VEGF observée dans de telles conditions.

Donc il semble que selon les conditions expérimentales employées, le VEGFR-2 est en mesure d'internaliser par une ou l'autre des voies endocytiques. Un point fait toutefois l'unanimité entre ces études, c'est-à-dire que l'internalisation du VEGFR-2 induite par le VEGF est requise pour l'intégralité de son activité.

Nos résultats vont également dans la même direction. Tel que mentionné ci-haut, nous avons démontré en exprimant le dominant négatif de la dynamine que le VEGFR-2 doit internaliser pour activer la kinase Akt. Dans ces conditions,

l'incapacité du VEGFR-2 à activer Akt est accompagnée d'une baisse de la production de NO et de la phosphorylation en tyrosine de la chaperone HSP90. Ces résultats viennent donc renforcer le nouveau concept suggérant que l'internalisation des RTKs activés assure la bonne finalité de l'action biologique initiée, en modulant l'intensité et la durée du signal.

La phosphorylation de la Y³⁰⁰ d'HSP90 par la kinase Src en est un bon exemple. Il est connu que l'association d'HSP90 à eNOS permet une libération plus efficace de NO (Garcia-Cardena et al, 1998). Bien qu'il fut antérieurement rapporté qu'HSP90 pouvait être phosphorylée en tyrosine (Harris et al, 2000), aucun rôle ne fut attribué à cette modification post-traductionnelle pouvant expliquer ce phénomène. Or, nos résultats révèlent que la phosphorylation du résidu Y³⁰⁰ d'HSP90 dépend non seulement de l'internalisation du VEGFR-2 mais joue un rôle important dans l'association d'HSP90 à eNOS et par corrélation sur la production du monoxyde d'azote.

La chaperone HSP90 est responsable du bon repliement et de la stabilité de ses protéines dites clientes. L'association de ces protéines à la chaperone est régulée par l'activité ATPasique du domaine N-terminal d'HSP90. HSP90 est requis pour l'activité de plusieurs régulateurs de l'apoptose suggérant ainsi que cette association pourrait avantager la survie des cellules tumorales (Fortugno et al, 2003; Lewis et al, 2000; Sato et al, 2000; Schulte et al, 1995; Pandey et al, 2000; Zhao and Wang, 2004). De plus, il fut rapporté que les niveaux d'expression des protéines de choc thermique sont à la hausse dans certains cas de cancers. Ces constatations menèrent au développement d'inhibiteurs de l'activité d'HSP90. Les

ansamycines tels que le 17 AAG et la geldanamycine inhibent les fonctions de chaperone d'HSP90 en liant son site ATPasique (Roe et al, 1999). Ceci a pour effet d'altérer le processus de maturation des protéines clientes d'HSP90 qui seront par la suite ubiquitinilées et dégradées par le protéasome. Par conséquent, l'utilisation de ces inhibiteurs comme agent anti-cancéreux est présentement à l'étude en phases cliniques I et II (Chiosis et al, 2004).

Le facteur HIF-1 α est un important modulateur de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Il fut démontré que le facteur HIF-1 α est associé à HSP90 dans des conditions hypoxiques ce qui lui confère une certaine stabilité (Gradin et al, 1996; Isaacs et al, 2002). De façon intéressante, un traitement à la geldanamycine favorise la dégradation protéosomale du facteur HIF-1 α et inhibe l'activité angiogénique de l'hypoxie. Or, un traitement aux ansamycines pourrait avoir des effets bénéfiques chez les patients atteints d'un cancer en agissant également comme agent antiangiogénique.

Par conséquent, il serait bon d'évaluer le rôle de la phosphorylation de la Y³⁰⁰ dans d'autres activités qui dépendent du VEGF, menant au processus angiogénique. Ces informations pourraient renforcer les données récemment rapportées voulant que l'inhibiteur d'HSP90, le 17-AAG, bloque les propriétés angiogéniques du VEGF en interférant avec l'activité d'eNOS (Sun and Liao, 2004). Par surcroît, nos expériences utilisant le même type d'inhibiteur ont montré un blocage de la phosphorylation en tyrosine et du recrutement d'HSP90 au VEGFR-2 suite à une stimulation au VEGF des cellules endothéliales prétraitées à la geldanamycine. L'internalisation du récepteur n'était quant à elle pas affectée

par ce traitement (résultats non présentés). Or, ces résultats précisent que l'association d'HSP90 au récepteur n'est pas impliquée dans le processus endocytaire du VEGFR-2 et qu'un traitement au geldanamycine bloque le recrutement de la chaperone au VEGFR-2 et la phosphorylation d'HSP90 (Le Boeuf F. et al, 2004) qui se traduit ultimement par une réduction de la relâche de NO des cellules endothéliales par l'activation du VEGFR-2. Cette inhibition pourrait en partie expliquer les effets anti-angiogéniques de la geldanamycine.

5.4 c-Cbl et HSP90 collaborateurs ou adversaires?

L'ubiquitine ligase c-Cbl et la chaperone HSP90 ont quelques points en commun. Tout d'abord, ces protéines sont impliquées dans le procédé menant à l'ubiquitination et à la dégradation de protéines. En plus, nos résultats indiquent que l'activité de c-Cbl et d'HSP90 est influencée par la kinase c-Src. Effectivement, l'activité de c-Src est nécessaire à l'ubiquitination du VEGFR-2 dirigée par c-Cbl ainsi qu'à la phosphorylation du résidu Y³⁰⁰ d'HSP90 qui régule la production du monoxyde d'azote dans les cellules endothéliales. Il est à noter que c-Cbl et HSP90 ont aussi un rôle à jouer dans la régulation de c-Src. En effet, c-Cbl est responsable de l'ubiquitination de c-Src et HSP90 est nécessaire à sa maturation (Yokouchi et al, 2001b; Xu et al, 1999). c-Src est aussi responsable de la phosphorylation du résidu tyrosine 731 de c-Cbl qui est semble-t-il importante pour l'interaction c-Cbl/PI-3k qui mène à l'activation d'Akt (Kassenbrock et al, 2002; Wang et al, 2004; Miao et al, 2002). Une étude a tenté de démontrer l'interaction entre c-Cbl, c-Src et HSP90. Celle-ci rapporte qu'un traitement à la

geldanamycine provoque une dissociation de c-Src et d'HSP90 mais qu'au lieu d'être dégradée, la kinase devient plus active. Ceci occasionne une hausse de la phosphorylation du résidu Y⁷³¹ de c-Cbl et par corrélation, une augmentation de l'activité d'Akt (Koga et al, 2006). L'inhibition d'HSP90 pourrait donc favoriser la survie et ou la progression tumorale. Cette étude apporte un bémol sur l'effet bénéfique d'une inhibition d'HSP90 pour une thérapie anticancéreuse.

Une autre étude a établi l'action opposée de c-Cbl et HSP90 dans des cellules cancéreuses. En fait, certains types de cellules tumorales expriment des formes mutantes du récepteur à l'EGF. Ces récepteurs mutants sont insensibles à la régulation à la baisse habituellement induite par une stimulation à l'EGF et sont constitutivement associés à c-Cbl et à HSP90. Ces mutants sont préférentiellement associés à la forme non-phosphorylée de c-Cbl et par le fait même ils ne sont ni ubiquitinilés ni recrutés par CIN85 en vue d'être internalisés par la voie des clathrines. Un traitement à la geldanamycine a permis de démontrer que l'association d'HSP90 aux récepteurs mutants stabilise leurs structures matures et empêche l'ubiquitination de ces derniers par c-Cbl (Yang et al, 2006). Ces résultats pourraient donc expliquer l'amplification de la réponse à l'EGF observée au niveau de certaines cellules cancéreuses.

Dans ce même ordre d'idées, il serait intéressant de vérifier si c-Cbl et HSP90 agissent l'une sur l'autre et de quelle manière dans notre système. Premièrement, nous pourrions évaluer si l'expression du mutant 70Z/3-Cbl affecte la phosphorylation de la Y³⁰⁰ d'HSP90 ainsi que l'activation de la kinase c-Src. Dans le cas où la phosphorylation d'HSP90 serait augmentée, ceci pourrait

apporter une nouvelle explication à la hausse de production de NO observée chez les cellules endothéliales infectées à l'Ad-HA-70Z/3-Cbl. Nous pourrions également étudier l'ubiquitination du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales exprimant le mutant Y300F d'HSP90. Une augmentation de l'ubiquitination et de la dégradation du récepteur dévoileraient que la phosphorylation du résidu Y³⁰⁰ serait en plus impliquée dans la fonction de chaperone d'HSP90. Celle-ci pouvant interférer avec l'activité de c-Cbl en augmentant la stabilité du VEGFR-2.

Or, notre étude montre que le VEGF induit l'internalisation du VEGFR-2 par un mécanisme qui requiert l'activité de la dynamine. Cette internalisation est essentielle à l'activation d'Akt, à la relâche de NO et à la phosphorylation de la Y³⁰⁰ d'HSP90. De plus, nos résultats font la preuve que la signalisation du VEGF est négativement régulée par l'ubiquitine ligase c-Cbl dans les cellules endothéliales.

Finalement, nos données apportent des informations originales nous permettant de mieux comprendre la régulation de la signalisation endothéliale du VEGF.

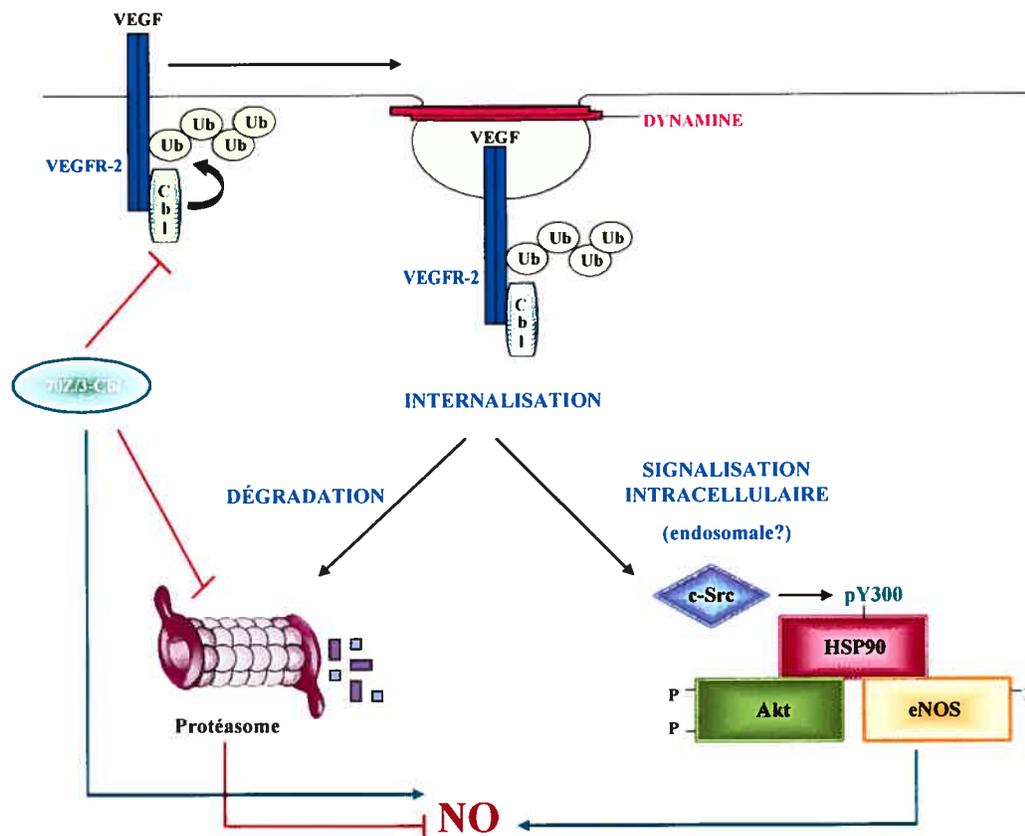


Figure 1 : Résumé schématique des résultats

Nos résultats dévoilent 2 voies distinctes de la régulation de la signalisation du VEGFR-2 au niveau des cellules endothéliales. 1) Une stimulation au VEGF entraîne l'ubiquitination du VEGFR-2 par l'ubiquitine ligase c-Cbl. Une fois internalisé, le récepteur ubiquitinilé peut être conduit vers la voie de dégradation protéasomale et ainsi participer à la terminaison de la signalisation intracellulaire du VEGFR-2. 2) L'endocytose du VEGFR-2 permet aussi l'induction de signaux intracellulaires spécifiques menant à l'activation d'Akt, à la phosphorylation, via c-Src, d'HSP90 recruté au récepteur et à la relâche de NO. L'expression du mutant 70Z/3-Cbl contrecarre l'action de c-Cbl ce qui entraîne une augmentation de la réponse au VEGF.

CHAPITRE 6

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le VEGF est une cytokine multifonctionnelle essentielle au développement du réseau vasculaire. L'activation du VEGFR-2 est responsable de la majorité des effets biologiques du VEGF au niveau des cellules endothéliales. Or, plusieurs études ont mené à la découverte des éléments réceptoriels nécessaires à l'activation du VEGFR-2 mais très peu d'informations sont connues concernant les mécanismes intracellulaires qui contrôlent la réponse au VEGF.

Les objectifs de cette thèse étaient donc de découvrir quels sont les mécanismes qui régulent négativement l'activité du VEGFR-2 et de déterminer quelles sont les conséquences de cette régulation sur la signalisation endothéliale du VEGF.

Donc, nos résultats ont dévoilé qu'un traitement au VEGF entraîne l'ubiquitination, l'internalisation et la dégradation du VEGFR-2. L'ubiquitination menant à la dégradation du récepteur est initié par l'association de l'ubiquitine ligase c-Cbl au récepteur qui grâce à son domaine « RING » finger, distribue des ubiquitine sur le récepteur activé. Ces deux mécanismes réduisent donc les niveaux d'expression du VEGFR-2 et par corrélation, interfèrent dans l'activité intracellulaire de celui-ci. L'internalisation du VEGFR-2 est un évènement essentiel à l'activation spécifique de la kinase Akt. Nos données indiquent que l'internalisation du VEGFR-2 permet une fine mise au point de la signalisation du VEGF par la phosphorylation de la Y³⁰⁰ d'HSP90, via c-Src, qui est importante pour l'association de la chaperone à eNOS et conséquemment pour la relâche de NO par les cellules endothéliales.

À la lumière de nos observations, il serait intéressant de poursuivre notre étude du processus angiogénique induit par le VEGF en étudiant plus en profondeur les conséquences de la phosphorylation du résidu tyrosine 300 d'HSP90 et l'inhibition de la fonction ubiquitine ligase de c-Cbl dans ce mécanisme.

Tout d'abord, nos résultats portent à croire qu'une inhibition de c-Cbl pourrait entraîner une augmentation de l'angiogenèse induite par le VEGF. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré une lignée de souris transgénique qui exprime le mutant 70Z/3-Cbl. Grâce à ce modèle murin, il nous serait donc possible d'évaluer la formation de vaisseaux sanguins stimulée par le VEGF, par des essais *in vitro* et *in vivo*. Dans le même ordre d'idée, nous pourrions générer un adénovirus codant pour le mutant Y300F d'HSP90 pour infecter des cellules endothéliales et ainsi déterminer si la phosphorylation de la tyrosine 300 d'HSP90 est impliquée dans sa fonction de chaperone sur eNOS, Akt, VEGFR-2 et autres protéines impliquées dans le processus angiogénique induit par le VEGF. Cette étude apporterait de nouveaux éléments qui faciliteraient la compréhension des mécanismes intracellulaires qui mènent à la formation de vaisseaux sanguins et nous donnerait de nouveaux moyens pour moduler ce processus. Ces travaux futurs pourraient donc contribuer à l'avancement de la thérapie pro et anti-angiogénique.

Pour conclure, les résultats rapportés dans cette thèse ont permis de recueillir plusieurs informations nous amenant à mieux comprendre les

évènements intracellulaires qui régulent l'activité angiogénique du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales.

RÉFÉRENCES

Abedi H, Zachary I (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 272:15442-15451.

Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, Deutsch U, Risau W, Klein R (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 13:295-306.

Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, Haigh JJ, le NF, Wang L, Mukhopadhyay D, Ahmed A (2006). Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 99:715-722.

Ahmed Z, Smith BJ, Pillay TS (2000). The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett* 475:31-34.

Andoniou CE, Thien CB, Langdon WY (1994). Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. *EMBO J* 13:4515-4523.

Arnal JF, Yamin J, Dockery S, Harrison DG (1994). Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am J Physiol* 267:C1381-C1388.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343.

Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125:1591-1598.

Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410.

Blake TJ, Shapiro M, Morse HC, III, Langdon WY (1991). The sequences of the human and mouse c-cbl proto-oncogenes show v-cbl was generated by a large truncation encompassing a proline-rich domain and a leucine zipper-like motif. *Oncogene* 6:653-657.

Bonita DP, Miyake S, Luper ML, Jr., Langdon WY, Band H (1997). Phosphotyrosine binding domain-dependent upregulation of the platelet-derived

- growth factor receptor alpha signaling cascade by transforming mutants of Cbl: implications for Cbl's function and oncogenicity. *Mol Cell Biol* 17:4597-4610.
- Boo YC, Hwang J, Sykes M, Michell BJ, Kemp BE, Lum H, Jo H (2002a). Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1819-H1828.
- Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H (2002b). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 277:3388-3396.
- Boo YC, Sorescu GP, Bauer PM, Fulton D, Kemp BE, Harrison DG, Sessa WC, Jo H (2003). Endothelial NO synthase phosphorylated at SER635 produces NO without requiring intracellular calcium increase. *Free Radic Biol Med* 35:729-741.
- Bouloumie A, Schini-Kerth VB, Busse R (1999). Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 41:773-780.
- Breier G, Risau W (1996). The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* 6:454-456.
- Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC (2000). In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6:1362-1367.
- Cao S, Yao J, McCabe TJ, Yao Q, Katusic ZS, Sessa WC, Shah V (2001). Direct interaction between endothelial nitric-oxide synthase and dynamin-2. Implications for nitric-oxide synthase function. *J Biol Chem* 276:14249-14256.
- Cao S, Yao J, Shah V (2003). The proline-rich domain of dynamin-2 is responsible for dynamin-dependent in vitro potentiation of endothelial nitric-oxide synthase activity via selective effects on reductase domain function. *J Biol Chem* 278:5894-5901.
- Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.
- Carmeliet P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936.
- Carmeliet P (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653-660.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de GA, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147-157.

Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243:1576-1583.

Chen WS, Kitson RP, Goldfarb RH (2002). Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1). *In Vivo* 16:439-445.

Cheng N, Brantley DM, Liu H, Lin Q, Enriquez M, Gale N, Yancopoulos G, Cerretti DP, Daniel TO, Chen J (2002). Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis. *Mol Cancer Res* 1:2-11.

Chiosis G, Vilenchik M, Kim J, Solit D (2004). Hsp90: the vulnerable chaperone. *Drug Discov Today* 9:881-888.

Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH (2000). Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275:25733-25741.

Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49:507-521.

Cox CM, Poole TJ (2000). Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. *Dev Dyn* 218:371-382.

Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28:488-494.

Cunningham SA, Arrate MP, Brock TA, Waxham MN (1997). Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 240:635-639.

d'Azzo A, Bongiovanni A, Nastasi T (2005). E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* 6:429-441.

Dai Q, Wang H (2006). "Cullin 4 makes its mark on chromatin". *Cell Div* 1:14.

- de Melker AA, van der HG, Borst J (2004a). c-Cbl directs EGF receptors into an endocytic pathway that involves the ubiquitin-interacting motif of Eps15. *J Cell Sci* 117:5001-5012.
- de Melker AA, van der HG, Borst J (2004b). Ubiquitin ligase activity of c-Cbl guides the epidermal growth factor receptor into clathrin-coated pits by two distinct modes of Eps15 recruitment. *J Biol Chem* 279:55465-55473.
- de Melker AA, van der HG, Calafat J, Jansen H, Borst J (2001). c-Cbl ubiquitinates the EGF receptor at the plasma membrane and remains receptor associated throughout the endocytic route. *J Cell Sci* 114:2167-2178.
- Dedio J, Konig P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Muller-Esterl W (2001). NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J* 15:79-89.
- Dedkova EN, Blatter LA (2002). Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol* 539:77-91.
- Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477:258-262.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605.
- Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, Claesson-Welsh L (2003). 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* 278:40973-40979.
- Dougher M, Terman BI (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* 18:1619-1627.
- Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P, Terman BI (1994). Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 205:728-738.
- Duda DG, Fukumura D, Jain RK (2004). Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends Mol Med* 10:143-145.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:235-276.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282:946-949.

Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, Gratton JP (2003). Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells. *J Biol Chem* 278:20091-20097.

Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4:915-924.

Emerson MV, Lauer AK, Flaxel CJ, Wilson DJ, Francis PJ, Stout JT, Emerson GG, Schlesinger TK, Nolte SK, Klein ML (2007). Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 27:439-444.

Eto M, Barandier C, Rathgeb L, Kozai T, Joch H, Yang Z, Luscher TF (2001). Thrombin suppresses endothelial nitric oxide synthase and upregulates endothelin-converting enzyme-1 expression by distinct pathways: role of Rho/ROCK and mitogen-activated protein kinase. *Circ Res* 89:583-590.

Ewan LC, Jopling HM, Jia H, Mittar S, Bagherzadeh A, Howell GJ, Walker JH, Zachary IC, Ponnambalam S (2006). Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic* 7:1270-1282.

Feng D, Nagy JA, Brekken RA, Pettersson A, Manseau EJ, Pyne K, Mulligan R, Thorpe PE, Dvorak HF, Dvorak AM (2000). Ultrastructural localization of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) receptor-2 (FLK-1, KDR) in normal mouse kidney and in the hyperpermeable vessels induced by VPF/VEGF-expressing tumors and adenoviral vectors. *J Histochem Cytochem* 48:545-556.

Feng Q, Baird D, Peng X, Wang J, Ly T, Guan JL, Cerione RA (2006). Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth. *Nat Cell Biol* 8:945-956.

Ferrara N, Henzel WJ (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161:851-858.

Ferrara N, vis-Smyth T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4-25.

- Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I (2000). Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 168:81-88.
- Flamme I, Breier G, Risau W (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol* 169:699-712.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001a). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88:E68-E75.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R (2001b). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88:E68-E75.
- Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285:1182-1186.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376:66-70.
- Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126:3015-3025.
- Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC (2003). Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13791-13796.
- Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, DeLaria GA, Tyner JJ, Schaer GL, March R, Snell RJ, Henry TD, Van CJ, Lopez JJ, Richenbacher W, Isner JM, Schatz RA (2003). One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* 92:436-439.
- Fryer BH, Field J (2005). Rho, Rac, Pak and angiogenesis: old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. *Cancer Lett* 229:13-23.
- Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2604-2609.
- Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, Venema RC (2005). Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J Biol Chem* 280:35943-35952.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC (2001). Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299:818-824.

Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berk BC, Aebersold R, Corson MA (1999). Identification of flow-dependent endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem* 274:30101-30108.

Garcia-Blanes M, Oubaha M, Rautureau Y, Gratton JP (2007). Phosphorylation of Tyrosine 801 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Is Necessary for Akt-dependent Endothelial Nitric-oxide Synthase Activation and Nitric Oxide Release from Endothelial Cells. *J Biol Chem* 282:10660-10669.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392:821-824.

Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997). Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272:25437-25440.

Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC (1996). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6448-6453.

Gavard J, Gutkind JS (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8:1223-1234.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273:30336-30343.

Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4:403-414.

Ghosh S, Gachhui R, Crooks C, Wu C, Lisanti MP, Stuehr DJ (1998). Interaction between caveolin-1 and the reductase domain of endothelial nitric-oxide synthase. Consequences for catalysis. *J Biol Chem* 273:22267-22271.

Girnita L, Girnita A, Larsson O (2003). Mdm2-dependent ubiquitination and degradation of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8247-8252.

Girnita L, Shenoy SK, Sehat B, Vasilcanu R, Girnita A, Lefkowitz RJ, Larsson O (2005). β -Arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase. *J Biol Chem* 280:24412-24419.

Goligorsky MS, Abedi H, Noiri E, Takhtajan A, Lense S, Romanov V, Zachary I (1999). Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol* 276:C1271-C1281.

Golser R, Gorren AC, Leber A, Andrew P, Habisch HJ, Werner ER, Schmidt K, Venema RC, Mayer B (2000). Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation. *J Biol Chem* 275:5291-5296.

Gonzalez D, Herrera B, Beltran A, Otero K, Quintero G, Rojas A (2003). Nitric oxide disrupts VE-cadherin complex in murine microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304:113-118.

Gorren AC, Mayer B (2007). Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochim Biophys Acta* 1770:432-445.

Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Whitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M, Poellinger L (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16:5221-5231.

Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC (2000). Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 275:22268-22272.

Gratton JP, Lin MI, Yu J, Weiss ED, Jiang ZL, Fairchild TA, Iwakiri Y, Groszmann R, Claffey KP, Cheng YC, Sessa WC (2003). Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell* 4:31-39.

Grazia LM, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO, Dejana E (2003). Contact inhibition of

VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* 161:793-804.

Greif DM, Kou R, Michel T (2002). Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry* 41:15845-15853.

Greif DM, Sacks DB, Michel T (2004). Calmodulin phosphorylation and modulation of endothelial nitric oxide synthase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1165-1170.

Grovdal LM, Stang E, Sorkin A, Madhus IH (2004). Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation. *Exp Cell Res* 300:388-395.

Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, Dikic I (2003). Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5:461-466.

Hanai J, Dhanabal M, Karumanchi SA, Albanese C, Waterman M, Chan B, Ramchandran R, Pestell R, Sukhatme VP (2002). Endostatin causes G1 arrest of endothelial cells through inhibition of cyclin D1. *J Biol Chem* 277:16464-16469.

Hangai M, Kitaya N, Xu J, Chan CK, Kim JJ, Werb Z, Ryan SJ, Brooks PC (2002). Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am J Pathol* 161:1429-1437.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, Venema RC (2000). Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol* 35:165-170.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 276:16587-16591.

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S (2002). Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 8:841-849.

Hawkins PT, Eguinoa A, Qiu RG, Stokoe D, Cooke FT, Walters R, Wennstrom S, Claesson-Welsh L, Evans T, Symons M, . (1995). PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* 5:393-403.

Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126:3047-3055.

Henley JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141:85-99.

Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER (2003). The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107:1359-1365.

Hicke L (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:195-201.

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267:26031-26037.

Howe CL, Valletta JS, Rusnak AS, Mobley WC (2001). NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32:801-814.

Ikeda S, Ushio-Fukai M, Zuo L, Tojo T, Dikalov S, Patrushev NA, Alexander RW (2005). Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 96:467-475.

Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, Martinez A, Cuttitta F, Neckers LM (2002). Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* 277:29936-29944.

Jain RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693.

Jain RK (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307:58-62.

Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, Lundin L, Eriksson I, Kjellen L, Claesson-Welsh L (2006). Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell* 10:625-634.

Jiang X, Huang F, Marusyk A, Sorkin A (2003). Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell* 14:858-870.

Jiang X, Sorkin A (2003). Epidermal growth factor receptor internalization through clathrin-coated pits requires Cbl RING finger and proline-rich domains but not receptor polyubiquitylation. *Traffic* 4:529-543.

Ju H, Venema VJ, Marrero MB, Venema RC (1998). Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 273:24025-24029.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC (1997). Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272:18522-18525.

Kang-Decker N, Cao S, Chatterjee S, Yao J, Egan LJ, Semela D, Mukhopadhyay D, Shah V (2007). Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *J Cell Sci* 120:492-501.

Karantzoulis-Fegaras F, Antoniou H, Lai SL, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GK, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA (1999). Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem* 274:3076-3093.

Kassenbrock CK, Hunter S, Garl P, Johnson GL, Anderson SM (2002). Inhibition of Src family kinases blocks epidermal growth factor (EGF)-induced activation of Akt, phosphorylation of c-Cbl, and ubiquitination of the EGF receptor. *J Biol Chem* 277:24967-24975.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6:1365-1375.

Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 126:4895-4902.

Kim F, Gallis B, Corson MA (2001). TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1057-C1065.

Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 121:4309-4318.

Kobayashi S, Sawano A, Nojima Y, Shibuya M, Maru Y (2004). The c-Cbl/CD2AP complex regulates VEGF-induced endocytosis and degradation of Flt-1 (VEGFR-1). *FASEB J* 18:929-931.

Koga F, Xu W, Karpova TS, McNally JG, Baron R, Neckers L (2006). Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11318-11322.

Kowanetz K, Szymkiewicz I, Haglund K, Kowanetz M, Husnjak K, Taylor JD, Soubeyran P, Engstrom U, Ladbury JE, Dikic I (2003). Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 278:39735-39746.

Krah K, Mironov V, Risau W, Flamme I (1994). Induction of vasculogenesis in quail blastodisc-derived embryoid bodies. *Dev Biol* 164:123-132.

La M, Reid JJ (1995). Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:315-323.

Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Beliveau R (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 14:334-347.

Lamallice L, Houle F, Jourdan G, Huot J (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* 23:434-445.

Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 174:593-604.

Lane P, Gross SS (2002). Disabling a C-terminal autoinhibitory control element in endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylation provides a molecular explanation for activation of vascular NO synthesis by diverse physiological stimuli. *J Biol Chem* 277:19087-19094.

Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW (1997). Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 273:L119-L126.

Le Boeuf F., Houle F, Huot J (2004). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J Biol Chem* 279:39175-39185.

Le Roy C., Wrana JL (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:112-126.

Lee PS, Wang Y, Dominguez MG, Yeung YG, Murphy MA, Bowtell DD, Stanley ER (1999). The Cbl protooncogene stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *EMBO J* 18:3616-3628.

Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4:1029-1040.

Lewis J, Devin A, Miller A, Lin Y, Rodriguez Y, Neckers L, Liu ZG (2000). Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* 275:10519-10526.

Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 240:419-424.

Li S, Seitz R, Lisanti MP (1996). Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J Biol Chem* 271:3863-3868.

Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA, Jr., Sessa WC (2003). Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem* 278:44719-44726.

Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC (1996). Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry* 35:13277-13281.

Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC (1995). Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry* 34:12333-12340.

Lobov IB, Brooks PC, Lang RA (2002). Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11205-11210.

Lu JL, Schmiede LM, III, Kuo L, Liao JC (1996). Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 225:1-5.

Magnifico A, Ettenberg S, Yang C, Mariano J, Tiwari S, Fang S, Lipkowitz S, Weissman AM (2003). WW domain HECT E3s target Cbl RING finger E3s for proteasomal degradation. *J Biol Chem* 278:43169-43177.

Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 20:4762-4773.

Marieb E (1993). *Anatomie et physiologie humaine*. Éditions du nouveau pédagogique. p. 1-1014.

- Marmor MD, Yarden Y (2004). Role of protein ubiquitylation in regulating endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Oncogene* 23:2057-2070.
- Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, Venema RC (1999). Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 343 Pt 2:335-340.
- Martini FH, Bartholomew EF (2002). *Essentials of anatomy and physiology*. Benjamin Cummings. p. 1-720.
- Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem (Tokyo)* 133:773-781.
- Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1993). Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2423-2427.
- McGill MA, McGlade CJ (2003). Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 278:23196-23203.
- McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S (1994). Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol* 267:H1921-H1927.
- Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K (2001). Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem* 276:49289-49298.
- Meyer RD, Dayanir V, Majnoun F, Rahimi N (2002). The presence of a single tyrosine residue at the carboxyl domain of vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 regulates its autophosphorylation and activation of signaling molecules. *J Biol Chem* 277:27081-27087.
- Meyerle CB, Freund KB, Iturralde D, Spaide RF, Sorenson JA, Slakter JS, Klancnik JM, Jr., Fisher YL, Cooney MJ, Yannuzzi LA (2007). Intravitreal bevacizumab (Avastin) for retinal angiomatous proliferation. *Retina* 27:451-457.
- Miao H, Yuan S, Wang Y, Tsygankov A, Chien S (2002). Role of Cbl in shear-activation of PI 3-kinase and JNK in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 292:892-899.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997). Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272:15583-15586.
- Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase

phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:17625-17628.

Mimnaugh EG, Worland PJ, Whitesell L, Neckers LM (1995). Possible role for serine/threonine phosphorylation in the regulation of the heteroprotein complex between the hsp90 stress protein and the pp60v-src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 270:28654-28659.

Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB (2003). Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1179-L1183.

Miyake S, Mullane-Robinson KP, Lill NL, Douillard P, Band H (1999). Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain. *J Biol Chem* 274:16619-16628.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976). An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.

Morabito A, De ME, Di MM, Normanno N, Perrone F (2006). Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 11:753-764.

Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, Sessa WC (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* 86:892-896.

Mount PF, Kemp BE, Power DA (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 42:271-279.

Mukherjee S, Tessema M, Wandinger-Ness A (2006). Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function. *Circ Res* 98:743-756.

Murdaca J, Treins C, Monthouel-Kartmann MN, Pontier-Bres R, Kumar S, Van OE, Giorgetti-Peraldi S (2004). Grb10 prevents Nedd4-mediated vascular endothelial growth factor receptor-2 degradation. *J Biol Chem* 279:26754-26761.

Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM (1998). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97:99-107.

Nath AK, Enciso J, Kuniyasu M, Hao XY, Madri JA, Pinter E (2004). Nitric oxide modulates murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy. *Development* 131:2485-2496.

Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13:9-22.

Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 12:13-19.

Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A (1995). Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sci* 108 (Pt 1):225-233.

Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, Giaever I, Goligorsky MS (1998). Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 274:C236-C244.

Oh P, McIntosh DP, Schnitzer JE (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141:101-114.

Oksvold MP, Skarpen E, Wierod L, Paulsen RE, Huitfeldt HS (2001). Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *Eur J Cell Biol* 80:285-294.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359-371.

Page EL, Robitaille GA, Pouyssegur J, Richard DE (2002). Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha by transcriptional and translational mechanisms. *J Biol Chem* 277:48403-48409.

Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S (2000). Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19:4310-4322.

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100:3131-3139.

Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4:1317-1326.

- Penengo L, Rubin C, Yarden Y, Gaudino G (2003). c-Cbl is a critical modulator of the Ron tyrosine kinase receptor. *Oncogene* 22:3669-3679.
- Plouet J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F (1997). Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 272:13390-13396.
- Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10480-10484.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-684.
- Raman CS, Li H, Martasek P, Kral V, Masters BS, Poulos TL (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95:939-950.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J (2000). Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:26765-26771.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401-410.
- Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674.
- Risau W, Flamme I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91.
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 42:260-266.
- Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, Dimmeler S (1999). Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* 274:6823-6826.
- Rossig L, Haendeler J, Hermann C, Malchow P, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S (2000). Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis. *J Biol Chem* 275:25502-25507.
- Rotin D, Kanelis V, Schild L (2001). Trafficking and cell surface stability of ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:F391-F399.

- Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15:2169-2177.
- Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, Bender JR (2000). Estrogen stimulates heat shock protein 90 binding to endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. Effects on calcium sensitivity and NO release. *J Biol Chem* 275:5026-5030.
- Salerno JC, Harris DE, Irizarry K, Patel B, Morales AJ, Smith SM, Martasek P, Roman LJ, Masters BS, Jones CL, Weissman BA, Lane P, Liu Q, Gross SS (1997). An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272:29769-29777.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10832-10837.
- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63:1129-1136.
- Schnitzer JE, Liu J, Oh P (1995). Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem* 270:14399-14404.
- Schulte TW, Blagosklonny MV, Ingui C, Neckers L (1995). Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J Biol Chem* 270:24585-24588.
- Scott RP, Eketjall S, Aineskog H, Ibanez CF (2005). Distinct turnover of alternatively spliced isoforms of the RET kinase receptor mediated by differential recruitment of the Cbl ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 280:13442-13449.
- Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* 25:151-159.
- Sessa WC, Barber CM, Lynch KR (1993). Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ Res* 72:921-924.
- Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, Desai KM (1995). The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 270:17641-17644.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376:62-66.

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271:6518-6522.

Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294:1307-1313.

Shepherd JT, Katusic ZS (1991). Endothelium-derived vasoactive factors: I. Endothelium-dependent relaxation. *Hypertension* 18:III76-III85.

Shirangi TR, Zaika A, Moll UM (2002). Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *FASEB J* 16:420-422.

Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA (1999). Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res* 85:247-256.

Singh AJ, Meyer RD, Band H, Rahimi N (2005). The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation. *Mol Biol Cell* 16:2106-2118.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F (1999). Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J* 18:882-892.

Sorkin A, Eriksson A, Heldin CH, Westermark B, Claesson-Welsh L (1993). Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization. *J Cell Physiol* 156:373-382.

Sorkin A, Von Zastrow M. (2002). Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:600-614.

Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature* 416:183-187.

Spence J, Sadis S, Haas AL, Finley D (1995). A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol* 15:1265-1273.

Stack MS, Gately S, Bafetti LM, Enghild JJ, Soff GA (1999). Angiostatin inhibits endothelial and melanoma cellular invasion by blocking matrix-enhanced plasminogen activation. *Biochem J* 340 (Pt 1):77-84.

Stevens A, Lowe J (1992). *Histologie. Edisem.* p. 1-378.

Strack P, Caligiuri M, Pelletier M, Boisclair M, Theodoras A, Beer-Romero P, Glass S, Parsons T, Copeland RA, Auger KR, Benfield P, Brizuela L, Rolfe M (2000). SCF(beta-TRCP) and phosphorylation dependent ubiquitination of I kappa B alpha catalyzed by Ubc3 and Ubc4. *Oncogene* 19:3529-3536.

Sun J, Liao JK (2004). Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2238-2244.

Swaminathan G, Tsygankov AY (2006). The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol* 209:21-43.

Taher TE, Tjin EP, Beuling EA, Borst J, Spaargaren M, Pals ST (2002). c-Cbl is involved in Met signaling in B cells and mediates hepatocyte growth factor-induced receptor ubiquitination. *J Immunol* 169:3793-3800.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 20:2768-2778.

Thien CB, Langdon WY (1997). Tyrosine kinase activity of the EGF receptor is enhanced by the expression of oncogenic 70Z-Cbl. *Oncogene* 15:2909-2919.

Thien CB, Langdon WY (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:294-307.

Thomas SR, Chen K, Keaney JF, Jr. (2002). Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 277:6017-6024.

Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286:2511-2514.

Tonini T, Rossi F, Claudio PP (2003). Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 22:6549-6556.

Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437:426-431.

- Ungermannova D, Gao Y, Liu X (2005). Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J Biol Chem* 280:30301-30309.
- Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morrione A (2003). The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol* 23:3363-3372.
- Vepa S, Scribner WM, Natarajan V (1997). Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells: identification of tyrosine phosphorylation of caveolin. *Free Radic Biol Med* 22:25-35.
- Volonte D, Galbiati F, Pestell RG, Lisanti MP (2001). Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as mechanical sensors of osmotic stress. *J Biol Chem* 276:8094-8103.
- Walker-Daniels J, Riese DJ, Kinch MS (2002). c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol Cancer Res* 1:79-87.
- Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93:741-753.
- Wang Y, Chang J, Li YC, Li YS, Shyy JY, Chien S (2004). Shear stress and VEGF activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H685-H692.
- Waterman H, Katz M, Rubin C, Shtiegman K, Lavi S, Elson A, Jovin T, Yarden Y (2002). A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling. *EMBO J* 21:303-313.
- Wei Q, Xia Y (2005). Roles of 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function by heat shock protein 90. *J Biol Chem* 280:18081-18086.
- Weissman AM (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:169-178.
- Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C, Luft FC, Haller H (1999). The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:178-185.
- Wennstrom S, Hawkins P, Cooke F, Hara K, Yonezawa K, Kasuga M, Jackson T, Claesson-Welsh L, Stephens L (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr Biol* 4:385-393.

Whitesell L, Lindquist SL (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5:761-772.

Wong A, Lamothe B, Lee A, Schlessinger J, Lax I (2002a). FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6684-6689.

Wong ES, Fong CW, Lim J, Yusoff P, Low BC, Langdon WY, Guy GR (2002b). Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling. *EMBO J* 21:4796-4808.

Xu Y, Singer MA, Lindquist S (1999). Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:109-114.

Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, Tojo T, Fukai T, Fujimoto M, Patrushev NA, Wang N, Kontos CD, Bloom GS, Alexander RW (2004). IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res* 95:276-283.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407:242-248.

Yang S, Qu S, Perez-Tores M, Sawai A, Rosen N, Solit DB, Arteaga CL (2006). Association with HSP90 inhibits Cbl-mediated down-regulation of mutant epidermal growth factor receptors. *Cancer Res* 66:6990-6997.

Yokouchi M, Kondo T, Sanjay A, Houghton A, Yoshimura A, Komiya S, Zhang H, Baron R (2001a). Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins. *J Biol Chem* 276:35185-35193.

Yokouchi M, Kondo T, Sanjay A, Houghton A, Yoshimura A, Komiya S, Zhang H, Baron R (2001b). Src-catalyzed phosphorylation of c-Cbl leads to the interdependent ubiquitination of both proteins. *J Biol Chem* 276:35185-35193.

Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME (1993). Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 73:205-209.

Zachary I (2003). VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans* 31:1171-1177.

Zeng S, Xu Z, Lipkowitz S, Longley JB (2005). Regulation of stem cell factor receptor signaling by Cbl family proteins (Cbl-b/c-Cbl). *Blood* 105:226-232.

Zhao C, Wang E (2004). Heat shock protein 90 suppresses tumor necrosis factor alpha induced apoptosis by preventing the cleavage of Bid in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Signal* 16:313-321.

Zhao YG, Gilmore R, Leone G, Coffey MC, Weber B, Lee PW (2001). Hsp90 phosphorylation is linked to its chaperoning function. Assembly of the reovirus cell attachment protein. *J Biol Chem* 276:32822-32827.

Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J, Jr., Chien KR (2002). Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11375-11380.

Zhu L, Schwegler-Berry D, Castranova V, He P (2004). Internalization of caveolin-1 scaffolding domain facilitated by Antennapedia homeodomain attenuates PAF-induced increase in microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H195-H201.

